



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Tatiana Fonseca Alvarenga

Estudo do papel dos genes *SALL4* e *CHFR* em síndrome mielodisplásica primária e sua correlação com as características morfológicas, citogenéticas e clínicas

Rio de Janeiro

2022

Tatiana Fonseca Alvarenga

Estudo do papel dos genes *SALL4* e *CHFR* em síndrome mielodisplásica primária e sua correlação com as características morfológicas, citogenéticas e clínicas

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Cecília de Souza Fernandez

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A473 Alvarenga, Tatiana Fonseca.

Estudo do papel dos genes SALL4 e CHFR em síndrome mielodisplásica primária e sua correlação com as características morfológicas, citogenéticas e clínicas / Tatiana Fonseca Alvarenga – 2022.
182f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas
Coorientadora: Prof.^a Dra. Cecília de Souza Fernandez

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Medula óssea – Doenças - Teses. 2. Síndromes Mielodisplásicas. 3. Análise Citogenética. 4. Biomarcadores - Teses. I. Seixas, Teresa de Souza Fernandez. II. Fernandez, Cecília de Souza. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.71-008.46

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Tatiana Fonseca Alvarenga

Estudo do papel dos genes *SALL4* e *CHFR* em síndrome mielodisplásica primária e sua correlação com as características morfológicas, citogenéticas e clínicas

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de julho de 2022.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Cecília de Souza Fernandez
Universidade Federal Fluminense

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas (Orientadora)
Instituto Nacional de Câncer

Prof.^a Dra. Maria Christina Paixão Maioli
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Dr. Cesar de Souza Bastos Junior
Marinha do Brasil

Dr. Mario Lucio Cordeiro Araújo Junior
Instituto Nacional do Câncer

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pequenininho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio, pela dedicação e pelas horas furtadas, principalmente minha mãe Fatima, irmão André e a Ana;

Agradeço à Prof.^a Dra. Teresa e à Prof.^a Dra. Cecilia pelo belo trabalho e pela orientação;

Agradeço à minha equipe de pesquisa do CEMO-INCA pelo acolhimento durante todos esses anos;

Agradeço aos amigos do DIPAT-INCA, em especial a Dra. Veronica Goulart e a Priscila Valverde;

Agradeço aos amigos da Anatomia Patológica da UERJ pelos ensinamentos, principalmente a Prof.^a Daurita;

Agradeço à Dra. Vera Lobo e à Dra. Luciana Wernersbach pelas vivências em hematopatologia;

Agradeço à toda a equipe da PGCM-UERJ pela minha formação acadêmica e científica;

Agradeço aos órgãos de fomento CNPq e FAPERJ;

Agradeço a Deus pela oportunidade.

Somos o que pensamos. Tudo que somos surge de nossos pensamentos. Com os nossos
pensamentos, fazemos o nosso mundo.

Buda

RESUMO

ALVARENGA, Tatiana Fonseca. *Estudo do papel dos genes SALL4 e CHFR em síndrome mielodisplásica primária e sua correlação com as características morfológicas, citogenéticas e clínicas*. 2022. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Introdução e objetivo: A síndrome mielodisplásica primária (SMD) compreende um grupo de doenças clonais de célula tronco hematopoética, caracterizada por hematopoese ineficaz, apoptose intramedular aumentada, displasias na medula óssea e citopenias no sangue periférico. As características morfológicas e as alterações cromossômicas específicas têm refletido diferentes questões biológicas. A história natural da SMD é altamente variável, podendo apresentar formas iniciais da doença com sobrevivência alta ou formas mais avançadas que podem evoluir rapidamente para leucemia mieloide aguda (LMA). O objetivo deste trabalho foi estudar as associações dos achados morfológicos, citogenéticos e moleculares com as características clínicas dos pacientes para caracterizar o papel dos genes *SALL4* e *CHFR* no desenvolvimento da SMD e sua evolução para LMA. **Metodologia:** A análise morfológica foi realizada em biópsias de medula óssea e pelo mielograma. A análise citogenética foi realizada em células de medula óssea através da técnica de bandeamento GTG e hibridização in situ por fluorescência (FISH). Foi analisado o padrão de expressão dos genes *SALL4* e *CHFR* através de PCR em tempo real e pelo estudo imuno-histoquímico. A análise estatística foi considerada significativa quando $p < 0,05$. **Resultados:** Os pacientes foram classificados de acordo com a OMS em estágios iniciais: SMD-CRDU (25 pacientes), SMD-CRDM (44 pacientes), SMD-SA (2 pacientes); estágios avançados: SMD-EB-1 (14 pacientes), SMD-EB-2 (12 pacientes) e LMA secundária à SMD (3 pacientes). Anormalidades cromossômicas foram detectadas em 39 pacientes (39%). As anormalidades mais frequentes foram: cariótipos complexos, +8, -7/del(7q), del(17p)/i(17q) e del(11q). Pacientes com doença avançada apresentaram maior incidência de medula óssea hiper celular ($p < 0,006$), de aumento da relação mieloide:eritroide ($p < 0,001$), de perda arquitetural medular ($p < 0,001$), de megacariócitos com hipolobulação nuclear ($p < 0,011$) e de ALIP ($p < 0,001$). Em relação à evolução da doença, aqueles com pior prognóstico pelo IPSS e IPSS-R apresentaram maior risco de transformação para LMA ($p < 0,001$). Anormalidades cromossômicas foram detectadas em todos os pacientes com expressão de *SALL4*. Esses pacientes encontravam-se com doença avançada. Pacientes com expressão de *SALL4* tiveram menor sobrevida ($p < 0,0014$). Todos os pacientes com expressão aumentada de *SALL4* apresentaram evolução leucêmica ($p < 0,02$). Cariótipos anormais e os grupos de risco citogenéticos intermediário e desfavorável pelo IPSS e IPSS-R estiveram associados com níveis de expressão mais baixos de *CHFR*, sugerindo associação com a presença de aneuploidias. **Conclusão:** A biópsia de medula óssea é um método auxiliar no diagnóstico de SMD e tem valor prognóstico, assim como o estudo citogenético. Nossos resultados sugerem que a alta expressão de *SALL4* e a baixa expressão de *CHFR* apresentam um papel importante no desenvolvimento da SMD e sua evolução para LMA, estando associados com prognóstico desfavorável, sendo potenciais biomarcadores de evolução da doença.

Palavras-chave: Síndrome Mielodisplásica Primária. Alterações citogenéticas. Displasias. *SALL4*. *CHFR*. Biomarcadores de diagnóstico e prognóstico.

ABSTRACT

ALVARENGA, Tatiana. Fonseca. *Study of the role of SALL4 and CHFR genes in primary myelodysplastic syndrome and their correlation with morphological, cytogenetic and clinical characteristics*. 2022. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Introduction and objective: Primary myelodysplastic syndrome (MDS) comprises a group of clonal hematopoietic stem cell diseases, characterized by ineffective hematopoiesis, increased intramedullary apoptosis, bone marrow dysplasias and peripheral blood cytopenias. Morphological characteristics and specific chromosomal alterations have reflected different biological issues. The natural history of MDS is highly variable, and may present with early forms of the disease with high survival or more advanced forms that can rapidly progress to acute myeloid leukemia (AML). The objective of this work was to study the associations of morphological, cytogenetic and molecular findings with the clinical characteristics of patients to characterize the role of *SALL4* and *CHFR* genes in the development of MDS and its evolution to AML. **Methodology:** Morphological analysis was performed on bone marrow biopsies and myelogram. Cytogenetic analysis was performed on bone marrow cells using the GTG banding technique and fluorescence in situ hybridization (FISH). The expression pattern of *SALL4* and *CHFR* genes was analyzed by quantitative real-time PCR and by immunohistochemical study. Statistical analysis was considered significant when $p < 0,05$. **Results:** Patients were classified according to the WHO in early stages: MDS-SLD (25 patients), MDS-MLD (44 patients), MDS-RS (2 patients); advanced stages: MDS-EB-1 (14 patients), MDS-EB-2 (12 patients) and AML secondary to MDS (3 patients). Chromosomal abnormalities were detected in 39 patients (39%). The most frequent abnormalities were: complex karyotypes, +8, -7/del(7q), del(11q) and del(17p)/i(17q). Patients with advanced disease had a higher incidence of hypercellular bone marrow ($p < 0,006$), increased myeloid:erythroid ratio ($p < 0,001$), medullary architectural loss ($p < 0,001$), megakaryocytes with nuclear hypolobulation ($p < 0,011$) and of ALIP ($p < 0,001$). Regarding progression to leukemia, those with a worse prognosis by the IPSS and IPSS-R had a higher risk of transformation to AML ($p < 0,001$). Chromosomal abnormalities were detected in all patients with *SALL4* expression. These patients had advanced disease. Patients with higher *SALL4* expression had lower survival ($p < 0,0014$). All patients with increased expression of *SALL4* had leukemic evolution ($p < 0,02$). Abnormal karyotypes and intermediate and unfavorable cytogenetic risk groups by IPSS and IPSS-R were associated with lower *CHFR* expression levels, suggesting an association with the presence of aneuploidies. **Conclusion:** Bone marrow biopsy is an auxiliary method in the diagnosis of MDS and has prognostic value, as well as the cytogenetic study. Our results suggest that high expression of *SALL4* and low expression of *CHFR* play an important role in the development of MDS and its evolution to AML, being associated with unfavorable prognosis, and they are potential biomarkers of disease evolution.

Keywords: Primary Myelodysplastic Syndrome. Cytogenetic. Dysplasias. *SALL4*. *CHFR*.

Diagnostic and prognostic biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Coleta do material para análise de medula óssea: Biópsia e Mielograma	27
Figura 2 – Topografia normal de cada linhagem celular na medula óssea.....	27
Figura 3 – Corte histológico de medula óssea em coloração Hematoxilina e Eosina	30
Figura 4 – Displasia na linhagem eritroide.....	31
Figura 5 – Displasia na linhagem granulocítica	32
Figura 6 – Displasia na linhagem megacariocítica	32
Figura 7 – Blastos tipo I, II e III no mielograma.....	33
Figura 8 – Expressão de <i>SALL4</i> em neoplasias hematológicas e tumores sólidos.....	45
Figura 9 – <i>SALL-4</i> e seu Papel na Regulação de Células-tronco Hematopoéticas.....	47
Figura 10 – <i>CHFR</i> e o Controle do Ciclo Celular da fase G2 para mitose	48
Figura 11 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com os subgrupos da OMS ($p < 0,0001$).....	62
Figura 12 – Exemplos de celularidade da medula óssea	64
Figura 13 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com celularidade em biópsia de medula óssea classificada em hipercelular (Hiper), normocelular (Normo) e hipocelular (Hipo) ($p = 0,29$).....	65
Figura 14 – Medula óssea de paciente com AREB-2 apresentando precursores mieloides imaturos no espaço trabecular agrupados (ALIP delimitado por—), outros isolados (identificado com ♦) e células da linhagem eritroide sem delimitar grupamentos (→).....	66
Figura 15 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com perda de orientação arquitetural avaliada em biópsia de medula óssea considerada como importante, moderada e discreta e ausente ($p < 0,0001$).....	67
Figura 16 – Grupamento de células CD34 positivas (ALIP) e outras células isoladas marcadas pela imuno-histoquímica em medula óssea de paciente com AREB-2.....	68
Figura 17 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de ALIP considerada como importante, moderado e discreto e a sua ausência na biópsia de medula óssea ($p = 0,041$).....	68
Figura 18 – Células CD34 positivas isoladas em medula óssea hipercelular em paciente classificado como CRDM e com cariótipo complexo (44,XY,del(4)(q31),-5,-7,t(12;19)(p12;q11),add(17)(p13),-18,+mar)	69

Figura 19 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de ALIP e de porcentagem de células CD34 positivas isoladas ($p = 0,007$).....	70
Figura 20 – Hiperplasia eritróide com numeroso megaloblastos em medula óssea hipercelular de paciente masculino, 52 anos com anemia e plaquetopenia, classificado como ARSA e apresentando displasia em três linhagens. Presença de 1% blasto no mielograma.	71
Figura 21 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de megaloblastos ($p = 0,95$).72	
Figura 22 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com relação mieloide:eritroide pela avaliação da biópsia de medula óssea distribuídos em aumentada (alto), normal e reduzida (baixo) ($p < 0,0028$).....	73
Figura 23 – Medula óssea hipercelular de paciente, masculino, de 21 anos, classificado como AREB-2. Presença de ninhos eritroides e de numerosos megacariócitos juntos as trabéculas ósseas. Há acentuada hipolobulação nuclear de megacariócitos e micromegacariócitos.....	74
Figura 24 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a quantificação de megacariócitos pela biópsia de medula óssea agrupada em aumentada, normal e reduzida ($p = 0,46$).75	
Figura 25 – Paciente AREB-2 com cariótipo normal apresentando medula óssea hipercelular com micromegacariócito (→) e megacariócitos com hipolobulação nuclear (●). Observa-se ectasia sinusoidal (linha)	76
Figura 26 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com hipolobulação nuclear megacariocítica observada em biópsia de medula óssea em importante, moderada e discreta e ausente ($p = 0,0011$)	77
Figura 27 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de alterações estromais em biópsia de medula óssea ($p = 0,73$).....	78
Figura 28 – Fibrose medular grau 2 em paciente AREB-2 (coloração reticulina).....	79
Figura 29 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de fibrose medular grau I, II, II e ausente, grau 0, em biópsia de medula óssea ($p = 0,13$).....	80
Figura 30 – Distribuição da frequência de cariótipos normais e anormais em pacientes com SMD.....	83
Figura 31 – Análise por bandeamento G, cariótipo: 47,XY,+8.....	84
Figura 32 – FISH em núcleos interfásicos mostrando 3 sinais vermelhos utilizando a sonda LSI MYC Spectrum Orange (Vysis, Abbott Laboratories) indicando a trissomia do cromossomo 8.....	85
Figura 33 – Análise por bandeamento G, cariótipo: 46,XX,del(17)(p11).....	85

Figura 34 – FISH em núcleos interfásicos mostrando 1 sinal vermelho utilizando a sonda LSI p53, Spectrum Orange (Vysis, Abbott Laboratories) indicando a del(17p)	86
Figura 35 – Frequência das alterações cromossômicas em SMD primária.	86
Figura 36 – Distribuição do padrão cromossômico nos estágios iniciais e avançados de SMD primária.....	88
Figura 37 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com prognóstico citogenético pelo IPSS ($p < 0,0001$).	89
Figura 38 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com prognóstico citogenético pelo IPSS-R ($p = 0,0047$).	90
Figura 39 – Distribuição dos pacientes com SMD primária de acordo com o IPSS. Número de pacientes com evolução leucêmica e óbitos por grupo de risco	105
Figura 40 – Distribuição dos pacientes com SMD primária de acordo com o IPSS-R. Número de pacientes com evolução leucêmica e óbitos por grupo de risco.	105
Figura 41 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com o prognóstico pelo IPSS ($p < 0,0001$) ...	106
Figura 42 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com o prognóstico pelo IPSS-R ($p < 0,0001$)	106
Figura 43 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>SALL4</i> em pacientes com SMD primária em relação aos controles (doadores de medula óssea).....	107
Figura 44 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>SALL4</i> em pacientes com SMD primária em relação à celularidade da medula óssea.....	108
Figura 45 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>SALL4</i> em pacientes com SMD primária em relação à ausência e presença de ALIP	109
Figura 46 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>SALL4</i> em pacientes com SMD primária em relação à ausência e presença de porcentagem de células CD34 positivas	109
Figura 47 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>SALL4</i> em pacientes com SMD primária em relação ao padrão cromossômico: cariótipo normal versus cariótipo anormal.....	110
Figura 48 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>SALL4</i> em pacientes com SMD primária em relação ao grupo de risco citogenético segundo o IPSS: bom prognóstico, intermediário (Int) e prognóstico desfavorável (A) e segundo o IPSS-R: muito bom e bom, intermediário (Int) e desfavorável	111
Figura 49 – Análise dos níveis relativos de expressão de <i>SALL4</i> em pacientes com SMD primária: estágios iniciais da doença (CRDU/CRDM) e avançados (AREB1/AREB2) com os controles	111

Figura 50 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>SALL4</i> em pacientes com SMD primária em relação à evolução da SMD para LMA	112
Figura 51 – Imuno-histoquímica pelo anticorpo SALL4 (400x). Presença de imunopositividade de padrão de marcação nuclear (coloração castanha) nas células com expressão de SALL4. Setas evidenciam algumas dessas células com imunopositividade.	113
Figura 52 – Curva de Kaplan-Meier evidenciando sobrevida global dos pacientes com SMD. Aqueles pacientes que apresentaram imunopositividade para SALL4 apresentaram menor sobrevida, independente da fase da doença.	114
Figura 53 – Curva de Kaplan-Meier evidenciando que os pacientes do grupo avançado pela OMS com expressão de SALL4 tiveram menor sobrevida do que os pacientes com doença avançada sem expressão de SALL4 e do que os pacientes com doença na fase inicial. Não houve pacientes na fase inicial da doença com expressão imuno-histoquímica de SALL4 ($p < 0,0001$).....	114
Figura 54 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>CHFR</i> em pacientes com SMD primária em relação aos controles (doadores de medula óssea)	115
Figura 55 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>CHFR</i> em pacientes com SMD primária em relação à celularidade da medula óssea.....	116
Figura 56 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>CHFR</i> em pacientes com SMD primária em relação à ausência e presença de ALIP	116
Figura 57 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>CHFR</i> em pacientes com SMD primária em relação à quantidade de células CD34 <1% e igual ou >1%	117
Figura 58 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>CHFR</i> em pacientes com SMD primária em relação ao padrão cromossômico: cariótipo normal versus cariótipo anormal	117
Figura 59 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>CHFR</i> em pacientes com SMD primária em relação ao grupo de risco citogenético segundo o IPSS: bom prognóstico, intermediário (Int) e prognóstico desfavorável (A) e segundo o IPSS-R: muito bom e bom, intermediário (Int) e desfavorável	118
Figura 60 – Análise dos níveis relativos de expressão de <i>CHFR</i> em pacientes com SMD primária: estágios iniciais da doença (CRDU/CRDM) e avançados (AREB1/AREB2) com os controles.....	119
Figura 61 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>CHFR</i> em pacientes com SMD primária em relação à evolução da SMD para LMA	119

- Figura 62 – Paciente CRDU, com cariótipo complexo que evoluiu para LMA. Medula óssea hipercelular e com células blásticas, apresentando cerca de 5% de células hematopoéticas positivas pelo CHFR, mostrando a baixa expressão (<10% de células positivas para CHFR) 120
- Figura 63 – Paciente CRDU apresentando del(11)(q23) como alteração citogenética e ALIP na biópsia de medula óssea. O estudo da expressão do CHFR foi positivo em cerca de 40% das células medulares hematopoéticas 120
- Figura 64 – Paciente com CRDU, apresentando cariótipo normal (46,XX) e expressão aumentada (cerca de 80% de células positivas) de CHFR pelo estudo imuno-histoquímico, mostrando a alta expressão (> 50% de células positivas) 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferenças entre SMD primária em pacientes pediátricos e adultos	24
Tabela 2 – Classificação da Síndrome Mielodisplásica segundo os critérios propostos pelo Grupo FAB em 1982	37
Tabela 3 – Cariótipo sugestivo de SMD em citopenia idiopática de significado indeterminado (OMS, 2008).....	39
Tabela 4 – Classificação da Síndrome Mielodisplásica segundo a proposta OMS em 2016...	40
Tabela 5 – Pontuação segundo os Parâmetros Críticos do IPSS em Síndrome Mielodisplásica (1997).....	41
Tabela 6 – Pontuação Prognóstica segundo os critérios do IPSS-R.....	42
Tabela 7 – Grupos de risco citogenéticos segundo os Parâmetros do IPSS-R em Síndrome Mielodisplásica (2012)	42
Tabela 8 – Mutações em genes relacionados ao prognóstico desfavorável em SMD primária	43
Tabela 9 – Oligonucleotídeos e condições de ciclagem utilizados para a análise de expressão dos Genes <i>SALL4</i> e <i>CHFR</i> em pacientes com síndrome mielodisplásica primária .	58
Tabela 10 – Comparação da celularidade medular e da relação mieloide:eritroide de pacientes com síndrome mielodisplásica primária analisados pelo mielograma e pela biópsia de medula óssea	81
Tabela 11 – Comparação da presença de megablostos em pacientes com síndromes mielodisplásicas primária analisados pelo mielograma e pela biópsia de medula óssea	81
Tabela 12 – Comparação entre a presença de ALIP e células CD34 pela biópsia de medula óssea e a porcentagem de blastos analisados pelo mielograma em pacientes com síndromes mielodisplásicas primária	82
Tabela 13 – Comparação das análises qualitativas e quantitativas da linhagem megacariocítica de pacientes com síndromes mielodisplásicas primária analisados pelo mielograma e pela biópsia de medula óssea	83
Tabela 14 – Classificação dos pacientes e a distribuição de cariótipos anormais	87
Tabela 15 – Distribuição dos pacientes de acordo com grupo de risco citogenético segundo o IPSS e sua associação com a evolução da doença.....	89
Tabela 16 – Distribuição dos pacientes segundo o risco citogenético do IPSS-R e sua associação com a evolução para LMA	90

Tabela 17 – Celularidade Medular de Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Estratificados pelo Prognóstico Citogenético segundo o IPSS.....	91
Tabela 18 – Celularidade Medular de Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Estratificados pelo Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R.....	92
Tabela 19 – Relação Mieloide:Eritroide em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Avaliada pelo Prognóstico Citogenético segundo o IPSS.....	93
Tabela 20 – Relação Mieloide:Eritroide de Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Estratificados pelo Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R	93
Tabela 21 – Relação da Quantidade de Megacariócitos em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS	94
Tabela 22 – Relação da Quantidade de Megacariócitos em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R)	95
Tabela 23 – Alterações Qualitativas em Megacariócitos (Micromegacariócitos) em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS.....	95
Tabela 24 – Alterações Qualitativas em Megacariócitos (Micromegacariócitos) em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R	96
Tabela 25 – Alterações Qualitativas em Megacariócitos (Hipolobulação Nuclear) em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS	97
Tabela 26 – Alterações Qualitativas em Megacariócitos (Hipolobulação Nuclear) em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R.....	97
Tabela 27 – Perda Arquitetural em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Estratificados de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS	98
Tabela 28 – Perda Arquitetural em pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R.....	99
Tabela 29 – ALIP e Células CD34 em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Avaliada pelo Prognóstico Citogenético segundo o IPSS.....	99
Tabela 30 – ALIP e Células CD34 em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Avaliada pelo Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R.....	100

Tabela 31 – Megaloblastos em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS	101
Tabela 32 – Megaloblastos em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R	101
Tabela 33 – Análise da Alteração Estromal em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com Prognóstico Citogenético segundo o IPSS	102
Tabela 34 – Análise da Alteração Estromal em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R.....	102
Tabela 35 – Fibrose Medular em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária e sua associação com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS	103
Tabela 36 – Fibrose medular em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária e sua associação com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R	103
Tabela 37 – Associação entre a expressão de CHFR e a presença de cariótipos anormais....	121
Tabela 38 – Associação entre o tipo de alteração citogenética e o padrão de expressão do CHFR	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
AR	Anemia Refratária
AREB	Anemia Refratária com Excesso de Blastos
AREB-t	Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação
ARSA	Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel
ESCs	Células-Tronco Embrionárias
CTH	Células-tronco hematopoéticas
CHFR	<i>Checkpoint with Forkhead and Ring Finger Domain</i>
CRDM	Citopenia Refratária com Displasia em Multilinhagem
CRDU	Citopenia Refratária com Displasia em uma Linhagem
ARA-C	Citosina Arabinosídeo
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
ANC	Contagem Neutrófila Absoluta
Del	Deleção
DIPAT-INCA	Divisão de Patologia do Instituto Nacional do Câncer
DECH	Doença De Enxerto x Hospedeiro
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FAB	Grupo Franco-Americano-Britânico
FISH	Hibridização “in situ” por fluorescência
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IHQ	Imuno-Histoquímica
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
Inv	Inversão
LLA-B	Leucemia Linfóide Aguda de células B
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica

M.O.	Medula óssea
OMS	Organização Mundial da Saúde
ALIP	Precursos imaturos de Localização Anormal
M:E	Relação mieloide:eritroide
rpm	Rotações por minuto
qRT-PCR	RT-PCR em tempo real quantitativo
SP	Sangue periférico
SMD-EB	Síndrome Mielodisplásica com Excesso de Blastos
SMD-F	Síndrome Mielodisplásica Com Fibrose
SMD-U	Síndrome Mielodisplásica não classificável
SMD	Síndrome Mielodisplásica
IPSS	Sistema Internacional de Escala Prognostica
IPSS-R	Sistema Internacional de Escala Prognóstica Revisado
ISCN	Sistema Internacional para Nomenclatura de Citogenética <u>Humana</u>
TCTH	Transplante de Células Tronco Hematopoéticas
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

p	Braço Curto do Cromossomo
q	Braço Longo do Cromossomo
KCl	Cloreto de Potássio
dL	Decilitro
CO ₂	Dióxido de Carbono
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico
Mg	Micrograma
mL	Miligrama
μL	Microlitro
M	Mol
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
pH	Potencial Hidrogênico
t	Translocação

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	22
1	ASPECTOS GERAIS DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA PRIMÁRIA ..	23
1.1	Características Morfológicas de Biópsia de Medula Óssea em Pacientes com SMD Primária	26
1.1.1	<u>Biópsia de Medula Óssea de Pacientes com SMD Primária</u>	27
1.1.2	<u>Características Morfológicas de Aspirado de Medula Óssea: Mielograma em Pacientes com SMD Primária</u>	30
1.2	Alterações Citogenéticas em SMD Primária	33
1.3	Classificação e Escala Prognóstica em SMD Primária	36
1.3.1	<u>Classificação da Síndrome Mielodisplásica segundo os critérios propostos pela FAB e pela Organização Mundial da Saúde</u>	36
1.3.2	<u>Escala Prognóstica em Síndrome Mielodisplásica: IPSS e IPSS-R</u>	41
1.4	Alterações Moleculares em SMD Primária	43
1.4.1	<u>Gene <i>SALL4</i></u>	45
1.4.2	<u>Gene <i>CHFR</i></u>	47
2	OBJETIVOS	50
3	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1	Pacientes	51
3.2	Estudo Clínico	51
3.3	Estudo das Características Morfológicas de Medula Óssea	52
3.3.1	<u>Análise de Biópsia de Medula Óssea</u>	52
3.3.2	<u>Análise do aspirado de medula óssea: Mielograma</u>	53
3.4	Análise Citogenética	54
3.4.1	<u>Citogenética Convencional: Bandeamento GTG</u>	54
3.4.2	<u>Citogenética Molecular: Hibridização “in situ” por fluorescência (FISH)</u>	55
3.5	Estudo Molecular: Análise do Padrão de Expressão dos Genes <i>SALL4</i> e <i>CHFR</i>	56
3.5.1	<u>Análise do padrão da expressão dos genes <i>SALL4</i> e <i>CHFR</i> por qRT-PCR em tempo real quantitativo</u>	56
3.5.1.1	Extração de RNA	56
3.5.1.2	Obtenção de cDNA	57

3.5.1.3	Reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa em tempo real quantitativa (qRT-PCR)	58
3.5.2	Análise do Padrão da Expressão de <i>SALL4</i> e <i>CHFR</i> e Avaliação de Células CD34+ por Imuno-histoquímica.....	58
3.6	Análise estatística	59
4	RESULTADOS	61
4.1	Análise das Características Clínicas dos Pacientes com SMD Primária	61
4.2	Análise das Características Morfológicas através da Biópsia de Medula Óssea em Pacientes com SMD Primária	62
4.2.1	<u>Estudo da Celularidade da Medula Óssea</u>	63
4.2.2	<u>Avaliação da Arquitetura Medular em SMD Primária</u>	65
4.2.3	<u>Análise das Características da Linhagem Mieloide</u>	67
4.2.4	<u>Análise das Características da Linhagem Eritroide</u>	70
4.2.5	<u>Avaliação da Relação Mieloide: Eritroide</u>	72
4.2.6	<u>Análise das Características da Linhagem megacariocítica</u>	73
4.2.7	<u>Análise do Componente Estromal</u>	77
4.2.8	<u>Avaliação de Fibrose Medular</u>	78
4.3	Análise Morfológica Comparativa entre Biópsia de Medula Óssea e Mielograma	80
4.4	Análise Citogenética em Pacientes com SMD Primária	83
4.4.1	<u>Distribuição das Alterações Cromossômicas nos Subtipos de SMD segundo a Classificação OMS</u>	86
4.4.2	<u>Distribuição dos Pacientes com SMD nos Subgrupos de Risco Citogenéticos de acordo com IPSS e IPSS-R</u>	88
4.5	Associação entre as Características Morfológicas e Citogenéticas	91
4.6	Distribuição dos Pacientes com SMD Primária segundo o IPSS e IPSS-R e seu Impacto na Sobrevida	104
4.7	Estudo Molecular	107
4.7.1	<u>Estudo do Padrão de Expressão de <i>SALL4</i> em Pacientes com SMD Primária</u>	107
4.7.1.1	Análise do Padrão de Expressão do gene <i>SALL4</i> por qRT-PCR.....	107
4.7.1.2	Análise de Expressão de <i>SALL4</i> por Imuno-histoquímica.....	112
4.7.2	<u>Estudo do Padrão de Expressão de <i>CHFR</i> em Pacientes com SMD Primária</u>	115
4.7.2.1	Análise do Padrão de Expressão do gene <i>CHFR</i> por qRT-PCR.....	115

4.7.2.2	Análise Expressão de CHFR por Imunohistoquímica.....	119
5	DISCUSSÃO	123
	CONCLUSÃO	132
	REFERÊNCIAS	134
	APÊNDICE A – Ficha de Identificação do Paciente.....	146
	APÊNDICE B – Avaliação dos achados morfológicos em biópsia de medula óssea em síndrome mielodisplásica primária.....	148
	APÊNDICE C – Produção Científica I	150
	APÊNDICE D – Produção Científica II	156
	APÊNDICE E – Produção Científica III	165
	ANEXO A - Carta do comitê de ética do HUPE	175
	ANEXO B - Carta do comitê de ética do INCA.....	176

INTRODUÇÃO

A síndrome mielodisplásica (SMD) primária compreende um grupo de neoplasias hematológicas de natureza clonal de célula tronco pluripotente, que se caracteriza por uma hematopoese ineficaz, presença de displasias na medula óssea, citopenias no sangue periférico em uma ou mais linhagens e risco de transformação para leucemia mieloide aguda (LMA). Dentre as citopenias periféricas, nos adultos, a anemia é a mais comum, seguida de neutropenia e de trombocitopenia. Nas crianças, as citopenias mais comuns são neutropenia e trombocitopenia. As displasias apresentam-se como alterações morfológicas decorrentes de defeitos no programa de diferenciação celular. Estas alterações podem acometer as linhagens eritroide, granulocítica, monocítica e megacariocítica (SWART et al., 2017).

A SMD é uma doença heterogênea em relação aos aspectos clínicos, citogenéticos e moleculares em pacientes pediátricos e adultos, o que torna, em muitas vezes, seu diagnóstico difícil assim como a definição de fatores prognósticos. A principal característica da SMD é a presença de displasias. Portanto, a análise histopatológica caracterizando a arquitetura da medula óssea é fundamental para esses pacientes. Entretanto, poucos estudos foram realizados associando as características morfológicas com as alterações citogenéticas e moleculares em pacientes com SMD.

1 ASPECTOS GERAIS DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA PRIMÁRIA

Nos estágios iniciais da SMD ocorre um aparente paradoxo entre citopenia periférica, associada com uma medula óssea hipercelular, devido ao aumento da porcentagem da apoptose intramedular (morte celular programada) dos precursores das células hematopoéticas (ZHENG et al., 2017). A progressão da SMD para LMA ocorre concomitantemente com a redução da apoptose e o aumento da proliferação das células neoplásicas, o que permite a expansão clonal subsequente (WANG et al., 2010; MOHAMMAD, 2018).

Morfológicamente, os granulócitos hiposegmentados tipo pseudo-Pelger-Hüet, vistos em mielograma de pacientes com SMD possuem alterações sugestivas de apoptose, quando observadas em relação a sua ultra-estrutura por microscopia eletrônica. Além disso, a presença de micromegacariócitos nesses pacientes leva ao questionamento se estas alterações morfológicas também seriam formas apoptóticas (ZENG et al., 2016).

A nível molecular, a expressão aumentada ou desregulada de oncogenes *BCL-2*, *MYC*, *RAS* e de genes supressores (*PT53*, *p15* e *p16*), pode estar envolvida no processo de apoptose em SMD. Por exemplo, a família Bcl-2, inclui proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, que estão envolvidas na ativação das caspases (proteases efetoras da apoptose subsequente) (WANG et al., 2010). Diversos mecanismos citogenéticos e moleculares como: translocação, deleção, mutação ou amplificação gênica têm um papel fundamental no desenvolvimento de neoplasias afetando o controle do ciclo celular, estimulando a produção de citocinas e promovendo ou suprimindo a apoptose (SCHROEDER et al., 2016).

A SMD primária ou “de novo” corresponde a cerca de 90% do total de casos de mielodisplasia (BARZI; SEKERES, 2010). Ocorre quando o paciente não foi submetido a nenhum tratamento prévio com medicamentos citotóxicos, nem esteve em contato com agentes mutagênicos, como a quimioterapia e a radioterapia para o tratamento de câncer. Nesses casos, a SMD é chamada de secundária (BARZI; SEKERES, 2010). Na SMD primária, não há causa conhecida para o aparecimento da doença. Entretanto, há um consenso de que fatores hereditários, ambientais e a senescência da hematopoese possam influenciar no surgimento desta neoplasia hematológica (LORANDMETZE, 2005; QUINN; NICHOLS, 2017).

A SMD primária afeta preferencialmente pacientes acima dos 50 anos de idade. A sua incidência anual nos Estados Unidos é de aproximadamente 3,5 a cada 100.000 indivíduos da população geral e de 36 a cada 100.000 indivíduos da população idosa. Sua prevalência é de 20,7 a cada 100.000 indivíduos da população geral (SEKERES, 2010). Não há dados

epidemiológicos no Brasil sobre a incidência e prevalência de SMD em relação à população geral. O aumento da frequência e da incidência da SMD primária podem ser atribuídos ao crescimento da expectativa de vida e aos fatores de diagnóstico desta doença (NISHINO; CHANG, 2005). No Brasil, o número de idosos (≥ 60 anos) aumentou de 3 milhões em 1960, para 7 milhões em 1975, 14 milhões em 2002 (LIMA-COSTA; VERAS, 2003), alcançando 20 milhões em 2010, segundo cálculo pelos dados do último censo (IBGE, 2010). Isto mostra que a SMD deve ser uma das enfermidades hematológicas mais frequentes em nossa população, merecendo por parte de investigadores e clínicos brasileiros uma maior reflexão.

A SMD primária na infância representa cerca de 4-9% de todas as malignidades hematológicas da faixa pediátrica (HASLE et al., 2003; XAVIER; KUTNY; COSTA, 2017). Crianças que apresentam essa neoplasia hematológica estão associadas a um pior prognóstico quando comparado com os adultos. Embora a SMD da infância seja considerada uma doença com características displásicas e hematopoese ineficaz, como a SMD do adulto, as características clínicas e citogenéticas têm refletido uma diferente questão biológica da SMD durante a infância (HASLE et al., 2003; KEEL et al., 2016; HASLE, 2016). Na Tabela 1 podemos observar as principais diferenças entre a SMD primária em pacientes pediátricos e adultos.

Tabela 1 – Diferenças entre SMD primária em pacientes pediátricos e adultos

Parâmetros	Crianças	Adultos
Incidência/milhão	3,6	>35
Anemia Refratária com Sidroblastos em Anel (ARSA)	< 2%	25%
Alterações Citogenéticas	60%	40%
-7/7q-	30%	10%
-5/5q-	1-2%	20%
Anormalidades clínicas associadas	30%	< 5%
Objetivo principal do tratamento	Curativo	Paliativo

Fonte: Hasle et al., 2013.

A história natural da SMD é altamente variável, podendo apresentar formas brandas, com alta sobrevida e baixa taxa de transformação leucêmica e formas mais agressivas que podem evoluir rapidamente para LMA. Pacientes com SMD primária raramente transformam para leucemia linfóide aguda (LLA), embora casos isolados tenham sido descritos (AYED et al., 2012; KOH et al., 2013)

A suspeita diagnóstica da SMD primária ocorre quando se realiza um hemograma que evidencia a presença de uma ou mais citopenias no sangue periférico, pois os sintomas, quando ocorrem, são vagos e inespecíficos. Quando há anemia isolada, causas não hematológicas devem ser pesquisadas como sangramento do trato gastrointestinal, causas cardíacas e deficiências nutricionais. Nos casos que apresentem trombocitopenia ou neutropenia isoladas, ou citopenia de mais de uma linhagem, geralmente há necessidade de investigação diagnóstica hematológica precoce, pois sugerem disfunção da medula óssea e doença avançada (BARZI; SEKERES, 2010).

Para investigação diagnóstica é necessário a análise do mielograma e da biópsia de medula óssea, para identificar displasias e a possível presença de blastos, caracterizando estágios mais avançados. Estudos adicionais auxiliam no estabelecimento do diagnóstico, incluindo a análise citogenética e imunofenotipagem (LIST et al., 2004; GERMING et al., 2013).

Grande variedade de tratamentos vem sendo utilizada em pacientes com SMD primária, com o objetivo de eliminar as citopenias, assim como de recuperar a hematopoese. As terapias utilizadas envolvem transfusões sanguíneas, antibióticos, fatores de crescimento isolados ou em combinação, ciclosporina ou globulina anti-linfócito que também são utilizadas em pacientes que apresentam medula óssea hipocelular (GARCIA-MANERO, 2014). Nos subtipos mais avançados da SMD (AREB, AREB-t e LMMC) é utilizada a quimioterapia com agente único: hidroxiurea, etoposídeo, mercaptopurina ou baixa dose de arabinosídeo citosina (ARA-C). Em alguns casos é utilizada a quimioterapia intensiva similar àquela dada à pacientes com LMA, como a combinação de fludarabina e alta dose de ARA-C (BEJAR, 2013).

O transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) alogênico é a única opção terapêutica curativa para pacientes com SMD. No entanto, o seu uso é limitado a pacientes até 55 anos de idade e que possuem doadores histocompatíveis (GIRALT, 2005). Entretanto, os regimes mieloablativos de alta dose que são utilizados para maximizar a morte de células neoplásicas vêm sendo substituídos por regimes de condicionamento menos intensos em pacientes idosos com SMD (SABER; HOROWITZ, 2016).

Com a delineação das características biológicas que norteiam o fenótipo da SMD, drogas introduzidas no tratamento desta doença têm mostrado um grande potencial terapêutico. Como por exemplo, agentes imunomoduladores anti-angiogênicos (talidomida e lenalidomida) (MUSTO, 2004; PICCOLOMO et al., 2020), citoprotetores (amifostina), inibidores do receptor da tirosina quinase (mesilato de imatinibe) (GILES et al., 2003) e inibidor de farnesil transferase (inibidor da via Ras) (KURZROCK et al., 2004). Além disso, a classe terapêutica dos inibidores

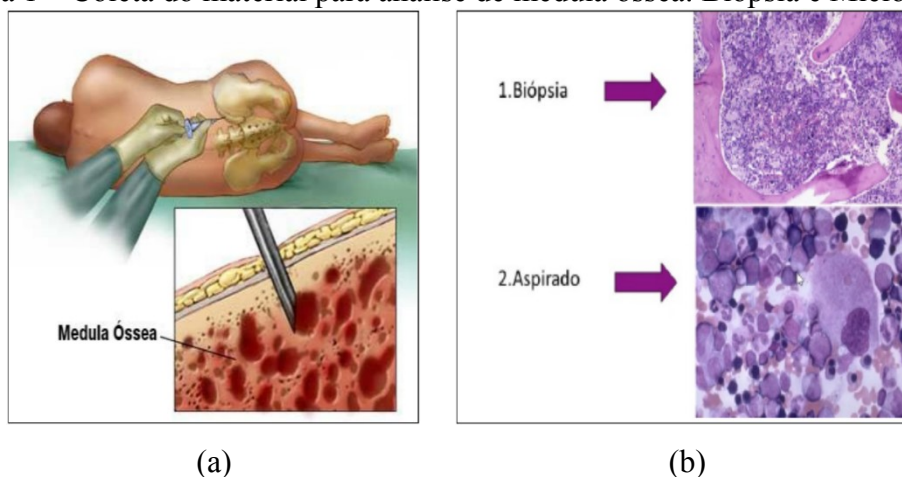
de DNA metiltransferase, enzima que catalisa a metilação do DNA, vem sendo utilizada no tratamento da SMD. Os representantes desta classe incluem a azacitidina (5-azacitidina) e decitabina (5-aza 2'deoxicitidina). Ambos são agentes hipometilantes que se incorporam no DNA e irreversivelmente ligam-se e inibem a ação da DNA metiltransferase. A ação destes fármacos leva à reativação de genes epigeneticamente reprimidos, como genes supressores de tumor, podendo induzir diferenciação, maturação celular e morte celular (DING et al., 2016). Resultados do tratamento com estes inibidores enzimáticos demonstraram que pacientes com SMD de alto risco apresentam um aumento no tempo de transformação para LMA e da sobrevida (SILVERMAN; MUFTI, 2005; ATALLAH; KANTARJIAN; GARCIA-MANERO, 2007; YE et al., 2017).

Um ponto importante para o tratamento dos pacientes com SMD é o diagnóstico na fase inicial da doença. Nesses casos, é fundamental a análise morfológica de medula óssea desses pacientes, definindo a composição e as características da arquitetura medular.

1.1 Características Morfológicas de Biópsia de Medula Óssea em Pacientes com SMD Primária

A definição histopatológica de displasia compreende a perda das características celulares individuais e da orientação da arquitetura medular. A maioria dos pacientes apresenta medula óssea hipercelular, contrastando com as citopenias periféricas, mas pode-se encontrar normocelularidade e hipocelularidade (ORAZI, 2007; KAYANO, 2018). A celularidade medular normal está relacionada com a idade do paciente, de tal maneira que as medulas ósseas com maior porcentagem de tecido hematopoético normalmente são encontradas em pessoas mais jovens e, as com menor porcentagem, em pessoas mais velhas. As características morfológicas da medula óssea dos pacientes com SMD podem ser avaliadas através do mielograma e da análise de biópsia de medula óssea, onde nesta última análise é possível observar principalmente a arquitetura medular (Figura 1).

Figura 1 – Coleta do material para análise de medula óssea: Biópsia e Mielograma

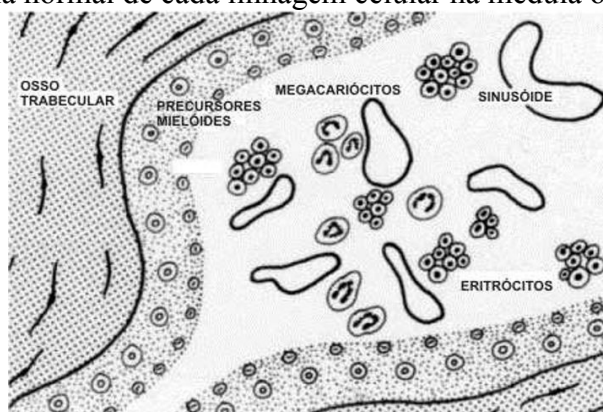


Legenda: Adaptado de Mayo Foundation for Medical Education and Research.

1.1.1 Biópsia de Medula Óssea de Pacientes com SMD Primária

Em decorrência das alterações estruturais na SMD primária, as células precursoras das três linhagens podem ser encontradas em todas as regiões na medula óssea, ou seja, a arquitetura medular é perdida durante o desenvolvimento desta doença (KAYANO, 2018). A displasia pode afetar uma ou mais linhagens, o que culmina com as células da linhagem envolvida apresentando topografia fora da sua região normal da medula óssea. A distribuição topográfica normal de cada linhagem celular está esquematizada na Figura 2.

Figura 2 – Topografia normal de cada linhagem celular na medula óssea



Legenda: Em um espaço trabecular observam-se, os precursoras mielóides paratrabeculares, a distribuição central da linhagem eritroide e os megacariócitos perivascular.

Fonte: Reddy, 2011.

Na SMD primária os grupamentos de eritrócitos e os megacariócitos podem ser observados no espaço para-trabecular, afastado do centro do espaço trabecular e dos sinusóides, respectivamente. Enquanto isso, os precursores mieloides podem estar distribuídos difusamente na medula óssea ou formando grupamentos nas regiões intertrabeculares, distantes das trabéculas. Esses agrupamentos de mieloblastos e/ou promielócitos na região central da medula óssea, afastado das trabéculas ósseas, seja formado por três a cinco células (agregados) ou por cinco ou mais células (aglomerado) são chamados de precursores imaturos de localização anormal (ALIP) (REDDY, 2001; NIERO-MELO et al., 2006; DELLA PORTA et al., 2015; KAYANO, 2018). Os ALIPs são mais frequentes nos pacientes com doença avançada. As células blásticas (células progenitoras e precursores imaturos) podem ser identificados pela imuno-positividade pelo anticorpo anti-CD34 (XIONG et al., 2017).

A presença de células CD34 positivas corresponde a menos de 1% da celularidade da medula óssea de indivíduos sem alterações hematológicas. Entretanto, valores aumentados podem ser encontrados em biópsia de medula óssea de pacientes com SMD, independente dessas células blásticas estarem agrupadas formando ALIP (DELLA PORTA et al., 2009).

A relação mielóide:eritroide (M:E) pode estar alterada em pacientes com mielodisplasia dependendo se há hiperplasia ou hipoplasia isolada de alguma dessas linhagens. Caso as duas linhagens estejam sofrendo o mesmo processo, por exemplo, hipoplasia, a celularidade medular pode reduzir, produzindo medula óssea hipocelular, porém, a relação M:E se mantém dentro da normalidade.

As alterações estromais na SMD são mais proeminentes na medula óssea hipocelular. Algumas dessas alterações correspondem a áreas de edema, infiltrado de células inflamatórias como linfócitos, por vezes formando agregados. Macrófagos com debris celulares e hemossiderina no seu interior podem ser observados (FORMAN, 1996; KAYANO, 2018), provavelmente decorrente do uso de hemotransfusão por período prolongado. Outras células inflamatórias que podem ser observadas são plasmócitos e mastócitos, sendo estas melhor visualizadas pelo mielograma. Pode-se verificar ectasia sinusoidal e, raramente, blastos no interior dos vasos (HORNY; SOTLAR; VALENT, 2007). Um aumento da densidade vascular por expansão da rede sinusoidal de pacientes com SMD também foi evidenciado por imunohistoquímica (PRUNERI et al., 1999; EWALT; GRATZINGER, 2016).

Vários estudos têm ressaltado a participação do microambiente estrutural da medula óssea na regulação da hematopoese. A estrutura do microambiente medular delimita compartimentos denominados nichos. Os nichos não são somente os compartimentos morfológicos de localização das células tronco e progenitoras das diversas linhagens

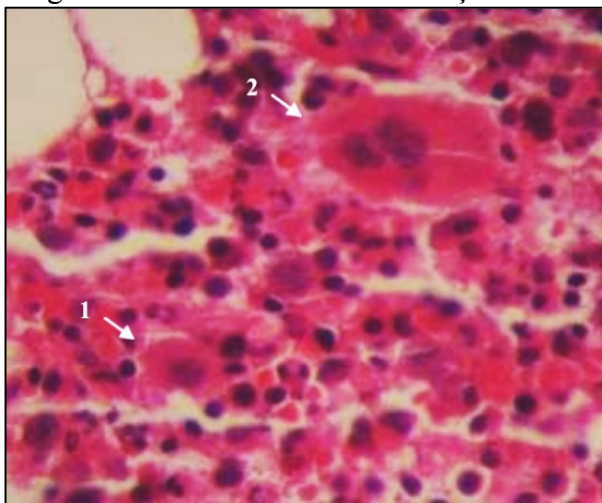
proliferativas, mas espaços dinâmicos de interações que determinam o comportamento das células tronco e progenitoras tanto na hematopoese normal como em doenças mieloproliferativas/mielodisplásicas, incluindo a SMD (LI; CALVI, 2017; KITAGAWA et al., 1998).

O papel do estroma na patogênese da SMD ainda não está definido, mas os nichos na medula óssea têm sido implicados na gênese de disfunções clonais na SMD. Foram evidenciadas alterações capazes de contribuir para a patogênese da SMD, como um aumento de apoptose das células do estroma (ABBAS et al., 2019) e alterações na produção de citocinas e no perfil de sinalização, envolvendo as células mesenquimais da medula óssea (BANERJEE et al., 2019).

A síndrome mielodisplásica com fibrose (SMD-F) é observada em aproximadamente 10% dos casos. Nesses pacientes a medula óssea apresenta fibrose reticulínica coesa e difusa, com ou sem fibras colágenas associadas e evidências morfológicas de displasia em pelo menos duas linhagens celulares. Entretanto, ainda não há consenso qual seria o grau de fibrose medular necessário para esse caso ser considerado SMD-F. Esses pacientes costumam apresentar doença avançada, displasia megacariocítica marcante com variação acentuada no tamanho dessas células (BRUNNING et al., 2008; DELLA PORTA et al., 2015; RAMOS et al., 2016) e, com mais frequência, notam-se hiperplasia eritroide e megacariócitos hiperlobulados (DELLA PORTA et al., 2015).

Algumas anormalidades celulares compatíveis com displasia podem ser observadas na biópsia de medula óssea. Pode-se encontrar eritropoese megaloblástica. Os megacariócitos podem ter hipolobulação nuclear, e se apresentar no formato de micromegacariócitos que evidenciam intensa redução citoplasmática e nuclear comparados aos megacariócitos normais (KOUIDES; BENNETT, 1992; DELLA PORTA et al., 2015). As alterações displásicas no setor megacariocítico podem ser observadas na Figura 3.

Figura 3 – Corte histológico de medula óssea em coloração Hematoxilina e Eosina



Legenda: Presença de micromegacariócito com hipolobulação nuclear, indicado pelo número 1, ao lado de um megacariócito sem alteração morfológica, indicado pelo número 2 em um paciente com SMD primária.

Fonte: A autora, 2011.

Alguns desses achados na medula óssea de pacientes com SMD estão associados a um pior prognóstico e a maior chance de evolução leucêmica. Os parâmetros mais estudados são: presença de precursores imaturos de localização anormal (ALIP) e fibrose intramedular (GEORGGI, 1997; ROMEO et al., 2001; KAYANO, 2018; WANG et al., 2020). Por outro lado, há dados morfológicos indicando bom prognóstico, como a hipocelularidade medular e a síndrome 5q- onde a medula óssea possui muitos megacariócitos pequenos e hipolobulados (KOUIDES; BENNETT, 1992; YUE et al., 2008).

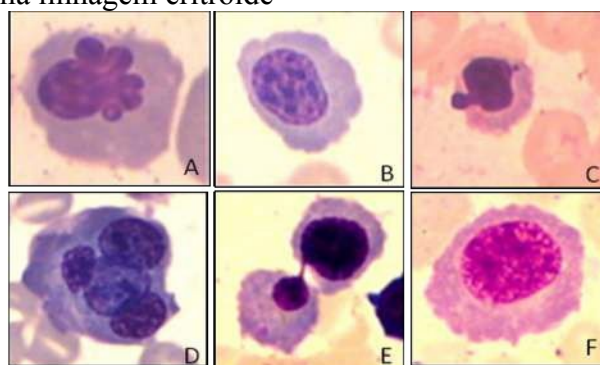
Além da análise da arquitetura medular através da biópsia de medula óssea, a análise morfológica das células do aspirado medular também é fundamental para o diagnóstico dos pacientes com SMD primária.

1.1.2 Características Morfológicas de Aspirado de Medula Óssea: Mielograma em Pacientes com SMD Primária

A análise do aspirado de medula óssea possibilita avaliação cito-morfológica das três séries hematológicas, principalmente alteradas em SMD (linhagens eritrocítica, granulocítica e megacariocítica), permitindo a caracterização da displasia em cada linhagem. Pelo menos 10% de células de cada linhagem devem apresentar alterações displásicas para serem significativas (BRUNNING et al., 2008).

Em relação à linhagem eritroide, a displasia é caracterizada pela diseritropoese que é avaliada por alterações nucleares, citoplasmáticas e por ausência de sincronismo entre a maturação nuclear e citoplasmática. As alterações nucleares são identificadas pelas formas aberrantes que incluem: irregularidade nuclear, formas bizarras, aumento da lobulação nuclear e mais de um núcleo (Figura 4). Podem ocorrer alterações megaloblásticas (eritrócitos imaturos com núcleo volumoso) e outras alterações como brotamentos nucleares, pontes internucleares, mitoses atípicas, cariorréxis (fragmentação de núcleo picnótico) e cariólise (dissolução da cromatina com perda da basofilia nuclear) (LIU et al., 2009; FLORENSA et al., 2019). Ainda são observadas nessa linhagem, as alterações citoplasmáticas como os sideroblastos em anel, vacuolização citoplasmática e eritoblastos com distribuição anômala da hemoglobina (BRUNNING et al., 2008; FLORENSA et al., 2019).

Figura 4 – Displasia na linhagem eritroide

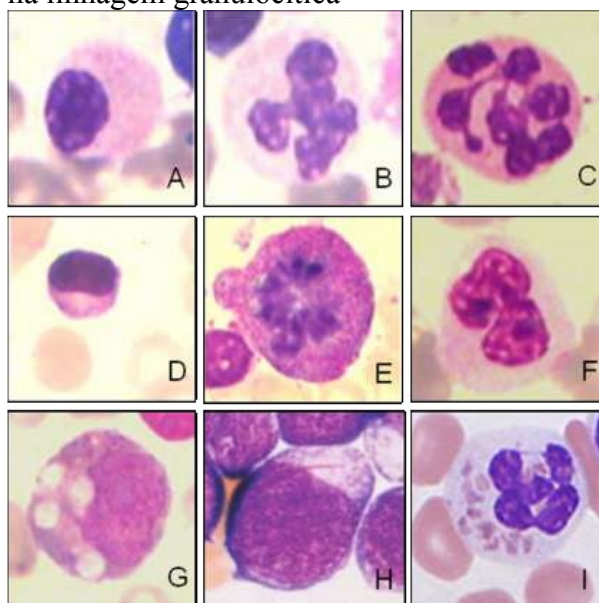


Legenda: (A) núcleo irregular; (B) cariólise; (C) brotamentos nucleares; (D) multinucleação; (E) ponte internuclear; (F) alterações megaloblásticas.

Fonte: Liu et al., 2009.

As alterações mielodisplásicas na linhagem granulocítica (disgranulopese) são caracterizadas por hipolobulação nuclear tipo pseudo-Pelger-Huët, podendo também ocorrer hipersegmentação irregular e binucleação. Há células com formato nuclear bizarro, por vezes com aumento do tamanho celular, mas podem se apresentar como granulócitos pequenos, do mesmo tamanho da hemácia. Assim como ocorre na diseritropoese, há um dissincronismo entre a maturação núcleo-citoplasma e figuras de mitose atípica. No citoplasma podem ser observados hipogranulação ou ausência de grânulos, grânulos tipo pseudo Chediak-Higashi, bastão de Auer e vacúolos intra-citoplasmáticos (Figura 5) (LIU et al., 2009; BRUNNING et al., 2008; FLORENSA et al., 2019).

Figura 5 – Displasia na linhagem granulocítica



Legenda: (A) pseudo-Pelger-Huët (B) núcleo bizarro (C) hipersegmentação (D) tamanho reduzido (E) mitose (F) hipogranulação (G) vacuolização (H) bastão de Auer (I) grânulos tipo pseudo Chediak-Higashi.

Fonte: Liu et al., 2009.

Em relação às alterações displásicas observadas nos megacariócitos, encontram-se tamanhos variados, inclusive na forma de micromegacariócitos. Os núcleos podem apresentar hipolobulação, ser hipersegmentados, bizarros e ter mais de um núcleo pequeno, redondo e separado entre si (Figura 6) (LIU et al., 2009; BRUNNING et al., 2008; FLORENSA et al., 2019).

Figura 6 – Displasia na linhagem megacariocítica



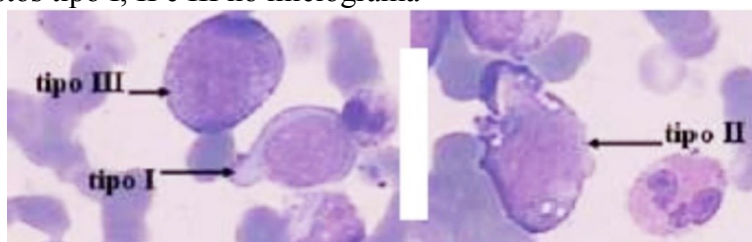
Legenda: (A) micromegacariócito; (B) hipersegmentação nuclear; (C) núcleos separados.

Fonte: Liu et al., 2009.

Morfologicamente os blastos no mielograma podem ter três apresentações. Os blastos tipo I que são os menores, com alta relação núcleo-citoplasmática, cromatina reticulada e fina, sendo observado de um a três nucléolos. O citoplasma possui basofilia discreta, sem grânulos e sem bastões de Auer. Os blastos tipo II são em geral maiores que o I, mas possuem menor relação núcleo-citoplasma e a cromatina mais condensada com um a três nucléolos. O

citoplasma apresenta discreta granulação primária (azurófila) e aparelho de Golgi proeminente. Os blastos tipo III são semelhantes aos do tipo II, mas com granulação azurófila mais abundante (≥ 20 grânulos), sem granulação secundária (metacromática) e sem zona de Golgi (Figura 7) (NIERO-MELO et al., 2006).

Figura 7 – Blastos tipo I, II e III no mielograma



Fonte: Niero-Melo et al., 2006.

Além da morfologia, a análise citogenética tem sido considerada uma importante metodologia aplicada ao diagnóstico e ao prognóstico dos pacientes com SMD. A citogenética também vem desempenhando um papel importante no conhecimento da biologia desta neoplasia hematológica, onde a descoberta de alterações cromossômicas não-randômicas confirmou a clonalidade, fornecendo uma maneira de identificar o clone maligno e identificar alguns oncogenes e genes supressores de tumor possivelmente envolvidos no desenvolvimento e na transformação leucêmica (SOUZA et al., 2014).

1.2 Alterações Citogenéticas em SMD Primária

As alterações citogenéticas podem ser detectadas em 30 a 50% dos pacientes com SMD primária. Essas alterações podem variar de uma simples mudança estrutural ou numérica até lesões genômicas complexas envolvendo três ou mais cromossomos distintos. Alterações citogenéticas simples podem ocorrer nos estágios iniciais da doença. Entretanto, nos estágios mais avançados e/ou durante a evolução da SMD para LMA são comuns alterações citogenéticas mais complexas (FERNANDEZ et al., 2000; PANANI; ROUSSOS, 2006; SOUZA et al., 2014).

As alterações cromossômicas numéricas são mais frequentes em SMD primária e envolvem perdas e ganhos cromossômicos. O ganho cromossômico mais observado é a trissomia do cromossomo 8 (+8) e a perda cromossômica mais comum é a monossomia do 7 (-7) (GUR et al., 2017). Quanto às deleções, as mais encontradas são as que envolvem o braço

longo dos cromossomos: 5 [del(5q)], 7 [del(7q)] e 20 [del(20q)]. As deleções do braço curto são menos comuns e acometem principalmente os cromossomos 17 [del(17p)] e 12 [del(12p)]. Translocações podem ocorrer, mas não são frequentes em SMD primária (PANANI; ROUSSOS, 2006; NOMDEDEU et al., 2016).

Apesar de não haver uma associação entre uma alteração cromossômica específica e um subgrupo da SMD, a deleção do braço longo do cromossomo 5 está mais frequentemente associada com o estágio inicial da doença. Clinicamente estes pacientes têm melhor prognóstico comparado com aqueles apresentando outras alterações cromossômicas, não sendo observada uma frequência aumentada de evolução para leucemia, a menos que existam alterações cromossômicas adicionais (GREENBERG et al., 1997; HAASE et al., 2007; HAASE, 2008; NOLTE; HOFMANN, 2008).

A del(5q) envolve genes cuja perda pode afetar processos importantes envolvidos na hematopoese. A região comumente deletada na síndrome 5q- encontra-se entre as regiões 5q32-q33 flanqueadas pelo marcador de DNA D5S413 e o gene *GLRA1* (Receptor alfa 1 de glicina, que fornece instruções para fazer uma parte, a subunidade alfa 1 da proteína receptora de glicina). Essa região mostrou vários mapeamentos promissores de genes candidatos associados à doença, incluindo o gene supressor de tumor *SPARC*, o gene de proteína ribossômica *RPS14* e vários de microRNAs. A haploinsuficiência do gene ribossômico *RPS14* mostrou causar um defeito na linhagem eritrocítica na del(5q) (BOULTWOOD et al., 1994; PELLAGATTI; BOULTWOOD, 2015; SOUZA et al., 2010).

As alterações do cromossomo 7 (monossomia 7 ou deleção 7q) são encontradas em aproximadamente 10% dos casos de SMD primária (HAASE et al., 2007; ZAHID et al., 2017). As regiões geralmente deletadas no braço longo do cromossomo 7 identificadas na SMD estão localizadas nas posições 7q22, 7q32-33 e 7q35-36 (HAASE et al., 2007; ZAHID et al., 2017). Na região 7q22 se localiza o gene *ACHE* (Acetilcolinesterase), que tem ampla expressão na medula óssea, entre outros tecidos. Há também os genes: *CUTL1* (a proteína codificada por este gene é um membro da família de proteínas com homeodomínio de ligação do DNA) que pode regular a expressão gênica, a morfogênese, a diferenciação celular e também pode desempenhar um papel na progressão do ciclo celular); *EPO* (a proteína codificada é sintetizada principalmente no rim, secretada no plasma sanguíneo e liga-se ao receptor de eritropoietina para promover a produção de glóbulos vermelhos, ou eritropoiese, na medula óssea). Na região 7q35-q36, está localizado o gene *EZH2* que codifica uma proteína considerada um membro-chave do complexo repressivo 2 da família Polycomb (PRC2), sendo responsável pela

regulação da metilação da lisina 27 na histona 3 (H3K27), bem como a repressão transcricional associada (VIRE et al., 2006; ONLEY; BEAU, 2009; CABRERO et al., 2016).

Pacientes com trissomia de 8 como anomalia isolada têm risco significativamente maior de transformação leucêmica, estando associada a um prognóstico desfavorável. As células hematopoéticas com essa alteração expressam níveis mais elevados de muitos genes que se localizam nesse cromossomo, incluindo o gene *MYC*, localizado na região 8q24, um proto-oncogene que codifica uma fosfoproteína nuclear que desempenha um papel importante na progressão do ciclo celular, apoptose e transformação celular (COLLER et al., 2000; SOUZA et al., 2014; XIA et al., 2015).

A deleção do braço longo do cromossomo 20 [del(20q)] está presente em 5% dos casos de SMD e é encontrada como uma mudança cariotípica isolada. A deleção 20q é geralmente intersticial, afetando a região 20q11-q13 (PANANI; ROUSSOS, 2006; ONLEY; BEAU, 2009). Tem sido sugerido que a del(20q) possa resultar na perda de um ou vários genes supressores de tumor. Estudos têm associado esta alteração com um bom prognóstico, pois apresenta baixa frequência de progressão para LMA e sobrevivência prolongada. Apenas os pacientes com a del(5q) têm sido descritos com um prognóstico mais favorável que pacientes com del(20q) (GREENBERG et al., 1997; BACHER et al., 2014).

Alguns estudos têm sugerido que a análise cromossômica é um fator prognóstico independente em SMD primária e em alguns casos as mudanças cariotípicas podem ser observadas antes de mudanças citológicas, sendo um fator fundamental para estratégias terapêuticas (HAASE et al., 2007). Entretanto, o valor prognóstico de algumas alterações cromossômicas em SMD primária precisa ser mais estudado, uma vez que existem poucos relatos na literatura, como é o caso de cariótipos hiperdiploides (ACAR et al., 2001; FERNANDEZ et al., 2003) e dados controversos como por exemplo em relação a +8 e del(11q) (GREENBERG et al., 1997; SOLÉ et al., 2000; FERNANDEZ et al., 2000; HAASE, 2008).

A presença de alterações citogenéticas pode refletir uma instabilidade genômica clonal, levando à predisposição para aquisições adicionais de lesões genéticas. Estudos citogenéticos de acompanhamento da evolução de SMD primária para LMA puderam demonstrar que anomalias cromossômicas simples ocorrendo em subtipos de SMD são acrescidas de outras anomalias durante a progressão da doença (FERNANDEZ et al., 2000; BERNASCONI et al., 2010; JHANWAR, 2015).

Como podemos observar as análises morfológica e citogenética são fundamentais para o diagnóstico e prognóstico da SMD, sendo utilizadas como critérios para a elaboração de

sistemas de classificação e escalas prognósticas para os pacientes com essa neoplasia hematológica.

1.3 **Classificação e Escala Prognóstica em SMD Primária**

1.3.1 Classificação da Síndrome Mielodisplásica segundo os critérios propostos pela FAB e pela Organização Mundial da Saúde

Em 1976, Linman e Bagby descreveram a síndrome pré-leucêmica que compreendia uma variedade de alterações da célula progenitora caracterizada por citopenias, aumento de blastos na medula óssea, mas sem alteração na sua celularidade. Esses autores sugeriram que anemias inexplicáveis como anemia refratária e anemia sideroblástica, por exemplo, poderiam representar o estágio inicial desse processo mielodisplásico que seguiriam com plaquetopenia e leucopenia. Uma grande proporção entre os pacientes com citopenias, finalmente progredia para leucemia aguda. Entretanto, pacientes, por vezes, não apresentavam evolução leucêmica e alguns fatores como a quantidade de blastos na medula óssea foram considerados relevantes para a ocorrência desse desfecho (SENN et al., 1982).

Em 1982, o grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) definiu a “síndrome mielodisplásica” e a classificou em 5 subgrupos utilizando como critérios: a porcentagem de blastos na medula óssea e no sangue periférico e características morfológicas (presença ou ausência de sideroblastos em anel e de bastões de Auer) (

Tabela 2) (BENNETT et al., 1982).

Tabela 2 – Classificação da Síndrome Mielodisplásica segundo os critérios propostos pelo Grupo FAB em 1982

Subtipo	Monócitos (µl) Sangue periférico	Sideroblastos em anel (%) Medula óssea	Células Blásticas (%)		Bastões de Auer Medula óssea
			Sangue periférico	Medula óssea	
AR	Não	< 15	< 1	< 5	Não
ARSA	Não	> 15	< 1	< 5	Não
AREB	Não	Não	< 5	5 - 20	Não
AREB-t	Não	Não	> 5	20 - 30	Sim ou Não
LMMC	> 1000	Não	< 5	< 20	Não

Legenda: AR- anemia refratária; ARSA- anemia refratária com sideroblastos em anel; AREB- anemia refratária com excesso de blastos; AREB-t- anemia refratária com excesso de blastos em transformação; LMMC- leucemia mielomonocítica crônica.

Fonte: Bennet et al., 1982.

Desde que essa classificação foi introduzida, vários estudos comprovaram sua utilidade, tanto para o monitoramento envolvendo um grande número de pacientes com SMD, quanto para o tratamento destes pacientes, permitindo comparações entre os diversos estudos. No entanto, para a determinação de um prognóstico preciso, esta classificação apresentava alguns problemas: distinguia somente duas categorias de risco, baixo (AR e ARSA) e alto risco (AREB, AREB-t e LMMC) e dentro de um mesmo subgrupo FAB os pacientes mostravam grandes variações na evolução da doença e na sobrevida, especialmente dentro dos subgrupos AR e ARSA. A denominação “anemia refratária” nem sempre era adequada, sendo a anemia apenas uma das três possíveis citopenias em SMD. Por este motivo, a expressão citopenia refratária foi sugerida por alguns autores (GARANDEAU et al., 2000). A LMMC apresenta em alguns casos características de síndrome mielodisplásica e em outros de síndrome mieloproliferativa, desta forma sua inclusão na SMD vem sendo discutida nas classificações mais recentes, como a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2000, que sofreu alterações em 2008 com critérios mais apurados (HARRIS et al., 2000; BRUNNING et al., 2008).

A OMS sugeriu novos critérios de classificação para SMD, sendo incorporados muitos conceitos e definições do grupo FAB, acrescentando dados visando melhorar a definição dos subgrupos, assim como a sua relevância clínica. A maior diferença entre as duas classificações foi o desaparecimento do subtipo AREB-t, sendo considerada a transformação para LMA a partir de 20% de blastos na medula óssea (HARRIS et al., 2000). Em 2016, a classificação da OMS foi revista, pois a(s) linhagem(ns) com displasia morfológica frequentemente não se

correlacionava(m) com a(s) citopenia(s) específica(s) no mesmo paciente (ARBER et al., 2016). Nessa nova classificação as síndromes mielodisplásicas são divididas em:

- a) **SMD com displasia em uma linhagem:** quando a medula óssea apresenta somente displasia em uma linhagem hematopoética;
- b) **SMD com sideroblastos em anel e displasia em uma linhagem:** quando há mais de 15% de sideroblastos em anel em relação a contagem do setor eritroide ou valores menores de 15% até 5% na presença de mutação no gene SF3B1, além de não haver evidências de displasias em outras duas linhagens na medula óssea.
- c) **SMD com displasia em multilinhagem:** quando a medula óssea apresenta displasias em duas ou mais linhagens.
- d) **SMD com sideroblastos em anel e displasia em multilinhagem:** quando, além de duas ou três linhagens displásicas, observam-se no aspirado de medula óssea mais de 15% de sideroblastos em anel na contagem do setor eritroide ou valores menores de 15% até 5% na presença de mutação no gene SF3B1 (BENNETT, 2016).

Pacientes com SMD tendo mais de 5% de blastos na medula óssea ou mais de 2% de blastos no sangue periférico, foram classificados como apresentando síndrome mielodisplásica com excesso de blastos (SMD-EB), sendo subdivididos em: SMD-EB-1 (5 a 9% de blastos na medula óssea e/ou 2 a 4% no sangue periférico) e SMD-EB-2 (acima de 10% até 19% de blastos na medula óssea e/ou bastão de auer ou 5 a 19% de blastos no sangue periférico) (ARBER et al., 2016). O subtipo LMMC foi retirado da categoria de SMD para um novo grupo de doenças mielodisplásicas/mieloproliferativas.

Na revisão de 2016, para o cálculo da porcentagem de blastos, o denominador utilizado em todas as neoplasias mieloides foi o todo das células blásticas nucleadas da medula óssea, e não apenas as células “não eritroides”. O aumento do denominador pode resultar em que casos classificados anteriormente como subtipo de leucemia aguda, atualmente sejam classificados como SMD com excesso de blastos (ARBER et al., 2016).

Dados citogenéticos foram incorporados à classificação OMS, como a adição do subtipo SMD com deleção do braço longo do cromossomo 5 (5q-) isolada, como uma entidade separada. Este subtipo é bem estabelecido entre os pacientes com SMD, estando associado com características clínicas específicas como anemia, em geral macrocítica, e hiperplasia micromegacariocítica. Displasias nas linhagens eritroide e mieloide são incomuns. A faixa

etária de acometimento é constituída principalmente por pacientes acima dos 50 anos de idade e do sexo feminino (MHAWECH; SALEEM, 2001). Pode-se incluir nessa categoria, além de pacientes com deleção 5q isolada, os pacientes com alguma alteração citogenética adicional, exceto a monossomia do cromossomo 7 e a del(7q) (BENNETT, 2016).

Além disso, os achados citogenéticos como: t(11;16) q23;p13), t(3;21) (q26;q22), t(2;11) (p23;q23), inv(3) (q21;q26), t(6;9) (p23;q34); -7 ou del(7q), -5 ou del(5q), i(17q) ou t(17p), - 13 ou del(13q), del(11q), del(12p) ou t(12p), del(9q), idic(X)(q13) em pacientes com citopenia persistente (mais de seis meses) de origem indeterminada em uma ou mais linhagens, citopenia idiopática de significado indeterminado, mesmo sem critérios morfológicos de displasia, passaram a ser considerados sugestivos de SMD (Tabela 3). Esses pacientes devem ser acompanhados para que alterações morfológicas possam ser monitoradas para caracterização da SMD (YIN; MEDEIROS; BUESO-RAMOS, 2010).

Os pacientes com SMD não classificável (SMD-U) são aqueles em que faltam critérios para serem considerados de outros subgrupos. Esse diagnóstico pode ser realizado mediante: 1) alterações morfológicas displásicas em uma ou mais linhagens acompanhadas de 1% de blastos no sangue periférico; 2) casos com displasia de uma linhagem associada a pancitopenia e 3) pacientes com citopenia persistente de uma ou mais linhagens, com 1% ou menos de blastos no sangue periférico e menos que 5% de blastos na medula óssea, displasia em menos de 10% das células em uma ou mais linhagens mieloides e aqueles que possuam alguma das alterações citogenéticas listadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Cariótipo sugestivo de SMD em citopenia idiopática de significado indeterminado (OMS, 2008)

Tipo	Alterações Citogenéticas
Balanceda	t(11;16)(q23;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3;q21.2), t(2;11)(p23;q23), inv(3)(q21;q26.2), t(6;9)(p23;q34)
Não balanceada	-7 ou del(7q), -5 ou del(5q), i(17q) ou t(17p), - 13 ou del(13q), del(11q), del(12p) ou t(12p), del(9q), idic(X)(q13)

Fonte: OMS, 2008.

Uma categoria provisória – citopenia refratária da infância – foi formulada, devido ao entendimento das diferenças clínicas, morfológicas e citogenéticas entre os pacientes pediátricos e os pacientes adultos. Nela se incluem pacientes menores de 14 anos, com citopenia persistente, menos de 5% de blastos na medula óssea ou menos de 2% de blastos no sangue periférico com displasia em duas linhagens ou em mais de 10% em uma única linhagem. É recomendado que mesmo aquelas crianças que se enquadrem nos critérios para SMD com

displasia de multilinhagem não devam ser consideradas nesse grupo, pois ainda não foi definido se o número de citopenias apresenta valor prognóstico nessa faixa etária (BRUNNING et al., 2008). Os subtipos de SMD segundo a OMS estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4 – Classificação da Síndrome Mielodisplásica segundo a proposta OMS em 2016

Subtipo	Número de displasia	Citopenias ¹	Siteroblastos em anel	Blastos (MO ² e SP ³)	Alteração citogenética (cariótipo convencional)
SMD com displasia em uma linhagem	1	1 ou 2	<15%/<5%+	MO<5%, SP<1%, sem bastões de Auer	Qualquer, exceto se critérios para SMD com del(5q) isolada
SMD com displasia em multilinhagem	2 ou 3	1 a 3	<15%/<5%+	MO<5%, SP<1%, sem bastões de Auer	Qualquer, exceto se critérios para SMD com del(5q) isolada
SMD com sideroblastos em anel com displasia em uma linhagem	1	1 ou 2	≥15%/≥5%+	MO<5%, SP<1%, sem bastões de Auer	Qualquer, exceto se critérios para SMD com del(5q) isolada
SMD com sideroblastos em anel com displasia em multilinhagem	2 ou 3	1 a 3	≥15%/≥5%+	MO<5%, SP<1%, sem bastões de Auer	Qualquer, exceto se critérios para SMD com del(5q) isolada
SMD com del(5q) isolada	1 a 3	1 ou 2	Nenhum ou algum	MO<5%, SP<1%, sem bastões de Auer	del(5q) isolada ou com mais uma alteração associada, exceto -7 ou del(7q)
SMD com excesso de blastos -1	0 a 3	1 a 3	Nenhum ou algum	MO 5-9%, SP 2-4%, sem bastões de Auer	Qualquer
SMD com excesso de blastos -2	0 a 3	1 a 3	Nenhum ou algum	MO 10-19%, SP 5-19%, ou bastões de Auer	Qualquer
SMD-U com 1% de blastos SP	1 a 3	1 a 3	Nenhum ou algum	MO<5%, SP=1%++, sem bastões de Auer	Qualquer
SMD-U com displasia em uma linhagem e pancitopenia	1	3	Nenhum ou algum	MO<5%, SP<1%, sem bastões de Auer	Qualquer
SMD-U baseado em alteração citogenética definidora	0	1 a 3	>15%+++	MO<5%, SP<1%, sem bastões de Auer	Alteração definidora de SMD
Citopenia refratária da infância	1 a 3	1 a 3	Nenhum	MO<5%, SP<2%	Qualquer

Legenda: ¹Citopenias são definidas por hemoglobina <10g/dL, plaquetas<100x10⁹/L e contagem absoluta de neutrófilos <1,8 x10⁹/L. Raramente pode apresentar com anemia ou trombocitopenia a baixo desses níveis. Monócitos no sangue periférico devem ser <1 x10⁹/L. +se mutação SF3B1 presente.++a contagem da % de blastos no sangue periférico deve ser realizada em duas ocasiões separadas. +++casos com ≥15% de sideroblastos em anel por definição apresenta displasia eritroide significativa e deve ser classificada como SMD com sideroblastos em anel com displasia em uma linhagem; ²Medula óssea; ³Sangue periférico.

1.3.2 Escalas Prognósticas em Síndrome Mielodisplásica: IPSS e IPSS-R

Alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar quais os fatores que mais influenciam a sobrevivência e a frequência de evolução para LMA nos pacientes com SMD, de modo a permitir a elaboração de escalas prognósticas. A classificação de grupos de risco em SMD primária mais utilizada corresponde ao Sistema Internacional de Escala Prognóstica (IPSS), estabelecida pelo estudo retrospectivo dos dados citogenéticos, morfológicos e clínicos de 816 pacientes. (GREENBERG et al., 1997). Os parâmetros mais importantes para o IPSS são a porcentagem de blastos na medula óssea, as alterações citogenéticas e o número de citopenias. Para cada um dos parâmetros foi atribuída uma pontuação. O somatório da pontuação de cada parâmetro determina o grupo de risco, sendo: baixo risco (0 pontos); intermediário 1 (0,5-1,0 pontos); intermediário 2 (1,5-2,0); alto risco (igual ou maior que 2,5). Em relação ao prognóstico citogenético, foi considerado com bom prognóstico: cariótipos normais, -Y, del(5q) e del(20q) e como prognóstico desfavorável: cariótipos complexos e anomalias envolvendo o cromossomo 7. As outras anomalias cromossômicas foram consideradas como prognóstico intermediário (Tabela 5).

Tabela 5 – Pontuação segundo os Parâmetros Críticos do IPSS em Síndrome Mielodisplásica (1997)

Variáveis Prognósticas	Pontuação				
	0	0,5	1	1,5	2
Blastos M. O.	< 5%	5 – 10%	-	11 – 20%	21 – 30 %
Cariótipo ¹	Bom	Intermediário	Desfavorável	-	-
Citopenias	0 - 1	2 – 3	-	-	-

Legenda: “Pontuação” para os grupos de risco: Baixo risco (0 pontos); intermediário 1 (0,5-1,0 pontos); intermediário 2 (1,5-2,0); Alto risco (> ou = 2,5). ¹Cariótipos: bom prognóstico: cariótipos normais, -Y, del(5q), del(20q), prognóstico desfavorável: cariótipos complexos, anomalias envolvendo o cromossomo 7; prognóstico intermediário: outras anomalias cromossômicas.

Fonte: Greenberg et al., 1997.

Em 2012 foi feita uma revisão nesse estudo, incluindo 7000 pacientes com síndrome mielodisplásica, que resultou no Sistema Internacional de Escala Prognóstica Revisado (IPSS-R), onde foram adicionados novos parâmetros prognósticos (GREENBERG et al., 2012).

No IPSS-R, foram definidos cinco grupos de risco: muito baixo risco, baixo risco, intermediário, alto risco e muito alto risco, de acordo com o somatório da pontuação das variáveis prognósticas vistas como relevantes, durante a revisão. Outras variáveis além da porcentagem de blastos, do prognóstico citogenético foram incorporadas e a quantidade de

citopenias foram desmembradas em outras variáveis, criando pontuações diferentes para a citopenia de cada linhagem.

A porcentagem de blastos medulares passou a ser pontuada quando maior que 2%, em vez de 5% e se maior de 10% a pontuação passa a ser a mesma, sem diferença entre 11-20% ou de 21-30%. As citopenias foram substituídas por pontuação de acordo com a quantidade das seguintes variáveis: hemoglobina (g/L), de plaquetas (109/L) e pela contagem neutrofílica absoluta (ANC), conforme pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 – Pontuação Prognóstica segundo os critérios do IPSS-R

Variável Prognóstica	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Citogenética	Muito Bom	-	Bom	-	Intermediário	Desfavorável	Muito Desfavorável
Blastos M.O. %	≥2	-	>2-5%	-	5-10%	>10%	-
Hemoglobina	≥10	-	8-<10	<8	-	-	-
Plaquetas	≥100	50-<100	<50	-	-	-	-
ANC	≥8	<0,8	-	-	-	-	-

Legenda: Sendo as categorias de risco e pontuação respectivamente: Muito Baixo: ≤ 1,5; Baixo: > 1,5 - 3; Intermediário: 3 - 4,5; Alto: 4,5 - 6; e Muito Alto: > 6.

Fonte: Greenberg et al., 2012.

Uma importante mudança no IPSS-R foi em relação aos grupos de risco pelos parâmetros citogenéticos. Os grupos de risco citogenéticos foram redefinidos e atualmente são reconhecidos cinco grupos prognósticos: muito bom, bom, intermediário, desfavorável e muito desfavorável (Tabela 7).

Tabela 7 – Grupos de risco citogenéticos segundo os Parâmetros do IPSS-R em Síndrome Mielodisplásica (2012)

Grupos de risco	Alterações citogenéticas
Muito bom	del(11q), -Y
Bom	Normal, del(20q), del(5q), única ou dupla, del(12p)
Intermediário	+8, del(7q), i(17q), +19, +20 e qualquer outra alteração única ou dupla, clones independentes
Desfavorável	inv(3)/t(3q)/del(3q), duas alterações incluindo -7/del(7q), complexo (três alterações)
Muito desfavorável	mais de três alterações

Fonte: Greenberg et al., 2012.

Apesar de vários estudos terem evidenciado alterações cito-arquiteturais e estromais com impacto na sobrevida (DELLA PORTA et al., 2009; VERBURGH et al., 2003; SAKUMA

et al., 2006; WANG et al., 2020), a análise de biópsia de medula óssea é subutilizada na prática clínica. Portanto, é necessário que os aspectos morfológicos em biópsia de medula óssea sejam avaliados em pacientes com SMD quanto a sua relevância para o diagnóstico, prognóstico e escolha terapêutica. Dentre as classificações elaboradas para SMD até o momento, somente a classificação da OMS ressalta as características da biópsia de medula óssea de modo complementar aos resultados do mielograma e da citogenética (BRUNNING et al., 2008).

Existem várias questões na patogênese da SMD que necessitam ser investigadas. Além disso, o reconhecimento desta síndrome como uma entidade clínica heterogênea de doenças hematológicas, associadas geralmente com a evolução para leucemia aguda, a tornou um modelo ideal de estudo das etapas envolvidas na leucemogênese, sendo sugerido um modelo de múltiplas etapas (AUL; BOWEN; YOSHIDA, 1998; ROSENFELD; LIST, 2000). Entretanto, não é conhecido o evento ou os eventos moleculares que levam ao desenvolvimento da SMD e sua evolução para LMA (TIEN et al., 2001; LOOK, 2005; SILVA-COELHO et al., 2017).

1.4 Alterações Moleculares em SMD Primária

Recentes descobertas moleculares têm proporcionado novos conhecimentos identificando alterações genéticas específicas relacionadas com os programas de proliferação, diferenciação e morte celular (apoptose), alterando processos de sinalização celular. Muitos desses genes mutados têm sido indicados como importantes fatores prognósticos, sendo críticos para o desenvolvimento da doença e sua evolução para LMA (Tabela 8) (GREENBERG et al., 2012).

Tabela 8 – Mutações em genes relacionados ao prognóstico desfavorável em SMD primária

Genes	Função
<i>RUNX1, NRAS, ETV6, FMS, FLT3, SETBP1</i>	Sinalização celular
<i>TP53, NPM1</i>	Regulação de ciclo celular
<i>BCL2</i>	Apoptose
<i>RPS1, RPL23, RPS4X, RPS25, RPS19</i>	Transcrição
<i>SF3B, SRSF, SETBP1, CUX1, U2AF1</i>	Reguladores de transcrição
<i>ASXL1, EZH2, TET, DNMT3A</i>	Reguladores epigenéticos

Fonte: Greenberg et al., 2012.

É interessante notar que muitos dos genes, frequentemente mutados em SMD primária codificam proteínas envolvidas na maquinaria epigenética da célula, sugerindo uma ligação entre os mecanismos genéticos e epigenéticos na patogênese desta doença. Apesar da maioria dos pacientes com SMD não apresentarem alterações citogenéticas, principalmente nos estágios iniciais da doença, a expressão gênica pode estar comprometida sem que ocorra alteração da sequência gênica. Isso pode ocorrer devido a metilação do DNA, modificações de histonas e pela expressão de microRNAs. Esses mecanismos são chamados de alterações epigenéticas e apresentam um papel fundamental no desenvolvimento embrionário e na diferenciação celular. Entretanto, a alteração da expressão gênica, principalmente via metilação do DNA, tem sido associada ao desenvolvimento e evolução da SMD para LMA (ZHOU et al., 2017).

As DNA-metiltransferases apresentam uma importante função na regulação na transcrição gênica, no remodelamento da cromatina e na instabilidade genômica. Atuam na metilação do DNA, adicionando um grupamento metil ao carbono 5 da ilha CpG, o que gera 5mC, levando a inibição da expressão genética. Geralmente, a metilação do DNA tende a inibir a transcrição, assim, nas neoplasias, geralmente os genes supressores tumorais, apresentam-se hipermetilados e os oncogenes tendem a estarem hipometilados (SHAHRABI et al., 2016).

O silenciamento gênico é a maior consequência das modificações epigenéticas, e evidências sugerem que a família de proteínas Polycomb, PcG, desempenha um papel importante neste processo (LIN et al., 2011). Além disso, as proteínas PcG parecem coordenar a acessibilidade ao DNA, reprimindo a transcrição através da regulação da metilação do DNA e modificação de aminoácidos específicos das histonas (RAJASEKHAR; BEGEMANN, 2007). Essas proteínas PcG foram identificadas originalmente como reguladoras dos genes HOX durante o desenvolvimento, no entanto, parecem contribuir para a proliferação celular aberrante e carcinogênese (LIN et al., 2011).

Um grande número de estudos clínicos tem mostrado evidências de que algumas proteínas PcG são anormalmente expressas em vários tumores, tais como câncer de mama, próstata, bexiga, tumores gastrointestinais e nas leucemias (SAUVAGEAU; SAUVAGEAU, 2010; LIN et al., 2011). Também tem sido demonstrado que algumas proteínas PcG podem desempenhar um papel crítico na invasão, metástase ou progressão tumoral, podendo assim ser vistos como marcadores de prognóstico (LIN et al., 2011).

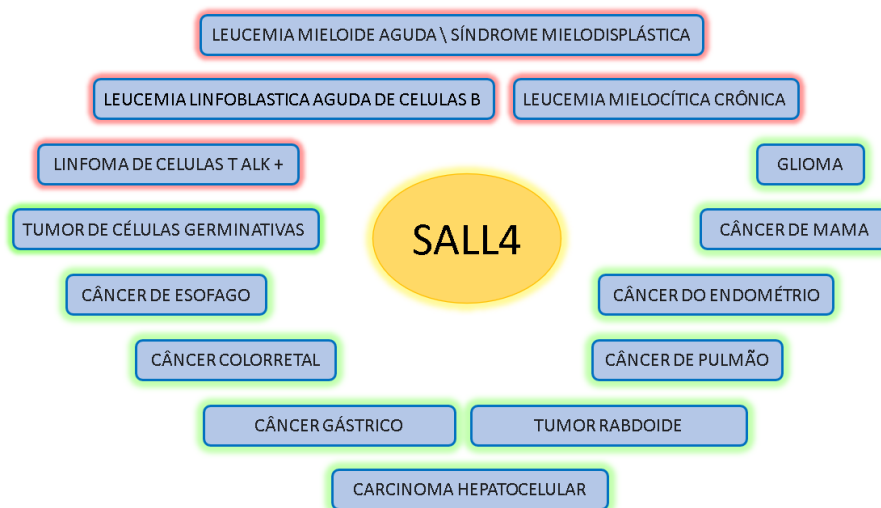
Dentre os genes da família de proteínas PcG, o gene *BMII* desempenha um papel crítico na auto-renovação das células tronco hematopoéticas (OGURO et al., 2006). Sendo assim, qualquer desequilíbrio na expressão ou na cascata de sinalização deste gene poderia levar a um descontrole no ciclo celular estando associado ao aparecimento de neoplasias hematológicas

(SCHURINGA; VELLENGA, 2010; KONUMA; OGURO; IWAMA, 2010). O gene *BMI1* é o principal alvo de regulação de expressão do gene *SALL-4*. Dessa forma, o gene *SALL-4* é um possível candidato associado a evolução da SMD para LMA.

1.4.1 Gene *SALL4*

SALL4 é um membro da família de genes spalt-like (*SALL*) (*SALL1* a *SALL4*), foi originalmente clonado com base em sua homologia de sequência de DNA com o gene homeótico em *Drosophila*, spalt (sal). Em humanos, *SALL4* está localizado na região cromossômica 20q13. Este gene desempenha um papel essencial na manutenção da pluripotência e auto renovação, propriedades das células-tronco embrionárias (ESCs). Após o nascimento, a expressão de *SALL4* é regulada negativamente e ausente na maioria dos tecidos adultos. No entanto, *SALL4* é reexpresso em vários tipos de câncer (Figura 8).

Figura 8 – Expressão de *SALL4* em neoplasias hematológicas e tumores sólidos



Fonte: Adaptado de Tatetsu et al., 2016.

O gene *SALL4* é crucial no desenvolvimento e no amadurecimento embrionário, mantendo a capacidade de pluripotência celular. Entretanto, a expressão desse gene não é detectada em tecidos humanos adultos normais, com exceção das células germinativas e das células hematopoéticas pluripotentes. Na hematopoese normal, há expressão elevada de *SALL4* nas células *CD34* positivas. O *SALL4* é considerado um dos reguladores transcricionais mais

importantes da célula tronco hematopoética e está envolvido na auto-renovação destas células, estimulando a expansão de células tronco e células progenitoras hematopoéticas na medula óssea, tendo um papel fundamental na diferenciação celular (AGUILA et al., 2011; WANG et al., 2014).

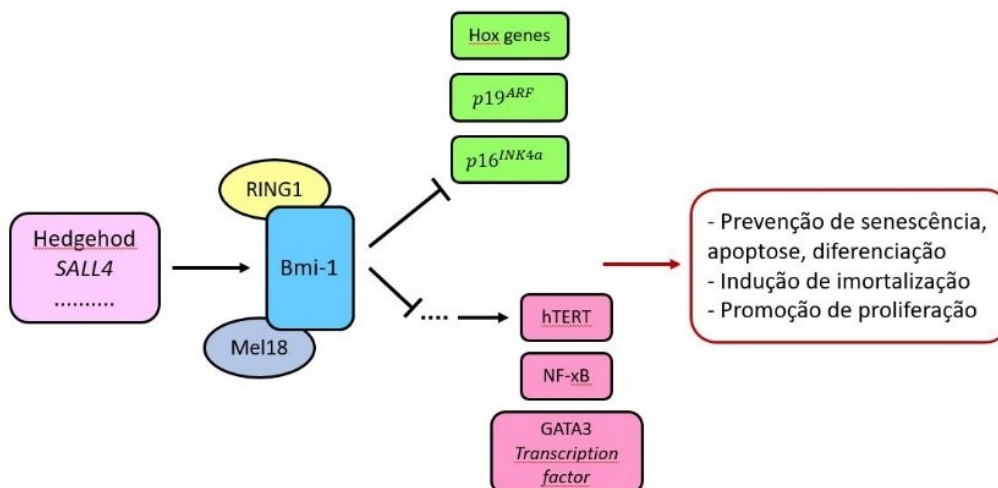
Estudos mostraram que o aumento de expressão de *SALL4* está associado com leucemogênese (SHUAI et al., 2009; LIN et al., 2013). A expressão de *SALL4* pode ser detectada na progressão de leucemia mieloide crônica (LMC) em crise blástica, em subtipos de LMA e em pacientes com LMA resistentes ao tratamento (CUI et al., 2006; GAO; KONG; CHAI, 2011; IBRAHEEM et al., 2019). Alguns estudos sugerem que o aumento de expressão deste gene está relacionado com os estágios mais avançados de SMD, sendo, portanto, um potencial marcador de prognóstico (WANG et al., 2013). Reforçando a importância deste gene na SMD, foi evidenciado que pacientes com SMD/LMA apresentando cariótipos mais complexos (com 3 ou mais alterações cromossômicas), mostravam expressão de *SALL4* maior do que os pacientes com SMD com cariótipos normais (WANG et al., 2016). Neste mesmo estudo uma correlação positiva entre a expressão de *SALL4* e de *TP53* foi observada, mas estudos com um número maior de pacientes ainda é necessário para validação deste resultado.

A SMD é considerada um estágio pré-leucêmico e o padrão de expressão de *SALL4* ainda é pouco estudado, principalmente no que se refere ao prognóstico. Em camundongos *SALL4* transgênicos foram encontradas citopenias e alterações displásicas na medula óssea. Nesse estudo, foram observadas no sangue periférico células blásticas imaturas, várias células mieloides atípicas e displásicas com hipersegmentação nuclear de neutrófilos e células ‘pseudo-Pelger-Huet-like’ (MA et al., 2006). Outro estudo com camundongos *SALL4* transgênicos mostrou um impacto negativo do gene *SALL4* no reparo do DNA, dando suporte ao modelo de ação leucemogênica do *SALL4* pela inibição do reparo do DNA e pela promoção da sobrevivência da célula (WANG et al., 2016).

Na medula óssea normal, a expressão de *SALL4* pode ser regulada pelo *OCT4* e pela via Wnt/ β -catenina, enquanto na leucemia observa-se hipometilação abrangendo a região entre o exon1-intron1 da ilha CpG (LIN et al., 2013; WANG et al., 2014). Além disso, nas células *CD34* normais, a regulação negativa (downregulation) de *SALL4*, leva a perda do marcador *CD34* de células tronco e progenitoras e afeta a expressão de genes envolvidos na autorenovação e diferenciação celular, como os genes *RUNX1*, *HOXA9*, *TPO*, *BMI-1* e *PTEN* (WANG et al., 2014). De forma diferente, na leucemia, *SALL4* funcionalmente mantém a proliferação das células tronco e progenitoras bloqueando a diferenciação, além de promover a sobrevivência, diminuindo a morte por apoptose. Na Figura 9 podemos observar que *SALL-4*

desempenha papéis importantes na regulação das células-tronco através da ativação de múltiplas vias, incluindo o gene *BMI-1*. Essas funções são, portanto, importantes no que se refere à sobrevida tumoral e imortalidade celular, podendo *SALL4* ser útil como alvo de terapias.

Figura 9 – SALL-4 e seu Papel na Regulação de Células-tronco Hematopoéticas



Legenda: *SALL4* desempenha papéis importantes na regulação das células-tronco através da ativação de múltiplas vias incluindo o gene *Bmi-1*. O gene *Bmi-1* pode ser regulado positivamente pelo sinal de *SALL4* e Hedgehog (Hh), ativando a auto-renovação das células-tronco através da repressão dos genes Hox e do locus *INK4a*, *P16INK4a* e *p19ARF*, e ativação de telomerase, fator transcripcional *GATA3* e via *NF-B*. Esses genes desempenham um papel importante nas decisões do destino das células progenitoras, incluindo a prevenção da senescência, apoptose e diferenciação, bem como a indução de imortalização e promoção da proliferação.

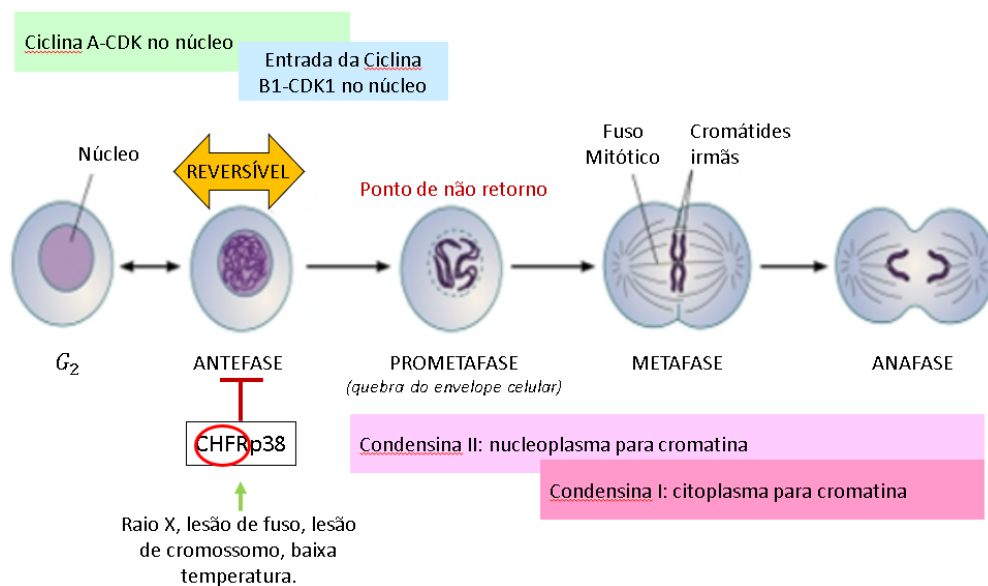
Fonte: Adaptado de www.cancerlink.ru/enbmi.html em 04/07/2017.

1.4.2 Gene *CHFR*

O gene *CHFR* (*checkpoint with forkhead and ring finger domain*) é um gene de controle do ciclo celular cuja função é manter a integridade cromossômica. Esse gene está localizado na região cromossômica 12q24. Esse gene codifica uma ubiquitina-proteína ligase E3 necessária para a manutenção do checkpoint da antefase que regula a entrada do ciclo celular na mitose e, portanto, pode desempenhar um papel fundamental na progressão do ciclo celular e na tumorigênese. É expresso no núcleo de todas as células em tecidos normais e se acumula no núcleo em resposta a dano nos microtúbulos e ou estresse radioativo. Quando localizado no núcleo, é fosforilado pela proteína quinase B e sinaliza a parada do ciclo celular, interrompendo a mitose. Por outro lado, quando é degradado pela auto-ubiquitinação, a célula entra em mitose. Além disso, o *CHFR* interage no fuso mitótico com a proteína TCTP, envolvida na

estabilidade dos microtúbulos, e com alfa-tubulina. No estresse de microtúbulos, o rompimento dessas interações impede a via de sinalização que resultaria em mitose. Portanto, o *CHFR* controla a progressão do ciclo celular de G2 para M (DERKS et al., 2014; SANBHNANI; YEONG, 2012). Na Figura 10 podemos observar o papel de *CHFR* no ciclo celular.

Figura 10 – *CHFR* e o Controle do Ciclo Celular da fase G2 para mitose



Legenda: Principais efetores do ponto de verificação antefase. À medida que as células passam de G2 para a mitose, há uma etapa entre essas fases chamada antefase, onde a condensação cromossômica é reversível. O antefase parece depender de ambos os genes *p38* e *CHFR* para reverter a condensação cromossômica quando as células são expostas a agentes de estresse.

Fonte: Chin e Yeong (2010).

O *CHFR* é um gene supressor de tumor, considerado um biomarcador de câncer. A sua inibição está associada com mau prognóstico, estágios avançados e recidiva da doença (TANAKA et al., 2011; DERKS et al., 2014). Em alguns tumores sólidos como câncer pulmonar não pequenas células, câncer colorretal e gástrico, e também em linfomas não-Hodgkin, observou-se diminuição da expressão gênica de *CHFR* devido a mecanismos epigenéticos, como a hipermetilação da região promotora deste gene (SONG et al., 2015; WANG et al., 2017; SUN et al., 2017; DAI et al., 2019). Além de estar relacionado com instabilidade cromossômica, o *CHFR* inativado pela metilação da região promotora pode causar aneuploidias (SANBHNANI; YEONG, 2012; PRIVETTE; PETTY, 2008; DERKS et al., 2014).

As alterações no número de cromossomos, as aneuploidias, correspondem às principais alterações citogenéticas observadas em SMD, e o gene *CHFR* está associado com a presença de aneuploidias. Este gene foi considerado marcador de prognóstico da LMA (ZHOU et al.,

2017). Uma revisão da literatura, mostra que não existem estudos associando o papel do gene *CHFR* no desenvolvimento e evolução da SMD para LMA, portanto, deve ser melhor investigado a possibilidade de que esse gene possa ser um biomarcador de prognóstico para os pacientes com SMD.

Como podemos notar, existem várias questões em relação à patogênese da SMD que necessitam ser investigadas. Também existem dificuldades em relação ao diagnóstico e na definição, em alguns casos, de fatores prognósticos em pacientes com SMD. Assim, a caracterização das alterações morfológicas e o conhecimento das alterações cromossômicas e moleculares em SMD primária, são de fundamental importância para o diagnóstico clínico e para terapia direcionada ao risco da doença.

2 OBJETIVOS

Analisar a expressão dos genes *SALL4* e *CHFR* em pacientes com SMD primária e o papel destes genes no desenvolvimento da SMD e sua evolução para LMA, correlacionando com características morfológicas, citogenéticas e clínicas.

Lista-se como objetivos específicos:

- a) Avaliar as características morfológicas dos pacientes com SMD primária considerando os seguintes fatores: celularidade, relação mieloide:eritroide, alteração qualitativa e quantitativa de megacariócitos, arquitetura medular, ALIP, presença de células CD34+, megaloblastos, alterações estromais e fibrose medular e comparar os resultados em biópsia de medula óssea e mielograma;
- b) Avaliar o padrão cariotípico em pacientes com SMD primária para verificarmos a frequência de alterações cromossômicas nos diferentes subgrupos OMS e as principais alterações cromossômicas numéricas e estruturais envolvidas no processo de transformação leucêmica;
- c) Analisar o impacto prognóstico de acordo com a classificação OMS e as escalas prognósticas IPSS e com o IPSS-R;
- d) Analisar a expressão dos genes *SALL4* e *CHFR* em pacientes com SMD primária e indivíduos saudáveis (doadores de medula óssea) e sua associação com os subtipos da SMD, cariótipos e evolução para LMA;
- e) Estudar as associações dos achados morfológicos, citogenéticos e moleculares com as características clínicas dos pacientes para caracterizar o papel dos genes *SALL4* e *CHFR* no desenvolvimento da SMD e sua evolução para LMA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Foi realizado uma análise retrospectiva, a partir de 2000 e prospectiva até 2020, em 100 pacientes com diagnóstico de SMD primária provenientes do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ), do Serviço de Hematologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA) e do Centro de Transplante de Medula Óssea (INCA). O diagnóstico da SMD primária foi realizado com base nas características clínicas, morfológicas do aspirado e da biópsia de medula óssea e no estudo citogenético. A classificação da SMD seguiu os critérios da OMS (ARBER et al., 2016). Foram excluídos: pacientes pediátricos com idade inferior a 19 anos, pacientes com SMD secundária, os que não possuíam avaliação citogenética conclusiva, aqueles cujo material para análise morfológica não estava disponível no arquivo da instituição (lâminas e bloco de parafina da biópsia de medula óssea), as biópsias consideradas artefatuais e aquelas com menos de cinco espaços trabeculares. Todos os experimentos foram realizados com amostras de medula óssea dos pacientes, e como controles dos experimentos de expressão gênica foram utilizadas amostras de medula óssea de doadores, provenientes do Centro de Transplante de Medula Óssea (INCA). Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (Ref. CEP- INCA 62/10) e pelo Comitê Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (protocolo no 2001 - CEP/HUPE) (Anexos A e B).

3.2 Estudo Clínico

O levantamento das características clínicas de cada paciente foi realizado através da análise de prontuários e do prontuário eletrônico, incluindo os exames laboratoriais. A partir desse levantamento foi preenchida uma ficha, elaborada pelo nosso grupo, para cada paciente (Apêndice A). Nessa análise foram verificadas: a classificação dos pacientes em subgrupos segundo a OMS, a taxa de evolução de SMD para LMA, a causa óbito e a sobrevida média dos pacientes.

3.3 Estudo das Características Morfológicas de Medula Óssea

3.3.1 Análise de Biópsia de Medula Óssea

As lâminas utilizadas para o diagnóstico foram revistas e reavaliadas quanto às características morfológicas da SMD primária utilizando a coloração de hematoxilina-eosina que é realizada na rotina diagnóstica no Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e da Divisão de Anatomia Patológica do Instituto Nacional do Câncer (DIPAT/INCA). A descrição de cada biópsia dos pacientes estudados foi padronizada de acordo com a ficha "Avaliação dos Achados Morfológicos em Biópsia de Medula Óssea em Síndrome Mielodisplásica primária" elaborada por nosso grupo de pesquisa (Apêndice B).

A avaliação dos achados nas biópsias de medula óssea foi dividida em: alterações estromais, incluindo fibrose medular e alterações celulares qualitativas e quantitativas. A contagem de espaços trabeculares indica se a amostra é representativa para ser avaliada, desconsiderando-se a área para-cortical. Foram consideradas inadequadas para análise as biópsias de medula óssea com menos de cinco espaços trabeculares. As análises qualitativas e quantitativas foram realizadas por dois observadores.

As alterações estromais foram classificadas como “ausente”, “discreta”, “moderada”, “importante” e “não avaliável” seguindo os parâmetros apresentados nas “diretrizes para diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas” (NIERO-MELO et al., 2006). Foram avaliadas a existência de edema, ectasia sinusoidal, plasmócitos, linfócitos, nódulos linfóides e precursores intravasculares (COTELINGAM, 2003).

O estudo da fibrose medular foi realizado pela coloração para reticulina e havendo necessidade, foi feita a coloração com tricrômico de Gomori para visualização de fibras colágenas (STEENSMA et al., 2001). A escala de Bauermeister foi utilizada para graduar a quantidade de fibrose (NIERO-MELO et al., 2006). Essa escala possui cinco graduações. No grau 0 não há fibrose; no grau 1 há fibras ocasionais e/ou focos finos e no grau 2 nota-se rede fina em grande parte do corte, sem fibras grossas. O grau 3 possui rede difusa, com focos esparsos e fibras grossas, mas sem colágeno, enquanto que no grau 4 os focos são grossos e notam-se áreas de collagenização.

As alterações quantitativas que foram analisadas envolveram a celularidade global e a específica de cada linhagem e a sua organização arquitetural na medula óssea. A celularidade da medula óssea foi quantificada em porcentagem. A classificação quanto a celularidade, em hipocelular, normocelular e hiperclular, foi associada com a idade do paciente. Em pacientes com menos de 60 anos e com a celularidade igual ou menor que 30%, foi considerado hipocelular e, com mais de 70%, hiperclular. Nos pacientes com mais de 60 anos e celularidade igual ou menor que 20%, foi considerado hipocelular e hiperclular com mais de 60% (COTELINGAM, 2003; THIELE et al., 2005).

Em relação à quantificação da celularidade específica de cada série foi utilizado a razão entre as linhagens mieloide:eritroide (relação M:E) e analisado se está dentro dos limites da normalidade, ou seja, de 2:1 a 3:1 (COTELINGAM, 2003). A contabilidade da linhagem megacariocítica foi feita por uma média do número de megacariócitos presentes em dez campos de 400X no microscópio Nikon Eclipse E200, sendo considerado normal as médias entre 2 a 5 megacariócitos por campo. A perda da orientação arquitetural foi avaliada em “ausente”, “discreta”, “moderada”, “importante” e “não avaliável”, onde consideramos as três linhagens hematopoéticas (mieloide, eritroide e megacariocítica).

As alterações qualitativas foram classificadas em “ausente”, “discreta”, “moderada”, “importante” e “não avaliável”. Na linhagem eritroide foi investigada a presença de megaloblastos. Em relação à linhagem megacariocítica, foram observadas a presença de micromegacariócitos e de hipolobulação nuclear. Em relação à linhagem mieloide, foram analisadas a existência de ALIP e de células blásticas isoladas (CD34 positivas).

3.3.2 Análise do aspirado de medula óssea: Mielograma

As lâminas utilizadas para o diagnóstico inicial de SMD foram revistas por dois observadores para caracterizar as alterações morfológicas em SMD primária, utilizando a coloração de May-Grünwald/Giemsa.

Os esfregaços de medula óssea - mielograma - foram analisados de acordo com a celularidade em hiperclular, normocelular e hipocelular, a partir da quantidade de células e de espículas ósseas presentes na lâmina.

A contagem da celularidade específica para cada linhagem foi realizada contando-se 500 células em cada exame e seu valor expresso em porcentagem, separando as linhagens: eritroide, megacariocítica e mieloide, além da porcentagem de blastos.

A presença de alterações citológicas mielodisplásicas foi considerada significativa a partir do acometimento de 10% das células nucleadas para as linhagens mieloide e eritroide. A displasia na linhagem megacariocítica foi considerada significativa a partir do acometimento de 15% em 30 células avaliadas.

A pesquisa de sideroblastos em anel foi realizada utilizando-se a coloração azul da Prússia. Foram contados 100 eritroblastos, para avaliação da porcentagem de sideroblastos em anel, ou seja, da porcentagem de eritroblastos que possuem cinco ou mais siderossomos ou 1/3 da circunferência nuclear com depósito azulado do corante marcando a presença de ferro.

3.4 Análise Citogenética

3.4.1 Citogenética Convencional: Bandeamento GTG

Inicialmente as células de medula óssea dos pacientes com SMD foram lavadas com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma), em seguida, foi feita uma diluição de 1:20 da suspensão celular em líquido de Thomas (1mL de ácido acético glacial, uma gota de violeta genciana, 100mL de água destilada) e as células contadas na câmara de Newbauer em microscópio óptico Zeiss (contraste de fase). Foram incubadas de 5×10^6 a 10×10^6 células em 80% de RPMI e 20% de soro fetal bovino (GIBCO), a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂, por 24 horas. Duas horas antes do término da cultura, foram adicionados 0.05µg/mL de colchicina e a cultura incubada novamente por mais 1 hora nas mesmas condições.

Ao final da incubação, o material foi centrifugado a 1500 rpm (centrífuga Eppendorf modelo - 5804) por 6 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspenso em 5mL de uma solução hipotônica (KCl 0,075M). O material foi incubado a 37°C por 15 minutos, sendo em seguida centrifugado a 1500 rpm (centrífuga Eppendorf modelo - 5804) por 6 minutos. Em seguida, o material foi fixado com Solução Carnoy 3:1 (metanol:ácido acético), sendo na primeira fixação adicionado lentamente um volume de 5 mL. Após 20 minutos à temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 1500 rpm (centrífuga Eppendorf modelo -

5804) durante 6 minutos e o sobrenadante desprezado. O procedimento foi repetido mais 2 vezes e o material da última fixação foi ressuspensão em um pequeno volume de fixador, que varia de acordo com a quantidade de material. As lâminas foram preparadas pingando-se uma gota de suspensão celular em uma lâmina limpa e umedecida e o material foi fixado sobre a lâmina na chama. A primeira lâmina obtida foi corada com corante Giemsa 2% em tampão fosfato (0,102M NaH_2PO_4 ; 0,098M Na_2HPO_4 , pH 6,8) e observada no microscópio óptico para verificar o índice mitótico e a qualidade das metáfases. As demais lâminas foram envelhecidas em um período que variou de 1 dia a 1 semana para o bandeamento GTG.

Para obtenção de padrões de bandeamento GTG foi utilizada a seguinte técnica: as lâminas previamente fixadas foram colocadas em um preparado de tripsina 0,1% diluída em solução Dulbecco (0,137 M NaCl ; 0,0027 M KCl ; 0,0015 M KH_2PO_4 ; 0,011 M NaH_2PO_4 ; pH 7,8), em tempos que variavam em função da qualidade do material fixado. Em seguida, as lâminas foram lavadas em soro fisiológico (NaCl 9%) e as mesmas foram coradas em uma solução de Giemsa (Merck) a 2% em tampão fosfato (pH 6,8) durante 15 minutos.

Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com o Sistema Internacional para Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN, 2016). A análise cromossômica foi realizada em microscopia óptica utilizando no mínimo 20 metáfases por paciente. Um caso foi considerado anormal quando três ou mais metáfases apresentaram a mesma alteração cromossômica estrutural e/ou numérica. Foram adquiridos através do Sistema de Cariotipagem Ikaros (Zeiss) de 5 a 10 metáfases para a montagem dos cariótipos de cada paciente.

3.4.2 Citogenética Molecular: Hibridização “in situ” por fluorescência (FISH)

Para a técnica de hibridização “in situ” por fluorescência, foi usado o material da preparação da citogenética clássica (metáfases e núcleos interfásicos em fixador). Foram utilizadas sondas da Vysis, Abbott Laboratories, USA, para investigação: da deleção na região q31 do braço longo do cromossomo 5 (LSI EGR1 Spectrum Orange/LSI D5S23, D5S71 Spectrum Green); de alterações envolvendo o cromossomo 7 (LSI D7S486 “Spectrum Orange”/CEP 7 “Spectrum Green”), da trissomia do cromossomo 8 (LSI MYC Spectrum Orange Probe), deleção do gene *MLL*, atualmente denominado *KMT2A*, localizado na região q23 do cromossomo 11 (LSI *MLL* “dual color break apart rearrangement probe”) e da deleção

do gene *TP53*, localizado na região p13 do cromossomo 17 (LSI p53, “spectrum orange”). Foram utilizadas de 2 a 3 gotas da preparação da citogenética clássica para preparação da lâmina para a análise através do FISH. As lâminas foram preparadas e envelhecidas durante 24 horas. Após esse período, as lâminas foram colocadas em uma solução 2x SSC (obtida da diluição da solução 20x SSC: 3,0 M de NaCl e 0,3 M de Citrato de Sódio, pH 7,0), em temperatura ambiente, por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em soluções de etanol 70%, 90% e 100%, também à temperatura ambiente, por 2 minutos cada etapa. Em seguida, o material foi colocado em uma solução de 70% formamida/2x SSC, a 73°C por 5 minutos. Na sequência, as lâminas foram colocadas em novas soluções de etanol 70%, 90% e 100%, à temperatura ambiente, por 2 minutos cada etapa. Após esse procedimento, foi aplicada uma solução contendo a sonda em um volume final de 10µL (sendo 2µL de água MiliQ, 7µL de tampão e 1µL de sonda), previamente desnaturada por 5 minutos a uma temperatura de 73°C, e o material foi coberto com uma lamínula de vidro. As lâminas foram seladas com cola de isopor e incubadas de 16 a 18 horas em câmara úmida a 37°C. Após o período de hibridização, as lâminas foram colocadas em uma solução de 0,4x SSC e 0,3% IGEPAL (SIGMA) a 73°C durante 1 minuto e, em seguida, em uma solução 0,2x SSC e 0,1% IGEPAL (SIGMA) pelo mesmo período. Foi adicionado sobre a lâmina um volume de 10µL de DAPI/Antiphide para corar os cromossomos e núcleos interfásicos; a área foi coberta com uma lamínula de vidro e selada com esmalte incolor. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência (OLYMPUS BX51) com filtros apropriados e as imagens foram adquiridas pelo sistema de captura ISIS MetaSystems (ZEISS).

3.5 Estudo Molecular: Análise do Padrão de Expressão dos Genes *SALL4* e *CHFR*

3.5.1 Análise do padrão da expressão dos genes *SALL4* e *CHFR* por qRT-PCR em tempo real quantitativo

3.5.1.1 Extração de RNA

O RNA total de células mononucleares da medula óssea de 46 pacientes com SMD primária e 21 doadores (indivíduos saudáveis) foi extraído pelo método de TRIzol (Life

technologies, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Inicialmente, foi adicionada nas amostras de medula óssea uma solução de lise de hemácias RCBL (Sacarose 1,6M, Triton X-100 5%, $MgCl_2$ 25mM e Tris-HCl 60mM pH 7.5). Após a lise, o material foi centrifugado a 1500 rpm por 6 minutos (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific, USA) e lavado com solução de soro fisiológico (9% NaCl). Após a lavagem, foi adicionado 1mL de TRIzol (para cada $5-10 \times 10^6$ células). Em seguida, foi acrescentado 0,2mL de clorofórmio, homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 3 minutos. Após este tempo, o material foi centrifugado a 7000 rpm por 10 minutos (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific, USA) e a fase correspondente ao RNA foi retirada (fase aquosa). Posteriormente, o material foi precipitado com 100% de álcool isopropílico (Merck, Alemanha), ressuspendido em 10 μ L de água tratada com DEPC e armazenado a temperatura de -70°C. A concentração de RNA foi realizada através de espectrometria em um biofotômetro (Nanodrop, ND-1000).

3.5.1.2 Obtenção de cDNA

Para a obtenção de cDNA, inicialmente foi adicionada nas amostras de RNA (4 μ g) 1U de "DNase I amplification grade" (Invitrogen), 1 μ L de tampão 10X e água com DEPC para um volume final de reação de 10 μ L. Este material foi incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente. Após este período, foi adicionado 1 μ L de EDTA (25mM) para inativação da enzima e incubado a 65°C por 10 minutos. Em seguida, foi realizada a reação de transcrição reversa (RT-PCR). Para esta reação foi utilizado o volume de 10 μ L da solução contendo o RNA, 1 μ L de Oligo (dT) (50 μ M) (Invitrogen) e 1 μ L de uma mistura de DNTPS (10mM) (Invitrogen) em um volume final de reação de 12 μ L. Esta reação foi mantida a 65°C por 5 minutos. Após este período, o material foi colocado imediatamente em gelo por 5 minutos, e foi adicionado 7 μ L de uma mistura contendo 4 μ L tampão "first-Strand" 5X, 2 μ L de dithiotreitol (DTT) e 1 μ L RNase OUT (40U/ μ L), sendo esta reação incubada a 42°C por 5 minutos. Finalmente, foi adicionado 1 μ L da enzima SuperScript II (Invitrogen), que seguiu um programa de incubação de 50 minutos a 42°C e posteriormente 15 minutos a 70°C. O cDNA foi armazenado a uma temperatura de -70°C.

3.5.1.3 Reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa em tempo real quantitativa (qRT-PCR)

A análise do padrão da expressão dos genes *SALL4* e *CHFR* em pacientes com SMD primária foi realizada pela metodologia de qRT-PCR. Foi utilizado como controles amostras de medula óssea de doadores para o TCTH e para o controle interno da reação foi utilizado o gene “housekeeping” β -actina. Para cada reação foi utilizado 60ng de cDNA, 1,25 μ M de cada oligonucleotídeo dos genes pesquisados e 5 μ l Syber-green RT-PCR Master Mix (Sigma). As sequências dos oligonucleotídeos de cada gene e as condições de ciclagem estão descritas na Tabela 9. Em cada reação foram realizados 50 ciclos e todas as amostras foram feitas em triplicata. Para avaliar a eficiência de amplificação foi utilizado o método DDCT. As reações e análises foram realizadas utilizando o termociclador Corbett Research, Rotor-Gene 6000 serie software 1.7 (Qiagen, USA).

Tabela 9 – Oligonucleotídeos e condições de ciclagem utilizados para a análise de expressão dos Genes *SALL4* e *CHFR* em pacientes com síndrome mielodisplásica primária

Genes	Oligonucleotídeos (senso/ anti-senso)	Desnaturação	Anelamento	Extensão
<i>SALL4</i>	5'-TGCAGCAGTTGGTGGAGAAC-3' / 5'-TCGGTGGCAAATGAGACATTC-3'	95°C /20 segundos	60°C /45 segundos	72°C / 20 segundos
<i>CHFR</i>	5'-CGTAACATCCCGTCCTGACT-3' / 5'-GCTCTCTTCACCTCCAGTGC-3'	95°C /20 segundos	60°C /45 segundos	72°C / 20 segundos
β -actina	5' TGGAACGGTGAAGGTGACA 3' / 5' ATGTGCAATCAAAGTCCTCGGC 3'	95°C /20 segundos	60°C /45 segundos	72°C / 20 segundos

Legenda: AR- anemia refratária; ARSA- anemia refratária com sideroblastos em anel; AREB- anemia refratária com excesso de blastos; AREB-t- anemia refratária com excesso de blastos em transformação; LMMC- leucemia mielomonocítica crônica

3.5.2 Análise do Padrão da Expressão de SALL4 e CHFR e Avaliação de Células CD34+ por Imuno-histoquímica

A técnica de imunohistoquímica (IHQ) foi realizada em dois dias consecutivos. As lâminas comerciais, previamente tratadas com cargas (immunoSlide- Easy Path) contendo cortes de 3 μ m foram imersas em 3 banhos de 5 minutos em xilol, seguidos de banhos rápidos em álcool 100%, 90%, 80% e 70%. O excesso de álcool foi retirado em água corrente por 3

minutos. A recuperação antigênica ocorreu em Tampão Trilogy (Cell Marque), à temperatura de 98°C, utilizando-se o processo a vapor, por 30 minutos. O bloqueio de peroxidase e o bloqueio de proteína foi feito utilizando-se o kit NovoLink Max Polymer Detection (Leica Microsystems), por 5 minutos cada. A incubação com o anticorpo primário foi realizada “overnight”, a 4°C. Foram utilizados os anticorpos primários para CD34 (clone QBEnd/10, diluição 1:10, Dako), para SALL4 (clone 6E3, diluição 1:500, Cell Marque) e para CHFR (clone ab83304, diluição 1:800, Abcam).

No segundo dia de técnica, as lâminas foram incubadas com o anticorpo pós-primário e com o polímero (Novolink), ambos por 30 minutos. Para a revelação da reação utilizou-se o cromógeno DAB, por 3 minutos. A contra coloração foi feita com a hematoxilina, por 30 segundos. Utilizamos o DAB, kit Novolink e a hematoxilina de Haris. Após a retirada do excesso de hematoxilina em água corrente, as lâminas foram imersas em banhos de 70%, 80%, 90%, 100% e xilol. Utilizou-se o bálsamo, para a montagem das lâminas, que foram analisadas ao microscópio óptico.

3.6 Análise estatística

Inicialmente as análises estatísticas foram conduzidas com o pacote estatístico R, versão 2.11.1 (DALGAARD, 2010). Para compor as análises de sobrevida, utilizaram-se as seguintes variáveis: classificação OMS, IPSS, IPSS-R, análise citogenética, celularidade, relação mieloide:eritroide, quantidade de megacariócitos, presença de micromegacariócitos, hipobulção nuclear megacariocítica, arquitetura medular, ALIP, presença de células CD34+, megaloblastos, alterações estromais e fibrose medular. O tempo de sobrevida (em meses) foi estabelecido como o período decorrente da data do diagnóstico até o último evento. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier para cada variável e o teste de Log-Rank para comparar os tempos de sobrevida entre os grupos de cada variável. Este teste identifica se as curvas de Kaplan-Meier apresentam diferença entre os grupos estudados. Há diferença estatisticamente significativa quando valor de p for menor que 0,05 (SHROUT; FLEISS, 1979; STREINER; NORMAN, 2003).

O teste de Stuart-Maxwell foi utilizado para comparar o mielograma com a biópsia de medula óssea, exceto a contagem de blastos. Todos os pacientes realizaram os dois métodos, sendo considerado um teste pré-pós. Quando o valor de p é significativo (menor

que 0,05), há uma diferença estatisticamente significativa entre mielograma e biópsia (STUART,1955; MAXWELL, 1970). A análise dos dados foi realizada para verificar a associação entre as variáveis morfológicas, as classificações OMS, IPSS e citogenética utilizando-se o teste exato de Fisher (CLARKSON et al, 1993).

Em seguida, para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0. (Graphpad Software, Inc., São Diego, CA, EUA). O teste de Mann-Whitney foi utilizado para as comparações não paramétricas realizadas para análise do padrão de expressão de SALL4 e CHFR em pacientes com SMD e doadores, a presença e ausência de ALIP, a quantidade de células CD34 (menor que 1% e igual ou maior que 1%), cariótipo normal e anormal. Também foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para análise do padrão de expressão de SALL4 e CHFR em pacientes com SMD em relação à celularidade (hiper celular, normocelular e hipocelular), os grupos de prognóstico citogenéticos segundo o IPSS e IPSS-R, em relação aos controles e evolução e não evolução para LMA. Foi considerado estatisticamente significativo, valores de p inferiores a 0,05.

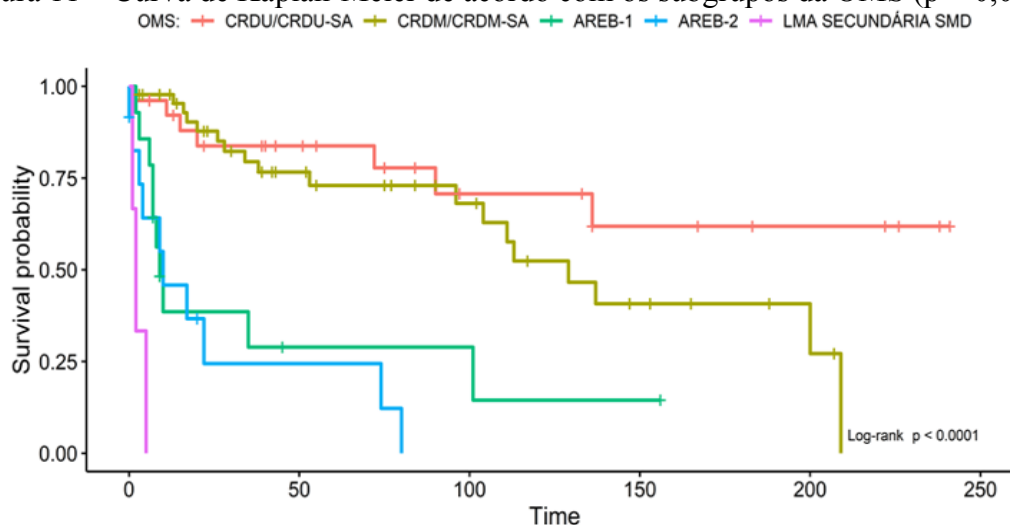
4 RESULTADOS

4.1 Análise das Características Clínicas dos Pacientes com SMD Primária

Foram avaliados 100 pacientes com SMD primária diagnosticados e acompanhados pelo Serviço de Hematologia do HUPE-UERJ, Serviço de Hematologia do INCA e do Centro de Transplante de Medula Óssea do INCA entre 2000 e 2020. A idade média dos pacientes foi de 58,7 anos, variando de 20 a 91 anos, sendo 40 pacientes do sexo masculino e 60 pacientes do sexo feminino. Na época do diagnóstico, os pacientes apresentavam os seguintes índices hematimétricos médios: hemoglobina de 9,16g/dL, leucometria de 9.497 células/mm³, monócitos totais de 952 células/mm³, número de plaquetas de 45.593 células/mm³ e, respectivamente, as seguintes medianas: hemoglobina de 8,9g/dL, leucometria de 4.550 células/mm³, monócitos totais de 360 células/mm³ e número de plaquetas de 198 células/mm³. Os pacientes foram classificados segundo a classificação OMS em citopenia refratária com displasia em uma linhagem - CRDU (25 pacientes), citopenia refratária com displasia em multilinhagem - CRDM (44 pacientes), citopenia refratária com displasia em uma linhagem com sideroblastos em anel - CRDU-SA (1 paciente), citopenia refratária com displasia em multilinhagem com sideroblastos em anel - CRDM-SA (1 paciente), síndrome mielodisplásica com excesso de blastos 1 – SMD-EB-1 (14 pacientes), síndrome mielodisplásica com excesso de blastos 2 - SMD-EB-2 (12 pacientes) e três pacientes com LMA secundária a SMD.

A sobrevida média nos pacientes CRDU e CRDU-SA foi de 92,8 meses, variando de 1 a 241 meses. Nos grupos CRDM e CRDM-SA, a sobrevida média foi de 71,2 meses, variando de 1 a 209 meses, enquanto que nos pacientes do grupo AREB-1 e AREB-2, foi de 28,9 meses e de 20 meses, com variação entre 1 a 156 meses e entre 0,1 a 80 meses, respectivamente. Os pacientes com LMA secundária a SMD apresentaram sobrevida média de 2,7 meses, variando entre 1 e 5 meses. Essa diferença de sobrevida está ilustrada na Figura 11(p < 0,0001).

Figura 11 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com os subgrupos da OMS ($p < 0,0001$)



Fonte: A autora, 2022.

Durante o acompanhamento clínico desses pacientes, 49 faleceram, sendo 25 pacientes devido à evolução para LMA, representando 51% do total de óbitos. Esses pacientes eram dos subgrupos: CRDU (2), CRDM (3), CRDM-SA (1), AREB-1 (8) e AREB-2 (12). Os outros 15 pacientes foram ao óbito devido às causas cardiovasculares, metabólicas, infecciosas ou por doença de enxerto x hospedeiro (DECH) pós transplante de medula óssea. Nos grupos CRDU e CRDM as outras causas foram: infarto agudo do miocárdio acometendo dois pacientes, insuficiência cardíaca (1 paciente), pneumonia fúngica (1 paciente), pneumonia bacteriana (2), endocardite relacionada à prótese mitral (1 paciente), neutropenia febril (1), choque séptico (1), DECH (1) e peritonite fecalóide como complicação de endoscopia digestiva baixa (1 paciente). Em oito pacientes a causa mortis não foi determinada, sendo 5 pacientes com CRDM, dois com CRDU e um com CRDU-SA. Nos subtipos AREB-1 e AREB-2, um paciente faleceu em decorrência de pneumonia associada à DPOC, um devido a choque séptico, um por complicações de diabetes e outro por neutropenia febril.

4.2 Análise das Características Morfológicas através da Biópsia de Medula Óssea em Pacientes com SMD Primária

A análise morfológica das biópsias de medula óssea foi realizada considerando-se o componente celular e estromal. A morfologia das biópsias de medula óssea foi avaliada em conjunto com o estudo imuno-histoquímico para CD34. Para esse objetivo, os pacientes foram agrupados segundo os subtipos da classificação OMS em fase inicial da doença (CRDU,

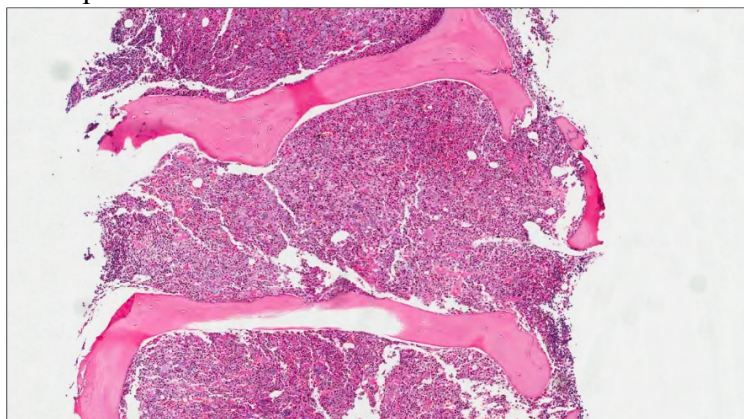
CRDM, CRDU-SA e CRDM-SA) - 71 pacientes e em fase avançada (AREB-1, AREB-2 e LMA secundária a SMD) - 29 pacientes.

Além disso, foram estratificados pela escala de prognóstico IPSS-R em 1) menor risco (muito baixo risco e baixo risco) - 54 pacientes, em 2) risco intermediário (intermediário) – 21 pacientes e em 3) maior risco (alto risco e muito alto risco) - 26 pacientes.

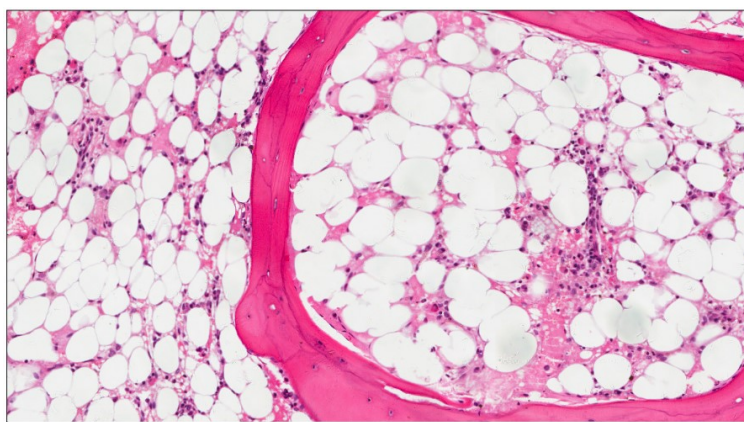
4.2.1 Estudo da Celularidade da Medula Óssea

Em relação à celularidade medular do grupo de pacientes com doença inicial, a medula óssea foi hiper celular em 38 pacientes (53,52%), normocelular em 21 (29,58%) e hipocelular em 12 pacientes (16,9%). Exemplos de celularidade medular podem ser observados na Figura 12. Por outro lado, no grupo de pacientes com doença avançada, 23 (79,31%) possuíam medula óssea hiper celular. Outros pacientes (17,24%) com doença avançada foram classificados como hipocelular e um paciente (3,45%) foi considerado normocelular ($p = 0,006813$).

Figura 12 – Exemplos de celularidade da medula óssea



(a) Paciente com medula óssea hipercelular classificado como CRDU-SA



(b) paciente com medula óssea hipocelular classificado como LMA secundária à SMD

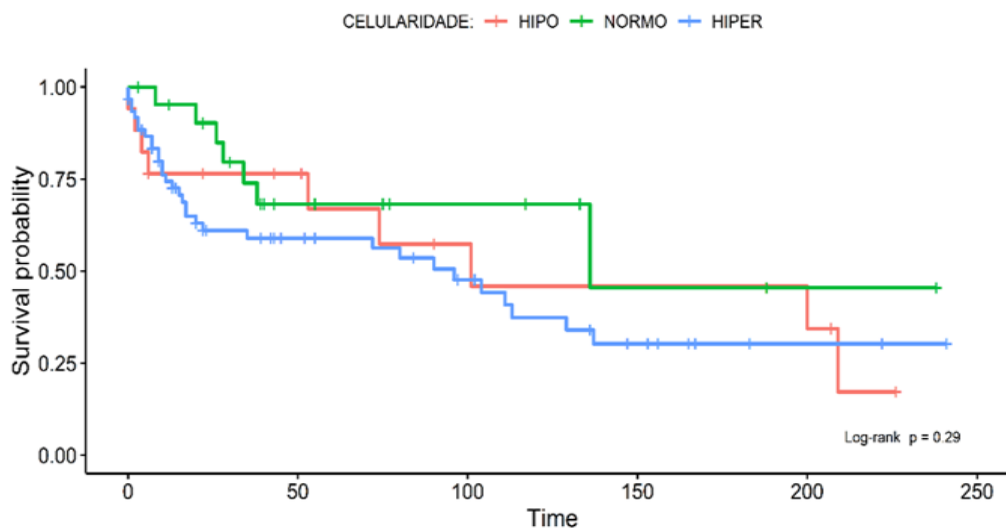
Legenda: Coloração de Hematoxilina e Eosina, 10X e 400x, respectivamente.

Fonte: A autora, 2022.

Durante a avaliação do risco de evolução leucêmica, foi verificado que no grupo de pacientes com menor risco de evolução leucêmica, 30 pacientes (55,56%) possuíam medula óssea hipercelular. Ainda nesse grupo, a medula óssea foi considerada normocelular em 15 pacientes (27,78%) e em outros nove pacientes (16,67%), foi considerada hipocelular. No grupo de pacientes de risco intermediário, 11 pacientes (52,38%) apresentaram medula óssea hipercelular, seis pacientes (28,57%) normocelular e quatro (19,05%) pacientes a medula óssea foi considerada hipocelular. No grupo de pacientes com maior risco de transformação leucêmica, apenas um paciente (4%) havia medula normocelular. A maioria dos pacientes desse grupo, 20 pacientes (80%) possuíam medula óssea hipercelular. Quatro pacientes (16%) apresentaram medula óssea hipocelular ($p = 0,0921$).

O estudo de sobrevida não revelou diferença entre os pacientes que possuíam medula óssea hipercelular, normocelular e hipocelular ($p = 0,29$), como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com celularidade em biópsia de medula óssea classificada em hipercelular (Hiper), normocelular (Normo) e hipocelular (Hipo) ($p = 0,29$)

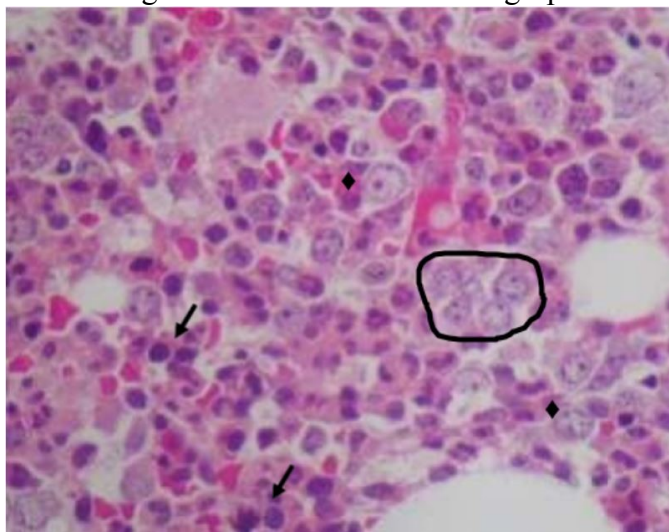


Fonte: A autora, 2022.

4.2.2 Avaliação da Arquitetura Medular em SMD Primária

A avaliação da arquitetura da medula óssea foi realizada de modo global, das três linhagens em conjunto (Figura 14). Entre os pacientes com doença na fase inicial, três (4,23%) foram classificados com alteração arquitetural importante, 27 (38,03%) como moderada e 36 (50,70%) de modo discreto. Em cinco pacientes, não foram observadas alterações arquiteturais. No grupo de pacientes com doença avançada, esse achado morfológico acometia 15 pacientes (51,72%) deste grupo de forma importante, 10 pacientes (34,48%) de forma moderada e quatro pacientes (13,79%) de forma discreta ($p < 0,0001$).

Figura 14 – Medula óssea de paciente com AREB-2 apresentando precursores mieloides imaturos no espaço trabecular agrupados (ALIP delimitado por—), outros isolados (identificado com ♦) e células da linhagem eritroide sem delimitar grupamentos (→)

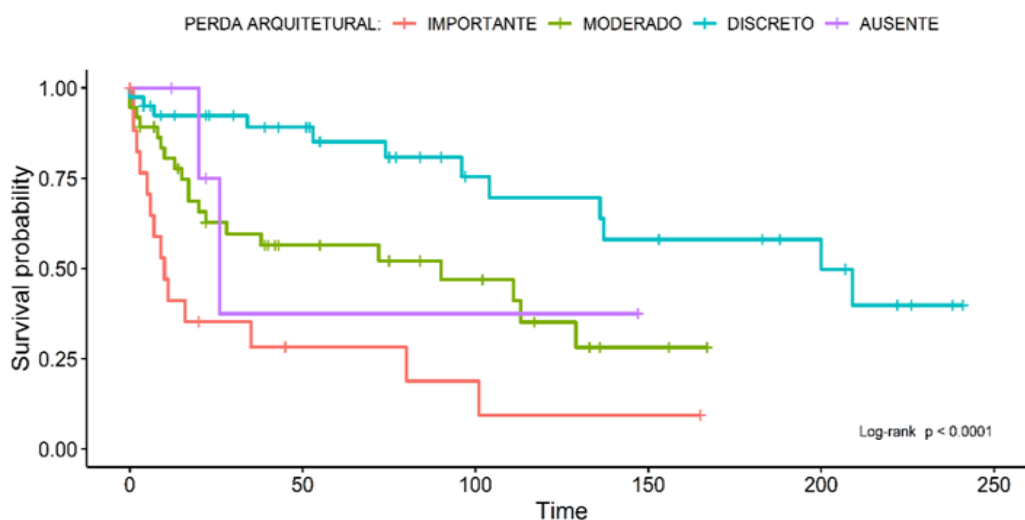


Legenda: Coloração de Hematoxilina e Eosina, 400x
Fonte: A autora, 2022.

Em relação aos grupos de prognóstico pelo IPSS-R, a maioria dos pacientes com alto risco e muito alto risco, apresentaram perda arquitetural considerada importante, correspondendo a 12 pacientes (48%), enquanto que aqueles com muito baixo risco ou com baixo risco a perda arquitetural foi considerada principalmente de moderada a discreta em 19 (35,18%) e 28 (51,85%) pacientes, respectivamente. Os pacientes no grupo intermediário apresentaram principalmente perda arquitetural discreta, sendo observada em 10 (47,61%) pacientes ($p < 0,001$).

Esses grupos de pacientes com alteração arquitetural considerada importante e moderada e demonstraram possuir uma diferença significativa de sobrevida em relação aos pacientes com essa alteração discreta ou ausente ($p < 0,0001$) (Figura 15).

Figura 15 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com perda de orientação arquitetural avaliada em biópsia de medula óssea considerada como importante, moderada e discreta e ausente ($p < 0,0001$)

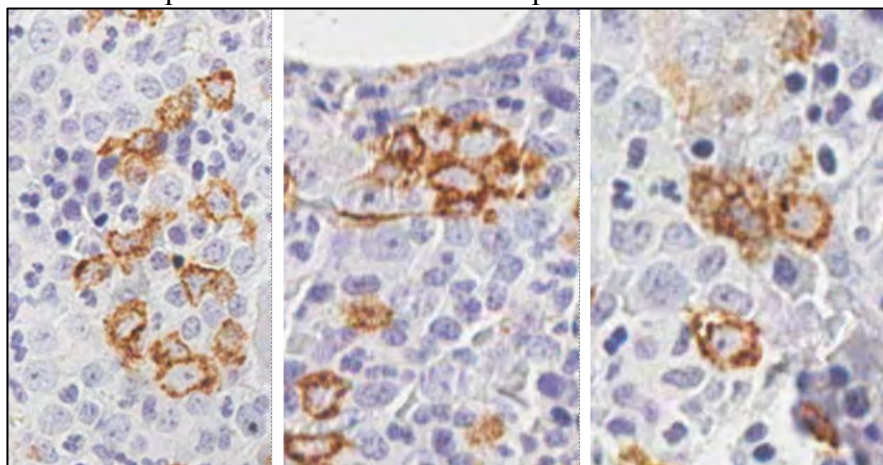


Fonte: A autora, 2022.

4.2.3 Análise das Características da Linhagem Mieloide

A linhagem mieloide foi avaliada para a presença de precursores imaturos de localização anormal (ALIP) e de células CD34 positivas isoladas (Figura 16). A presença de ALIP foi visualizada principalmente na medula óssea dos pacientes na fase avançada da doença. Nesse grupo de pacientes, 10 (34,9%) possuíam essa alteração considerada como importante, três (10,34%) como moderada e quatro pacientes (13,8%) como discreta. Doze pacientes (41,4%) desse grupo não apresentaram ALIP ($p < 0,001$). Na fase inicial da doença, em dois pacientes (2,8%) evidenciou-se a presença de ALIP como moderada e em cinco pacientes (7,04%) como discreto. Os demais 64 pacientes (90,1%) desse grupo não apresentaram essa alteração.

Figura 16 – Grupamento de células CD34 positivas (ALIP) e outras células isoladas marcadas pela imuno-histoquímica em medula óssea de paciente com AREB-2

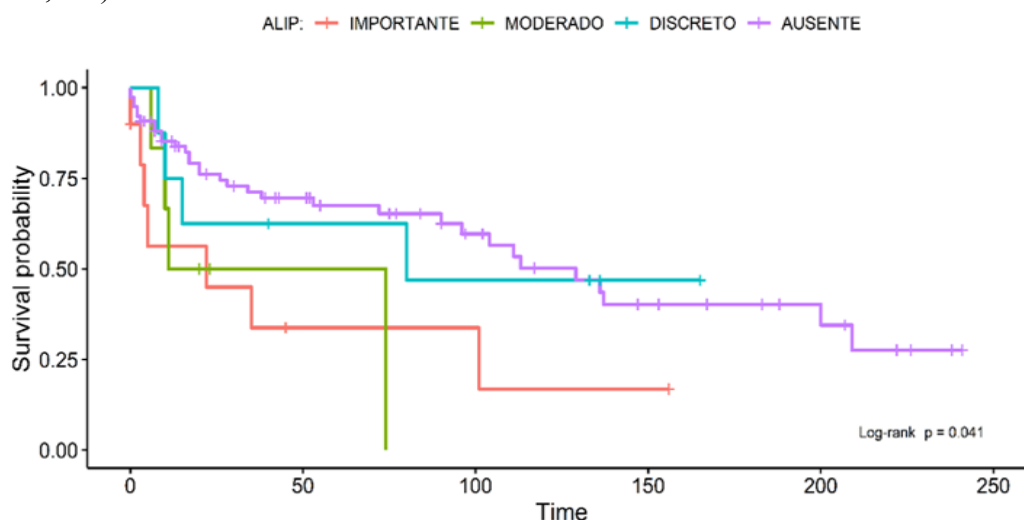


Fonte: A autora, 2022.

De acordo com o grupo de risco prognóstico pelo IPSS-R, a maioria dos pacientes de baixo risco ou de muito baixo risco - 50 pacientes (92,59%) - não apresentaram ALIP na biópsia de medula óssea. Por outro lado, ao pacientes com muito alto risco ou alto risco apresentaram ALIP considerado importante em 8 pacientes (32%), moderado em 4 pacientes (16%) e discreto em outros 4 pacientes (16%). No grupo intermediário, dois pacientes (9,5%) apresentaram ALIP de modo importante e outros dois pacientes (9,5%) de modo discreto ($p < 0,001$).

O estudo de sobrevida comparando os pacientes sem ALIP e com ALIP considerado como importante, moderado e discreto evidenciou diferença significativa entre esses grupos ($p = 0,041$) como pode ser observado na Figura 17.

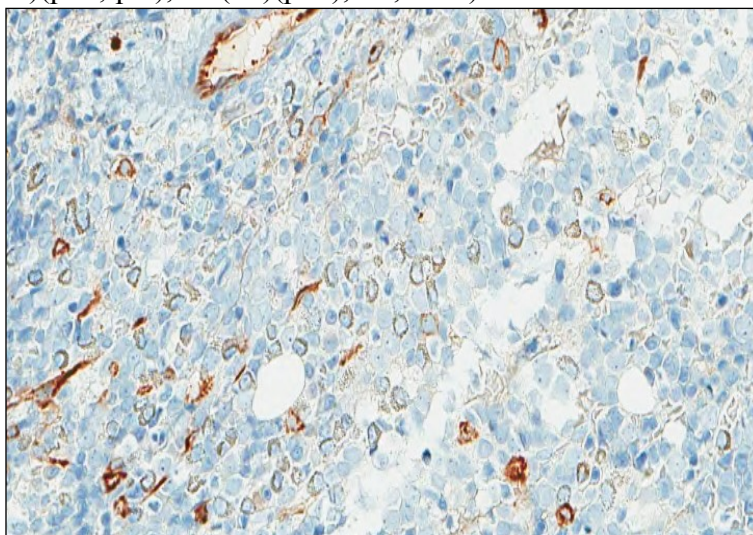
Figura 17 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de ALIP considerada como importante, moderado e discreto e a sua ausência na biópsia de medula óssea ($p = 0,041$)



Fonte: A autora, 2022.

Posteriormente, excluiu-se os pacientes com ALIP para analisar o valor da presença de células CD34 positivas isoladas, sem formar grupamentos, nas biópsias de medula óssea dos pacientes estudados. No grupo da fase avançada da doença, seis pacientes (50%) possuíam células CD34 positivas isoladas, como pode ser observado na Figura 18. No grupo de pacientes na fase inicial da doença, 50 pacientes (79,68%) não apresentavam células CD34 positivas, enquanto que 13 pacientes (20,31%) possuíam células isoladas imunorreativas para CD34. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p = 0,06239$).

Figura 18 – Células CD34 positivas isoladas em medula óssea hiper celular em paciente classificado como CRDM e com cariótipo complexo (44,XY,del(4)(q31),-5,-7,t(12;19)(p12;q11),add(17)(p13),-18,+mar)

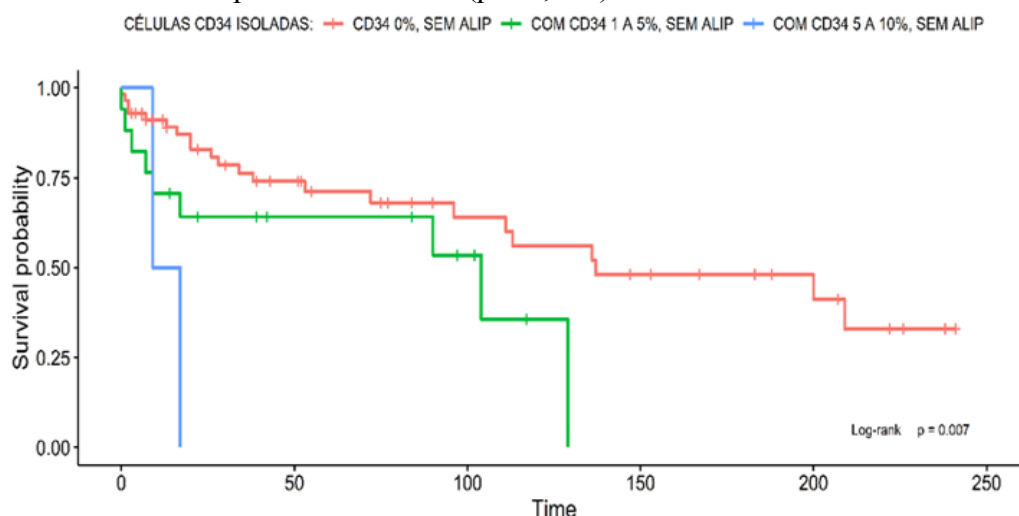


Fonte: A autora, 2022.

Na avaliação do risco de evolução leucêmica, entre os pacientes com maior risco (alto e muito alto risco) cinco pacientes (20%) possuíam células CD34 positivas isoladas e 20 pacientes (80%) não possuíam essa alteração morfológica. Entre os pacientes com menor risco (muito baixo e baixo risco) 10 (18,52%) pacientes apresentaram células CD34 isoladas. Quarenta e quatro pacientes (81,48%) desse grupo não apresentaram células CD34 positivas isoladas. No grupo de risco intermediário, quatro (19%) apresentaram essa alteração e em 17 essas células não foram observadas. ($p = 0,08662$).

A análise comparativa da sobrevida entre os grupos de pacientes sem ALIP e sem células CD34 com aqueles com células CD34 isoladas variando de 1% a 5% e de 5% a 10% mostrou diferença estatística ($p = 0,007$) como pode ser observado na Figura 19. Não houveram pacientes com mais de 10% de células CD34 sem formar ALIP.

Figura 19 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de ALIP e de porcentagem de células CD34 positivas isoladas ($p = 0,007$)



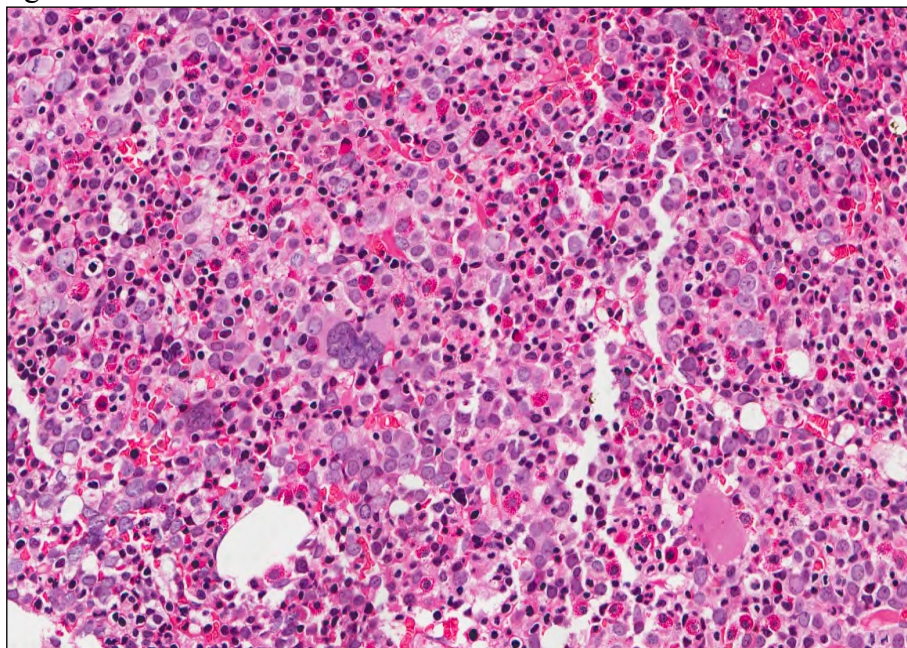
Fonte: A autora, 2022.

4.2.4 Análise das Características da Linhagem Eritroide

Outro aspecto morfológico estudado foi a presença de megaloblastos na avaliação da linhagem eritroide em biópsia de medula óssea (Figura 20). Na fase inicial da doença, em oito pacientes (11,27%) a presença de megaloblastos foi considerada como importante e 18 (25,35%) pacientes tiveram esse achado considerado moderado. Em 18 pacientes (25,35%) a presença de megaloblastos foi considerada como discreto. Não foram observados megaloblastos em 27 pacientes (38,03%). Na fase avançada da doença, quatro pacientes (13,79%) foram considerados com esse achado como importante e outro paciente como moderado. Sete pacientes (24,14%) desse grupo apresentavam megaloblastos de modo discreto. Em 17 pacientes (58,62%) desse grupo, não foram observados megaloblastos. Houve diferença significativa entre esses dois grupos ($p=0,0428$). Entre os pacientes com maior risco de evolução leucêmica, 20 pacientes (80%) apresentaram megaloblastos de forma discreta ou ausente, um apresentou de forma moderada e quatro pacientes (16%) possuíam megaloblastos de forma importante. O grupo de pacientes com menor risco para desenvolvimento de leucemia, a maioria dos pacientes, 36 pacientes (66,7%), apresentou essa alteração morfológica de modo discreto ou ausente. Entre os demais pacientes desse grupo, 13 (24%) pacientes apresentaram megaloblastos de forma moderada, enquanto que cinco pacientes (9,3%) possuíam megaloblastos de modo importante. Nos pacientes do grupo intermediário, três (14,3%)

apresentaram megacariócitos de modo importante e cinco, moderado (23,8%). Treze pacientes (61,9%) apresentaram megacariócitos de modo discreto ou ausente ($p = 0,3968$).

Figura 20 – Hiperplasia eritróide com numeroso megaloblastos em medula óssea hipercelular de paciente masculino, 52 anos com anemia e plaquetopenia, classificado como ARSA e apresentando displasia em três linhagens. Presença de 1% blasto no mielograma

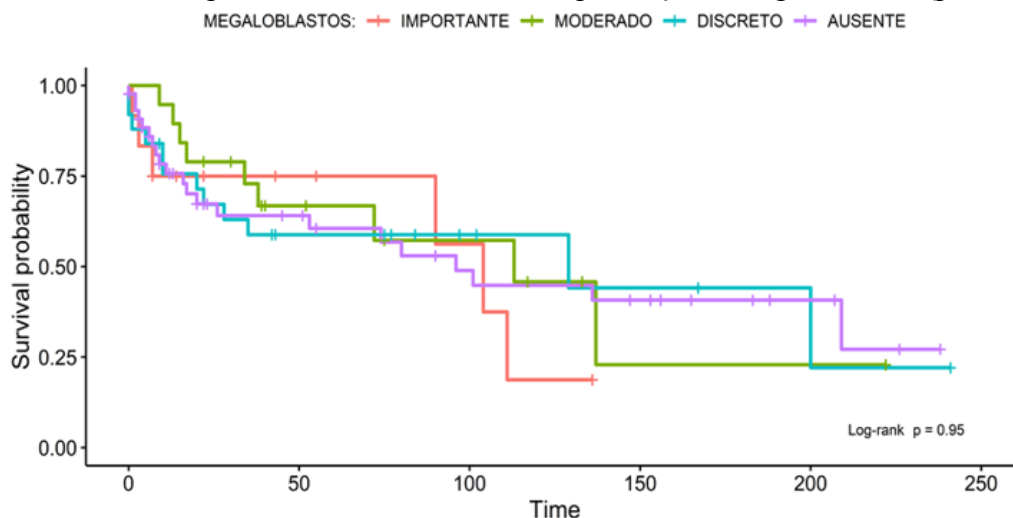


Legenda: Coloração pelo HE, aumento de 400x.

Fonte: A autora, 2022.

A análise de sobrevida dos pacientes com e sem megaloblastos na biópsia de medula óssea revelou que os pacientes que possuíam esta alteração morfológica na ocasião do diagnóstico não apresentavam diferença de sobrevida em relação aos demais pacientes ($p = 0,95$) como pode ser observado na Figura 21.

Figura 21 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de megaloblastos ($p = 0,95$)



Fonte: A autora, 2022.

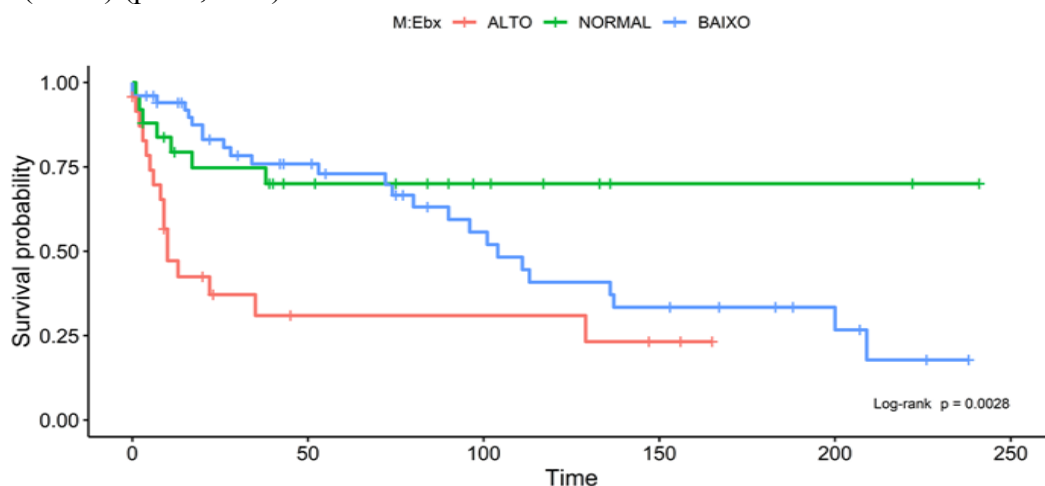
4.2.5 Avaliação da Relação Mieloide: Eritroide

Ao avaliar a relação mieloide:eritroide (M:E), 46 pacientes (64,79%) do grupo com doença inicial apresentavam redução da relação M:E. Vinte (20) pacientes (28,17%) desse grupo não demonstraram alteração dessa relação. Somente em quatro (5,63%) pacientes evidenciou-se relação mieloide:eritroide aumentada. Enquanto isso, nos pacientes com doença avançada, o aumento da relação mieloide:eritroide, foi observada em 19 pacientes (65,52%). Cinco pacientes com doença avançada (17,24%) apresentavam relação M:E reduzida e outros cinco pacientes (17,24%) com relação M:E dentro da normalidade. Houve significância estatística entre os grupos ($p < 0,001$).

Foi avaliado o risco de progressão leucêmica dos pacientes de acordo com a relação mieloide: eritroide. Dezesesseis pacientes (64%) com maior risco possuíam esta relação aumentada e três (12%) possuíam valores reduzidos. Seis pacientes (24%) essa relação foi normal nesse grupo. Por outro lado, a quantidade de pacientes no grupo de baixo risco com relação mieloide: eritroide reduzida foi significativamente maior ($p < 0,001$), compreendendo 35 pacientes (64,81%). Além desses pacientes, três (5,56%) com relação mieloide:eritroide aumentada e 16 (29,63%) com esta relação normal. No grupo de pacientes com risco intermediário de evolução leucêmica, quatro (19%) apresentavam aumento da relação M:E, três (14,3%) essa relação foi considerada normal e em 14 (66,7%) pacientes essa relação foi considerada reduzida.

Os pacientes com relação mieloide:eritroide alterada apresentaram sobrevida reduzida quando comparados aos pacientes com esta relação normal ($p < 0,0028$) (Figura 22).

Figura 22 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com relação mieloide:eritroide pela avaliação da biópsia de medula óssea distribuídos em aumentada (alto), normal e reduzida (baixo) ($p < 0,0028$)

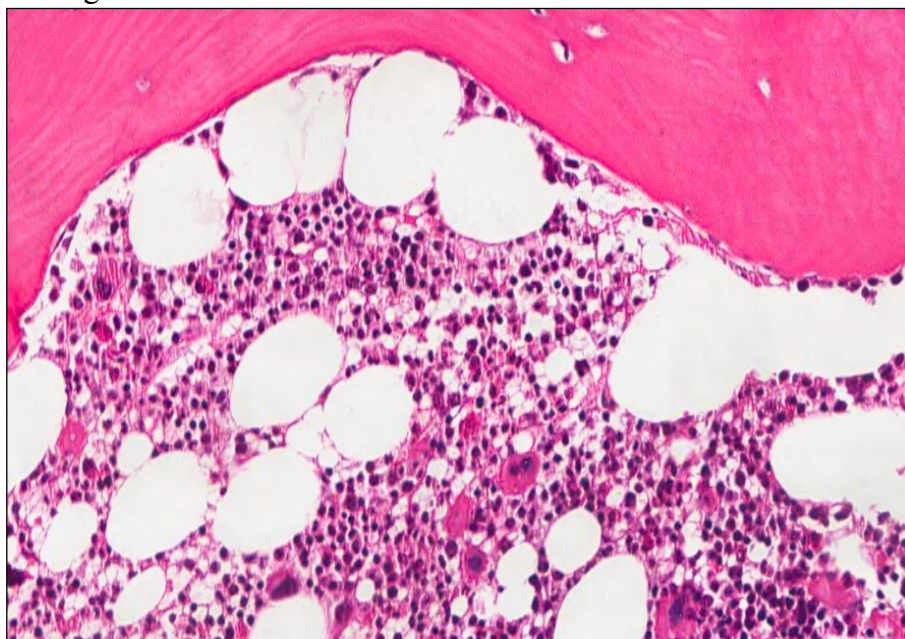


Fonte: A autora, 2022.

4.2.6 Análise das Características da Linhagem megacariocítica

Na avaliação quantitativa da linhagem megacariocítica, nos pacientes do grupo com doença inicial, 43 (60,6%) tinham quantidades consideradas normais de megacariócitos e 13 (18,3%) possuíam quantidades reduzidas (Figura 23). Quinze pacientes (21,1%) apresentaram número de megacariócitos aumentados. Dos pacientes do grupo com doença avançada, em oito (27,6%) houve aumento da linhagem megacariocítica. Em sete pacientes (24,1%) o número de megacariócitos encontrava-se reduzido e em 14 pacientes (48,3%) foi observado quantidades normais de megacariócitos ($p < 0,5199$).

Figura 23 – Medula óssea hipercelular de paciente, masculino, de 21 anos, classificado como AREB-2. Presença de ninhos eritroides e de numerosos megacariócitos juntos as trabéculas ósseas. Há acentuada hipolobulação nuclear de megacariócitos e micromegacariócitos



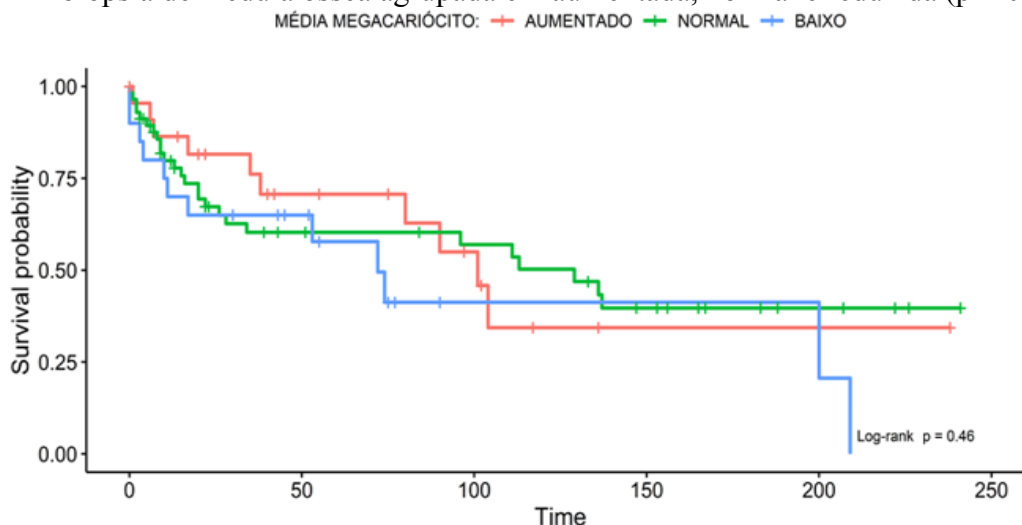
Legenda: Coloração pelo HE, aumento de 400x.

Fonte: A autora, 2022.

A avaliação do risco para evolução leucêmica revelou que os pacientes do grupo com menor risco apresentaram na sua maioria quantidades normais de megacariócitos. 36 pacientes (66,67%) possuíam quantidades normais e sete (12,96%) tinham quantidades reduzidas. Outros 11 pacientes (20,37%) deste grupo possuíam quantidades aumentadas de megacariócitos. Nos pacientes com risco intermediário de evolução da doença, sete (33,33%) a quantidade de megacariócitos mostrou-se aumentada, oito (38,1%) a quantidade foi normal e em seis (28,57%) foi reduzida. No grupo de pacientes de maior risco para evolução leucêmica, cinco (20%) apresentavam quantidades aumentadas, enquanto sete pacientes (27%) possuíam quantidades reduzidas. Treze pacientes (53%) desse grupo apresentavam quantidades normais de megacariócitos ($p < 0,149$).

A avaliação da sobrevida estratificando os pacientes pelo número de megacariócitos em aumentado, normal e baixo não evidenciou diferença entre os grupos ($p < 0,46$), conforme pode ser observado na Figura 24.

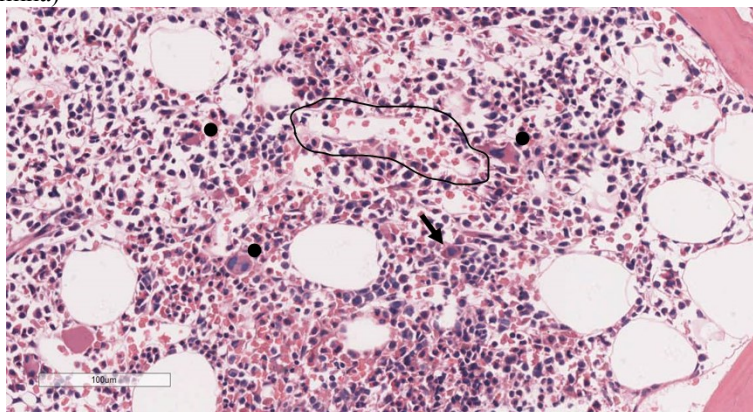
Figura 24 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a quantificação de megacariócitos pela biópsia de medula óssea agrupada em aumentada, normal e reduzida ($p = 0,46$)



Fonte: A autora, 2022.

A análise qualitativa da linhagem megacariocítica evidenciou que quando estavam presentes alterações citológicas, essas eram expressas como micromegacariócitos e com hipolobulação nuclear, como pode ser observado na Figura 25. Ao considerar a fase da doença, verificou-se que 11 pacientes (15,5%) em doença inicial apresentavam micromegacariócitos em quantidade considerada de modo importante e 11 pacientes de modo moderado (15,5%). Vinte e oito pacientes (39,4%) apresentavam essas alterações morfológicas de forma discreta e 21 pacientes (29,6%) houve ausência de micromegacariócitos. No grupo de pacientes em doença avançada, sete (24,1%) apresentavam na biópsia de medula óssea quantidade de micromegacariócitos considerada como importante e em sete (24,1%) pacientes essa alteração foi considerada moderada. Em outros sete pacientes (24,1%), este achado foi considerado como discreto e em oito pacientes (27,6%) foi ausente. Não houve significância estatística entre os grupos ($p = 0,3604$).

Figura 25 – Paciente AREB-2 com cariótipo normal apresentando medula óssea hipercelular com micromegacariócito (→) e megacariócitos com hipolobulação nuclear (●). Observa-se ectasia sinusoidal (linha)



Legenda: Coloração pelo HE, aumento de 400x.

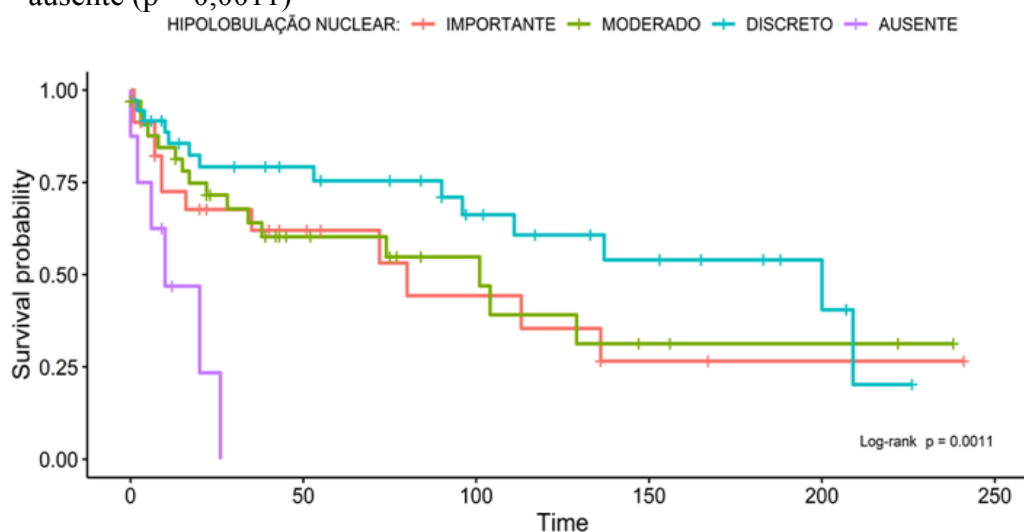
Fonte: A autora, 2022

Na avaliação da hipolobulação nuclear megacariocítica de acordo com a fase da doença, verificou-se que 10 pacientes (34,5%) em doença avançada apresentavam essa alteração de modo importante, 11 pacientes (37,9%) apresentavam essa alteração morfológica como moderada e outros quatro (13,7%) como discreta. No grupo de pacientes em doença inicial, 13 (18,3%) apresentavam na biópsia de medula óssea hipolobulação nuclear de megacariócitos considerada como importante e em 22 pacientes (31%) como moderada. Em 32 pacientes (45,2%), esses achados foram considerados como discretos. Houve significância estatística entre os grupos ($p = 0,0113$).

Na avaliação do risco de evolução leucêmica foi verificado que no grupo de maior risco, seis pacientes (24%) apresentaram hipolobulação nuclear megacariocítica de modo importante, enquanto 10 (40%) apresentaram de modo moderado e em nove pacientes (36%) não havia essa alteração ou foi considerada discreta. Nos pacientes com risco intermediário, em cinco (23,8%) foram observados megacariócitos com hipolobulação nuclear de modo importante, em seis (28,6%) foi considerado moderado e em 10 pacientes (47,6%) esse achado foi considerado discreto ou ausente. No grupo de menor risco, 12 pacientes (22,2%) apresentavam essa alteração considerada como importante e 17 pacientes (31,5%) como moderada. Em 25 pacientes (46,3%), essa alteração foi considerada discreta ou ausente. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p = 0,9947$).

Analizando a sobrevida dos pacientes em relação à hipolobulação nuclear, foi observado que houve diferença em relação a presença dessa alteração, seja importante, moderada ou discreta e a ausência de hipolobulação nuclear em megacariócitos ($p = 0,0011$), como pode ser observado na Figura 26.

Figura 26 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com hipobulção nuclear megacariocítica observada em biópsia de medula óssea em importante, moderada e discreta e ausente ($p = 0,0011$)



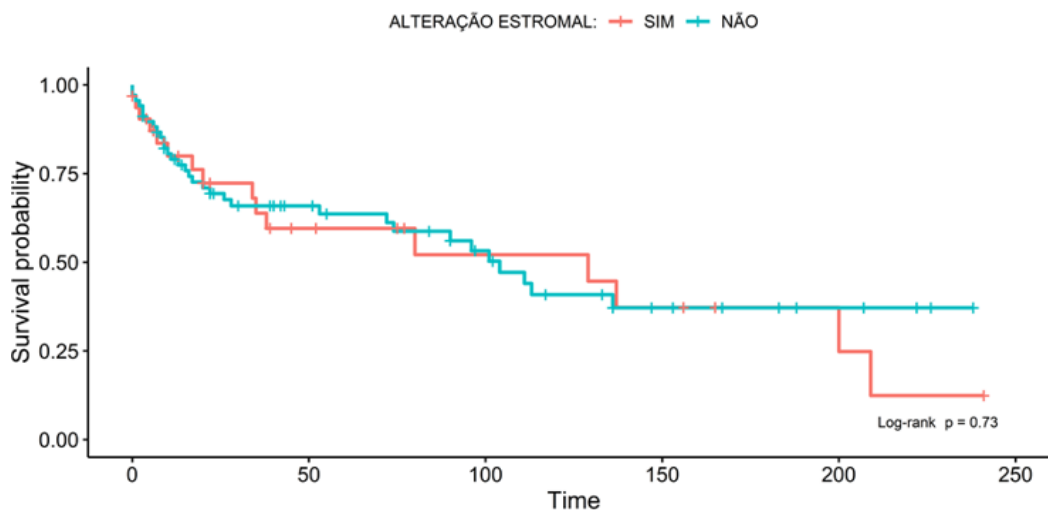
Fonte: A autora, 2022.

4.2.7 Análise do Componente Estromal

Entre os 100 pacientes estudados, 30 apresentavam alterações estromais consideradas moderadas (11) e discretas (19). Entre os pacientes com alterações moderadas, cinco encontravam-se na fase avançada da doença, sendo observado edema, nódulos linfóides, ectasia sinusoidal, além de plasmócitos e linfocitose. No grupo de pacientes com doença avançada também havia sete pacientes com alterações estromais discretas. No grupo da fase inicial da doença, seis apresentavam alterações estromais moderadas, onde foram observados edema, ectasia sinusoidal, macrófagos, linfocitose e nódulo linfóide. Outros 12 pacientes do grupo de doença inicial apresentaram alterações discretas ($p = 0,2198$). Em relação ao risco de evolução leucêmica pelo IPSS-R, 11 pacientes (44%) possuíam maior risco de evolução leucêmica (alto risco e muito alto risco), 9 (42,8%) do grupo intermediário e outros 10 pacientes (18,5%) apresentavam menor risco (muito baixo e baixo risco) ($p = 0,06969$).

A presença de alterações estromais, não significou diferença de sobrevida ($p = 0,73$), como se pode observar na Figura 27.

Figura 27 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de alterações estromais em biópsia de medula óssea ($p = 0,73$)

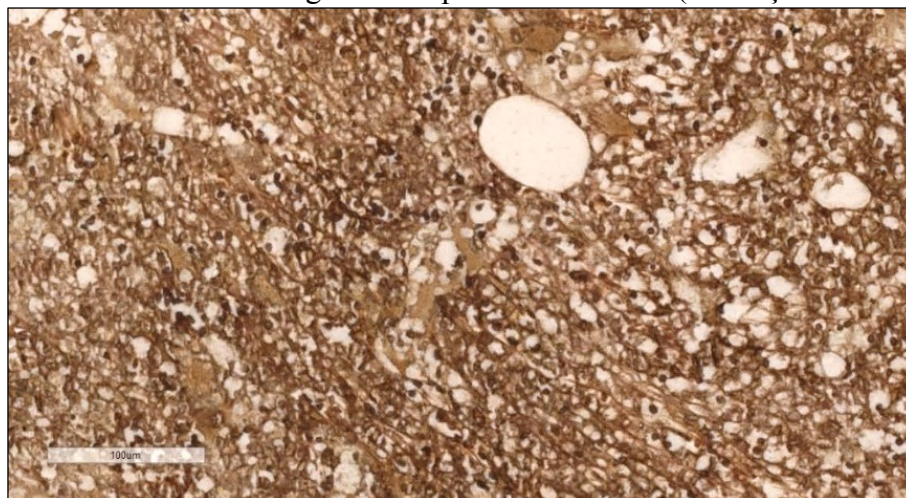


Fonte: A autora, 2022.

4.2.8 Avaliação de Fibrose Medular

A fibrose medular foi visualizada na coloração para reticulina em 24 pacientes. Em 14 pacientes, esta foi considerada grau I, sendo pela classificação da OMS, quatro CRDU, um CRDU-SA, quatro CRDM e um CRDM-SA. Na fase avançada, esse achado foi observado em três pacientes AREB-1 e em um paciente AREB-2, Figura 28. Em oito pacientes, a fibrose medular foi considerada grau II, dois deles classificados como CRDU, um com CRDM, um como AREB-1 e os outros quatro como AREB-2. A fibrose medular grau III foi observada em um paciente CRDM e em outro AREB-1. Ao analisar a fase da doença, no grupo com doença inicial encontramos 14 pacientes (19,72%) com fibrose medular e no grupo com doença avançada, encontramos 10 pacientes (34,49%). Observando-se uma relação da fibrose medular grau II ou III ser mais frequente no grupo de pacientes com doença avançada ($p = 0,0325$).

Figura 28 – Fibrose medular grau 2 em paciente AREB-2 (coloração reticulina)

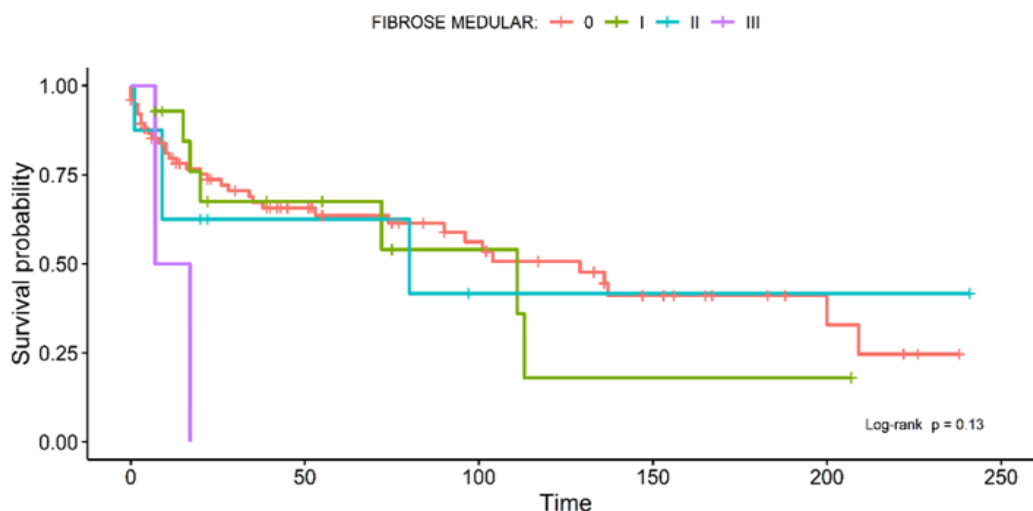


Fonte: A autora, 2022.

De acordo com o risco de evolução leucêmica pelo IPSS-R os pacientes com maior risco de evolução apresentaram fibrose medular grau II, acometendo três pacientes (12%). Nesse grupo, dois pacientes (8%) possuíam fibrose medular grau I. Nos pacientes classificados como muito baixo risco e baixo risco, nove (16,7%) possuíam fibrose medular grau I, outros dois (3,7%) apresentavam fibrose medular grau II e um (1,85%) apresentou fibrose medular grau III. No grupo dos pacientes de risco intermediário, um paciente (4,75%) apresentou fibrose medular grau III, três (14,3%) pacientes fibrose medular grau II e outros três (14,3%) apresentaram fibrose medular grau I ($p = 0,1924$).

O estudo da sobrevida estratificando os pacientes nos seguintes grupos: fibrose medular grau I, fibrose medular grau II, fibrose medular II e sem fibrose (grau 0) não evidenciou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,13$) (Figura 29).

Figura 29 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de fibrose medular grau I, II, II e ausente, grau 0, em biópsia de medula óssea ($p = 0,13$)



Fonte: A autora, 2022.

4.3 Análise Morfológica Comparativa entre Biópsia de Medula Óssea e Mielograma

As características encontradas no mielograma foram comparadas com aquelas observadas na biópsia de medula óssea realizada no mesmo período em cada paciente. A análise comparativa entre esses dois exames foi realizada avaliando-se os seguintes parâmetros: celularidade medular, relação mieloide:eritroide, número de megacariócitos, presença de micromegacariócito, de megacariócitos atípicos, de megaloblastos e de blastos mieloides. Como há parâmetros que somente a biópsia pode informar como arquitetura medular e fibrose medular, esses foram excluídos da avaliação. Além desses, o número de linhagens displásicas também foi excluído dessa comparação, pois, ao contrário do mielograma, na biópsia de medula óssea não há uma padronização dos parâmetros a serem avaliados para que essa análise possa ser feita, pois, há dificuldade em se estabelecer critérios e um ponto de corte para que as alterações, quando presentes, sejam significativas, principalmente em relação à linhagem eritróide que é frequentemente acometida. Além disso, foi excluída a análise do componente estromal, pois algumas alterações com edema e ectasia sinusoidal não podem ser avaliadas pelo mielograma. O mesmo acontece em relação a análise da mielofibrose.

A celularidade da medula óssea foi melhor analisada pela biópsia de medula óssea do que pelo mielograma ($p = 0,044$). Entretanto, não houve diferença entre a avaliação da relação mieloide:eritroide na utilização das duas metodologias ($p = 0,1958$). Esses dados podem ser observados na Tabela 10 –.

Tabela 10 – Comparação da celularidade medular e da relação mielóide:eritroide de pacientes com síndrome mielodisplásica primária analisados pelo mielograma e pela biópsia de medula óssea

Mielograma	Biópsia de Medula Óssea		
Celularidade			
	Hipercelular	Normocelular	Hipocelular
Hipercelular	34	3	4
Normocelular	10	6	2
Hipocelular	9	7	9
Relação M:E			
	Aumentada	Normal	Reduzida
Aumentada	12	7	8
Normal	5	12	10
Reduzida	7	27	4

Fonte: A autora, 2022.

A linhagem eritroide foi avaliada pela presença de megaloeritroblastos, pois é a única alteração morfológica dessa linhagem que foi possível de ser observada pelos dois métodos empregados. A partir dos dados obtidos, foi possível notar que não houve diferença entre o mielograma e a biópsia de medula óssea para verificar essa alteração ($p = 0,486$). A comparação dos dois métodos pode ser observada na Tabela 11.

Tabela 11 – Comparação da presença de megaloeritroblastos em pacientes com síndromes mielodisplásicas primária analisados pelo mielograma e pela biópsia de medula óssea

Mielograma	Biópsia de medula óssea	
	Presente	Ausente
Presente	35	29
Ausente	19	11

Fonte: A autora, 2022.

O estudo comparativo da presença de blastos na medula óssea foi realizado, separando os pacientes de acordo com a presença de ALIP pela biópsia de medula óssea em importante, moderada, discreta ou ausente e nos casos de ausência, foi verificado se tinha células CD34 positivas isoladas ou não. A contagem de blastos pelo mielograma foi separada em cinco grupos, sendo: $<1\%$, de 1% a 5% , entre 5% a $<10\%$, de 10% a $<20\%$ e de 20% ou mais de blastos. Foi verificado que a presença de blastos mielóides pelo mielograma não foi equivalente

à contagem de blastos usando o estudo imuno-histoquímico em biópsia de medula óssea. O mielograma mostrou-se melhor para avaliação de blastos mieloides quando estes eram entre 1% a 5% ($p < 0,001$), indicando que o mielograma e a biópsia devem ser usados de modo complementar (Tabela 12).

Tabela 12 – Comparação entre a presença de ALIP e células CD34 pela biópsia de medula óssea e a porcentagem de blastos analisados pelo mielograma em pacientes com síndromes mielodisplásicas primária

Mielograma	Biópsia de medula óssea				
	ALIP - importante	ALIP - moderada	ALIP - discreta	Sem ALIP e com células CD34 isoladas	Sem ALIP e sem células CD34 isoladas
<1%	0	1	4	6	38
1% a 5%	2	1	3	9	9
> 5% a < 10%	3	1	1	1	3
>10% a < 20%	3	2	0	3	0
>20%	2	1	0	0	2

Fonte: A autora, 2022.

A avaliação da linhagem megacariocítica não revelou diferença qualitativa entre os métodos comparados ($p = 0,998$). Os parâmetros quantitativos analisados foram: presença de micromegacariócito ($p = 1$), não havendo diferença entre a análise pelo mielograma e pela biópsia de medula óssea. por outro lado, a biópsia de medula óssea mostrou-se melhor para observação de megacariócitos atípicos ($p < 0,001$) (Tabela 13).

Tabela 13 – Comparação das análises qualitativas e quantitativas da linhagem megacariocítica de pacientes com síndromes mielodisplásicas primária analisados pelo mielograma e pela biópsia de medula óssea

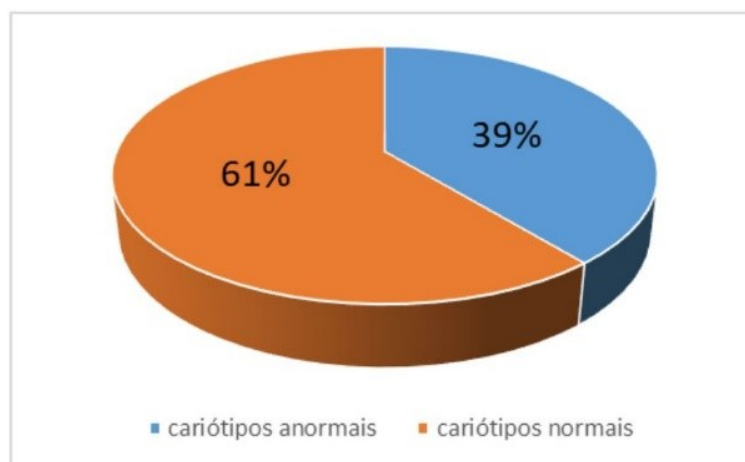
Mielograma	Biópsia de medula óssea		
Micromegacariócito	Presente	Ausente	
Presente	47	17	
Ausente	18	9	
Megacariócitos atípicos	Presente	Ausente	
Presente	60	4	
Ausente	24	3	
Quantidade de megacariócitos	Aumentada	Normal	Reduzida
Aumentada	8	18	4
Normal	11	21	4
Reduzida	2	14	9

Fonte: A autora, 2022.

4.4 Análise Citogenética em Pacientes com SMD Primária

A análise citogenética foi realizada em 100 pacientes com SMD. Do total de pacientes analisados 39 (39%) apresentaram cariótipos anormais (Figura 30).

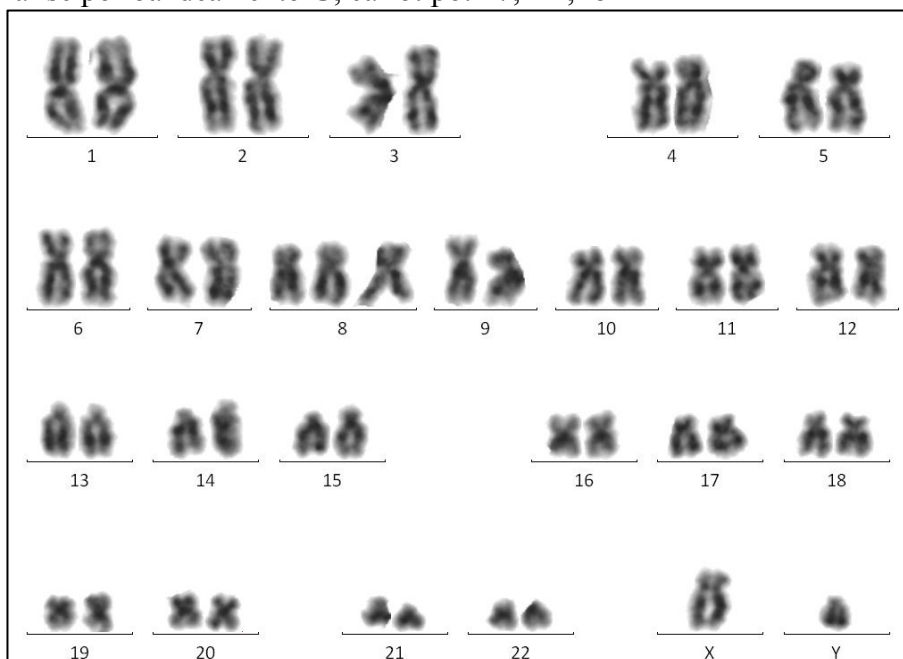
Figura 30 – Distribuição da frequência de cariótipos normais e anormais em pacientes com SMD



Fonte: A autora, 2022.

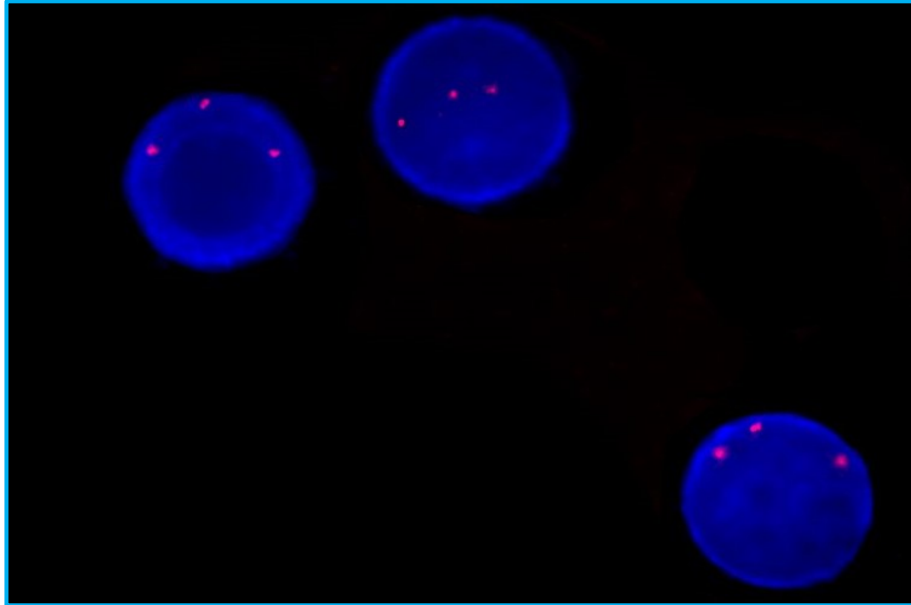
Em nosso estudo, os cariótipos anormais envolveram principalmente perdas parciais e totais de cromossomos, as deleções e monossomias, respectivamente e também ganho cromossômico, as trissomias. As principais alterações cromossômicas foram: cariótipos complexos (com 3 ou mais alterações citogenéticas) representando 16% do total de casos com cariótipos anormais, a trissomia de 8 representando 13,2% dos casos (Figura 31 e Figura 32), a $\text{del}(17\text{p})/\text{i}(17\text{q})$ que esteve presente em 10,5% dos casos (Figura 33 e Figura 34), a $-7/\text{del}(7\text{q})$ presente em 10,5% dos casos, a $\text{del}(11\text{q})$ também esteve presente em 10,5% dos casos, $\text{del}(5\text{q})$ como alteração única e associada com outra alteração cromossômica representou 7,9% dos casos, $\text{inv}(3\text{q})/\text{del}(3\text{p})$ também esteve presente em 7,9% dos casos, a $\text{del}(12\text{p})$ esteve presente em 5,3% dos casos e ocorreram em menor frequência representando cada alteração 2,6% dos casos: $\text{t}(3;5)$, $\text{t}(6;12)$, $\text{del}(8\text{p})/\text{+19}$, $\text{i}(9\text{q})$, $\text{add}(16\text{q})$, $\text{del}(20\text{q})$, +21 . Na Figura 35 podemos observar a frequência das alterações cromossômicas encontradas neste estudo.

Figura 31 – Análise por bandeamento G, cariótipo: 47,XY,+8



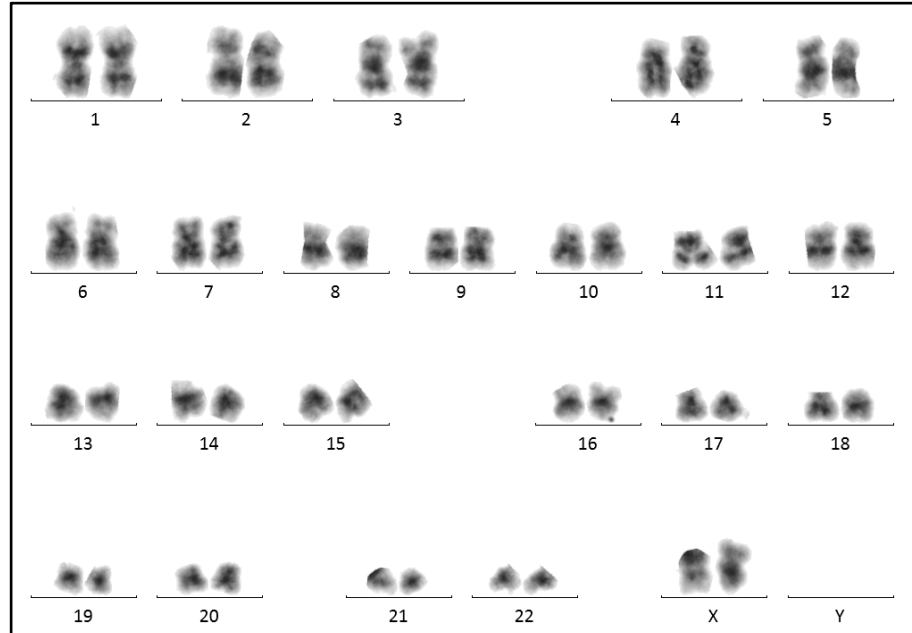
Fonte: A autora, 2022.

Figura 32 – FISH em núcleos interfásicos mostrando 3 sinais vermelhos utilizando a sonda LSI MYC Spectrum Orange (Vysis, Abbott Laboratories) indicando a trissomia do cromossomo 8



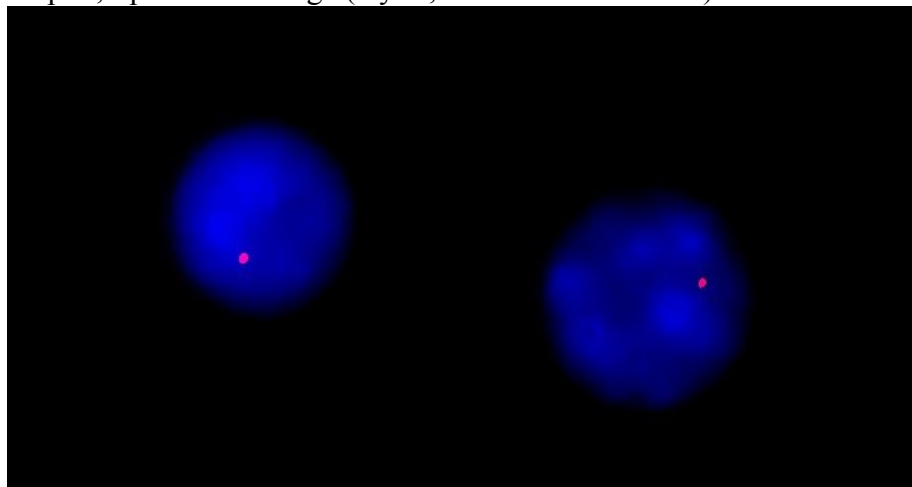
Fonte: A autora, 2022.

Figura 33 – Análise por bandeamento G, cariótipo: 46,XX,del(17)(p11)



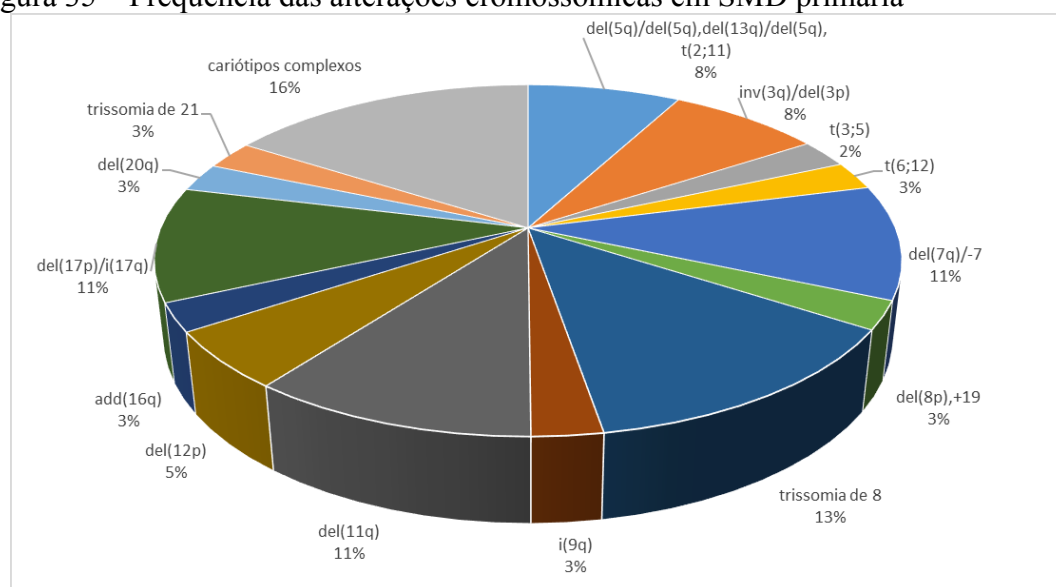
Fonte: A autora, 2022.

Figura 34 – FISH em núcleos interfásicos mostrando 1 sinal vermelho utilizando a sonda LSI p53, Spectrum Orange (Vysis, Abbott Laboratories) indicando a del(17p)



Fonte: A autora, 2022.

Figura 35 – Frequência das alterações cromossômicas em SMD primária



Fonte: A autora, 2022.

4.4.1 Distribuição das Alterações Cromossômicas nos Subtipos de SMD segundo a Classificação OMS

Segundo a classificação da OMS 2016, nossos pacientes foram distribuídos nos subtipos: CRDU (25 pacientes), CRDM (44 pacientes), CRDU-SA (1 paciente), CRDM-SA (1 paciente), AREB-1 (14 pacientes), AREB-2 (12 pacientes) e LMA secundária a SMD considerando a contagem de blastos 21-29% (3 pacientes). Os pacientes nos subtipos iniciais da SMD apresentaram uma frequência de 30% de cariótipos anormais, já os pacientes com AREB-

1, AREB-2, apresentaram uma frequência de 54% de cariótipos anormais e LMA secundária a SMD apresentaram uma frequência de 66,6% de cariótipos anormais (Tabela 14).

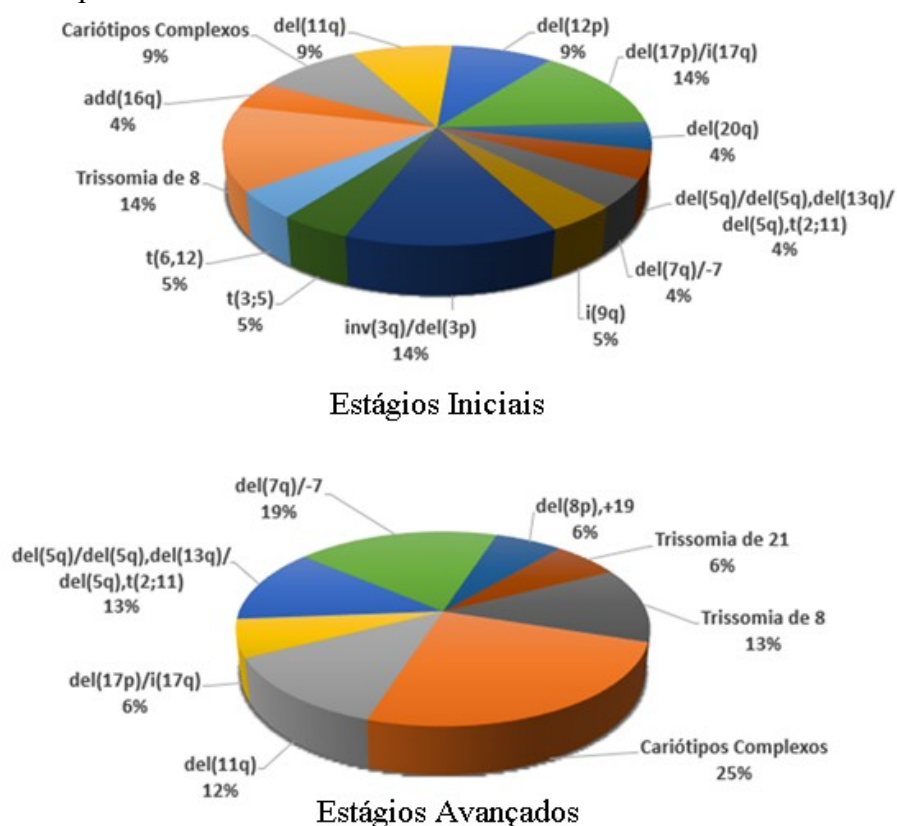
Tabela 14 – Classificação dos pacientes e a distribuição de cariótipos anormais

Subtipo	nº de pacientes	Cariótipos anormais	Cariótipos normais
CRDU	25	10 (40%)	15 (60%)
CRDM	44	10 (23%)	34 (77%)
CRDU-SA	1	1 (100%)	0 (0%)
CRDM-SA	1	0 (0%)	1 (100%)
AREB-1	14	8 (57%)	6 (43%)
AREB-2	12	6 (50%)	6 (50%)
LMA sec SMD	3	2 (67%)	1 (33%)
Total	100 (100%)	39 (39%)	61 (61%)

Fonte: A autora, 2022.

Analisando a distribuição do padrão cromossômico na SMD, não foi identificado um padrão cariotípico específico por subtipo. Nos pacientes classificados nos estágios iniciais da doença (CRDU, CRDM, CRDU-SA, CRDM-SA) foi observada uma incidência (30%) de cariótipos anormais. As alterações cromossômicas mais frequentes neste grupo foram trissomia do 8, del(17p) e del(3q). Nos estágios mais avançados da doença (AREB-1, AREB-2 e LMA secundária) foi observada uma incidência de 55% de cariótipos anormais. As alterações cromossômicas mais frequentes nesse grupo foram: cromossomos complexos, monossomia do 7, trissomia do 8 e del(5). Na Figura 36 podemos observar a distribuição do padrão cromossômicos dos estágios iniciais e avançados de SMD.

Figura 36 – Distribuição do padrão cromossômico nos estágios iniciais e avançados de SMD primária



Fonte: A autora, 2022.

4.4.2 Distribuição dos Pacientes com SMD nos Subgrupos de Risco Citogenéticos de acordo com IPSS e IPSS-R

Foi utilizada a classificação segundo o grupo de risco citogenético de acordo com o Sistema Internacional de Escala Prognóstica (IPSS, de 1997) e o IPSS- revisado (IPSS-R, de 2012). De acordo com a classificação do IPSS, os pacientes foram estratificados nos grupos: prognóstico bom, intermediário e desfavorável. Em nosso estudo, os pacientes foram agrupados da seguinte forma: a maioria dos pacientes foi classificada no grupo de bom prognóstico 63 pacientes (63%); no intermediário, foram 28 pacientes (28%); no grupo de prognóstico desfavorável, foram 9 pacientes (9%). A evolução da doença foi observada em 17,46% dos pacientes do grupo classificados como bom prognóstico, em 46,43% daqueles de prognóstico intermediário e em 100% dos com mau prognóstico (Tabela 15).

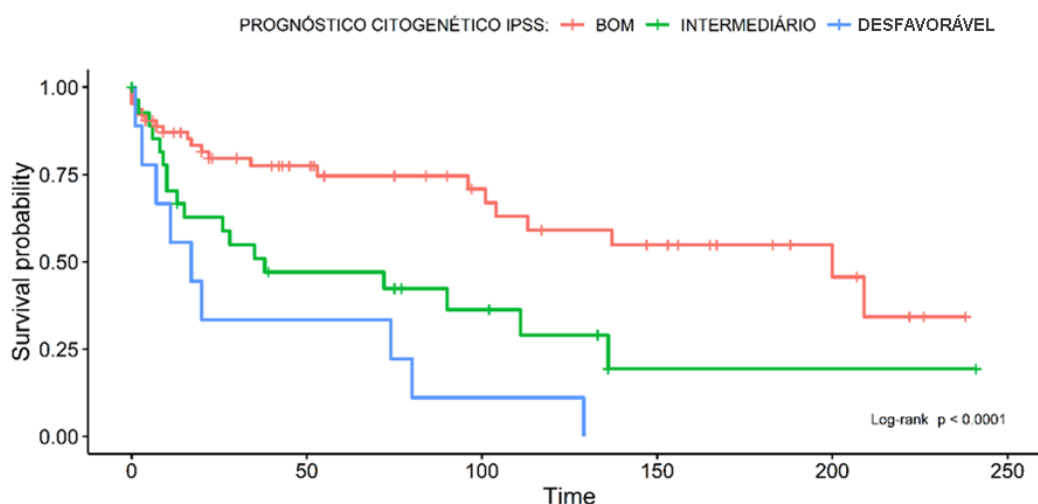
Tabela 15 – Distribuição dos pacientes de acordo com grupo de risco citogenético segundo o IPSS e sua associação com a evolução da doença

Grupo de risco citogenético pelo IPSS	Nº de pacientes/ Frequência (%)	Evolução SMD→LMA Nº de pacientes/ Frequência (%)	Óbitos Nº de pacientes/ Frequência (%)
Bom	63 (63%)	11 (17,46%)	8 (12,7%)
Intermediário	28 (28%)	13 (46,43%)	13 (46,43%)
Desfavorável	9 (9%)	9 (100%)	9 (100%)

Fonte: A autora, 2022.

A análise de sobrevida dos pacientes com alterações citogenéticas de acordo com o grupo de risco pelo IPSS, mostrou ser significativa, com maior sobrevida nos pacientes com bom prognóstico em relação ao prognóstico desfavorável ($p < 0,0001$) (Figura 37).

Figura 37 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com prognóstico citogenético pelo IPSS ($p < 0,0001$)



Fonte: A autora, 2022.

Foi analisada, também, a distribuição dos pacientes de acordo com a citogenética segundo o IPSS-R. De acordo com essa classificação, nossos pacientes foram distribuídos nos seguintes grupos de risco: 4 (4%) pacientes como muito bom prognóstico; 65 (65%) bom prognóstico; 19 (19%) como prognóstico intermediário; 11 (11%) como prognóstico desfavorável e 1 (1%) paciente estratificados no grupo citogenético de prognóstico muito desfavorável.

Segundo essa distribuição, a evolução da doença ocorreu em 50% (2/4) dos pacientes do grupo citogenético de muito bom prognóstico, em 18,45% (12/65) do grupo de bom

prognóstico, em 52,63% (10/19) dos classificados como risco intermediário, em 72,73% (8/11) dos considerados como prognóstico desfavorável e em 100% (1/1) do grupo de prognóstico muito desfavorável (Tabela 16).

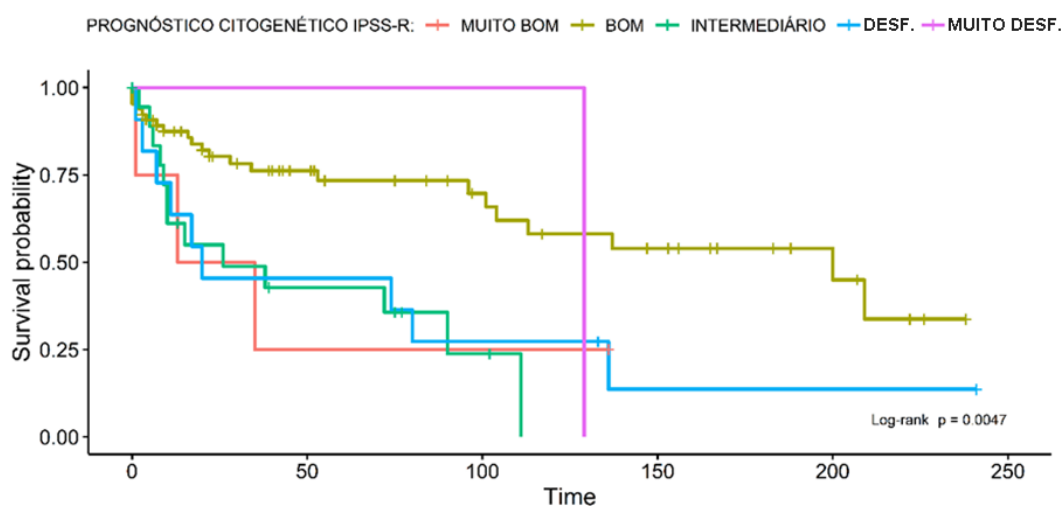
Tabela 16 – Distribuição dos pacientes segundo o risco citogenético do IPSS-R e sua associação com a evolução para LMA

Grupo de risco citogenético pelo IPSS-R	Nº de pacientes/ Frequência (%)	Evolução SMD→LMA No de pacientes/ Frequência (%)	Óbitos Nº de pacientes/ Frequência (%)
Muito Bom	4 (4%)	2 (50%)	2 (50%)
Bom	65 (65%)	12 (18,45%)	9 (13,85%)
Intermediário	19 (19%)	10 (52,63%)	10 (52,63%)
Desfavorável	11 (11%)	8 (72,73%)	8 (72,73%)
Muito Desfavorável	1 (1%)	1 (100%)	1 (100%)

Fonte: A autora, 2022.

Ao avaliar a sobrevida dos pacientes de acordo com o prognóstico citogenético pelo IPSS-R, houve significância estatística entre os grupos ($p=0,0047$), como pode-se observar na Figura 38.

Figura 38 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com prognóstico citogenético pelo IPSS-R ($p = 0,0047$)



Fonte: A autora, 2022.

4.5 Associação entre as Características Morfológicas e Citogenéticas

O total de pacientes deste estudo (100) foram divididos em três grupos segundo o prognóstico citogenético definido pelo IPSS e em cinco grupos de acordo com o prognóstico citogenético pelo IPSS-R. Esses grupos foram comparados morfolologicamente em relação aos parâmetros estudados em biópsia de medula óssea: celularidade, relação mieloide:eritroide, megaloblastos, número de megacariócitos, micromegacariócito, megacariócitos hipolobulados, perda de orientação arquitetural, presença de ALIP, células CD34 positivas, alteração estromal e fibrose medular.

Em relação à celularidade, pela classificação do IPSS, na maioria dos casos a medula óssea era hiper celular, independente do prognóstico citogenético. Esse achado foi observado em 37 (58,8%) dos pacientes com bom prognóstico citogenético. Nos pacientes com prognóstico desfavorável esse achado foi visto em 7 (77,8%) e nos casos de prognóstico intermediário em 17 pacientes (60,7%). Em relação aos pacientes que apresentaram medula óssea hipocelular, a maioria estavam associados ao grupo com bom prognóstico citogenético. No grupo de pacientes com prognóstico citogenético intermediário, havia dois pacientes com medula óssea hipocelular. Apenas um paciente (11,1%) com mau prognóstico citogenético apresentou hipocelularidade medular (Tabela 17). Não houve diferença estatística entre os grupos estudados ($p = 0,283$).

Tabela 17 – Celularidade Medular de Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Estratificados pelo Prognóstico Citogenético segundo o IPSS

Prognóstico Citogenético (IPSS)	Celularidade Medular		
	Hipocelular nº de pacientes (%)	Normocelular nº de pacientes (%)	Hiper celular nº de pacientes (%)
Bom	14 (22,2%)	12 (19%)	37 (58,8%)
Intermediário	2 (7,12%)	9 (32,1%)	17 (60,7%)
Desfavorável	1 (11,1%)	1 (11,1%)	7 (77,8%)

Fonte: A autora, 2022.

Ao avaliar a celularidade em relação aos grupos de risco pelo IPSS-R, todos os pacientes do grupo muito bom prognóstico apresentaram medula hiper celular. A maioria dos pacientes do grupo de bom prognóstico (58,5%) apresentou medula óssea hiper celular e os demais

pacientes eram ou hipocelular (21,5%) ou normocelular (20%). Os pacientes com prognóstico citogenético intermediário, 11 (57,9%) eram hiper celulares e a minoria, 2 pacientes (10,5%) apresentaram medula óssea hipocelular. Dos pacientes do grupo desfavorável, sete (63,7%) apresentaram medula óssea hiper celular e apenas um paciente (9%) a medula era hipocelular ($p = 0,725$). Dos dois pacientes com prognóstico citogenético muito desfavorável, um a medula óssea era normocelular e o outro, a medula era hiper celular (Tabela 18).

Tabela 18 – Celularidade Medular de Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Estratificados pelo Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R

Prognóstico Citogenético (IPSS-R)	Celularidade Medular		
	Hipocelular nº de pacientes (%)	Normocelular nº de pacientes (%)	Hiper celular nº de pacientes (%)
Muito bom	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)
Bom	14 (21,5%)	13 (20%)	38 (58,5%)
Intermediário	2 (10,5%)	6 (31,5%)	11 (57,9%)
Desfavorável	1 (9%)	3 (27,3%)	7 (63,7%)
Muito Desfavorável	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)

Fonte: A autora, 2022.

A relação mieloide:eritroide mostrou-se aumentada em dois pacientes (22,2%) com prognóstico citogenético desfavorável, reduzida em 3 (33,3%) e normal em quatro (44,5%) desses grupo pelo IPSS. No grupo de pacientes com prognóstico citogenético intermediário, a maioria dos pacientes apresentava alteração dessa relação, em 10 pacientes (35,8%) encontrava-se aumentada e em 9 pacientes (32,1%) havia redução ($p = 0,0297$). No grupo de pacientes com bom prognóstico citogenético, houve uma tendência de redução desses valores, visto em 63,5% dos casos (Tabela 19). A redução desses valores pode indicar hiperplasia da linhagem eritroide.

Tabela 19 – Relação Mieloide:Eritroide em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Avaliada pelo Prognóstico Citogenético segundo o IPSS

Prognóstico Citogenético (IPSS)	Relação M:E		
	Reduzida nº de pacientes (%)	Normal nº de pacientes (%)	Aumentada nº de pacientes (%)
Bom	40 (63,5%)	12 (19%)	11 (17,5%)
Intermediário	9 (32,1%)	9 (32,1%)	10 (35,8%)
Desfavorável	3 (33,3%)	4 (44,5%)	2 (22,2%)

Fonte: A autora, 2022.

Nos grupos de prognóstico citogenético pelo IPSS-R, a maioria dos pacientes de muito bom prognóstico apresentaram aumento da relação mieloide:eritroide (75%). Os demais pacientes (25%) desse grupo apresentaram essa relação normal. Os pacientes com bom prognóstico apresentaram redução dessa relação em 41 pacientes (63%). Os demais pacientes desse grupo ou não apresentaram alteração dessa relação (20%) ou essa estava aumentada (17%). No grupo de prognóstico intermediário, sete pacientes (36,8%) apresentaram aumento da relação M:E e outros sete (36,8%) apresentaram redução dessa relação. Em cinco pacientes (26,4%) essa relação não apresentou alteração (Tabela 20). No grupo de pacientes com prognóstico citogenético desfavorável, em 4 (36,5%) a relação M:E estava reduzida, em seis (54,5%) estava aumentada e em um paciente (9%) estava aumentada. O paciente do grupo muito desfavorável apresentava aumento da relação mieloide:eritroide ($p = 0,0044$).

Tabela 20 – Relação Mieloide:Eritroide de Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Estratificados pelo Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R

Prognóstico Citogenético (IPSS-R)	Relação M:E		
	Reduzida nº de pacientes (%)	Normal nº de pacientes (%)	Aumentado nº de pacientes (%)
Muito bom	0 (0%)	1 (0%)	3 (75%)
Bom	41 (63%)	13 (20%)	11 (17%)
Intermediário	7 (36,8%)	5 (26,4%)	7 (36,8%)
Desfavorável	4 (36,5%)	6 (54,5%)	1 (9%)
Muito Desfavorável	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)

Fonte: A autora, 2022.

Em relação à linhagem megacariocítica, esta encontra-se em quantidade reduzida (33,3%) ou normal (55,5%) na maioria dos pacientes com prognóstico citogenético desfavorável de acordo com IPSS. Apenas um paciente desse grupo havia aumento de megacariócitos desse grupo. No grupo intermediário, a redução dessa linhagem foi observada em apenas três pacientes (10,72%), enquanto no grupo com bom prognóstico citogenético, foi observada em 14 pacientes (22,2%) ($p = 0,446$). A maioria dos pacientes do grupo de bom prognóstico e de prognóstico intermediário não apresentava alteração quantitativa de megacariócitos, respectivamente 57,2% e 57,1% (Tabela 21).

Tabela 21 – Relação da Quantidade de Megacariócitos em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS

Prognóstico Citogenético (IPSS)	Alteração Megacariocítica Quantitativa		
	Reduzido nº de pacientes (%)	Normal nº de pacientes (%)	<u>Aumentado</u> nº de pacientes (%)
Bom	14 (22,2%)	36 (57,2%)	13 (20,6%)
Intermediário	3 (10,7%)	16 (57,1%)	9 (32,2%)
Desfavorável	3 (33,3%)	5 (55,5%)	1 (11,2%)

Fonte: A autora, 2022.

A análise quantitativa de megacariócitos revelou que a maioria dos pacientes de todos os grupos pelo IPSS-R, exceto o de muito bom prognóstico, apresentaram contagem normal de megacariócitos, sendo 58,5% no grupo bom, 52,7% no grupo intermediário e 63,7% no grupo desfavorável ($p = 0,398$). O paciente do grupo de prognóstico citogenético muito desfavorável tinha contagem normal de megacariócitos (Tabela 22).

Tabela 22 – Relação da Quantidade de Megacariócitos em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R)

Prognóstico citogenético (IPSS-R)	Alteração Megacariocítica Quantitativa		
	Reduzido nº de pacientes (%)	Normal nº de pacientes (%)	Aumentado nº de pacientes (%)
Muito bom	0 (0%)	1 (25%)	3 (75%)
Bom	14 (21,5%)	38 (58,5%)	13 (20%)
Intermediário	3 (15,8%)	10 (52,7%)	6 (31,5%)
Desfavorável	3 (27,3%)	7 (63,7%)	1 (9%)
Muito Desfavorável	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)

Fonte: A autora, 2022.

Qualitativamente, a presença de micromegacariócitos mostrou-se predominantemente discreta ou ausente nos grupos de pacientes com prognóstico citogenético bom e intermediário pelo IPSS. No grupo de bom prognóstico, em 24 pacientes (38%) esse achado foi considerado importante ou moderado. Os pacientes com prognóstico citogenético intermediário, apresentaram uma distribuição similar, sendo que em oito pacientes (28,5%) esse achado foi considerado importante ou moderado ($p = 0,3133$). No grupo de pacientes com prognóstico citogenético desfavorável, quatro (44,5%) apresentaram essa alteração considerada importante ou moderada e em cinco (55,5%) a presença de micromegacariócitos foi considerada discreta ou ausente (Tabela 23).

Tabela 23 – Alterações Qualitativas em Megacariócitos (Micromegacariócitos) em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS

Prognóstico Citogenético (IPSS)	Alterações Qualitativas em Megacariócitos (Micromegacariócitos)	
	Importante/Moderado nº de pacientes (%)	Discreto/Ausente nº de pacientes (%)
Bom	24 (38%)	39 (62%)
Intermediário	8 (28,5%)	20 (71,5%)
Desfavorável	4 (44,5%)	5 (55,5%)

Fonte: A autora, 2022.

Em relação aos cinco grupos do prognóstico citogenético pelo IPSS-R, a maioria dos pacientes dos grupos de bom prognóstico, de prognóstico intermediário e o paciente do grupo muito desfavorável, apresentaram micromegacariócitos em quantidades discretas ou ausentes, sendo 60% no grupo bom e 89,5% no grupo intermediário. Os grupos muito bom e desfavorável, tiveram uma distribuição parecida ($p < 0,0408$). No primeiro, 2 pacientes (50%) tiveram quantidades importantes e moderadas de micromegacariócitos e essa alteração foi observada em seis (54,5%) dos pacientes com prognóstico desfavorável (Tabela 24).

Tabela 24 – Alterações Qualitativas em Megacariócitos (Micromegacariócitos) em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R

Prognóstico Citogenético (IPSS-R)	Alterações Qualitativas em Megacariócitos (Micromegacariócitos)	
	Importante/Moderado nº de pacientes (%)	Discreto/Ausente nº de pacientes (%)
Muito bom	2 (50%)	2 (50%)
Bom	26 (40%)	39 (60%)
Intermediário	2 (10,5%)	17 (89,5%)
Desfavorável	6 (54,5%)	5 (45,5%)
Muito Desfavorável	0 (0%)	1 (100%)

Fonte: A autora, 2022.

A hipolobulação nuclear megacariocítica mostrou-se importante/moderada principalmente nos grupos de prognóstico citogenético intermediário e mau de acordo com o IPSS ($p = 0,3091$). Dentre os pacientes que possuíam esse achado de forma importante ou moderada, 31 (49%) pertenciam ao grupo de bom prognóstico citogenético, 18 (64,3%) ao grupo de prognóstico intermediário e 7 pacientes (77,7%) com mau prognóstico citogenético. Esses dados podem ser observados na Tabela 25.

Tabela 25 – Alterações Qualitativas em Megacariócitos (Hipolobulação Nuclear) em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS

Prognóstico Citogenético (IPSS)	Alterações Qualitativas em Megacariócitos (Hipolobulação Nuclear)	
	Importante/Moderado nº de pacientes (%)	Discreto/Ausente nº de pacientes (%)
Bom	31 (49%)	32 (51%)
Intermediário	18 (64,3%)	10 (35,7%)
Desfavorável	7 (77,7%)	2 (22,3%)

Fonte: A autora, 2022.

Os quatro pacientes do grupo de muito bom prognóstico citogenético e o paciente com prognóstico muito desfavorável pelo IPSS-R apresentaram hipolobulação nuclear megacariocítica importante ou moderada. No grupo de pacientes de prognóstico citogenético desfavorável, a maioria dos pacientes (72,8%) do grupo desfavorável apresentavam megacariócitos considerado importante ou moderado ($p = 0,1202$). A análise nos pacientes com bom prognóstico e com prognóstico intermediário apresentou, respectivamente, 50,7% e 52,5% de hipolobulação megacariocítica importante ou moderada, como pode ser observado na Tabela 26.

Tabela 26 – Alterações Qualitativas em Megacariócitos (Hipolobulação Nuclear) em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R

Prognóstico Citogenético (IPSS-R)	Alterações Qualitativas em Megacariócitos (Hipolobulação Nuclear)	
	Importante/Moderado nº de pacientes (%)	Discreto/Ausente nº de pacientes (%)
Muito bom	4 (100%)	0 (0%)
Bom	33 (50,7%)	32 (49,3%)
Intermediário	10 (52,6%)	9 (47,4%)
Desfavorável	8 (72,8%)	3 (27,2%)
Muito Desfavorável	1 (100%)	0 (0%)

Fonte: A autora, 2022.

A avaliação da perda arquitetural demonstrou que a maioria dos pacientes com bom prognóstico citogenético de acordo com o IPSS apresentavam esse achado considerado discreto/ ausente, enquanto que no grupo com mau prognóstico citogenético a maioria dos pacientes (88,9%) apresentavam esse achado de forma importante ou moderada ($p = 0,004$). Enquanto isso, no grupo de pacientes com prognóstico citogenético intermediário, foi observada perda arquitetural importante ou moderada em 21 pacientes (75%) (Tabela 27).

Tabela 27 – Perda Arquitetural em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Estratificados de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS

Prognóstico Citogenético (IPSS)	Perda Arquitetural	
	Importante/Moderado nº de pacientes (%)	Discreto/Ausente nº de pacientes (%)
Bom	26 (41,2%)	37 (58,8%)
Intermediário	21 (75%)	7 (25%)
Desfavorável	8 (88,9%)	1 (11,1%)

Fonte: A autora, 2022.

Em relação aos grupos de prognóstico pelo IPSS-R, todos os pacientes com muito bom prognóstico citogenético ou com prognóstico desfavorável, apresentaram medula óssea com perda arquitetural importante ou moderada. Dos pacientes com bom prognóstico citogenético, 57% não tinham perda de arquitetura medular ou essa era discreta ($p = 0,03522$). A maioria dos pacientes do grupo intermediário e do grupo de prognóstico citogenético desfavorável possuíam perda arquitetural considerada importante ou moderada, conforme a Tabela 28.

Tabela 28 – Perda Arquitetural em pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R

Prognóstico Citogenético (IPSS-R)	Perda Arquitetural	
	Importante/Moderado nº de pacientes (%)	Discreto/Ausente nº de pacientes (%)
Muito bom	4 (100%)	0 (0%)
Bom	28 (43%)	37 (57%)
Intermediário	14 (73,7%)	5 (26,3%)
Desfavorável	8 (72,8%)	3 (27,2%)
Muito desfavorável	1 (100%)	0 (0%)

Fonte: A autora, 2022.

A presença de ALIP foi observada em 10 pacientes (35,7%) com prognóstico citogenético intermediário, em quatro pacientes (44,5%) com prognóstico desfavorável e em 10 (15,8%) entre os pacientes com bom prognóstico citogenético pelo IPSS ($p = 0,0375$). A avaliação da presença de células CD34 positivas nos pacientes que não apresentavam ALIP demonstrou que 11 pacientes (20,7%) pertenciam ao grupo de bom prognóstico citogenético, cinco pacientes (27,8%) do grupo de prognóstico intermediário e três pacientes (60%) do grupo de prognóstico desfavorável apresentavam células CD34 positivas isoladas ($p = 0,1385$) (Tabela 29).

Tabela 29 – ALIP e Células CD34 em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Avaliada pelo Prognóstico Citogenético segundo o IPSS

Prognóstico Citogenético (IPSS)	ALIP		Células CD34 Isoladas	
	Presente nº de pacientes (%)	Ausente nº de pacientes (%)	Presente nº de pacientes (%)	Ausente nº de pacientes (%)
Bom	10 (15,8%)	53 (84,2%)	11 (20,7%)	42 (79,3%)
Intermediário	10 (35,7%)	18 (64,3%)	5 (27,8%)	13 (72,2%)
Desfavorável	4 (44,5%)	5 (55,5%)	3 (60%)	2 (40%)

Fonte: A autora, 2022.

Ao analisar os grupos de risco citogenéticos pelo IPSS-R, dois pacientes (50%) no grupo de muito baixo risco apresentam ALIP, 10 pacientes (15,4%) no grupo intermediário, sete (36,8%) no grupo intermediário, e cinco pacientes (45,5%) no grupo de prognóstico

citogenético desfavorável. O paciente com prognóstico citogenético muito desfavorável não apresentou ALIP, ($p = 0,0545$). Quando se avaliou a presença de células CD34 positivas nos casos sem ALIP, observou que um paciente (50%) do grupo de muito bom prognóstico e um paciente do grupo de prognóstico muito desfavorável apresentaram essa alteração. Entre os pacientes de bom prognóstico, 11 (20%) possuíam essa alteração, no grupo intermediário, quatro pacientes (33,3%) e no grupo de prognóstico citogenético desfavorável, dois pacientes (33,3%) tinham células CD34 isoladas na biópsia de medula óssea ($p = 0,2023$). Esses dados podem ser observados na Tabela 30.

Tabela 30 – ALIP e Células CD34 em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Avaliada pelo Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R

Prognóstico Citogenético (IPSS-R)	ALIP		Células CD34 Isoladas	
	Presente nº de pacientes (%)	Ausente nº de pacientes (%)	Presente nº de pacientes (%)	Ausente nº de pacientes (%)
Muito bom	2 (50%)	2 (50%)	1 (50%)	1 (50%)
Bom	10 (15,4%)	55 (84,6%)	11 (20,7%)	44 (80%)
Intermediário	7 (36,8%)	12 (63,2%)	4 (33,3%)	8 (66,7%)
Desfavorável	5 (45,5%)	6 (54,6%)	2 (33,3%)	4 (66,7%)
Muito desfavorável	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)

Fonte: A autora, 2022.

A presença de megaloblastos foi considerada discreta/ausente na maioria dos casos independente do prognóstico citogenético pelo IPSS ($p = 0,105$). Dentre os pacientes que possuíam esse achado considerado como importante ou moderado, 18 (28,5%) pertenciam ao grupo de bom prognóstico citogenético e 11 (30,2%) ao grupo de prognóstico intermediário. Essa alteração morfológica foi considerada importante ou moderada em dois pacientes (23,5%) com prognóstico citogenético desfavorável como pode ser observado na Tabela 31.

Tabela 31 – Megaloblastos em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS

Prognóstico Citogenético IPSS	Megaloblastos	
	Importante/Moderado nº de pacientes (%)	Discreto/Ausente nº de pacientes (%)
Bom	18 (28,5%)	45 (71,5%)
Intermediário	11 (30,2%)	17 (60,8%)
Desfavorável	2 (22,3%)	7 (77,7%)

Fonte: A autora, 2022.

Ao avaliar a distribuição de megaloblastos pelos grupos de prognóstico citogenético segundo o IPSS-R, dois dos pacientes (50%) de bom prognóstico apresentaram megacariócitos considerados importantes ou moderados, enquanto que nenhum paciente do grupo de prognóstico muito desfavorável apresentou essa alteração (Tabela 32). No grupo dos pacientes de bom prognóstico, 19 (29,3%) tinham megaloblastos considerados importantes ou moderados, já a quantidade de pacientes no grupo de prognóstico intermediário foi de 7 (36,8%) e no grupo de prognóstico desfavorável foi de três pacientes (27,2%) ($p = 0,327$).

Tabela 32 – Megaloblastos em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R

Prognóstico Citogenético (IPSS-R)	Megaloblastos	
	Importante/Moderado nº de pacientes (%)	Discreto/Ausente nº de pacientes (%)
Muito bom	2 (50%)	2 (50%)
Bom	19 (29,3%)	46 (70,7%)
Intermediário	7 (36,8%)	12 (63,2%)
Desfavorável	3 (27,2%)	8 (72,3%)
Muito desfavorável	0 (0%)	1 (100%)

Fonte: A autora, 2022.

A alteração estromal foi observada em 30 pacientes, sendo 16 (25,4%) com bom prognóstico citogenético, 10 (35,7%) com prognóstico citogenético intermediário e em todos os quatro pacientes (44,4%) com prognóstico citogenético desfavorável de acordo com o IPSS (Tabela 33). Esses dados não foram estatisticamente significativos ($p = 0,1734$).

Tabela 33 – Análise da Alteração Estromal em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com Prognóstico Citogenético segundo o IPSS

Prognóstico Citogenético (IPSS)	Alteração Estromal	
	Presente nº de pacientes (%)	Ausente nº de pacientes (%)
Bom	16 (25,4%)	47 (74,6%)
Intermediário	10 (35,7%)	18 (64,3%)
Desfavorável	4 (44,4%)	5 (55,6%)

Fonte: A autora, 2022.

Em relação ao IPSS-R, dois pacientes (50%) do grupo de muito bom prognóstico citogenético, 17 pacientes (26%) de grupo de bom prognóstico citogenético, seis pacientes (31,5%) do grupo de prognóstico citogenético intermediário, quatro pacientes (36,3%) do grupo de prognóstico citogenético desfavorável e um paciente (100%) do grupo de prognóstico citogenético muito desfavorável apresentaram alteração estromal ($p = 0,096$). Esses dados podem ser vistos na Tabela 34.

Tabela 34 – Análise da Alteração Estromal em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de acordo com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R

Prognóstico Citogenético (IPSS-R)	Alteração Estromal	
	Presente nº de pacientes (%)	Ausente nº de pacientes (%)
Muito bom	2 (50%)	2 (50%)
Bom	17 (26%)	48 (74%)
Intermediário	6 (31,5%)	13 (68,5%)
Desfavorável	4 (36,3%)	7 (63,7%)
Muito desfavorável	1 (100%)	0 (0%)

Fonte: A autora, 2022.

A fibrose medular foi vista em 13 pacientes (20%) com bom prognóstico citogenético, em oito pacientes (28,6%) com prognóstico citogenético intermediário e em 3 pacientes (33,4%) com prognóstico citogenético desfavorável de acordo com o IPSS ($p = 0,6702$), conforme pode ser observado na Tabela 35.

Tabela 35 – Fibrose Medular em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária e sua associação com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS

Prognóstico Citogenético (IPSS)	Fibrose Medular	
	Presente nº de pacientes (%)	Ausente nº de pacientes (%)
Bom	13 (20%)	50 (76,9%)
Intermediário	8 (28,6%)	20 (71,4%)
Desfavorável	3 (33,4%)	6 (66,6%)

Fonte: A autora, 2022.

De acordo com a classificação citogenética pelo IPSS-R, um dos pacientes (25%) com muito bom prognóstico citogenético apresentou fibrose medular. Nos que apresentaram bom prognóstico citogenético, 14 (21,5%) dos pacientes tinham fibrose medular. No grupo de prognóstico citogenético intermediário, 5 pacientes (26,3%) tinham mielofibrose. Entre os com prognóstico citogenético desfavorável, quatro pacientes (36,3%) apresentaram fibrose medular ($p = 0,6769$). O paciente com prognóstico citogenético muito desfavorável não apresentou fibrose medular (Tabela 36).

Tabela 36 – Fibrose medular em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária e sua associação com o Prognóstico Citogenético segundo o IPSS-R

Prognóstico Citogenético IPSS-R	Fibrose Medular	
	Presente nº de pacientes (%)	Ausente nº de pacientes (%)
Muito bom	1 (25%)	3 (75%)
Bom	14 (21,5%)	51 (78,5%)
Intermediário	5 (26,3%)	14 (73,7%)
Desfavorável	4 (36,3%)	7 (63,7%)
Muito Desfavorável	0 (0%)	1 (100%)

Fonte: A autora, 2022.

4.6 Distribuição dos Pacientes com SMD Primária segundo o IPSS e IPSS-R e seu Impacto na Sobrevida

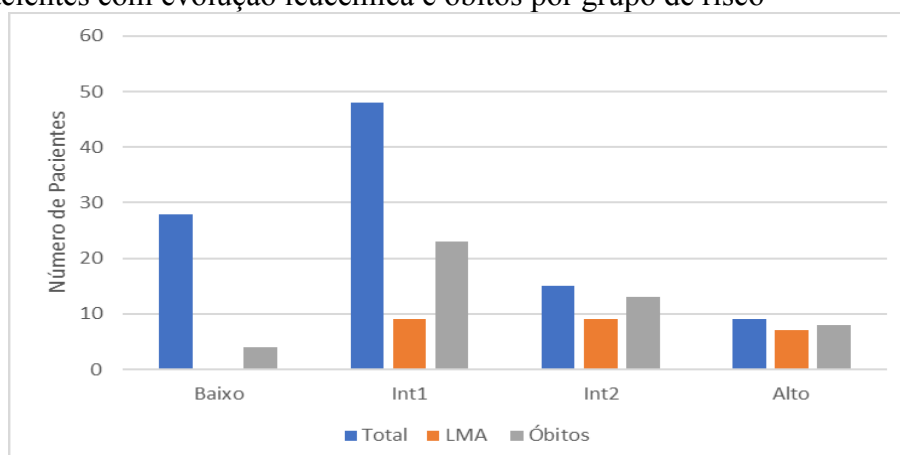
Foram utilizados os critérios adotados pelo IPSS (número de citopenias, citogenética e porcentagem de blastos na medula óssea) e IPSS-R (citogenética, porcentagem de blastos na medula óssea, hemoglobina, contagem de plaquetas e contagem de ANC (Contagem absoluta de neutrófilos) para classificar os pacientes segundo os grupos de risco.

De acordo com os critérios do IPSS, 28 pacientes (28%) foram classificados como baixo risco, 48 (48%) intermediário 1, 15 (15%) intermediário 2 e 9 (9%) alto risco (Figura 39). Em relação ao IPSS-R, os pacientes foram distribuídos em: 22 (22%) pacientes com muito baixo risco, 32 (32%) pacientes baixo risco, 21 (21%) de risco intermediário e 12 (12%) alto risco e 13 (13%) de muito alto risco (Figura 40).

Avaliando os grupos de risco pelo IPSS com a taxa de evolução da doença, verificamos que os pacientes classificados como intermediário e alto risco, apresentaram a maior taxa de evolução da doença ($p < 0,001$). Dos pacientes classificados como intermediário 1, nove pacientes (18,8%) apresentaram evolução da doença; no grupo intermediário 2, nove pacientes (60%) apresentaram evolução e no grupo alto risco outros sete pacientes (77,8%) evoluíram para LMA. Não houve transformação leucêmica no grupo de baixo risco (Figura 39). De acordo com o IPSS, foram a óbito quatro pacientes de baixo risco, 23 pacientes com prognóstico intermediário 1, 13 pacientes com prognóstico intermediário 2 e oito pacientes com alto risco.

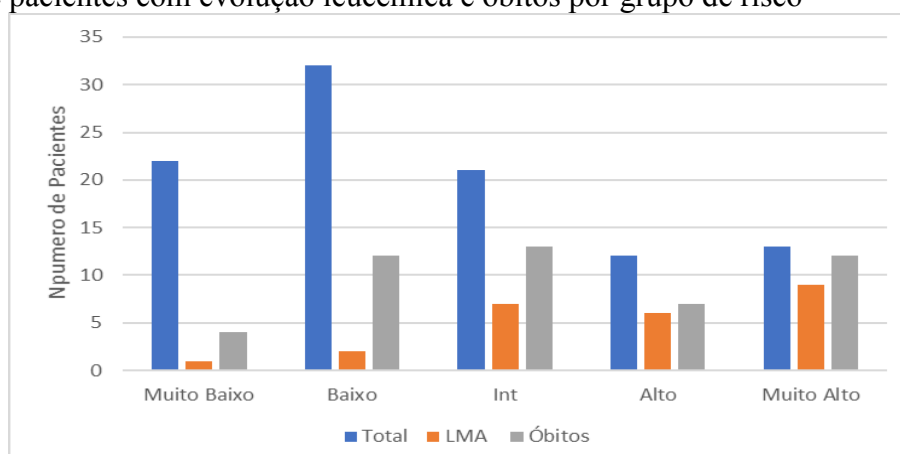
Em relação aos grupos de risco pelo IPSS-R, os pacientes classificados com alto risco e muito alto risco, apresentaram a maior frequência de evolução da doença para LMA ($p < 0,001$). Dentre os classificados como muito baixo risco, um paciente (4,55%) apresentou evolução leucêmica. No grupo de baixo risco, dois pacientes (6,25%) apresentaram evolução da doença; no grupo intermediário, sete pacientes (33,3%) apresentaram evolução, no grupo de alto risco seis pacientes (50%) apresentaram LMA e no grupo muito alto risco outros 9 pacientes (69,2%) evoluíram para leucemia (Figura 40). Foram a óbito, 4 pacientes com muito baixo risco, 12 pacientes com baixo risco, 13 pacientes do grupo intermediário, 7 pacientes de alto risco e 12 pacientes de muito alto risco, de acordo com o IPSS-R.

Figura 39 – Distribuição dos pacientes com SMD primária de acordo com o IPSS. Número de pacientes com evolução leucêmica e óbitos por grupo de risco



Fonte: A autora, 2022.

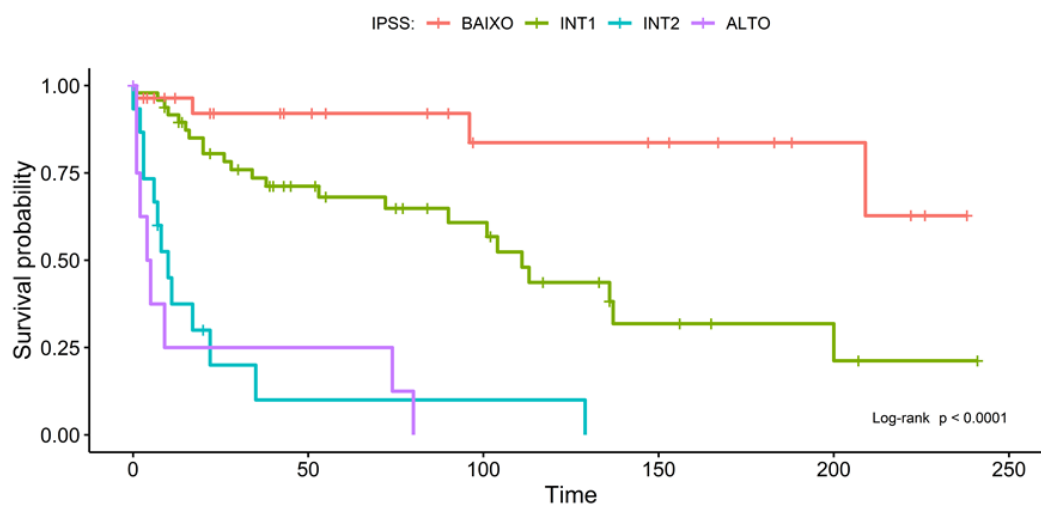
Figura 40 – Distribuição dos pacientes com SMD primária de acordo com o IPSS-R. Número de pacientes com evolução leucêmica e óbitos por grupo de risco



Fonte: A autora, 2022.

Segundo o IPSS, os pacientes com menor risco de evolução leucêmica (baixo risco e intermediário 1) apresentaram sobrevida maior em relação aqueles com maior risco (alto risco e intermediário 2) ($p < 0,0001$), como pode ser observado na Figura 41.

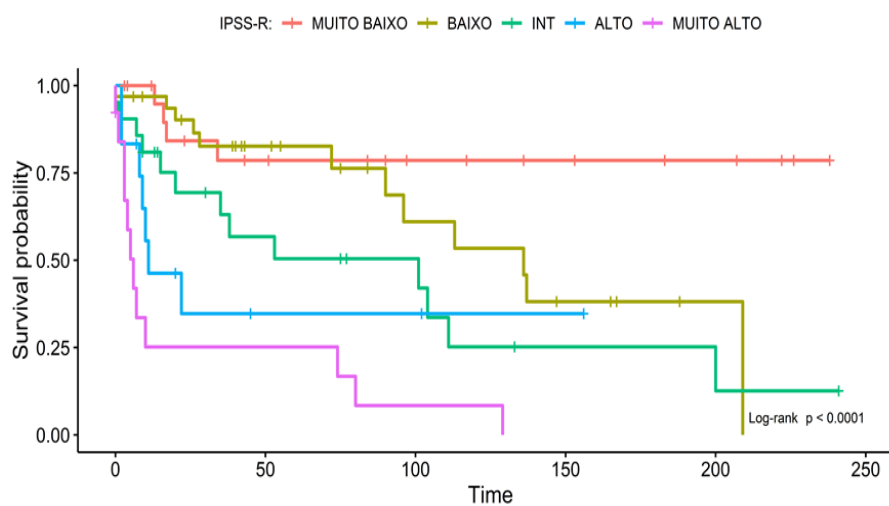
Figura 41 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com o prognóstico pelo IPSS ($p < 0,0001$)



Fonte: A autora, 2022.

Segundo o IPSS-R, os pacientes com menor risco de evolução leucêmica (muito baixo e baixo risco) apresentaram sobrevida maior em relação aqueles com maior risco (alto risco e muito alto risco) ($p < 0,0001$), como pode ser observado na Figura 42.

Figura 42 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com o prognóstico pelo IPSS-R ($p < 0,0001$)



Fonte: A autora, 2022.

4.7 Estudo Molecular

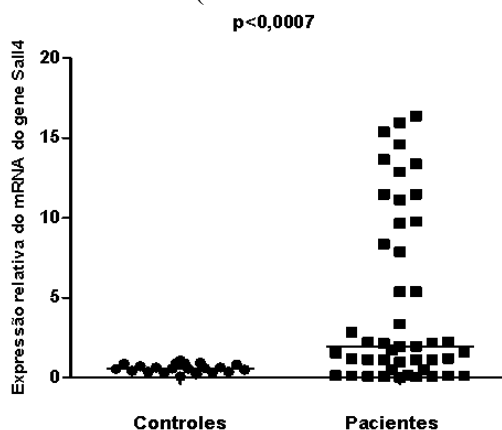
4.7.1 Estudo do Padrão de Expressão de *SALL4* em Pacientes com SMD Primária

4.7.1.1 Análise do Padrão de Expressão do gene *SALL4* por qRT-PCR

A análise do padrão de expressão do gene *SALL4* em pacientes com SMD primária foi realizada pela técnica de qRT-PCR. Para esta análise foram estudadas 21 amostras de doadores de medula óssea, controles (indivíduos saudáveis) e 46 amostras de medula óssea de pacientes com SMD primária. Desses pacientes, 32 foram classificados em estágios iniciais da doença (CRDU/CRDM) e 14 nos subtipos mais avançados (SMD-EB1/SMD-EB2).

A mediana referente aos níveis relativos de expressão do gene *SALL4* nos controles foi de 0,5762 (amplitude de 0,0733 a 1,0851). Esse resultado quando comparado com a mediana dos pacientes, 1,95835 (amplitude de 0,0317 a 15,9539) mostrou significância estatística, $p < 0,0007$ (Figura 43).

Figura 43 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene *SALL4* em pacientes com SMD primária em relação aos controles (doadores de medula óssea)



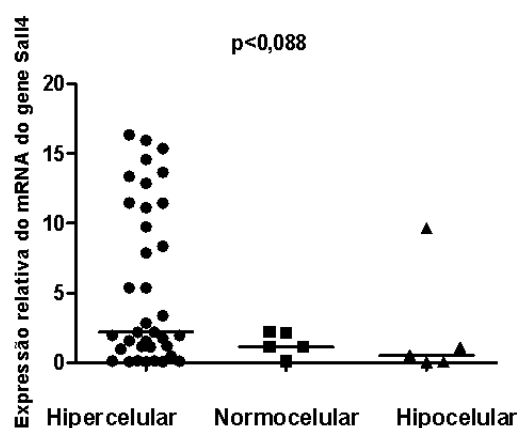
Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

Em relação ao estudo de algumas características morfológicas com o padrão de expressão de *SALL4*, verificamos que a associação do padrão de expressão de *SALL4* com a

celularidade da medula óssea, onde 5 pacientes apresentaram medula óssea hipocelular, 5 normocelular e 36 hiper celular, não apresentou diferença significativa entre esses 3 grupos $p < 0,088$ (Figura 44). No entanto, quando comparado o padrão de expressão de *SALL4* entre a medula óssea hiper celular com a hipocelular foi verificado diferença entre esses dois grupos $p < 0,05$ (Teste de Mann-Whitney).

Figura 44 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene *SALL4* em pacientes com SMD primária em relação à celularidade da medula óssea

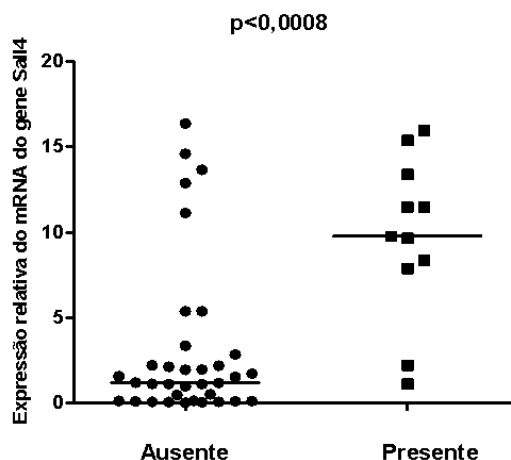


Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

A associação do padrão de expressão de *SALL4* com a ausência (35 pacientes) comparando com presença (11 pacientes) de ALIP, mostrou significância estatística $p < 0,0008$ (Figura 45).

Figura 45 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene *SALL4* em pacientes com SMD primária em relação à ausência e presença de ALIP

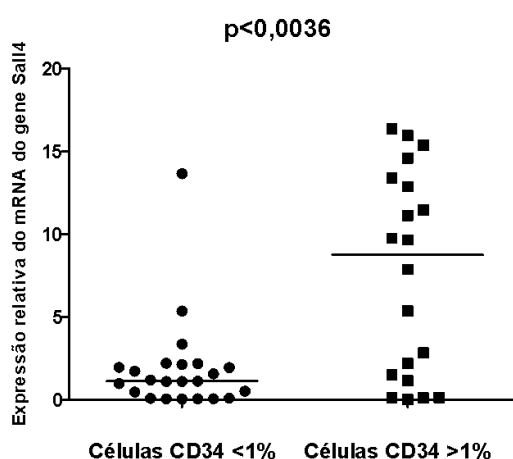


Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

A associação do padrão de expressão de *SALL4* com um número de células CD34 menor que 1% (23 pacientes) comparado com o número de células igual ou maior que 1% (20 pacientes) mostrou significância estatística $p < 0,0036$ (Figura 46).

Figura 46 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene *SALL4* em pacientes com SMD primária em relação à ausência e presença de porcentagem de células CD34 positivas



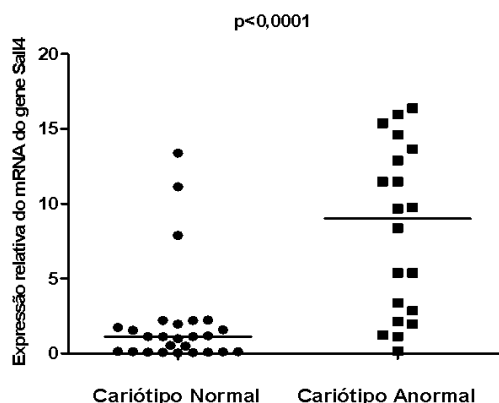
Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

Analisando o padrão de expressão do gene *SALL4* em relação ao cariótipo, observamos que os pacientes com cariótipos normais apresentaram uma mediana de 1,1161 (amplitude de 0,0317- 13,3759). Já os pacientes com cariótipos anormais apresentaram uma mediana referente

aos níveis relativos de expressão do gene *SALL4* de 9,652 (amplitude de 0,1434 a 15,9539). Esses resultados mostraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) (Figura 47).

Figura 47 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene *SALL4* em pacientes com SMD primária em relação ao padrão cromossômico: cariótipo normal versus cariótipo anormal

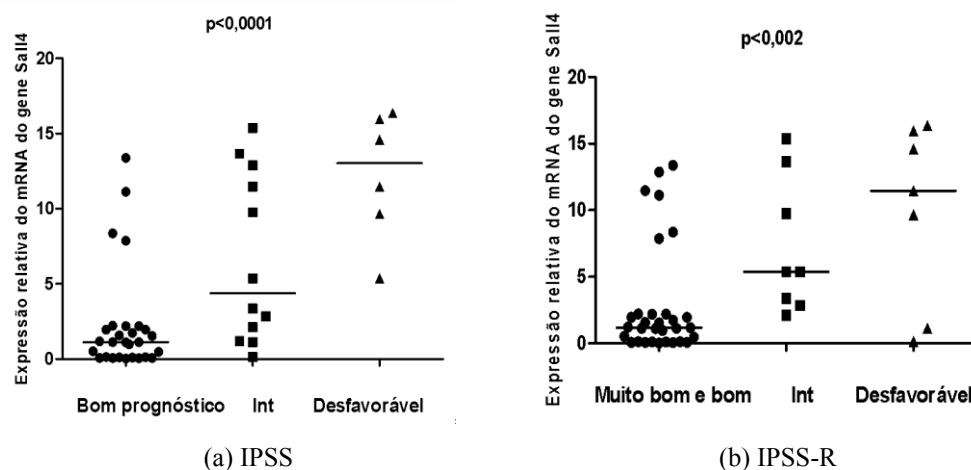


Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

Analisando o padrão de expressão relativa do gene *SALL4* em relação aos grupos de risco citogenéticos, foi observado que os pacientes segundo o IPSS mostraram para o grupo de bom prognóstico uma mediana de 1,1241 (amplitude de 0,0317 a 13,3759), para o grupo de prognóstico intermediário foi observado uma mediana de 4,3686 (amplitude 0,1434 - 15,3683) e para o grupo de prognóstico desfavorável foi observada uma mediana de 13,0265 (amplitude de 5,3683 a 15,9539). A comparação dos níveis relativos de expressão do gene *SALL4* mostrou significância estatística entre os grupos de risco citogenéticos segundo o IPSS ($p < 0,0001$) (Figura 48.a). Considerando o IPSS-R, foi observado para o grupo de muito bom prognóstico apenas dois pacientes que foram adicionados ao grupo de bom prognóstico para análise estatística. Nesse grupo foi observado uma mediana de 1,1738 (amplitude 0,0317- 12,8749), para o grupo intermediário foi observado uma mediana de 5,3686 (amplitude 2,1313- 15,3683) e para o prognóstico desfavorável a mediana foi 11,4627 (amplitude 0,1434-15,9539). A comparação dos níveis relativos de expressão do gene *SALL4* mostrou significância estatística entre os grupos de risco citogenéticos segundo o IPSS ($p < 0,002$) (Figura 48.b).

Figura 48 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene *SALL4* em pacientes com SMD primária em relação ao grupo de risco citogenético segundo o IPSS: bom prognóstico, intermediário (Int) e prognóstico desfavorável (A) e segundo o IPSS-R: muito bom e bom, intermediário (Int) e desfavorável

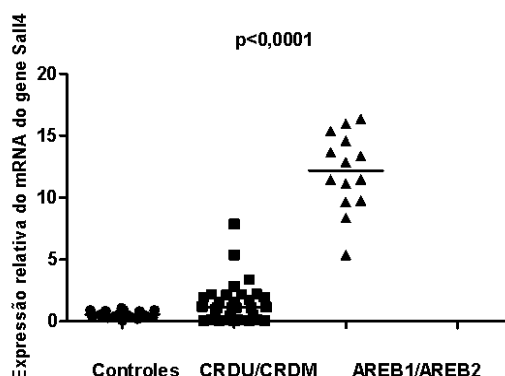


Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

Em relação os subtipos segundo a classificação OMS, 32 pacientes foram classificados em estágios iniciais da doença (CRDU/CRDM) e 14, nos subtipos mais avançados (SMD-EB1/SMD-EB2). Para os pacientes em estágios iniciais a mediana referente aos níveis relativos de expressão do gene *SALL4* foi de 1,1281 (amplitude de 0,0317 a 7,8761) e para os pacientes em estágios avançados (SMD-EB1/SMD-EB2) a mediana foi de 12,1731 (amplitude 5,3689-15,9539). A análise comparativa dos níveis de expressão de *SALL4* nesses grupos mostrou diferença significativa $p < 0,0001$ (Figura 49).

Figura 49 – Análise dos níveis relativos de expressão de *SALL4* em pacientes com SMD primária: estágios iniciais da doença (CRDU/CRDM) e avançados (AREB1/AREB2) com os controles

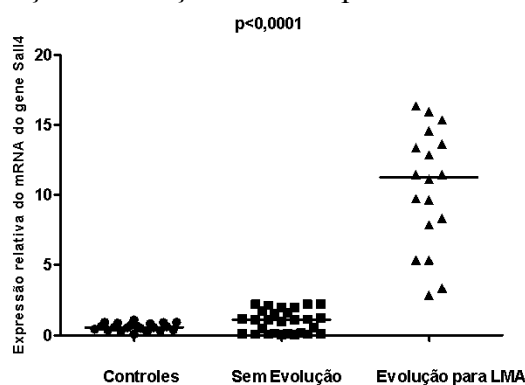


Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

Dos 46 pacientes, 18 (39%) apresentaram evolução para LMA. Para os pacientes que não apresentaram evolução da doença a mediana foi de 1,1161 (amplitude de 0,0317 a 2,2154) e para os pacientes com evolução para LMA a mediana foi de 11,2967 (amplitude 2,8451-15,9539). A análise comparativa dos níveis de expressão de *SALL4* nesses grupos e os controles mostrou diferença significativa $p < 0,0001$ (Figura 50).

Figura 50 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene *SALL4* em pacientes com SMD primária em relação à evolução da SMD para LMA



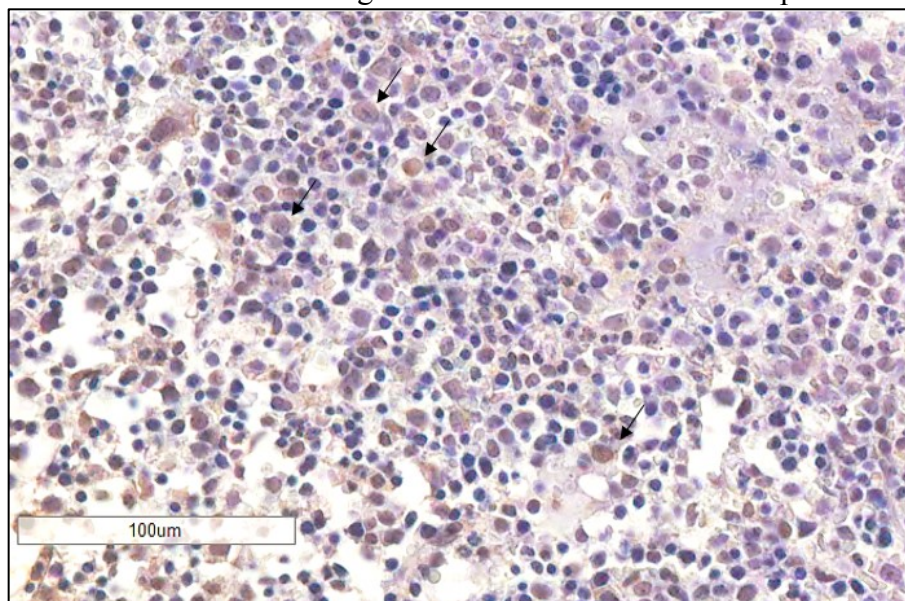
Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

4.7.1.2 Análise de Expressão de SALL4 por Imuno-histoquímica

A análise de expressão de SALL4 por imuno-histoquímica foi realizada em 36 pacientes com SMD primária. Os pacientes foram classificados de acordo com a OMS em estágios iniciais: CRDU (11 pacientes), CRDM (8 pacientes), CRDM-SA (1 paciente); estágios avançados: SMD-EB-1 (7 pacientes), SMD-EB-2 (6 pacientes) e LMA secundária à SMD (3 pacientes). Na Figura 51 podemos observar uma amostra de biópsia de medula óssea de uma paciente com AREB-1 mostrando positividade para a expressão de SALL4.

Figura 51 – Imuno-histoquímica pelo anticorpo SALL4 (400x). Presença de imunopositividade de padrão de marcação nuclear (coloração castanha) nas células com expressão de SALL4. Setas evidenciam algumas dessas células com imunopositividade



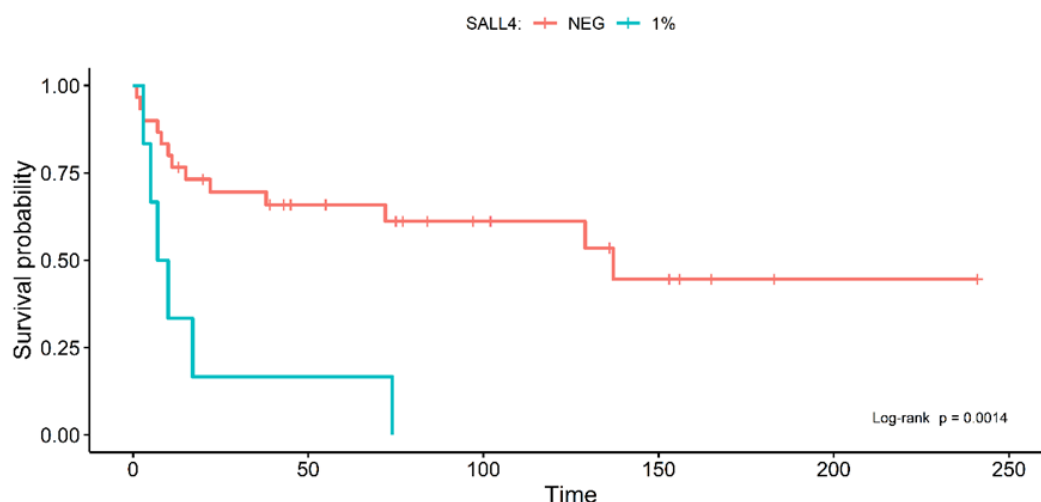
Fonte: A autora, 2022.

Anormalidades cromossômicas foram detectadas em todos os 36 pacientes (100%) com expressão de SALL4 pelo estudo imuno-histoquímico e em 18 pacientes (60%) sem expressão de SALL4. As alterações cromossômicas encontradas nos pacientes com expressão de SALL4 foram monossomia do cromossomo 7 (2 casos), del7q31 (1 caso), trissomia do cromossomo 8 (2 casos) e cariótipos complexos (2 casos).

A expressão de SALL4 foi observada em 6 pacientes com doença avançada. De acordo com a classificação da OMS, foram observados um paciente AREB-1, três pacientes AREB-2 e um paciente com LMA secundária a SMD. Nenhuma expressão de SALL4 foi observada pelo método imuno-histoquímico em pacientes com SMD inicial pela classificação da OMS ($p = 0,004$).

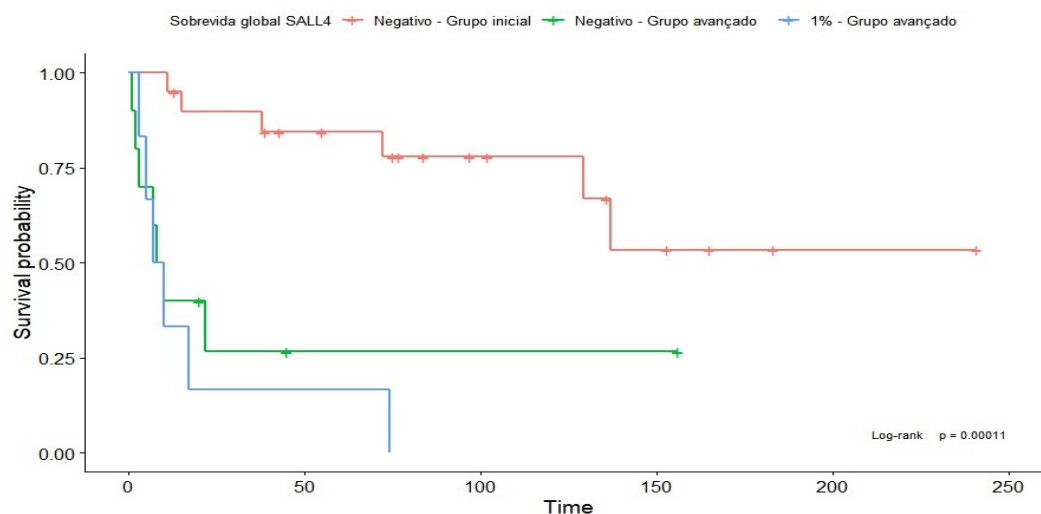
Os pacientes com expressão de SALL4 pelo estudo imuno-histoquímico tiveram menor sobrevida em relação aos demais pacientes sem a expressão desse gene, como pode ser observado na Figura 52 ($p = 0,0014$). Na Figura 53, observa-se que a sobrevida do grupo de pacientes com doença avançada e apresentando expressão de SALL4 foi menor do que os demais desse grupo ($p = 0,00011$). Todos os pacientes com expressão de SALL4 tiveram evolução leucêmica ($p = 0,02$).

Figura 52 – Curva de Kaplan-Meier evidenciando sobrevida global dos pacientes com SMD. Aqueles pacientes que apresentaram imunopositividade para SALL4 apresentaram menor sobrevida, independente da fase da doença



Fonte: A autora, 2022.

Figura 53 – Curva de Kaplan-Meier evidenciando que os pacientes do grupo avançado pela OMS com expressão de SALL4 tiveram menor sobrevida do que os pacientes com doença avançada sem expressão de SALL4 e do que os pacientes com doença na fase inicial. Não houve pacientes na fase inicial da doença com expressão imunohistoquímica de SALL4 ($p < 0,0001$)



Fonte: A autora, 2022.

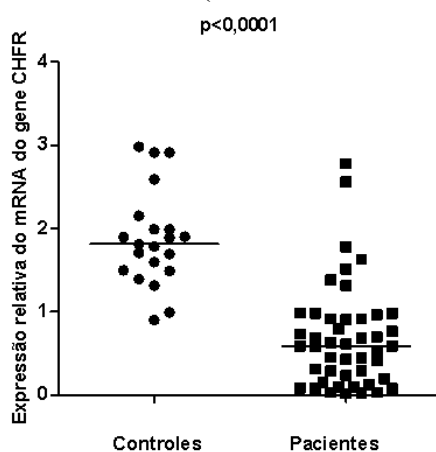
4.7.2 Estudo do Padrão de Expressão de *CHFR* em Pacientes com SMD Primária

4.7.2.1 Análise do Padrão de Expressão do gene *CHFR* por qRT-PCR

A análise do padrão de expressão do gene *CHFR* em pacientes com SMD primária foi realizada pela técnica de qRT-PCR. Para esta análise foram estudadas 21 amostras de doadores de medula óssea, controles (indivíduos saudáveis) e 46 amostras de medula óssea de pacientes com SMD primária. Desses pacientes, 32 foram classificados em estágios iniciais da doença (CRDU/CRDM) e 14 nos subtipos mais avançados (SMD-EB1/ SMD-EB2).

A mediana referente aos níveis relativos de expressão do gene *CHFR* nos controles foi de 1,813 (amplitude de 0,901 a 2,981). Esse resultado quando comparado com a mediana dos pacientes, 0,5873 (amplitude de 0,019 a 2,781) mostrou significância estatística, $p < 0,0001$ (Figura 54).

Figura 54 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene *CHFR* em pacientes com SMD primária em relação aos controles (doadores de medula óssea)

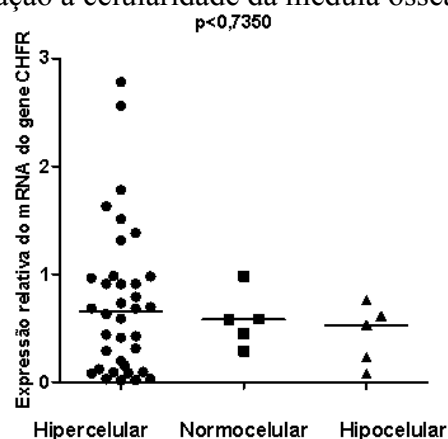


Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

Em relação ao estudo de algumas características morfológicas com o padrão de expressão de *CHFR*, verificamos que a associação do padrão de expressão de *CHFR* com a celularidade da medula óssea, onde 5 pacientes apresentaram medula óssea hipocelular, 5 normocelular e 36 hiper celular, não apresentou diferença significativa entre esses 3 grupos $p < 0,7350$ (Figura 55).

Figura 55 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene *CHFR* em pacientes com SMD primária em relação à celularidade da medula óssea

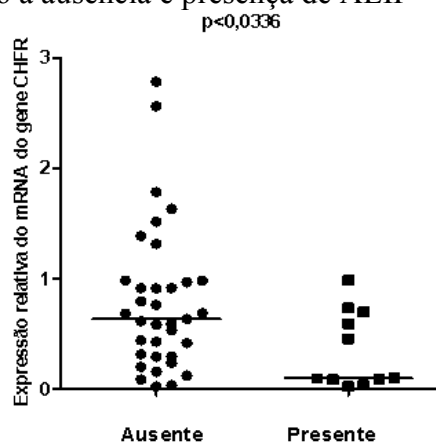


Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

A associação do padrão de expressão de *CHFR* com a ausência (35 pacientes) comparando com presença (11 pacientes) de ALIP, mostrou significância estatística $p < 0,0336$ (Figura 56).

Figura 56 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene *CHFR* em pacientes com SMD primária em relação à ausência e presença de ALIP

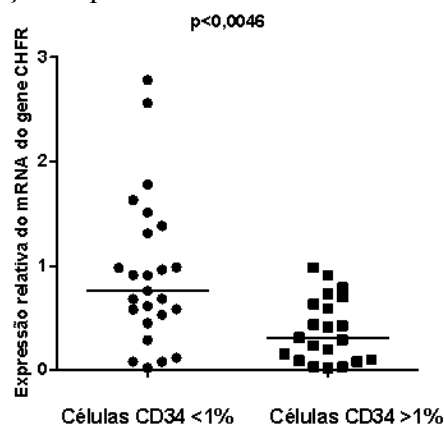


Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

A associação do padrão de expressão de *CHFR* com um número de células CD34 menor que 1% (25 pacientes) comparado com o número de células igual ou maior que 1% (21 pacientes) mostrou significância estatística $p < 0,0046$ (Figura 57).

Figura 57 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene *CHFR* em pacientes com SMD primária em relação à quantidade de células CD34 <1% e igual ou >1%

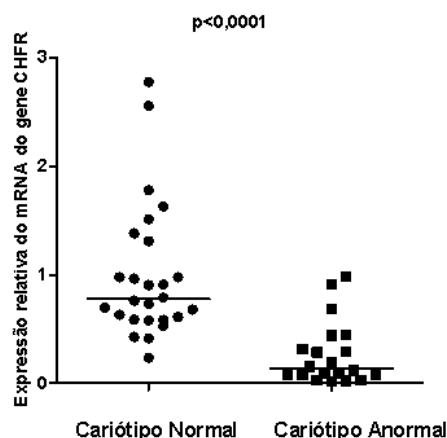


Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

Analisando o padrão de expressão do gene *CHFR* em relação ao cariótipo, observamos que os pacientes com cariótipos normais apresentaram uma mediana de 0,77655 (amplitude de 0,2351-2,7816) quando comparado com os pacientes com cariótipos anormais que apresentaram uma mediana referente aos níveis relativos de *CHFR* de 0,1373 (amplitude de 0,0192-0,9851) ($p<0,0001$) (Figura 58).

Figura 58 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene *CHFR* em pacientes com SMD primária em relação ao padrão cromossômico: cariótipo normal versus cariótipo anormal



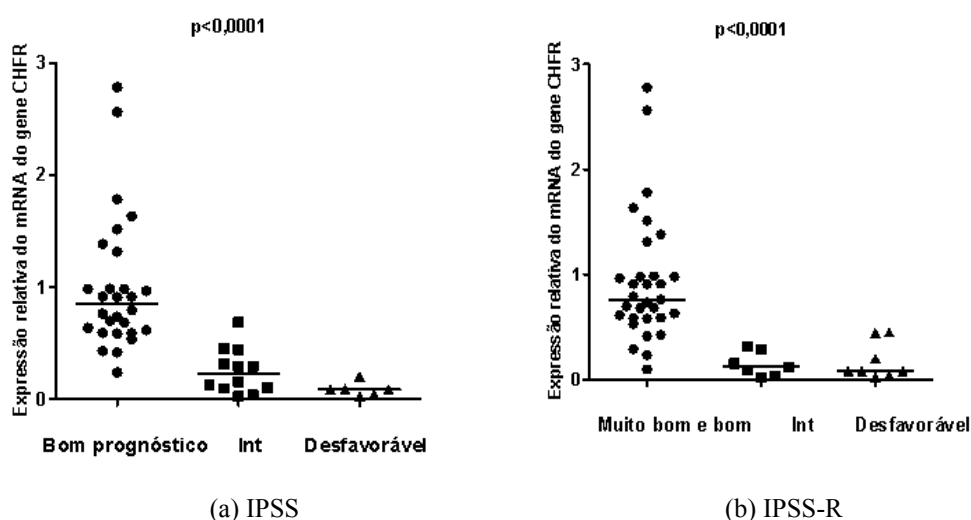
Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

Analisando o padrão de expressão relativa do gene *CHFR* comparando os grupos de risco citogenéticos segundo o IPSS foi possível verificar diferença estatística entre os grupos

($p < 0,0001$) (Figura 59a). Considerando o IPSS-R, foi observado para o grupo de muito bom prognóstico apenas dois pacientes que foram adicionados ao grupo de bom prognóstico para análise estatística. A comparação dos níveis relativos de expressão do gene *CHFR* entre os grupos de risco citogenéticos segundo o IPSS-R também mostrou significância ($p < 0,0001$) (Figura 59b).

Figura 59 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene *CHFR* em pacientes com SMD primária em relação ao grupo de risco citogenético segundo o IPSS: bom prognóstico, intermediário (Int) e prognóstico desfavorável (A) e segundo o IPSS-R: muito bom e bom, intermediário (Int) e desfavorável

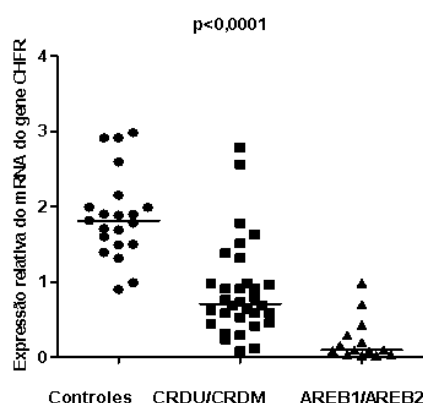


Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

Em relação aos subtipos segundo a classificação OMS, 32 pacientes foram classificados em estágios iniciais da doença (CRDU/CRDM) e 14, nos subtipos mais avançados (SMD-EB1/ SMD-EB2). A análise comparativa dos níveis de expressão relativa de *CHFR* entre os controles, estágios iniciais da doença (CRDU/CRDM) e avançados SMD-EB1/ SMD-EB2) mostrou diferença significativa $p < 0,0001$ (Figura 60).

Figura 60 – Análise dos níveis relativos de expressão de *CHFR* em pacientes com SMD primária: estágios iniciais da doença (CRDU/CRDM) e avançados (AREB1/AREB2) com os controles

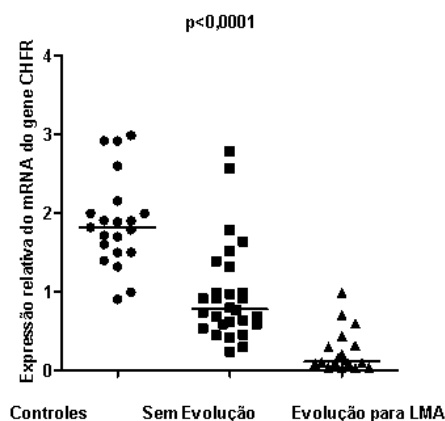


Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

Fonte: A autora, 2022.

Dos 46 pacientes, 18 (39%) apresentaram evolução para LMA. A análise comparativa dos níveis de expressão de *CHFR* nesses grupos e os controles mostrou diferença significativa $p<0,0001$ (Figura 61).

Figura 61 – Análise dos níveis relativos de expressão do gene *CHFR* em pacientes com SMD primária em relação à evolução da SMD para LMA



Legenda: Os resultados estão representados no gráfico “dot-plot” mostrando a mediana e amplitude (Teste de Mann-Whitney, GraphPad Prism versão 5.0).

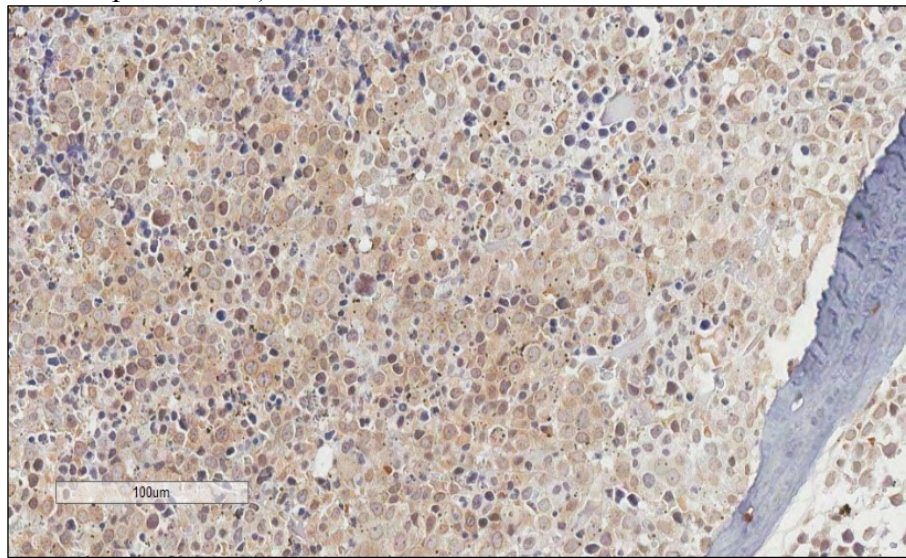
Fonte: A autora, 2022.

4.7.2.2 Análise Expressão de *CHFR* por Imunohistoquímica

A análise de expressão de *CHFR* por imunohistoquímica em 23 pacientes revelou 3 grupos: pacientes que apresentaram baixa expressão (12/52%), expressão intermediária

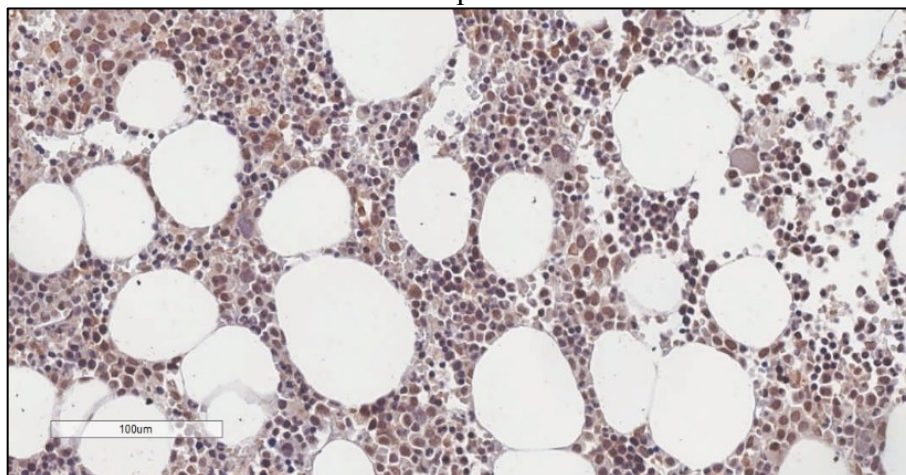
(6/26%) e alta expressão (5/22%) (Figura 62, Figura 63 e Figura 64).

Figura 62 – Paciente CRDU, com cariótipo complexo que evoluiu para LMA. Medula óssea hipercelular e com células blásticas, apresentando cerca de 5% de células hematopoéticas positivas pelo CHFR, mostrando a baixa expressão (<10% de células positivas para CHFR)



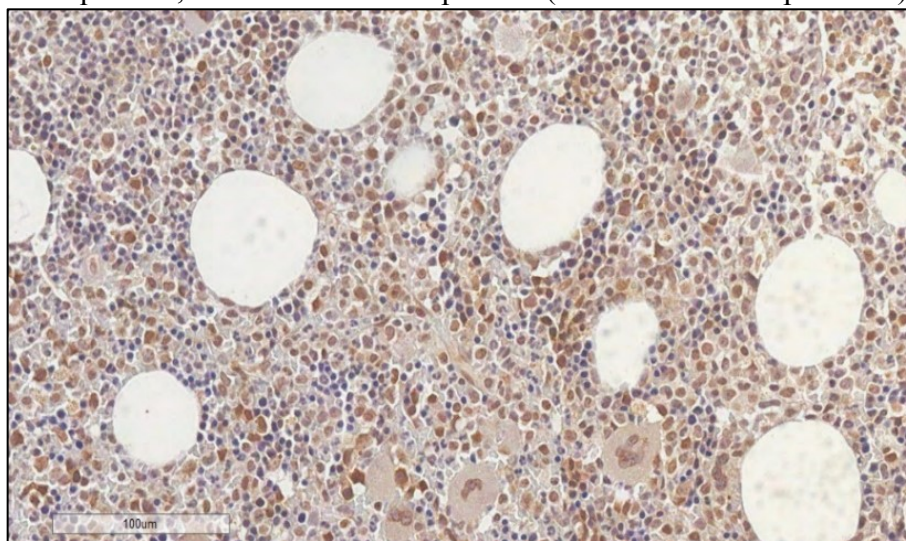
Fonte: A autora, 2022.

Figura 63 – Paciente CRDU apresentando del(11)(q23) como alteração citogenética e ALIP na biópsia de medula óssea. O estudo da expressão do CHFR foi positivo em cerca de 40% das células medulares hematopoéticas



Fonte: A autora, 2022.

Figura 64 – Paciente com CRDU, apresentando cariótipo normal (46,XX) e expressão aumentada (cerca de 80% de células positivas) de CHFR pelo estudo imunohistoquímico, mostrando a alta expressão (> 50% de células positivas)



Fonte: A autora, 2022.

Foi possível observar que baixa expressão de CHFR esteve presente em 100% de casos com cariótipos anormais envolvendo as seguintes alterações cromossômicas: t(2;11) (1/12), del(3p) (1/12), del(7q) (1/12), +8 (4/12), del(8p)+19 (1/12), i(9q) (1/12), del(17p)(1/12), cariótipo complexo (2/12). A expressão intermediária de CHFR esteve associada em apenas um caso com cariótipo normal e 4 casos com cariótipos anormais envolvendo as alterações: t(3;5), -7, del(11q23), +21 e cariótipo complexo, pacientes com uma expressão maior de CHFR apresentaram principalmente cariótipos normais na maioria dos casos (4/5) e um paciente apresentou cariótipo anormal envolvendo a del(20q) (Tabela 37).

Tabela 37 – Associação entre a expressão de CHFR e a presença de cariótipos anormais

Expressão CHFR	Cariótipo normal nº de pacientes/(%)	Cariótipo anormal nº de pacientes/(%)
Baixa (<10% células)	0	12 (100%)
Intermediária (10-50% células)	1 (17%)	5 (83%)
Alta (>50% células)	4 (80%)	1 (20%)
Total	5 (22%)	18 (78%)

Fonte: A autora, 2022.

Analisando os tipos de alteração citogenética: estrutural, numérica e numérica e estrutural e os demais cariótipos normais foi possível observar diferença estatística entre esses grupos ($p = 0,027$). Os resultados sugerem que a baixa expressão de CHFR está associada à presença de alterações numéricas (Tabela 38).

Tabela 38 – Associação entre o tipo de alteração citogenética e o padrão de expressão do CHFR

CFHR	Tipo de Alteração Citogenética				Total
	Estrutural	Numérica	Numérica e Estrutural	Normal	
Baixa expressão	4	5	4	0	13
Expressão intermediária	1	2	1	1	5
Alta expressão	0	1	0	4	5
Total	5	8	5	5	23

p-valor (teste de Fisher): 0.027

Fonte: A autora, 2022.

5 DISCUSSÃO

Em 1982, a classificação FAB definiu critérios diagnósticos para a SMD primária e separou os pacientes em grupos de acordo com a fase da doença (BENNETT et al., 1982). A partir disso, os critérios morfológicos, incluindo a biópsia de medula óssea foram revistos com objetivo de auxiliar o diagnóstico (DE WOLF-PEETERS; PITTALUGA; VERHOEF, 1994). Em seguida, novas classificações e escalas prognósticas foram elaboradas e passaram a incluir as características citogenéticas. A classificação mais recente formulada pela OMS em 2016 enfatizou a importância da correlação da biópsia de medula óssea com o mielograma, a citogenética e as características clínicas do paciente (BENNETT, 2016). Dessa forma, faz-se necessário explorar as características morfológicas da biópsia de medula óssea para verificar seu possível emprego como instrumento prognóstico. Atualmente para a SMD dispomos de duas classificações prognósticas: IPSS e IPSS-R, entretanto nenhuma utiliza critérios morfológicos de biópsia de medula óssea como variável prognóstica (GREENBERG et al., 1997; GREENBERG et al., 2012). Nesse sentido, o desenvolvimento da padronização de laudos anatomo-patológico para avaliação diagnóstica e de acompanhamento de paciente com SMD primária poderá auxiliar no desenvolvimento de classificações prognósticas futuras com maior grau de refinamento.

Nossos resultados morfológicos da análise em biópsia de medula óssea mostraram valor diagnóstico e prognóstico, sendo complementar ao mielograma, e associaram-se com as classificações da OMS, do IPSS e do IPSS-R.

No presente estudo, ALIP, descrita primariamente por Tricot e colaboradores em 1984, foi mais observada nos pacientes com doença avançada quando comparados com os doentes em fase inicial. A presença de ALIP em biópsia de medula óssea como fator prognóstico para evolução leucêmica foi demonstrada em nossos resultados. Outros estudos também descreveram o impacto da presença de ALIP como fator prognóstico desfavorável (VERBURGH et al., 2003; DELLA PORTA et al., 2009; XIONG, 2017). Tem sido recomendado a substituição do termo ALIP, usado para descrição de células mieloides imaturas agregadas observadas pelo estudo imunohistoquímico usando CD34, por acúmulo multifocal anormal de células precursoras CD34+ (AMA-34) nos laudos histopatológicos de casos confirmados ou suspeitos de SMD (VALENT et al, 2010).

Um aspecto cujo significado ainda é discutido é a presença de células CD34 positivas em mais de 1% da celularidade medular como fator prognóstico. Baur e colaboradores

estudaram a presença de células CD34 positivas isoladas e em agregados/aglomerados (ALIP) em biópsias de medula óssea de pacientes com SMD e LMA secundária à SMD, comparando com medulas ósseas reativas. Os autores observaram que a porcentagem de células CD34 na medula óssea era maior nos pacientes com SMD do que nas condições reativas e sua porcentagem aumentava conforme a progressão da doença de acordo com a classificação FAB, sendo observado ALIP principalmente nos subtipos avançados (AREB e AREB-t) (BAUR et al, 2000). Em outros estudos que analisaram a porcentagem de células CD34 positivas como fator prognóstico independente, a análise quantitativa foi realizada sem levar em consideração se essas células formavam ou não agregados/aglomerados (ALIP) (VERBURGH et al., 2003; DELLA PORTA et al., 2009). Em relação ao prognóstico, ainda não se chegou em um consenso sobre o uso de células CD34+ isoladas. Enquanto Cha e colaboradores (2014) não mostraram associação entre células CD34+ e o IPSS-R, apesar do aumento de células CD34+ ter sido relacionado à menor sobrevida, Xiong e colaboradores (2017) evidenciaram, em um n amostral 3 vezes maior de pacientes, que além de pacientes com 5% ou mais de células CD34+ terem sobrevida menor, houve significância de associação com os grupos de risco pelo IPSS-R.

Nosso estudo mostrou que tanto pacientes com ALIP, como pacientes com células CD34+ isoladas, apresentaram menor sobrevida, inclusive aqueles com contagens entre 1% a 5% de células CD34+ isoladas. O aumento de células blásticas em pacientes com SMD sem formação de ALIP pode ser considerado como indicativo de perda arquitetural dentro do contexto da presença de displasia e pode ser visto como um provável indicador de prognóstico desfavorável para evolução leucêmica, principalmente nas fases iniciais da doença. Ou seja, o uso do estudo imunohistoquímico utilizando o marcador CD34 reforça a necessidade da avaliação morfológica através da biópsia de medula óssea e como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico diferencial da SMD e condições reativas. A presença de células CD34+ isoladas também são importantes na avaliação clínica.

Vários estudos têm mostrado a correlação entre ALIP, presente na coloração de hematoxilina-eosina, e a expressão de CD34 ao diagnóstico (DUNPHY et al., 2007; HORHY et al., 2007; VERBURGH et al., 2003; DELLA PORTA et al., 2009). Entretanto, essa correlação não é absoluta devido a diversos motivos. Um deles é a semelhança morfológica dos mieblastos com os eritroblastos (DUNPHY et al., 2007). Outro é pela marcação de células endoteliais pelo anticorpo monoclonal CD34. A presença de angiogênese, com sinais de aumento da densidade microvascular, comumente observada nos pacientes com SMD, pode levar a uma interpretação enganosa de ALIP, pois as células endoteliais também são positivas para o anticorpo anti-CD34 (MEDINGER; FISCHER; TZANKOV, 2010; HORNY et al, 2007).

Além disso, existem raros casos de SMD com blastos CD34 negativos. Nestes casos, é conveniente a utilização do anticorpo anti-CD117, o qual não é específico para progenitores mieloides, pois também é expresso por mastócitos, o que torna necessário para avaliação dos resultados de células CD117 positivas, a correlação da morfologia celular com o estudo imuno-histoquímico (HORNY et al., 2007; VALENTE et al., 2010).

Outra característica morfológica que deve ser levada em consideração nos pacientes com SMD primária é a relação mieloide:eritroide (M:E), em especial nos casos de doença avançada, onde essa relação é observada aumentada por estímulo da proliferação celular principalmente de mielócitos e promielócitos (WANG et al., 2010). Por outro lado, em estágios iniciais da doença, há um estímulo à hiperplasia do setor eritroide e ocorre uma hematopoese ineficaz com aumento da quantidade de células apoptóticas, causando o aparente paradoxo entre citopenia periférica, principalmente anemia, associada com uma medula óssea hiper celular (SHIMAZAKI et al., 2000). Em nosso estudo, esse fato foi observado e corroborado por evidenciarmos nos pacientes de doença inicial diminuição da relação mieloide:eritroide pelo aumento do setor eritroide, assim como nos grupos de baixo risco e de muito baixo risco pelo IPSS-R. Por outro lado, os pacientes de alto e muito alto risco apresentaram aumento da relação mieloide:eritroide. Isso apresentou impacto na sobrevida, pois aqueles com aumento de M:E tiveram sobrevida menor quando comparados com aqueles com M:E normal ou diminuída.

De Wolf-Peeters e colaboradores (1994) descreveram uma redução gradual da eritropoiese concomitante ao aumento da mielopoese, durante o curso da doença, correlacionando com os grupos da classificação FAB, o que pode ser reforçado pelo fato da relação mieloide:eritroide encontrar-se aumentada principalmente na fase avançada e reduzida na fase inicial da doença. Isso indica que se o paciente apresentar hiper celularidade devido à hiperplasia eritróide, independentemente da presença de megaloblastose, sua sobrevida tende a ser maior do que aquele cuja celularidade está aumentada por desmaturação mieloide ineficaz e aumento de células blásticas intramedular. Por outro lado, medulas ósseas hiper celulares podem ocorrer às custas do aumento da quantidade de células blásticas mieloides. Ou seja, a celularidade *per si* não deve alterar o prognóstico do paciente, e sim, a linhagem celular que a predomina e a sua maturação. Nosso estudo reforça essa ideia, pois a celularidade, ao contrário da relação M:E, não apresentou associação com os grupos definidos pelo e pelo IPSS-R e com a sobrevida. Pela OMS, foi observado uma associação entre medulas ósseas hiper celulares e a fase avançada da doença.

A hiper celularidade medular é encontrada na maioria dos pacientes adultos com SMD. Em ordem decrescente esta hiperplasia acomete linhagens eritroide, mieloide e megacariocítica

(DE WOLF-PEETERS, 1991; MASHIMA et al, 2019). No presente estudo, o achado predominante foi a hipercelularidade, principalmente na fase avançada da doença. Observou-se medula óssea normocelular em pacientes com citopenias refratárias e em apenas um paciente na fase avançada. Entretanto, não houve correlação com o IPSS-R, nem houve diferença de sobrevida entre os pacientes com medula óssea hipercelular, normocelular e hipocelular.

A SMD hipocelular tem sido assunto de interesse por parte dos pesquisadores desde sua descrição pela OMS em 2008 (YUE et al., 2008; SLOAND, 2009; YAO et al., 2016). Nesses estudos, há dados que sugerem que a medula óssea hipocelular seja um fator independente de bom prognóstico, considerando a taxa de sobrevida e de evolução leucêmica. Entretanto, na literatura, a celularidade medular estratificada em normocelular, hipercelular e hipocelular usando como parâmetro análise em biópsia de medula óssea como foi realizado no nosso estudo é pouco explorada. A maioria dos trabalhos compara pacientes com medula óssea hipocelular com os demais pacientes e sugerem que a SMD hipocelular seja considerada uma classe separada (HUANG et al., 2008). O único estudo em que observamos estratificação da celularidade medular em normocelular, hipercelular e hipocelular com correlação com a classificação OMS e os grupos de risco pelo IPSS-R não concorda com essa separação da SMD hipocelular como entidade a parte (SCHEMENAU et al., 2015).

Além disso, Schemenau e colaboradores (2015) estudaram 1270 pacientes com SMD onde foi avaliado a correlação da celularidade com o risco de evolução para LMA. Os pacientes com medula óssea hipocelular e normocelular tiveram um risco muito similar de evolução leucêmica, enquanto que os pacientes com medula hipercelular tiveram maior associação com transformação leucêmica. Em relação a sobrevida, nesse estudo, os pacientes com medula óssea normocelular tiveram uma maior sobrevida, seguido pelos pacientes com medula hipocelular. Pacientes com medulas hipercelulares tiveram menor tempo de sobrevida

Em nosso estudo, entre os 100 pacientes estudados, 17 pacientes apresentaram medula óssea hipocelular. É importante, nesses casos, uma análise cuidadosa para excluir outros diagnósticos diferenciais como a anemia aplástica (KOBAYASHI et al., 2017). A dificuldade diagnóstica nestes casos encontra-se no fato do aspirado de medula óssea ser seco com maior frequência, o que impede a realização do mielograma e prejudica a análise citogenética, pois, no cultivo de células pode não haver mitose (SLOAND, 2009). Nessa situação a biópsia de medula óssea torna-se o principal meio de avaliação dos elementos medulares, incluindo a contagem de blastos. Em um dos pacientes que se encontrou medula óssea com celularidade menor que 5%, houve evolução para LMA com uma sobrevida de 6,9 meses. A biópsia de medula óssea desse paciente mostrou além da hipocelularidade, ALIP e diversas células CD34

positivas isoladas em localização atípica. Outro paciente com medula óssea com celularidade de 30% também apresentava ALIP e sofreu transformação leucêmica. Desta forma, a hipocelularidade é um fator importante onde nem todos os casos podem ser considerados como um fator independente de bom prognóstico, conforme descrito por alguns estudos (SLOAND, 2009; YUE et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2017) havendo outros fatores morfológicos e citogenéticos que influenciam na evolução leucêmica (SOUZA et al., 2014).

A análise citogenética de pacientes com SMD hipocelular envolve alterações nos cromossomos 5, 7 e 8 (WONG; SO, 2002). Essas alterações citogenéticas presentes em células da medula óssea de pacientes com SMD hipocelular são importantes porque os diferenciam daqueles pacientes portadores de anemia aplástica. A trissomia do cromossomo 8, uma das alterações que podem acometer esses pacientes, foi classificada como de risco intermediário pelo IPSS-R (Greensberg et al, 2012). No entanto, há estudos que a associam esta alteração cromossômica com um risco aumentado de evolução para leucemia e uma diminuição de sobrevida (SOLÉ et al., 2000; FERNANDEZ et al., 2000; SOUZA et al., 2014; SAUMELL et al., 2015; DREVON et al., 2018). O primeiro paciente descrito acima, com medula óssea hipocelular, reforça essa observação onde essa alteração citogenética foi associada com prognóstico desfavorável, pois o mesmo apresentava trissomia do cromossomo 8. Um dos pacientes estudados com medula óssea hipocelular apresentava inicialmente del(5q) e durante a evolução foi observado a aquisição da del(9p). Apesar desse paciente no momento do diagnóstico apresentar somente a del(5q), a série megacariocítica encontrava-se em quantidade reduzida, o que não é compatível com a síndrome 5q-. Na biópsia de medula óssea foram observados alguns micromegacariócitos e megacariócitos com hipolobulação nuclear. Além disso, no mielograma foi evidenciado 5% de blastos.

Em relação à avaliação da linhagem megacariocítica, foi verificado em nosso estudo que a maioria dos pacientes, independente da fase da doença, apresentaram megacariócitos em quantidade normal. Por outro lado, Sakuma e colaboradores em 2006 verificaram que os pacientes na fase avançada apresentaram quantidade maior de megacariócitos. Esses pacientes estudados apresentaram sobrevida reduzida com desfecho desfavorável. Essa divergência pode ser atribuída ao método de contagem realizada. Sakuma e colaboradores (2006) realizaram a contagem através do estudo imunohistoquímico pelo CD41, enquanto que no presente estudo, a contagem foi feita na lâmina corada pelo HE que é usada na rotina diagnóstica.

O uso do estudo imunohistoquímico pelo CD61 ou pelo CD41 tem sido recomendado principalmente para análise de micromegacariócitos que podem ser confundidos com outros tipos celulares, principalmente com eritroblastos em fase inicial de maturação, o que torna mais

difícil no caso de diseritropoese. Assim, há recomendação do estudo imunohistoquímico para a avaliação quantitativa e qualitativa de megacariócitos em pacientes com SMD (SAKUMA et al., 2006; FENG et al., 2016).

Em nosso estudo a avaliação quantitativa e qualitativa da linhagem megacariocítica revelou que os pacientes com maior risco de evolução leucêmica apresentaram maior quantidade de megacariócitos com hipolobulação nuclear. De modo geral, os estudos associam a dismegacariopoese, tanto pela avaliação pela biópsia medula óssea como pelo mielograma, com as fases da doença e como fator prognóstico (SAKUMA et al., 2006; FENG et al., 2016; HUANG, 2018).

A avaliação da perda arquitetural no presente estudo foi realizada considerando-se as três linhagens eritroide, mieloide e megacariocítica em relação a sua topografia habitual, dando-se ênfase, principalmente à linhagem mieloide. Entretanto, foram utilizados critérios subjetivos e notou-se a necessidade da elaboração de critérios mais restritos para essa avaliação, em relação ao que devemos considerar significativo para evitar casos falsos positivos. Além disso, é necessário avaliar a alteração arquitetural presente em cada linhagem. Mesmo utilizando critérios subjetivos, a perda arquitetural foi mais significativa em pacientes com doença avançada e com maior risco de evolução leucêmica. Portanto, há necessidade de estudos para que seja padronizado a avaliação da perda arquitetural em pacientes com SMD. Uma revisão da literatura mostrou que não existem estudos visando esse objetivo, talvez por conta da falta de uma padronização. A perda arquitetural esteve associada às fases da doença pela OMS, ao IPSS-R e quando importante ou moderada, os pacientes apresentaram menores taxas de sobrevida.

A presença de alterações estromais em pacientes com SMD pode ser, em alguns casos, confundida com aquela compatível com alterações associadas ao envelhecimento medular como agregado linfóide e linfocitose em pacientes idosos, principal faixa etária de acometimento de SMD (GIRODON et al., 2001; NAEMI et al., 2013). Entretanto, algumas características devem ser observadas como a presença de ectasia vascular uma das principais alterações estromais por nós verificada durante o estudo, principalmente em estágios avançados da doença. A partir disso, outras alterações estromais concomitantes devem ser pesquisadas e podem ser valorizadas (DE WOLF-PEETERS, 1994). A ectasia vascular pode estar relacionada com o aumento da densidade microvascular observada por imunohistoquímica em estudo anterior (PRUNERI et al., 1999). Essa angiogênese anormal está relacionada na patogênese da SMD, havendo relação com os grupos da OMS (SKRTIC et al., 2019; ORAZI, 2007). Além disso, os sinusóides dilatados podem ser associados com estágios fibróticos medular

(COTELINGAM, 2003). Entre os cinco pacientes estudados que possuíam ectasia sinusoidal, três também possuíam fibrose medular grau I.

Outra observação que se mostrou relevante durante a análise dos resultados foi a fibrose medular grau II ou III, sendo observada em 10% dos pacientes. Em 2005, O grupo europeu de estudo em mielofibrose, propôs um consenso para avaliação semi-quantitativa de fibrose medular (THIELE et al., 2005). No nosso estudo, os pacientes em fase avançada da doença tiveram associação com fibrose medular grau II/III, sem associação com o prognóstico pelo IPSS-R e impacto na sobrevida dos pacientes. Estudos demonstraram que pacientes com essa alteração apresentam pior comportamento biológico e esta alteração é considerada um fator de risco independente para a evolução leucêmica (DELLA PORTA et al., 2009; STEENSMA et al., 2001; LI et al., 2016). Entretanto, ainda não foi estabelecido qual deve ser o grau de fibrose para a mesma ter valor prognóstico (SAKUMA et al., 2006; BRUNNING et al., 2008), pois alguns estudos evidenciaram que apenas fibrose grau de III esteve associada com a redução da sobrevida dos pacientes com SMD, enquanto outros estudos sugerem que tanto a fibrose grau II, como a fibrose grau III, apresentam um pior prognóstico (MELODY et al., 2020; JAIN et al., 2022; FU et al., 2014). Esta alteração morfológica deve-se a uma produção acentuada de fibras colágenas tipo I e II por fibroblastos medulares estimulados por citocinas derivadas das células clonais (STEENSMA et al., 2001). A variante fibrótica da SMD tem sido associada a uma proeminente hiperplasia da linhagem megacariocítica (SAKUMA et al., 2006). Entre os pacientes com fibrose medular avaliada grau II / III, seis (60%) apresentaram essa associação.

Um estudo unicêntrico envolvendo 2624 pacientes com SMD evidenciou que a fibrose medular foi mais frequente nos pacientes com SMD-EB-1 e SMD-EB-2. Apenas a fibrose medular grau III apresentou associação com grupos de risco para evolução leucêmica pelo IPSS-R como fator prognóstico independente e foi observada em 4% dos pacientes estudados (JAIN et al., 2022). Durante o estabelecimento dos critérios prognósticos no IPSS-R, foi discutido a inclusão de fibrose medular como fator de risco de evolução leucêmica, entretanto, não foi incluído esse critério devido à baixa prevalência entre os pacientes com SMD.

As alterações citogenéticas ocorrem em aproximadamente 65% dos casos dos pacientes com fibrose medular (BUESCHE et al., 2008). As mais encontradas nesses pacientes são: del(5q), del(7q), -7, +8, del(11q), del(12p), i(17q) e del(20q) (STEENSMA et al., 2001). Os resultados do nosso estudo mostraram uma associação de fibrose medular grau II/III nos pacientes com doença avançada pela OMS, sendo observadas alterações citogenéticas em 40% dos pacientes. Foram encontradas as seguintes alterações citogenéticas: del(3)(p21), del(11)(q23), del(17)(p12) e cariótipo complexo.

A fibrose medular pode estar associada em até um terço dos pacientes com alterações do metabolismo do ferro e com sideroblastos em anel (BUESCHE et al., 2008). No presente estudo, houve um paciente com fibrose medular que foi classificado como SMD-SA. Este paciente apresentava a t(6;12) como alteração cromossômica única e, apesar de estar na fase inicial da doença, evoluiu rapidamente para LMA.

Entre os itens estudados pela biópsia de medula óssea que também puderam ser avaliados pelo mielograma, apenas três parâmetros mostraram-se divergentes durante essa análise. Um deles foi a celularidade medular, na qual a análise da biópsia mostrou ser mais precisa. Além disso, a biópsia de medula óssea, mesmo sem o estudo imunohistoquímico, mostrou-se mais eficaz em detectar megacariócitos atípicos. Por outro lado, o mielograma mostrou ser mais eficiente na detecção de blastos quando estes correspondiam a menos de 5% das células nucleadas, fato que não exclui o impacto prognóstico da presença deste achado em biópsia de medula óssea e não interfere também na classificação da fase da doença pela OMS. Tem sido recomendado que a celularidade deve ser avaliada pela biópsia de medula óssea, pois vários fatores como hemodiluição, hipoplasia e fibrose medular que são causas de aspirado seco, podem influenciar na avaliação pelo mielograma (SCHEMENA et al., 2015).

Em relação a contagem de blastos, verificamos assim como em outros estudos (MATSUDA et al., 2018; FONT et al., 2015; DREXLER et al., 2020) que a contagem de blastos pelo mielograma e pela biópsia de medula óssea devem ser métodos complementares, evitando subcontagem e assim classificando corretamente o paciente. Na análise comparativa entre a biópsia de medula óssea e o mielograma para a detecção de dismegacariopose, a OMS considera que o estudo da linhagem megacariocítica seja mais fidedigno nas biópsias de medula óssea (BRUNNING et al., 2008).

As outras alterações que puderam ser comparadas ao avaliar os dois métodos foram: as alterações quantitativa e qualitativa de megacariócitos, a relação M:E e a quantificação da presença de blastos. Nenhum destes fatores apresentou diferença estatística em relação à avaliação comparativa dos resultados obtidos através dos dois métodos - biópsia e mielograma.

Apesar da biópsia de medula óssea ser um exame invasivo e doloroso, o mielograma não permite avaliar celularidade, fibrose medular, perda arquitetural, formação de ALIP, presença de células CD34+ isoladas e alterações estromais como edema e ectasia sinusoidal. A contagem de blastos pelo mielograma deve ser cuidadosamente correlacionada com a estimativa da biópsia de medula óssea para classificar o paciente (VERBURGH et al., 2008; BRUNNING et al., 2008). Além disso, nos casos de pacientes com medula óssea hipocelular ou com fibrose medular pode-se não obter representação celular significativa ou aspirado seco,

o que torna a biópsia de medula óssea o melhor meio para avaliação das displasias e para a contagem de blastos, o que é reforçado pela possibilidade de usar estudo imunohistoquímico com anticorpo anti-CD34. Na faixa etária pediátrica, há uma grande contribuição da análise morfológica para o diagnóstico diferencial entre as síndromes mielodisplásicas hipocelulares e outras causas de anemia, como a anemia aplástica e a anemia Fanconi (LOVATEL, 2018) (Apêndice C).

Outro exame adicional que deve ser feito para classificação e prognóstico dos pacientes com SMD primária é a análise citogenética. Entre os pacientes estudados, aqueles com alteração citogenética de pior prognóstico tiveram maior risco de desenvolver LMA, tanto pelo IPSS como pelo IPSS-R. Ao longo do acompanhamento do nosso estudo, três pacientes adquiriram novas alterações citogenéticas: del(9p), t(8;12)(q22;p12) e del(17)(p12), sendo que um deles apresentou transformação leucêmica. Os outros dois encontravam-se na fase inicial (CRDM).

Sakuma e colaboradores (2006) analisaram aspectos morfológicos em biópsia de medula óssea em 102 pacientes com SMD e correlacionaram com as características citogenéticas. Em sua metodologia, os pacientes foram agrupados em dois grupos citogenéticos: um com cariótipo normal e outro grupo com alterações citogenéticas. Entretanto, é importante agrupar as alterações citogenéticas de acordo com o seu valor prognóstico, onde pelo IPSS, as alterações cromossômicas são classificadas em 3 grupos de risco: bom prognóstico [cariótipos normais, -Y, del(5q), del(20q)]; prognóstico desfavorável (cariótipos complexos, anomalias envolvendo o cromossomo 7) e prognóstico intermediário (outras anomalias cromossômicas) (GREENBERG et al., 1997). Por outro lado, pelo IPSS-R, o padrão cromossômico é distribuído em 5 grupos de risco: muito bom prognóstico (del(11q) e -Y), bom prognóstico [cariótipos normais, del(5q), del(12p), del(20q), del(5q) acompanhado de outra alteração], intermediário [del(7q), +8, +19, +21, i(17q), outras e mais de uma alteração], prognóstico desfavorável [-7, inv(3), t(3), del(3q), -7/del(7q), acompanhadas de outras alterações e cariótipo complexo (até 3 alterações)] e prognóstico muito desfavorável (cariótipo complexo com mais de 3 alterações cromossômicas). Em nosso estudo verificamos uma melhor distribuição das alterações citogenéticas de acordo com o IPSS, onde as curvas de sobrevida não apresentaram sobreposição. Quando comparamos a estratificação do prognóstico citogenético pelo IPSS e IPSS-R observamos que, no IPSS-R, metade dos pacientes classificados com citogenética de muito bom prognóstico apresentaram evolução de SMD para LMA. Isso se deve ao fato que, pelo IPSS-R, cariótipos que apresentaram a del(11q23) foram considerados de muito bom prognóstico. Um maior número de estudos deve ser realizado para reavaliar o impacto prognóstico da del(11q) em pacientes com SMD.

A deleção do braço longo do cromossomo 11 na região q23 está associada a perda do gene *KMT2A* (também conhecido como *MLL*), que codifica uma proteína envolvida no remodelamento da cromatina e regula positivamente fatores transcricionais, sendo também associada com o desenvolvimento principalmente de leucemias agudas da infância (WINTERS; BERNT, 2017; MEYER et al., 2018). Geralmente, esse gene está associado com alterações cromossômicas do tipo translocação, conferindo prognóstico desfavorável (WINTERS; BERNT, 2017; PETERSON et al., 2018). Em SMD, translocações cromossômicas envolvendo o gene *KMT2A* são raras, entretanto estão associadas com prognóstico desfavorável (LOVATEL et al., 2022). Em nosso estudo verificamos o envolvimento do gene *KMT2A* principalmente associado com a deleção cromossômica, provavelmente contribuindo para uma alteração em seu papel durante a hematopoese.

Durante o estudo, foram observados quatro pacientes com del(11)(q23) como única alteração citogenética (1 CRDU, 1 CRDM, 1 SMD-EB-1 e 1 SMD-EB-2). Nesses pacientes a medula óssea mostrou-se hiper celular com aumento da relação M:E e perda arquitetural de moderada a importante. Na linhagem megacariocítica havia formas micromegacariocíticas e hipolobuladas de forma importante, exceto no paciente CRDM que havia de forma moderada. Os pacientes na fase avançada da doença apresentaram aumento das células CD34 positivas e um desses possuía ALIP. Os dois pacientes na fase avançada da doença evoluíram com LMA. Três pacientes vieram a óbito, um por LMA (SMD-EB-2), um por sepse pulmonar associada a doença pulmonar obstrutiva crônica (SMD-EB-1) e um por infarto agudo do miocárdio (CRDM).

A trissomia do cromossomo 8 é a alteração cromossômica numérica mais comum em SMD. O significado biológico da trissomia de 8 ainda não está claro, contudo vem sendo associado ao aumento do número de cópias do gene *c-MYC*. O gene *c-MYC* está localizado na região 8q24 e apresenta um papel central em uma variedade de funções como o controle do crescimento e apoptose, bem como metabolismo, adesão e diferenciação celular (ANGELOVA et al., 2011). O valor prognóstico da +8 é contraditório. Alguns estudos classificam esta alteração como intermediária, no entanto, outros trabalhos demonstraram que a +8 e a amplificação de *c-MYC* está correlacionada com a progressão da doença e a diminuição da sobrevida (FERNANDEZ et al., 2000; ANGELOVA et al., 2011; SOUZA et al., 2014).

No presente estudo haviam cinco pacientes com trissomia do 8, sendo dois com doença avançada (1 SMD-EB-1 e 1 SMD-EB2) e três na fase inicial. (1 CRDM, 1 CRDU e 1 CRDU-SA). Três evoluíram com transformação leucêmica. Foi observado perda arquitetural de moderada e importante em todos os pacientes. Os pacientes na fase avançada apresentaram

aumento de células CD34+, sendo observado ALIP em um paciente. Houve tendência a diminuição de megacariócitos. Quatro vieram a óbito, sendo dois por LMA, um por neutropenia febril (provavelmente por ineficiência da granulopoiese) e um por causas desconhecidas.

Dois pacientes apresentaram del(3p) e um inv(3q), sendo todos classificados como CRDU. O paciente com inv(3q) apresentou medula óssea hipercelular e os que apresentaram del(3p) tinham celularidade medular normal. A relação M:E estava dentro da normalidade e a perda arquitetural discreta a moderada. A displasia megacariocítica era importante em dois casos com micromegacariócitos. Em um dos casos com del(3p) havia ALIP com células CD34+ isoladas. Nenhum paciente evoluiu para LMA. Entretanto, o prognóstico citogenético pelo IPSS-R para alterações envolvendo o cromossomo 3 é de prognóstico desfavorável.

Os pacientes com monossomia do 7 e del(7q) apresentaram evolução para LMA. Foram estudados um paciente na fase inicial (CRDM) e três na fase avançada (2 SMD-EB-2 e 1 LMA secundária à SMD). Desses, os três pacientes na fase avançada apresentaram aumento da relação M:E e aumento das células CD34+, sendo observados ALIP em dois desses.

A partir dos resultados obtidos, pode-se notar a necessidade de estudar as características morfológicas da medula óssea principalmente através da biópsia e de correlacionar com características citogenéticas e moleculares, para auxiliar na identificação de genes envolvidos no desenvolvimento da SMD e sua evolução para LMA, auxiliando na identificação de novos marcadores de prognóstico e consequentemente no melhor entendimento da patogênese da SMD primária.

Nesse sentido, tem sido sugerido por alguns estudos o importante papel de *SALL4* como potencial marcador de prognóstico em SMD (WANG et al., 2013, TATETSU et al., 2020). Em nosso estudo, pacientes com SMD, apresentaram maior expressão de *SALL4* quando comparado com os controles (doadores de medula óssea, indivíduos saudáveis). A associação entre o aumento de expressão de *SALL4* com características morfológicas mostrou principalmente associação com a presença de ALIP, contagem superior a 1% de células CD34 na medula óssea. Em relação aos cariótipos, foi possível observar associação com cariótipos anormais e em relação principalmente ao grupos de risco citogenético intermediário e desfavorável, segundo o IPSS e IPSS-R, associado com -7/del(7q), +8, del(11)(q23) e cariótipos complexos. O aumento de expressão desse gene também está associado aos subtipos mais avançados de SMD e evolução para LMA. Dessa forma, nossos resultados mostram a associação do aumento de expressão de *SALL4* com características morfológicas e citogenéticas associadas com maior risco de evolução para LMA e diminuição de sobrevida, ou seja, um pior prognóstico. Nossos resultados corroboram com estudos anteriores (WANG et al., 2013, TATETSU et al., 2020).,

reforçando o resultado de que *SALL4* poderia ser usado como um biomarcador molecular de evolução da doença e preditor de evolução leucêmica.

Lin e colaboradores (2013) observaram uma significativa correlação entre o nível de expressão de *SALL4* e o estado de hipometilação de *SALL4* em pacientes com SMD. Eles mostraram em seu estudo que pacientes em grupos de maior risco pelo IPSS (Int-2/alto) e as classificações da OMS associadas com os estágios mais avançados da SMD tiveram incidência significativamente maior de hipometilação de *SALL4* do que aqueles em grupos de baixo risco e estágios iniciais de SMD, sugerindo que a hipometilação é um mecanismo para expressão aberrante em *SALL4* em pacientes com SMD. Ma e colaboradores (2013) estudando pacientes com LMA associaram a hipometilação de *SALL4* com grupos de risco intermediário e desfavorável citogeneticamente e o tempo de sobrevida dos pacientes que apresentaram hipometilação em *SALL4* foi menor do que o do grupo com metilação neste gene (4 meses vs 9 meses).

É interessante notar que no sistema hematopoético normal, a expressão de *SALL4* é enriquecida principalmente nas células-tronco/progenitoras hematopoéticas da medula óssea (HSCs/HPCs), mas é rapidamente silenciada após a diferenciação das linhagens celulares. Em malignidades hematopoiéticas, no entanto, a expressão de *SALL4* é reativada de forma anormal e associada a um quadro clínico em geral desfavorável. O gene *SALL4* atua potencializando o programa de proliferação celular de células progenitoras hematopoéticas aumentando o número de células imaturas na medula óssea. A ativação de *SALL4* participa da iniciação e da progressão do câncer (YANG, 2018). Provavelmente, um dos mecanismos associados com o aumento de expressão de *SALL4* seja a hipometilação de sua região promotora como mostrado em alguns estudos (LIN et al., 2013; MA et al., 2013).

Alguns estudos têm demonstrado que o aumento de expressão de *SALL4* está associado com a leucemogênese. Em leucemia mieloide crônica (LMC) em crise blástica, em subtipos de LMA e em pacientes com LMA resistentes ao tratamento, é observado aumento da expressão de *SALL4* (CUI et al., 2006; GAO; KONG; CHAI, 2011; IBRAHEEM et al., 2019).

Em nossos resultados, encontramos que pacientes em estágios avançados de SMD com expressão de *SALL4* apresentaram sobrevida menor quando comparados com pacientes em estágios avançados sem a expressão de *SALL4* e pacientes em estágios iniciais. Cui e colaboradores em 2006 mostraram o papel do *SALL4* na leucemogênese de LLA-B, associando o aumento de expressão de *SALL4*, porém, foi observado ausência de expressão de *SALL4* em um grupo desses pacientes, tanto a nível de mRNA quanto a nível de proteínas, sugerindo heterogeneidade da patogênese da LLA-B. Nossos resultados também sugerem que a

heterogeneidade da patogênese da SMD pode estar associada com diferentes níveis de expressão de *SALL4*, podendo existir diferentes vias de sinalização celular.

Em células CD34+ normais da medula óssea, a regulação negativa (downregulation) de *SALL4*, leva a perda do marcador CD34 de células tronco e progenitoras e afeta a expressão de genes envolvidos na autorenovação e na diferenciação celular, como os genes *RUNX1*, *HOXA9* e *Bmi-1*. A proteína Bmi-1 faz parte do complexo PRC1 (complexo repressivo Polycomb 1) que junto com o complexo PCR2 constituem as proteínas Polycomb que atuam no remodelamento da cromatina e no silenciamento gênico. A proteína EZH2 faz parte desse complexo PCR2, sendo a subunidade catalítica. EZH2 é uma histona metiltransferase que cataliza a trimetilação da histona H3 na lisina 27 (H3K27me3) (CAO; ZHANG, 2004). Essa modificação é um marcador para repressão gênica e é normalmente encontrada em regiões promotoras de genes de desenvolvimento e diferenciação celular (BRACKEN et al., 2006). Nosso grupo estudou o padrão de expressão de *EZH2* em pacientes pediátricos com SMD e foi possível mostrar o importante papel do *EZH2* em SMD pediátrica e sua associação com evolução de SMD para LMA (FERNANDEZ et al., 2019) (apêndice D).

Portanto, podemos notar o importante papel de *SALL4* atuando como um “master” gene na cascata de sinalização, onde na leucemogênese o *SALL4* funcionalmente mantém a proliferação das células tronco e progenitoras, bloqueando a diferenciação, além de promover a sobrevivência, por diminuir a morte celular por apoptose. Recentemente nosso grupo estudou apoptose em SMD e sua associação com a idade do paciente, celularidade da medula óssea e cariótipos (SOUZA et al., 2022) (apêndice E). Analizando a patogênese da SMD em estágios iniciais é observada alta taxa de apoptose e a medida que a doença evolui, a taxa de apoptose diminui, podendo ter uma influência do aumento de expressão de *SALL4*.

Outro gene que parece ter um papel importante na leucemogênese é o gene supressor de tumor, *CHFR*. Este gene codifica uma proteína que atua como “checkpoint” durante a mitose e está associado com instabilidade cromossômica e aparecimento de aneuploidias. A diminuição de expressão ou a ausência da proteína *CHFR* tem sido associada com a hipermetilação da região promotora do gene em alguns tumores sólidos (SANBHNANI; YEONG, 2012; PRIVETTE; PETTY, 2008; DERKS et al., 2014). O gene *CHFR* tem sido indicado como um biomarcador de câncer estando associado com estágios avançados e recorrência da doença (TANAKA et al., 2011). No entanto, uma revisão da literatura mostra que ainda não existem estudos mostrando o papel do gene *CHFR* em SMD.

Nossos resultados mostraram que os pacientes com SMD apresentaram uma menor expressão de *CHFR* quando comparado com os controles. Em relação à celularidade não foi

observada diferença estatística entre os níveis de expressão de *CHFR*. Por outro lado, a presença de ALIP e contagem de células CD34 maior que 1% estiveram associadas a baixa expressão desse gene. A presença de cariótipos anormais e os grupos de risco intermediário e desfavorável pelo IPSS e IPSS-R também estiveram associados com níveis de expressão mais baixos. Song e colaboradores (2015) avaliaram a expressão de *CHFR* em linfoma não Hodgkin de células B (LNH-B) e observaram que os níveis de expressão de mRNA e de proteína eram reduzidos em amostras de tecido B-NHL. Além disso, a metilação de *CHFR* foi detectada em 39 dos 122 pacientes com LNH-B, o que não foi encontrado na hiperplasia reativa não cancerosa dos tecidos dos linfonodos. A metilação de *CHFR* se correlacionou com a expressão reduzida de *CHFR* e estágios patológicos de evolução de LNH-B. Nossos resultados também mostraram uma expressão mais baixa nos estágios mais avançados de SMD (AREB-1 e AREB-2) em relação aos estágios iniciais (SMD-CRDU e SMD-CDRM) e nos pacientes que apresentaram evolução da doença. Em nossa análise de expressão de *CHFR* por imunohistoquímica foi possível também observar menores níveis de expressão associada com cariótipos anormais, em especial a trissomia do cromossomo 8 e cariótipos complexos.

Embora Gao e colaboradores (2016) mostraram que a hipermetilação de *CHFR* foi um evento frequente em LMA e correlacionaram com eventos clínicos desfavoráveis, Zhou e colaboradores (2017) observaram que a metilação de *CHFR* foi um evento raro, no entanto, a expressão de *CHFR* pode ser um biomarcador independente na LMA. Em pacientes com LMA, a menor expressão de *CHFR* foi associada a uma menor taxa de remissão completa (RC) e a expressão foi significativamente aumentada na RC após a quimioterapia. Também foi observado que pacientes com menor expressão de *CHFR* apresentaram menor sobrevida, estando associada com prognóstico desfavorável.

O câncer é causado por vários tipos de alterações genéticas, que variam em tamanho, desde mutações pontuais até ganhos e perdas de cromossomos inteiros, conhecidos como aneuploidia. A instabilidade cromossômica, processo que dá origem à aneuploidia, pode promover a tumorigênese, aumentando a heterogeneidade genética e promovendo a evolução tumoral. A SMD é uma doença heterogênea e é caracterizada citogeneticamente principalmente pela presença de aneuploidias. Nossos resultados sugerem que a baixa expressão de *CHFR* pode contribuir para o aparecimento de instabilidade cromossômica, e na formação de aneuploidias contribuindo para a patogênese da SMD e sua evolução leucêmica. No entanto, um maior número de estudos é necessário para confirmar essa correlação.

Nosso estudo aponta a importância da associação de estudos morfológicos, citogenéticos e moleculares para o diagnóstico, prognóstico e escolha do tratamento para os

pacientes com SMD. Em relação ao estudo morfológico, é importante a observação da biópsia de medula óssea como uma análise fundamental na caracterização de alterações na arquitetura medular que não é observada no mielograma. As alterações citogenéticas vêm sendo incluídas em escalas de prognóstico e indicam os possíveis oncogenes e genes supressores de tumor envolvidos no desenvolvimento da SMD e evolução para LMA. As alterações moleculares, incluindo as genéticas e epigenéticas, vem elucidando a patogênese da SMD contribuindo para o melhor entendimento da doença e indicação de novos tratamentos, como os agentes hipometilantes. A identificação de alterações moleculares em pacientes com cariótipos normais é fundamental para avaliação do prognóstico. Nossa análise molecular, mostrou o importante papel dos genes *SALL4* e *CHFR* no desenvolvimento da SMD e sua evolução para LMA, sugerindo alterações de expressão desses genes como potenciais biomarcadores de evolução da doença.

CONCLUSÃO

- a) A análise da biópsia de medula óssea é fundamental no diagnóstico de SMD e auxilia no diagnóstico diferencial de pacientes com suspeita de outras doenças hematológicas;
- b) A biópsia de medula óssea é uma ferramenta auxiliar na classificação das fases da doença de pacientes com SMD para definição de prognóstico;
- c) A biópsia de medula óssea e o mielograma são métodos diagnósticos complementares em SMD;
- d) A relação M:E aumentada, perda da arquitetura medular e ALIP foram associados com pacientes em fase avançada da doença e maior risco de evolução para LMA;
- e) Hipercelularidade medular, megacariócitos com hipolobulação nuclear e fibrose medular (grau II/III) foram associados a fase avançada da doença;
- f) As alterações citogenéticas: del(7q), -7, +8, del(11)(q23) e cariótipos complexos estiveram associadas com a evolução da SMD para LMA;
- g) Em relação à celularidade, pela classificação do IPSS e IPSS-R, na maioria dos casos a medula óssea era hipercelular, independente do prognóstico citogenético;
- h) A presença de ALIP foi observada principalmente em pacientes com prognóstico citogenético e desfavorável pelo IPSS;
- i) Ao analisar os grupos de risco citogenéticos pelo IPSS-R e a presença de ALIP, pacientes no grupo de muito baixo risco também apresentam ALIP;
- j) A avaliação de grupos de risco pelo IPSS com a taxa de evolução da doença mostrou que os pacientes classificados em intermediário e alto risco apresentaram a maior taxa de evolução da doença;
- k) A avaliação de grupos de risco pelo IPSS com a taxa de evolução da doença mostrou que os pacientes classificados com alto risco e muito alto risco, apresentaram a maior frequência de evolução para LMA. No entanto, pacientes com muito baixo risco e baixo risco também apresentaram evolução da doença, envolvendo principalmente a del(11q), sugerindo uma re-avaliação da classificação desta alteração em relação ao risco de evolução leucêmica;

- l) A associação entre o aumento de expressão de *SALL4* com características morfológicas mostrou associação com a presença de ALIP e contagem superior a 1% de células CD34;
- m) O aumento de expressão de *SALL4* esteve associado com cariótipos anormais e em relação principalmente ao grupos de risco citogenético intermediário e desfavorável, segundo o IPSS e IPSS-R, associado com -7/del(7q), +8, del(11)(q23) e cariótipos complexos;
- n) O aumento de expressão de *SALL4* também está associado aos subtipos mais avançados de SMD, evolução para LMA e menor sobrevida;
- o) A presença de ALIP e contagem de células CD34 maior que 1% estiveram associadas a baixa expressão de CHFR;
- p) Cariótipos anormais e os grupos de risco citogenéticos intermediário e desfavorável pelo IPSS e IPSS-R também estiveram associados com níveis de expressão mais baixos de CHFR, sugerindo associação com a presença de aneuploidias;
- q) A expressão mais baixa de CHFR esteve associada com os estágios mais avançados de SMD (AREB-1 e AREB-2) em relação aos estágios iniciais (SMD-CRDU e SMD-CDRM) e nos pacientes que apresentaram evolução da doença;
- r) Os genes *SALL4* e *CHFR* apresentam um importante papel no desenvolvimento da SMD e sua evolução para LMA, sendo potenciais biomarcadores de evolução da doença;

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. et al. *Heterogeneity of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndrome with multilineage dysplasia (mds-mld)*. Indian J Hematol Blood Transfus, v. 35, n. 2, p.223–232, 2019.
- ACAR, H. et al. *Hyperdiploid karyotype in a childhood mds patient*. Clin. Lab. Haematol., v. 23, n. 4, p. 255–258, 2001.
- AGUILA, J. R. et al. *Sall4 is a robust stimulator for the expansion of hematopoietic stem cells*. Blood, v. 118, n. 3, p. 576-585, 2011.
- ANGELOVA, S. *Amplification of c-MYC and MLL Genes as a Marker of Clonal Cell Progression in Patients with Myeloid Malignancy and Trisomy of Chromosomes 8 or 11*. Balkan Journal of Medical Genetics, v. 14, n. 2, p. 17-24, 2011.
- ARBER, D. A. et al. *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. Blood, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, maio 2016.
- ATALLAH, E.; KANTARJIAN, H.; GARCIA-MANERO, G. *The role of decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, v. 8, p. 65–73, 2007.
- AUL, C.; BOWEN, D. T.; YOSHIDA, Y. *Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes*. Haematologica, v. 83, n. 1, p. 76–86, 1998.
- AYED, W. et al. *Trisomie 21 et cancers*. Morfologia, v. 96, n. 314, p. 57–66, 2012.
- BACHER, U. et al. *Investigation of 305 patients with myelodysplastic syndromes and 20q deletion for associated cytogenetic and molecular genetic lesions and their prognostic impact*. British Journal of Haematology, v. 164, n. 6, p. 822–833, 2014.
- BANERJEE, T. et al. *Flaming and fanning: The spectrum of inflammatory influences in myelodysplastic syndromes*. Blood Rev, v. 36, p. 57–69, 2019.
- BARZI, A.; SEKERES, M. A. *Myelodysplastic syndromes: a practical approach to diagnosis and treatment*. Cleveland Clinic Journal of Medicine, v. 77, n. 1, p. 37–44, Jan. 2010.
- BAUR, A. S. et al. *Cd34/qbend10 immunostaining in bone marrow biopsies: an additional parameter for the diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes*. European Journal of Haematology, v. 64, n. 2, p. 71–79, 2000.
- BEJAR, R. *Prognostic models in myelodysplastic syndromes*. Hematology. American Society of Hematology. Education Program., v. 2013, p. 504–510, 2013.
- BENNETT, J. M. *Changes in the updated 2016: WHO classification of the myelodysplastic syndromes and related myeloid neoplasms*. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, v. 16, n. 11, p.607–609, 2016.

BENNETT, J. M. et al. *Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes*. British Journal of Haematology, v. 51, n. 2, p. 189–199, Jun 1982.

BERNASCONI, P et al. *Does cytogenetic evolution have any prognostic relevance in myelodysplastic syndromes? A study on 153 patients from a single institution*. Annals of Hematology, v. 89, n.6, p. 545-551, 2010.

BOULTWOOD, J. et al. *Molecular mapping of uncharacteristically small 5q deletions in two patients with the 5q- syndrome: Delineation of the critical region on 5q and identification of a 5q- breakpoint*. Genomics, v. 19, n. 3, p. 425–432, 1994.

BRACKEN, A. P. et al. *Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions*. Genes Dev., v. 20, n. 9, p. 1123 – 1136, 2006.

BRUNNING, R. et al. *Myelodysplastic syndromes*. 4. ed. France: IARC Press, 2008. v. 2.

BUESCHE, G. et al. *Marrow fibrosis predicts early fatal marrow failure in patients with myelodysplastic syndromes*. Leukemia, v. 22, n. 2, p. 313-322, 2008.

CABRERO, M. et al. *Down-regulation of ezh2 expression in myelodysplastic syndromes*. Leukemia Research, v. 44, p. 1–7, 2016.

CAO, R.; ZHANG, Y. *The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3*. Current Opinion in Genetics & Development, v. 14, n. 2, p. 155-164, 2004.

CHA, C.-H. et al. *Cd34 and p53 immunohistochemical stains differentiate hypocellular myelodysplastic syndrome (hmds) from aplastic anemia and a cd34 immunohistochemical stain provides useful survival information for hmds*. Annals of Laboratory Medicine, Korean Society for Laboratory Medicine, v. 34, n. 6, p. 426–432, Nov 2014.

CLARKSON, D. B.; FAN, Y. an; JOE, H. *A remark on algorithm 643: Fexact: an algorithm for performing fisher's exact test in r x c contingency tables*. ACM Transactions on Mathematical Software, v. 19, n. 4, p. 484–88, 1993.

COLLER, H. A. et al. *Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion*. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 97, n. 7, p. 3260–3265, 2000. Disponível em: www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.97.7.3260.

COTELINGAM, J. D. *Bone marrow biopsy: interpretive guidelines for the surgical pathologist*. Adv. Anat. Pathol., v. 10, n. 1, p. 8–26, 2003.

CUI, W. et al. *Differential expression of the novel oncogene, sall4, in lymphoma, plasma cell myeloma, and acute lymphoblastic leukemia*. Mod. Pathol., v. 19, n. 12, p. 1585–1592, 2006.

DAI, D. et al. *CHFR promoter hypermethylation is associated with gastric cancer and plays a protective role in gastric cancer process*. J Cancer, Ivyspring International Publisher, v. 10, p. 949–956, 2019.

DALGAARD, P. *R Development Core Team (2010): R: A language and environment for statistical computing.* 2010.

DERKS, S. et al. *Emerging evidence for CHFR as a cancer biomarker: from tumor biology to precision medicine.* Cancer Metastasis Rev., v. 33, n. 1, p. 161–171, 2014.

DREVON, L. et al. *Myelodysplastic syndrome (mds) with isolated trisomy 8: a type of mds frequently associated with myeloproliferative features: a report by the groupe francophone des myélodysplasies.* British Journal of Haematology, v. 182, n. 6, p. 843–850, 2018.

DREXLER, B. et al. *Blast counts are lower in the aspirate as compared to trephine biopsy in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome expressing cd56.* International Journal of Laboratory Hematology, John Wiley & Sons, Ltd, v. 43, n. 5, p. 1078–1084, Out 2021.

DUNPHY, C. H. et al.; *Analysis of Immunohistochemical Markers in Bone Marrow Sections to Evaluate for Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemias.* Appl Immunohistochem Mol Morphol., v.15, n. 2, p. 154-159, 2007.

EWALT, M. D.; GRATZINGER, D. *Selective quantitation of microvessel density reveals sinusoidal expansion in myelodysplastic syndromes.* Leukemia & Lymphoma, Taylor Francis, v. 57, n. 12, p. 2923–2926, 2016.

FENG, G. et al. *A systematic classification of megakaryocytic dysplasia and its impact on prognosis for patients with myelodysplastic syndromes.* Experimental Hematology & Oncology, v. 5, n. 1, p. 12, Abr 2016.

FERNANDEZ, T. D. S. et al. *Chromosomal alterations associated with evolution from myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia.* Leuk. Res., v. 24, p. 839–848, 2000.

FERNANDEZ, T. D. S. et al. *Hyperdiploid karyotype in a child with hypocellular primary myelodysplastic syndrome.* Eur. J. Haematol., v. 71, n. 5, 2003.

FERNANDEZ, T. D. S. et al. *Aberrant Expression of EZH2 in pediatric patients with myelodysplastic syndrome: A potential biomarker of leukemic evolution.* BioMed Research International, v. 2019, 2009

FERNANDEZ, T. D. S. et al. *Aberrant Expression of EZH2 in Pediatric Patients with Myelodysplastic Syndrome: A Potential Biomarker of leukemic evolution.* BioMed Research International, v. 2019, id. 3176565, 2019.

FLORENSA, L. et al. *The importance of adequate recognition of normal and dysplastic myelopoiesis for the diagnosis of myelodysplastic syndromes.* Histol. Histopathol., v. 34, n. 8, p. 857–873, Fev 2019.

FONT, P. et al. *Interobserver variance in myelodysplastic syndromes with less than 5 % bone marrow blasts: unilineage vs. multilineage dysplasia and reproducibility of the threshold of 2% blasts.* Annals of Hematology, v. 94, n. 4, p. 565–573, Abr 2015.

FORMAN, S. *Myelodysplastic syndrome.* Opinion in Hematol., v. 3, n. 4, p. 297–302, 1996.

- FU, B. et al. *Bone marrow fibrosis in patients with primary myelodysplastic syndromes has prognostic value using current therapies and new risk stratification systems*. *Mod. Pathol.*, v. 27, p. 681-689, 2014.
- GAO, C.; KONG, N. R.; CHAI, L. *The role of stem cell factor sall4 in leukemogenesis*. *Crit. Rev. Oncog.*, v. 16, n. 1-2, p. 117-127, 2011.
- GAO, L. et al. *CHFR hypermethylation, a frequent event in acute myeloid leukemia, is independently associated with an adverse outcome*. *Genes Chromosomes Cancer*, v. 55 n. 2 p. 158-68, 2016.
- GARANDEAU, C. et al. *Myelodysplastic syndromes*. In: *Annales de Biologie Clinique (Paris)*. v. 58, p. 405-416, 2000.
- GARCIA-MANERO, G. *Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management*. *Am. J. Hematol.*, v. 89, n. 1, p. 97-108, 2014.
- GEORGGI, A. *Impact of histopathology on diagnosis, clinics and outcome of myelodysplastic syndromes*. *Leuk. Res.*, v. 21, n. 1, 1997.
- GERMING, U. et al. *Myelodysplastic syndromes: diagnosis, prognosis, and treatment*. *Dtsch Arztebl Int.*, v. 110, n. 46, p. 783-790, 2013.
- GILES, F. J. et al. *Su5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes*. *Blood*, v. 102, n. 3, p. 795-801, 2003.
- GIRALT, S. *Bone marrow transplant in myelodysplastic syndromes: new technologies, same questions*. *Curr Hematol Rep*, v. 4, n. 3, p. 200-207, 2005.
- GIRODON, F. et al. *Minor dysplastic changes are frequently observed in the bone marrow aspirate in elderly patients without haematological disease*. *Clin Lab Haem.*, v. 23, p. 297-300, 2001.
- GREENBERG, P. et al. *International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes*. *Blood*, v. 89, p. 2079-2088, 1997.
- GREENBERG, P. L. et al. *Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes*. *Blood*, v. 120, n. 12, p. 2454-2465, 2012.
- GUR, H. D. et al. *Clinical significance of isolated del(7p) in myeloid neoplasms*. *Leuk. Res.*, v. 55, p. 18-22, 2017.
- HAASE, D. *Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes*. *Ann. Hematol.*, v. 87, n. 7, p. 515-526, 2008.
- HAASE, D. 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*, v. 110, n. 13, p. 4385-4395, Dec 2007.

HARRIS, N. L. et al. *The world health organization classification of hematological malignancies report of the clinical advisory committee meeting, airline house, virginia, november 1997*. Modern Pathology, v. 13, n. 2, p. 193–207, 2000.

HASLE, H. *Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood*. Hematology, v. 2016, n. 1, p. 598–604, 12 2016.

HASLE, H. et al. *A pediatric approach to the who classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases*. Leukemia, v. 17, p. 277–282, 2003.

HORNY, H.-P.; SOTLAR, K.; VALENT, P. *Diagnostic value of histology and immunohistochemistry in myelodysplastic syndromes*. Leukemia Research, v. 31, n. 12, p. 1609–1616, 2007.

HUANG, T. C. et al. *Comparison of hypoplastic myelodysplastic syndrome (MDS) with normo-/hyper cellular MDS by International Prognostic Scoring System, cytogenetic and genetic studies*. Leukemia, v. 22, p. 544–550, 2008.

HUANG, J. et al. *Cd41 immune staining of micromegakaryocytes improves the diagnosis of myelodysplastic syndrome and differentiation from pancytopenia*. Leukemia Research, v. 66, p. 15–19, Mar 2018.

IBGE. *Censo demográfico 2010*. disponível em www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9662-censo-demografico2010.html?edicao=10503t=destaques, 2010.

ICSN. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. 2016.

IBRAHEEM, F. M. et al. *Sall4 gene expression in acute myeloid leukemia*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 20, n. 10, p. 3121–3127, 2019.

JAIN, A. G. et al. *Myelodysplastic Syndromes with Bone Marrow Fibrosis: An Update*. Ann. Lab. Med., v. 42, n. 3, p. 299–305, 2022.

JHANWAR, S. C. *Genetic and epigenetic pathways in myelodysplastic syndromes: A brief overview*. Adv. Biol. Regul., v. 58, p.28–37, 2015.

KAYANO, H. *Histopathology in the diagnosis of high-risk myelodysplastic syndromes*. Journal of Clinical and Experimental Hematopathology, v. 58, n. 2, p. 51–60, 2018.

KEEL, S. B. et al. *Genetic features of myelodysplastic syndrome and aplastic anemia in pediatric and young adult patients*. Haematologica, v. 101, n. 11, p. 1343–1350, 2016.

KITAGAWA, M. et al. *Localization of fas and fas ligand in bone marrow cells demonstrating myelodysplasia*. Leukemia, v. 12, n. 4, p. 486–492, 1998.

KOBAYASHI, T. et al. *A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study)*. American Journal of Hematology, John Wiley & Sons, Ltd, v. 92, n. 12, p. 1324–1332, Dez 2017.

KOH, Y. R. et al. *A rare case of transformation of childhood myelodysplastic syndrome to acute lymphoblastic leukemia*. Ann. Lab. Med., v. 33, n. 2, p. 130–135, 2013.

KONUMA, T.; OGURO, H.; IWAMA, A. *Role of the polycomb group proteins in hematopoietic stem cells*. Development, Growth & Differentiation, v. 52, n. 6, p. 505–516, 2010.

KOUIDES, P. A.; BENNETT, J. M. *Morphology and classification of myelodysplastic syndromes*. Hematology/Oncology Clinics of North America, v. 6, p. 485–499, Jun 1992.

KURZROCK, R et al. *Phase II study of R115777, a farnesyl transferase inhibitor, in myelodysplastic syndrome*. Journal of Clin. Onc., v. 22, n. 7, p. 1287-1292, 2004.

LI, A. J.; CALVI, L. M. *The microenvironment in myelodysplastic syndromes: Niche-mediated disease initiation and progression*. Exp Hematol., v. 55, p. 3–18, 2017.

LI, B. et al. *Bone marrow fibrosis grade is an independent risk factor for overall survival in patients with primary myelofibrosis*. Blood Cancer Journal, v. 6, n. 12, p. e505–e505, Dez 2016.

LIMA-COSTA, M. F.; VERAS, R. *Aging and public health*. Cad Saúde Pública, v. 19, n. 3, p. 700–701, 2003.

LIN, J. et al. *Aberrant hypomethylation of sall4 gene in patients with myelodysplastic syndrome*. Leuk. Res., v. 37, n. 1, p. 71–75, 2013.

LIN, Y.-S. et al. *Identification of novel DNA methylation inhibitors via a two-component reporter gene system*. J Biomed Sci, v. 18, n. 3, 2011.

LIST, A. F. et al. *Myelodysplastic syndromes*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, p. 297–317, Jan 2004.

LIU, D. et al. *The significance of bone marrow cell morphology and its correlation with cytogenetic features in the diagnosis of mds-ra patients*. Leukemia Research, v. 33, n. 8, p. 1029–1038, 2009.

LORAND-METZE, I. *Síndromes mielodisplásicas. conceito e classificação. diagnóstico. evolução e complicações*. hematologia: Fundamentos e práticas. Ed. Atheneu. p. 519–536, 2005.

LORAND-METZE, I. et al. *Factors influencing survival in myelodysplastic syndromes in a Brazilian population: comparison of fab and who classifications*. Leukemia Research, v. 28, n. 6, p. 587–594, Jun 2004.

LOVATEL, V. L. et al. *An uncommon t(9,11)(p24;q22) with monoallelic loss of ATM and KMT2A genes in a child with myelodysplastic syndrome/ acute myeloid leukemia who evolved from Fanconi anemia*. Molecular, Cytogenetics, v. 11, 2018.

LOVATEL, V. L. et al. *Clinical and Prognostic Features in a Young Adult Patient with de novo Myelodysplastic Syndrome Presenting t(11;16)(q23;q24)*. Mediterr J Hematol Infect Dis., v. 14, n. 1, p. e2022013, 2022.

MA, J.-c. et al. *Aberrant hypomethylation of sall4 gene is associated with intermediate and poor karyotypes in acute myeloid leukemia*. Clinical Biochemistry, v. 46, n. 4, p. 304–307, Mar 2013.

MA, Y. et al. *Sall4, a novel oncogene, is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (aml) and induces aml in transgenic mice*. Blood, v. 108, n. 8, p. 2726–2735, 2006.

MASHIMA, K. et al. *Comparison of blast percentage calculated based on bone marrow all nucleated cells and non-erythroid cells in myelodysplastic syndromes with erythroid hyperplasia*. Annals of Hematology, v. 98, n. 5, p. 1127–1133, Maio 2019.

MATSUDA, A. et al. *Interobserver concordance of assessments of dysplasia and blast counts for the diagnosis of patients with cytopenia: From the Japanese central review study*. Leukemia Research, v. 74, p. 137–143, Nov 2018.

MAXWELL, A. E. *Comparing the classification of subjects by two independent judges*. Br J Psychiatry, v. 116, n. 535, p. 651–5, 1970.

MEDINGER, M.; FISCHER, N.; TZANKOV, A. *Vascular Endothelial Growth Factor-Related Pathways in Hemato-Lymphoid Malignancies*. Journal of Oncology, v. 2010, 729725, 2010.

MELODY, M. et al. *Decoding Bone Marrow Fibrosis in Myelodysplastic Syndromes*. Clin Lymphoma Myeloma Leuk., v. 20, n. 5, p. 324–328, 2020.

MEYER, C. et al. *The MLL recombinome of acute leukemias in 2013*. Leukemia, v. 27, p. 2165–2176, 2013.

MHAWECH, P.; SALEEM, A. *Myelodysplastic syndrome: review of the cytogenetic and molecular data*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, v. 40, p. 229–238, 2001.

MOHAMMAD, A. A. *Myelodysplastic syndrome from theoretical review to clinical application view*. Oncol. Rev., v. 2, n. 2, p. 397, Jul 2018.

MUSTO, P. *Thalidomide therapy for myelodysplastic syndromes: current status and future perspectives*. Leuk. Res., v. 28, n. 4, p. 325–332, 2004.

NAEMI, K. et al. *Benign lymphoid aggregates in the bone marrow: distribution patterns of b and t lymphocytes*. Human Pathology, v. 44, n. 4, p. 512–520, 2013.

NIERO-MELO, L. et al. *Diretrizes para diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas*. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., v. 28, n. 3, p. 167–174, 2006.

NISHINO, H. T.; CHANG, C.-C. *Myelodysplastic syndromes: clinicopathologic features, pathobiology, and molecular pathogenesis*. Arch Pathol Lab Med., v. 129, n. 10, p. 1299–1310, 2005.

NOLTE, F.; HOFMANN, W.-K. *Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes*. Ann. Hematol., v. 87, p. 777–795, 2008.

NOMDEDEU, M. et al. *Prognostic impact of chromosomal translocations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia patients. a study by the spanish group of myelodysplastic syndromes*. Genes Chromosomes Cancer., v. 55, n. 4, p. 322–327, 2016.

OGURO, H. et al. *Differential impact of Ink4a and Arf on hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment in Bmi1-deficient mice*. Journal of Experimental Medicine, v. 203, n. 10, p. 2247–2253, Set 2006.

ONLEY, H. J.; BEAU, M. M. L. *Myelodysplastic Syndrome*. In: Cancer cytogenetics. Wiley-Blackwell (ed.), 2009. p. 141–207, 2009.

ORAZI, A. *Histopathology in the diagnosis and classification of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and myelodysplastic/ myeloproliferative diseases*. Pathobiology, v. 74, n. 2, p. 97–114, 2007.

PANANI, A. D.; ROUSSOS, C. *Cytogenetic aspects of adult primary myelodysplastic syndromes: Clinical implications*. Cancer Letters, v. 235, n. 2, p. 177–190, 2006.

PETERSON, J. et al. *KMT2A (MLL) rearrangements observed in pediatric/young adult T-lymphoblastic leukemia/lymphoma: A 10-year review from a single cytogenetic laboratory*. Genes, Chromosomes and Cancer, v. 57, n. 11, p. 541–546, Nov 2018.

PICCOLOMO, A et al. *Immunomodulatory Drugs in Acute Myeloid Leukemia Treatment*. Cancers, v. 12, n. 9, p. 2528, 2020.

DELLA PORTA, M. et al. *Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of who classification of myelodysplastic syndromes*. Leukemia, v. 29, n. 1, p. 66–75, Jan 2015.

DELLA PORTA, M. et al. *Clinical relevance of bone marrow fibrosis and cd34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes*. J. Clin. Oncol., v. 27, n. 5, p. 754–762, 2009.

PRIVETTE, L. M.; PETTY, E. M. *Chfr: A novel mitotic checkpoint protein and regulator of tumorigenesis*. Translational Oncology, v. 1, n. 2, p. 57–64, 2008.

PRUNERI, G. et al. *Angiogenesis in myelodysplastic syndromes*. Br J Cancer, v. 81, n. 8, p. 1398–1401, 1999.

QUINN, E.; NICHOLS, K. E. *Cancer predisposition syndromes associated with myeloid malignancy*. Semin. Hematol., v. 54, n. 2, p. 115–122, 2017.

RAJASEKHAR, V. K.; BEGEMANN, M. *Concise review: Roles of polycomb group proteins in development and disease: A stem cell perspective*. STEM CELLS, v. 25, n. 10, p. 2498–2510, 2007.

RAMOS, F. et al. *Bone marrow fibrosis in myelodysplastic syndromes: a prospective evaluation including mutational analysis*. Oncotarget, Impact Journals, LLC, v. 7, n. 21, p. 30492–30503, 2016.

REDDY, V. V. *Topics in bone marrow biopsy pathology: role of marrow topography in myelodysplastic syndromes and evaluation of post-treatment and post-bone marrow transplant biopsies*. Ann. Diagn. Pathol., v. 5, n. 2, p. 110–120, 2001.

ROMEO, M. et al. *Myelodysplastic syndromes: histopathology as prognostic factor*. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., v. 23, n. 2, p. 63–68, 2001.

ROSENFELD, C.; LIST, A. *A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies*. Leukemia, Springer Science and Business Media LLC, v. 14, n. 1, p. 2–8, 2000.

SABER, W.; HOROWITZ, M. M. *Transplantation for myelodysplastic syndromes: who, when, and which conditioning regimens*. Hematology, v. 2016, n. 1, p. 478–484, 12 2016.

SAKUMA, T. et al. *Histological and cytogenetic characterization of bone marrow in relation to prognosis and diagnosis of myelodysplastic syndromes*. Pathology International, v. 56, n. 4, p. 191–99, 2006.

SANBHNANI, S.; YEONG, F. M. *CHFR: a key checkpoint component implicated in a wide range of cancers*. Cell. Mol. Life Sci., v. 69, n. 10, p. 1669–1687, 2012.

SAUMELL, S. et al. *Trisomy 8, a cytogenetic abnormality in myelodysplastic syndromes, is constitutional or not?* PLOS ONE, Public Library of Science, v. 10, n. 6, Jun 2015.

SAUVAGEAU, M.; SAUVAGEAU, G. *Polycomb group proteins: Multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer*. Cell Stem Cell, v. 7, n. 3, p. 299–313, 2010.

SCHEMENAU, J. et al. *Cellularity, characteristics of hematopoietic parameters and prognosis in myelodysplastic syndromes*. Eur. J. Haematol., v. 95, n. 3, p. 181–189, 2015.

SCHROEDER, T. et al. *Mesenchymal stromal cells in myeloid malignancies*. Blood Res., v. 51, n. 4, p. 225–232, 2016.

SCHURINGA, J. J.; VELLENGA, E. *Role of the polycomb group gene bmi1 in normal and leukemic hematopoietic stem and progenitor cells*. Current Opinion in Hematology, v. 17, n. 4, p. 294–299, 2010.

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

SENN, J. S. et al. *Peripheral blood blast cell progenitors in human preleukemia*. Blood, v. 59, n. 1, p. 106–9, 1982.

SHAHRABI, S. et al. *Genetics and epigenetics of myelodysplastic syndromes and response to drug therapy: new insights*. Oncology Reviews, v. 10, n. 2, 2016.

SHIMAZAKI, K. et al. *Evaluation of apoptosis as a prognostic factor in myelodysplastic syndromes*. Br J Haematol., v. 110, n. 3, p. 584-590, 2000.

SHROUT, P. E.; FLEISS, J. L. *Intraclass correlations: Uses in assessing rater reliability*. Psychological Bulletin, v. 86, n. 2, p. 420–28, 1979.

SHUAI, X. et al. *Overexpression of the novel oncogene SALL4 and activation of the Wnt/ β -catenin pathway in myelodysplastic syndromes*. Cancer Genetics and Cytogenetics, v. 194, n. 2, p. 119-124, 2009.

SILVA-COELHO, P. da et al. *Clonal evolution in myelodysplastic syndromes*. Nat Commun, v. 21, n. 8, p. 15099, 2017.

SILVERMAN, L. R.; MUFTI, G. J. *Methylation inhibitor therapy in the treatment of myelodysplastic syndrome*. Nat Clin Pract Oncol., n. 2, p. 12–23, 2005.

SKRTIC, A. et al. *Neoangiogenesis and microvascular density in myelodysplastic syndrome – a single center experience*. Molecular and Experimental Biology in Medicine, v. 2 n. 2, 2019.

SLOAND E. *Hypocellular myelodysplasia*. Hematol Oncol Clin N Am., v. 23, p. 347-360, 2009.

SOLÉ, F. et al. *Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes*. grupo cooperativo español de citogenética hematológica. Br J Haematol, v. 108, n. 2, p. 346–356, 2000.

SONG, A. et al. *Aberrant expression of the CHFR prophase checkpoint gene in human b-cell non-hodgkin lymphoma*. Leukemia Research, v. 39, n. 5, p. 536–543, 2015.

SOUZA, D. C. de et al. *Cytogenetic as an important tool for diagnosis and prognosis for patients with hypocellular primary myelodysplastic syndrome*. Biomed. Res. Int., v. 2014, p. 542395, 2014.

SOUZA, D. C. de et al. *An uncommon case of a child with del(5q) and hypocellular myelodysplastic syndrome*. Pediatric Blood & Cancer, v. 55, n. 4, p. 767–767, 2010.

SOUZA, D. C. de et al. *Apoptosis in myelodysplasia: Association with patient age, bone marrow cellularity and karyotypes*. Brazilian Journal of Health and Biomedical Sciences, v. 21, n.1, 2022.

STEENSMA, D. P. et al. *Myelodysplasia with fibrosis: a distinct entity?* Leuk. Res., v. 25, n. 10, p. 829–38, 2001.

STREINER, D. L.; NORMAN, G. R. *Health measurement scales: A practical guide to their development and use*. Health, v. 5, n. 3a, 2003.

STUART, A. *A test for homogeneity of the marginal distributions in a two-way classification*. Biometrika, v. 42, n. 3-4, p. 412–6, 1955.

SUN, Z. et al. *The diagnostic and prognostic value of chfr hypermethylation in colorectal cancer, a meta-analysis and literature review*. Oncotarget, Impact Journals, LLC, v. 8, n. 51, p. 89142–8, 2017.

TANAKA, M. et al. *Association of CHFR promoter methylation with disease recurrence in locally advanced colon cancer*. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, v. 17, n. 13, p. 4531–4540, Jul 2011.

TATETSU, H. et al. *Oncofetal protein sall4 is highly expressed in myelodysplastic syndrome alongside with nat10 and p53*. Blood, v. 136, n. Supplement 1, p. 34, Nov 2020.

THIELE, J. et al. *European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity*. Haematologica, v. 90, n. 8, p. 1128–1132, 2005.

TIEN, H. F. et al. *Methylation of the p15(ink4b) gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation*. Br. J. Haematol., v. 112, n. 1, p. 148–54, 2001.

VALENT, P. et al. *Standards and impact of hematopathology in myelodysplastic syndromes (mds)*. Oncotarget, v. 1, n. 7, 2010 2010.

VERBURGH, E. et al. *Additional prognostic value of bone marrow histology in patients subclassified according to the international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes*. J. Clin. Oncol., v. 21, n. 2, p. 273–82, 2003.

VIRÉ, E. et al. *The polycomb group protein ezh2 directly controls DNA methylation*. Nature, v. 439, n. 7078, p. 871–4, 2006.

WANG, C. et al. *Clinicopathological significance of CHFR methylation in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis*. Oncotarget, Impact Journals, LLC, v. 8, n. 65, p. 109732–109739, 2017.

WANG, F. et al. *Leukemic survival factor sall4 contributes to defective DNA damage repair*. Oncogene, v. 35, p. 6087–6095, 2016.

WANG, F. et al. *Stem cell factor sall4, a potential prognostic marker for myelodysplastic syndromes*. J Hematol. Oncol., v. 6, n. 1, 2013.

WANG, F. et al. *The next new target in leukemia: The embryonic stem cell gene sall4*. Mol. Cell. Oncol., v. 1, n. 4, 2014.

WANG, H. et al. *Cytogenetic evolution correlates with poor prognosis in myelodysplastic syndrome*. Cancer Genetics and Cytogenetics, v. 196, n. 2, p. 159–166, 2010.

WANG, N. et al. *Patients of myelodysplastic syndrome with mild/moderate myelofibrosis and a monosomal karyotype are independently associated with an adverse prognosis: Long-term follow-up data*. Cancer Management and Research, v. 12, p. 5881–5891, 2020.

WINTERS, A.; BERNT K. *MLL-Rearranged Leukemias—An Update on Science and Clinical Approaches*. Front. Pediatr., 5 v., 2017.

DE WOLF-PEETERS C.; PITTALUGA S.; VERHOEF G. *Histological characteristic of bone marrow trephines in myelodysplastic syndromes*. Current Diagnostic Pathology, v.1, n. 4, p. 189-193, 1994.

DE WOLF-PEETERS C. *Bone marrow trephine interpretation: diagnostic utility and potential pitfalls*. Histopathology, v. 18, n. 6, p. 489-493, 1991.

WONG K. F.; SO C. C. *Hypoplastic myelodysplastic syndrome-a clinical, morphologic, or genetic diagnosis?* Cancer Genet Cytogenet., v. 138, n. 1, p. 85-88, 2002.

XAVIER, A. C.; KUTNY, M.; COSTA, L. J. *Incidence and outcomes of paediatric myelodysplastic syndrome in the United States*. British Journal of Haematology, v. 180, n. 6, p. 898–901, 2017.

XIA, B. et al. *C-MYC plays part in drug resistance mediated by bone marrow stromal cells in acute myeloid leukemia*. Leukemia Research, v. 39, n. 1, p. 92–99, 2015.

XIONG, B. et al. *Prognostic evaluation of ALIP and CD34 immunostaining in IPSS-R subgroups of myelodysplastic syndromes*. Pathology, v. 49, n. 5, p. 526–533, 2017.

YANG, J. *SALL4 as a transcriptional and epigenetic regulator in normal and leukemic hematopoiesis*. Biomarker Research, v. 6, n. 1, p. 1, Jan 2018.

YAO, C.-Y. et al. *Distinct mutation profile and prognostic relevance in patients with hypoplastic myelodysplastic syndromes (h-mds)*. Oncotarget, Impact Journals, LLC, v. 7, n. 39, p. 63177–63188, 2016.

YE, L. et al. *Decitabine priming prior to low-dose chemotherapy improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes-raeb: a retrospective analysis vs. chemotherapy alone*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2017.

YIN, C. C.; MEDEIROS, L. J.; BUESO-RAMOS, C. E. *Recent advances in the diagnosis and classification of myeloid neoplasms – comments on the 2008 who classification*. International Journal of Laboratory Hematology, v. 32, n. 5, p. 461–476, 2010.

YUE, G. et al. *Hypocellularity in myelodysplastic syndrome is an independent factor which predicts a favorable outcome*. Leukemia research, v. 32, n. 4, p. 553-558, Abr 2008.

ZAHID, M. F. et al. *Cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes: An overview*. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res., v. 11, n. 3, p. 231–239., Jul 2017.

ZENG, Q. et al. *Apoptosis in human myelodysplastic syndrome cd34+ cells is modulated by the upregulation of tlrs and histone h4 acetylation via a -arrestin 1 dependent mechanism*. Exp. Cell. Res., v. 340, n. 1, p. 22–31, 2016.

ZHOU, J.-D. et al. *Epigenetic dysregulation of id4 predicts disease progression and treatment outcome in myeloid malignancies*. J. Cell. Mol. Med., v. 21, n. 8, p. 1468–1481, 2017.

APÊNDICE B – Avaliação dos achados morfológicos em biópsia de medula óssea em síndrome mielodisplásica primária

PC n^o: _____

- N^o de espaços trabeculares: _____
- Alterações estromais:

	ausente	discreta	moderada	importante	Não avaliável
Edema					
Ectasia sinusóide					
Plasmócitos					
Linfocitose					
Nódulos linfóides					
Precursosores intravascular					

- Escada de Bauereister para fibrose medular:
 - ☐ 0 – sem fibra.
 - ☐ I – fibras com ocasionais e/ou focos finos.
 - ☐ II – rede fina em grande parte do corte, sem fibras grossas.
 - ☐ III – rede difusa, com focos esparsos de fibras grossas, mas sem colágeno.
 - ☐ IV – rede difusa, focos grossos e áreas de colageneização.

- Alterações celulares:

1. Gerais:

Celularidade _____ %	☐ Hipocelular
	☐ Normocelular
	☐ Hiper celular
Proporção Mielóide: Eritróide	
Média de megacariócitos por 10cap/400X	

Parda da orientação arquitetural	ausente	discreta	moderada	importante	Não avaliável
Eritróide					
Mielóide					
Megacariocítia					

2. Linhagem eritroide:

	ausente	discreta	moderada	importante	Não avaliável
megaloblastos					

3. Linhagem megacariocítica:

	ausente	discreta	moderada	importante	Não avaliável
micromegaloblastos					
Hipolobulação nuclear					

4. Linhagem mieloide:

	ausente	discreta	moderada	importante	Não avaliável
ALIP					
Células CD34 + *					

* avaliar porcentagem

APÊNDICE C – Produção Científica I

Lovatel et al. *Molecular Cytogenetics* (2018) 11:40
<https://doi.org/10.1186/s13039-018-0389-x>

Molecular Cytogenetics

CASE REPORT

Open Access



An uncommon t(9;11)(p24;q22) with monoallelic loss of *ATM* and *KMT2A* genes in a child with myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia who evolved from Fanconi anemia

Viviane Lamim Lovatel^{1,5}, Daiane Corrêa de Souza¹, Tatiana Fonseca Alvarenga², Roberto R. Capela de Matos^{1,5}, Claudia Diniz¹, Marcia Trindade Schramm³, Juan Clinton Llerena Júnior⁴, Maria Luiza Macedo Silva^{1,5}, Eliana Abdelhay^{1,5} and Teresa de Souza Fernandez^{1,5*}

Abstract

Background: Myelodysplastic syndrome (MDS) is rare in the pediatric age group and it may be associated with inheritable bone marrow failure (BMF) such as Fanconi anemia (FA). FA is a rare multi-system genetic disorder, characterized by congenital malformations and progressive BMF. Patients with FA usually present chromosomal aberrations when evolving to MDS or acute myeloid leukemia (AML). Thus, the cytogenetic studies in the bone marrow (BM) of these patients have an important role in the therapeutic decision, mainly in the indication for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The most frequent chromosomal alterations in the BM of FA patients are gains of the chromosomal regions 1q and 3q, and partial or complete loss of chromosome 7. However, the significance and the predictive value of such clonal alterations, with respect to malignant progress, are not fully understood and data from molecular cytogenetic studies are very limited.

Case presentation: A five-year-old boy presented recurrent infections and persistent anemia. The BM biopsy revealed hypocellularity. G-banding was performed on BM cells and showed a normal karyotype. The physical examination showed to be characteristic of FA, being the diagnosis confirmed by DEB test. Five years later, even with supportive treatment, the patient presented severe hypocellularity and BM evolution revealing megakaryocyte dysplasia, intense dyserythropoiesis, and 11% myeloblasts. G-banded analysis showed an abnormal karyotype involving a der(9)t(9;11)(p24;q22). The FISH analysis showed the monoallelic loss of *ATM* and *KMT2A* genes. At this moment the diagnosis was MDS, refractory anemia with excess of blasts (RAEB). Allogeneic HSCT was indicated early in the diagnosis, but no donor was found. Decitabine treatment was initiated and well tolerated, although progression to AML occurred 3 months later. Chemotherapy induction was initiated, but there was no response. The patient died due to disease progression and infection complications.

(Continued on next page)

* Correspondence: teresafernandez@inca.gov.br

¹Bone Marrow Transplantation Center (CEMO), National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

³Post-Graduate Program in Oncology, National Cancer Institute José de Alencar Gomes da Silva (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

Conclusions: Molecular cytogenetic analysis showed a yet unreported der(9)t(9;11)(p24;q?22),der(11)t(9;11)(p24;q?22) during the evolution from FA to MDS/AML. The FISH technique was important allowing the identification at the molecular level of the monoallelic deletion involving the *KMT2A* and *ATM* genes. Our results suggest that this chromosomal alteration conferred a poor prognosis, being associated with a rapid leukemic transformation and a poor treatment response.

Keywords: Myelodysplastic syndrome, Acute myeloid leukemia, Fanconi anemia, Classical cytogenetics, FISH, T(9;11), *ATM*, *KMT2A*

Background

Myelodysplastic syndrome (MDS) comprises a heterogeneous group of clonal neoplastic blood diseases characterized by ineffective hematopoiesis, peripheral cytopenias, bone marrow dysplasias and an increased risk of acute myeloid leukemia (AML) [1]. Pediatric MDS is an uncommon disorder accounting for 4–9% of hematologic malignancies [2, 3] and it may be associated with inherited bone marrow failure (BMF) disorders such as Fanconi Anemia (FA) [4].

First described in 1920 by the pediatrician Guido Fanconi [5], nowadays, it is known that FA is a cancer-prone chromosomal instability disorder with diverse clinical symptoms. The congenital anomalies may include skeletal defects, classically abnormal thumb or radius, short stature, café-au-lait spots and endocrinopathies. FA is a rare autosomal and X-linked genetic disease, with a wide variety of symptoms, characterized by congenital abnormalities, progressive BMF and increased cancer risk, which can be difficult to diagnose [5–7].

At the molecular level, 21 FA-related genes that constitute FA-BRCA pathway were identified [6]. Proteins encoded by FA-related genes play important roles in various cellular functions, including DNA repair, detoxification of reactive oxygen species and aldehydes, energy metabolism and both pro-inflammatory and myelosuppressive cytokine homeostasis [8].

Since the first clinical report of FA, important laboratory and clinical advances were incorporated in the diagnosis and treatment, such as the DEB test and the application of HSCT, with a low dosage chemotherapy regimen for children with FA [9–11].

Supportive care using hematopoietic growth factors such as EPO, G-CSF or androgens such as oxymetholone to boost blood cell production, provides transient benefit in some patients. Although, the allogeneic HSCT remains the main treatment approach to advanced marrow failure in FA patients [11, 12]. In this context, some preclinical studies using gene therapy in an attempt to improve the life quality and survival of patients with FA have been performed [12].

Cytogenetic studies in the bone marrow have an important role in the therapeutic decision, mainly in the

indication for HSCT. A better understanding of the clinical relevance and biological implications of clonal chromosomal alterations in FA patients was achieved over the last decade by the incorporation of molecular cytogenetic technologies in addition to classical karyotyping [11, 13]. This has led to the identification of some specific chromosomal alterations in FA patients, their prognostic value and association with the risk of evolution to MDS and/or AML. The most frequent chromosomal alterations in bone marrow of patients with FA are gains of the chromosomal regions 1q and 3q, and partial or complete loss of chromosome 7. Besides, monosomy 7 and del(7q) have been associated with poor prognosis and progression to leukemia. A few reports also suggested that gains of 3q are associated with progression to MDS/AML and overall presenting poor prognosis [13, 14].

Alterations involving del(11q) are uncommon in FA and MDS, so the prognostic value of this alteration remains uncertain [13, 15]. In this region, there are genes such as Ataxia Telangiectasia Mutated gene [*ATM* (11q22)] and lysine methyltransferase 2A [*KMT2A* (11q23)] that have been described as having an important role in the pathogenesis of MDS. The *ATM* gene acts on the regulation of the cell cycle after a DNA damage is recognized [15, 16]. On the other hand, the *KMT2A* gene encodes a protein that is involved in chromatin remodeling and positively regulates multiple homeobox transcription factors, also it is highly associated with the development of AML [17].

Given the high incidence of hematological complications of FA patients, BM surveillance for morphological and cytogenetic changes provides an important contribution to the clinical decision [11]. However, there are only a few studies in patients with FA showing the bone marrow chromosomal alterations analyzed by classical and molecular cytogenetics associated with evolution to MDS and AML [13, 14, 17–19]. Here, we describe an uncommon yet unreported t(9;11)(p24;q22) with monoallelic loss of *ATM* and *KMT2A* genes, defined by classical cytogenetic and FISH analysis, in a child with MDS/AML who evolved from FA associated with poor clinical outcome.

Case presentation

A five-year-old male patient with recurrent infections and persistent anemia was admitted at the National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil. Physical examination showed a small stature (<P2); hyperpigmentation around the eyes; enophthalmia; multiple cafe-au-lait spots; hypoplasia of the thenar eminence accompanies left thumb hypoplasia. Laboratory findings: Hb 9.1 g/dl (age-adjusted 13.5–18.0 g/dl), platelet count $40 \times 10^9/l$ (150–400 $\times 10^9/l$) and white blood cell count $7.6 \times 10^9/l$ (age-adjusted range 4–10 $\times 10^9/l$). BM findings: hypocellularity and normal karyotype by G-banding, according to the International System form Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN 2016) [20]. Clinical genetic exams were done at Medical Genetic Department, Fernandes Figueira National Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil. Chromosome breakage test cytogenetic analysis was performed in peripheral lymphocytes during 72 h of cultures exposed to DEB (0.1 $\mu\text{g/ml}$), according to Auerbach [9]. This analysis demonstrated spontaneous chromosome breakage - 0.16 breaks per cell (reference 00.00–0.08) and DEB-induced chromosome breakage - 2.32 breaks per cell (reference 0.00–0.08), confirming the FA diagnosis. He was hospitalized due to the persistent anemia and progressive neutropenia. Oxymetholone (50 mg/day) was the initial treatment. A partial hematological response was achieved, even with oxymetholone dose reductions due to liver toxicity. However, the hematological parameters worsened and erythropoietin (EPO) and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) were associated, as well as danazol 200 mg/day was introduced. He also received multiple blood transfusions during the treatment but no satisfactory response was achieved. At this time, BM evaluation revealed dysplastic megakaryocytes, intense dyserythropoiesis and 11% of myeloblasts. Immunophenotypic analysis of BM cells also revealed 11% of myeloblasts expressing CD34/CD13/CD11b (54.25%), HLA-DR/CD33/CD7 (31.54%), dysplastic erythropoiesis (CD36/CD71/CD235a), dysgranulopoiesis (CD13/CD16/CD11b/Cd33/CD64/CD15,CD45) and monocytic lineage expressing CD14/CD64/CD36/HLA-DR,CD45. Cytogenetic analysis with G-band technique in bone marrow cells showed an abnormal karyotype: 46,XY,der(9)t(9;11)(p24;q?22)[9]/46,XY[12] (Fig. 1a). The diagnosis was MDS, refractory anemia with excess of blasts (RAEB). Fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed to analyze some genes that may be altered during chromosomal rearrangement. So, we investigated the *CDKN2A* gene (located in 9p) and the *ATM* and *KMT2A* genes (located in 11q22 and 11q23, respectively), due to the important role they play during leukemogenesis. The FISH analysis for the *CDKN2A* gene showed two normal signals (Fig. 1b). It was observed a monoallelic loss of *KMT2A* and *ATM* genes

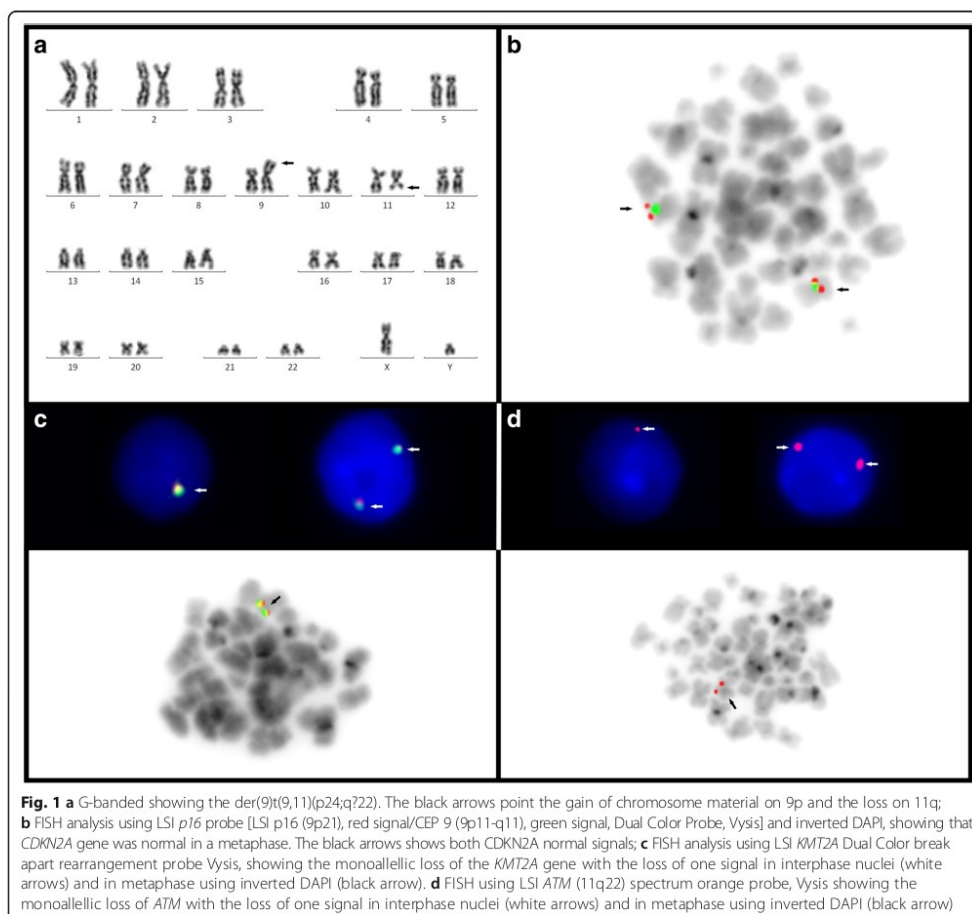
(Fig. 1c and d, respectively). The final karyotype with G-banded and FISH analysis, according to the ISCN 2016 [20], was: 46,XY,der(9)t(9;11)(p24;q?22),der(11)t(9;11)(p24;q?22)[9].ish del(11)(q22.3q23)(ATM-)(KMT2A-)[7]. Treatment with decitabine was initiated and well tolerated, although progression to AML occurred 3 months later. He had no remission with systemic chemotherapy. The patient died 8 months after the diagnosis of RAEB-t, due to disease progression and infectious complications. Allogeneic HSCT was indicated early in the diagnosis, but non-consanguineous parents were available and no donor was found.

Discussion and conclusions

Bone marrow failure occurs with a median age of 8 years and remains the primary cause of morbidity and mortality in FA [12]. The FA cells have a reduced fidelity in processing DNA double-strand breaks. This specific intrinsic susceptibility might, together with extrinsic factors, influence the course of the disease, resulting in the outgrowth of clones with chromosomal aberrations in the bone marrow cells [6]. Nevertheless, there is a cytogenetic clonal fluctuation in patients with FA, since clones often can disappear, reappear, evolve or be replaced by entirely new clones [10]. Therefore, the significance and the predictive value of such clonal alterations with respect to malignant progress are not fully understood [6].

Rochowski et al., (2012) hypothesized that unique bone marrow cytogenetic clones may distinguish patients with FA and AML from patients with de novo AML. Some chromosomal abnormalities as the gain of 1q, 3q, 13q and partial loss of 7q, 20q, 11q or complete loss of chromosome 7 are more frequent in patients with FA who showed progression to AML. While others like trisomy 8, t(8;21), t(9;11), t(6;9) and inv.(16) have been described exclusively in patients with de novo AML [21]. In this study, the t(9;11) was described in MDS/AML secondary from FA. Nevertheless, it is important to note that the breakpoints involved in this chromosomal translocation were not yet reported [22, 23]. In literature, the recurrent breakpoints involved in the t(9;11) in de novo AML patients were t(9;11)(q34;q23) with *FNBP1/KMT2A* gene rearrangement [24]; t(9;11)(q34;p15) with *NUP98/PRRX2* [25]; t(9;11)(q34;q23) with *AF9q34/MLL* [26] t(9;11)(p22;p15) with *NUP98/PSIP1* [27]; and t(9;11)(p21;q23) with *MLLT3/KMT2A* [28]; t(9;11)(q34;q23) with *DAB2IP/KMT2A* [29].

In our study, the patient with FA showed the acquisition of a der(9)t(9;11)(p24;q?22), der(11)t(9;11)(p24;q?22) associated with evolution from MDS to AML. In FISH analysis, it was detected the monoallelic loss of *ATM* gene. The *ATM* gene is located at 11q22 region. This gene encodes a serine/threonine protein kinase, a critical enzyme in the regulation of the stress response to DNA damage, especially double-strand DNA breaks and it is



also involved in cell cycle control. The *ATM* gene appears to act as a “caretaker” of the genome [16]. The loss of *ATM* has been described as having contributed to the increased need for transfusion in patients with MDS associated with del(11q) [15]. Currently, it has been demonstrated the joint and reciprocal action of *ATM* and FA proteins in the DNA repair pathway during replication [30, 31].

In our study, the FISH analysis also showed the monoallelic loss of the *KMT2A* gene. The *KMT2A* locus is involved in more than 60 different chromosomal translocations in pediatric acute leukemias [17]. In AML, the t(9;11) usually results from *KMT2A* gene translocation, being the (p22;q23) the breakpoint frequently described [11]. Interestingly, it was detected the monoallelic deletion of *KMT2A* gene in our study.

Wang et al. showed that deletions of chromosome 11q lack cryptic *KMT2A* rearrangements in patients with MDS and suggested that loss of tumor suppressor genes located in 11q through deletions and secondary allelic loss of heterozygosity is likely more important in pathogenesis and disease progression [15]. The detection of all possible types of *KMT2A* cyto-molecular abnormalities is of key importance for the identification of biological subgroups, which may differ in clinical outcome [30].

In the literature, data on FISH studies in FA are quite limited [14]. In our study, the analysis by the FISH technique was essential allowing the identification at the molecular level of the monoallelic deletion involving the *KMT2A* and *ATM* genes. With the FISH results it was

possible to note that this chromosomal abnormality was not a simple reciprocal translocation involving the regions of chromosomes 9p24 and 11q22, but an unbalanced chromosomal alteration due to the monoallelic loss of *ATM* and *KMT2A* genes. FISH continues to be considered an important technique for molecular investigation of small or hidden chromosomal abnormalities [32].

Taken together, the monoallelic deletions of the genes *KMT2A* and *ATM*, probably, contributed to the defects in the genomic instability of the chromatin remodeling, conferring a poor prognosis, being associated to a rapid leukemic transformation and a poor response to treatment. Furthermore, with our results we contribute to the literature showing an yet unreported *der(9)t(9;11)(p24;q?22)*, *der(11)t(9;11)(p24;q?22)* with monoallelic loss of *ATM* and *KMT2A* genes.

Abbreviations

AA: Aplastic anemia; AML: Acute myeloid leukemia; *ATM*: Ataxia Telangiectasia Mutated gene; BM: Bone marrow; BMF: Bone marrow failure; *CDKN2*: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; *DAB2IP*: DAB2: Interacting protein; DEB: Diepoxybutane; EPO: Erythropoietin; FA: Fanconi anemia; FA-BCRA DNA: Repair associated; FANCI: Fanconi anemia complementation; FISH: Fluorescence in situ hybridization; *FNBP1*: Formin binding protein 1; G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor; HSCT: Hematopoietic stem cell transplantation; ICLs DNA: Interstrand cross-links; *JAK*: Janus kinase 2; *KMT2A*: Lysine methyltransferase 2A; MDS: Myelodysplastic syndrome; *MLL2*: Super elongation complex subunit; MMC: Mitomycin C; *NUP98*: Nucleoporin 98; *PRRX2*: Paired related homeobox 2; *PSIP1*: PC4 and SFRS1 interacting protein 1; RAEB: Refractory anemia with excess of blast

Acknowledgments

This study was supported by the Brazilian Ministry of Health (National Institute of Cancer/INCA, Brazil) and CNPq.

Funding

Funding information is not applicable/No funding was received.

Availability of data and materials

Please contact author for data requests.

Authors' contributions

VLL participated in the design of the study and in manuscript writing. DCS conducted the conventional cytogenetic analyses and performed the FISH; TFA provided the revision of the myelogram and participated in manuscript writing. RRCM participated in manuscript writing. CD performed the immunophenotyping studies. The clinical history of the patient with MDS and AML was reviewed by MS. JCL Jr performed the clinical history of the patient with FA and DEB analysis. MLMS, EA and TSF revised the manuscript critically for important intellectual content. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Ethics Committee of the Brazilian National Cancer Institute (CEP #088/07). Written institutional informed consent for the participation of the patient in this study was obtained from the patient's mother.

Consent for publication

The patient's mother has given their institutional informed written consent for publication of the present case report.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Bone Marrow Transplantation Center (CEMO), National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil. ²Pathology Department of National Cancer Institute (INCA) and Post-Graduation Program in Medical Sciences, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil. ³Hematology Department, National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil. ⁴Medical Genetic Department, Fernandes Figueira National Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁵Post-Graduate Program in Oncology, National Cancer Institute José de Alencar Gomes da Silva (INCA), Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 11 May 2018 Accepted: 28 June 2018

Published online: 11 July 2018

References

- Bannon SA, DiNardo CD. Hereditary predispositions to myelodysplastic syndrome. *Int J Mol Sci*. 2016;17:838.
- Niemeyer CM, Baumann I. Myelodysplastic syndrome in children and adolescents. *Semin Hematol*. 2008;45:60–70.
- Xavier AC, Kutny M, Costa LJ. Incidence and outcomes of paediatric myelodysplastic syndrome in the United States. *Br J Haematol*. 2018;180:898–901.
- Hasle H, Niemeyer CM. Advances in the prognostication and management of advanced MDS in children. *Br J Haematol*. 2011;154:185–95.
- Lobitz S, Velleuer E, Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:893–8.
- Mamrak N, Shimamura A, Howlett NG. Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia. *Blood Rev*. 2017;31:93–9.
- Ostra AB, Nieuwint AWM, Joenje H, Winter JP. Diagnosis of Fanconi Anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia*. 2012; ID. 238731:1–9.
- Savage SA, Dufour C. Classical inherited bone marrow failure syndromes with high risk for MDS and AML. *Semin Hematol*. 2017;4:105–14.
- Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr Protoc Human Genet*. 2016;85:1–17.
- Alter BP. Inherited bone marrow failure syndromes: considerations pre post transplant. *Blood*. 2017;130:257–64.
- Dufour C. How I manage patients with Fanconi anemia. *Br J Haematol*. 2017;178:32–47.
- Müller LU, Williams DA. Finding the needle in the haystack: hematopoietic stem cells in Fanconi anemia. *Mutat Res*. 2009;31:141–9.
- Meyer S, Neitzel H, Tonnes H. Chromosomal aberrations associated with clonal evolution and leukemic transformation in Fanconi anemia: clinical and biological implications. *Anemia*. 2012;ID349837:1–6.
- Mehta PA, Harris RE, Davies KMO, Mueller R, Lampkin B, et al. Numerical chromosomal changes and risk of development of myelodysplastic syndrome – acute myeloid leukemia in patients with Fanconi anemia. *Cancer Genetics*. 2010;203:180–6.
- Wang SA, Abruzzo LV, Hasserjian RP, Zhang L, Hu Y, Zhang Y, et al. Myelodysplastic syndromes with deletions of chromosome 11q lack cryptic MLL rearrangement and exhibit characteristic clinicopathologic features. *Leuk Res*. 2011;35(3):351–7.
- Khanna KK. Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:795–802.
- Borges MLR, Matos RRC, et al. Molecular cytogenetic approach to characterize novel and cryptic chromosome abnormalities in childhood myeloid malignancies of Fanconi anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2017;39:e85–91.
- Quentin S, Cuccini W, Ceccaldi R, Nibourel O, Ponderre C, Pagès MP, et al. Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. *Blood*. 2011;117:e161–70.
- Gioc AM, Wagner JE, Mac Millan ML, DeFor T, Hirsch B. Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with Fanconi anemia: morphologic and cytogenetic characteristics. *Am J Clin Pathol*. 2010;133:92–100.

20. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M, editors. ISCN 2016: an international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: Karger; 2016.
21. Rochowski A, Olson SB, Alonzo TA, Gerbing RB, Lange BJ, Alter BP. Patients with Fanconi Anemia and AML have different cytogenetic clones than *de novo* cases of AML. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(5):922–4.
22. Huret JL, Ahmad M, Arsaban M, Bernheim A, Cigna J, Desangles F, et al. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and Hematology 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013 (Database issue):D920–4PMID:23161685.
23. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsaur D, Fechina L, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*. 2018;32:273–84.
24. Fuchs U, Borkhardt A. t(9;11)(q34;q23) FBP17/MLL. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*. 2001;5(3):200–201.
25. Huret JL. t(9;11)(q34;p15). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*. 2005;9(1):32–33.
26. von Bergh ARM. t(9;11)(q34;q23)AF9q34/MLL. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*. 2006;10(1):22–23.
27. Morerio C, Panarello C. t(9;11)(p22;p15). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*. 2007;11(4):322–323.
28. Knijnenburg J, Beverloo HB. t(9;11)(p21;q23) KMT2A/MLLT3. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*. in press.
29. Kühn MWM, Bullinger L, Gröschel S, Krönke J, Edelmann J, Rücker FG, et al. Genome-wide genotyping of acute myeloid leukemia with translocation t(9;11)(p22;q23) reveals novel recurrent genomic alterations. *Haematologica*. 2014;99:e133–5.
30. Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim S, et al. Convergence of the Fanconi Anemia and Ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell*. 2002;109:459–72.
31. Nepal M, Che R, Zhang J, Ma C, Fei P. Fanconi Anemia Signaling and Cancer. *Trends Cancer*. 2017;3:840–56.
32. Song Q, Peng M, Chu Y, Huang S. Techniques for detecting chromosomal aberrations in myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2017;8:62716–29.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



APÊNDICE D – Produção Científica II

Hindawi
BioMed Research International
Volume 2019, Article ID 3176565, 9 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/3176565>



Research Article

Aberrant Expression of *EZH2* in Pediatric Patients with Myelodysplastic Syndrome: A Potential Biomarker of Leukemic Evolution

Teresa de Souza Fernandez ¹, Tatiana Fonseca Alvarenga ²,
Elaiza Almeida Antônio de Kós,¹ Viviane Lamim Lovatel ¹, Rita de Cássia Tavares,¹
Elaine Sobral da Costa ³, Cecília de Souza Fernandez,⁴ and Eliana Abdelhay ¹

¹Bone Marrow Transplantation Center, National Cancer Institute (INCA), 20230-130 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Pathological Anatomy Department (DIPAT), National Cancer Institute (INCA), 20230-130 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Pediatrics Department, Faculty of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-590 RJ, Brazil

⁴Mathematical and Statistical Institute of Federal Fluminense University (UFF), 24020-140 Niterói, RJ, Brazil

Correspondence should be addressed to Teresa de Souza Fernandez; teresafernandez@inca.gov.br

Received 29 April 2019; Revised 22 July 2019; Accepted 9 August 2019; Published 10 December 2019

Academic Editor: Takashi Yazawa

Copyright © 2019 Teresa de Souza Fernandez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Pediatric myelodysplastic syndrome (MDS) is an uncommon disease and little is known about the molecular alterations of its development and evolution to acute myeloid leukemia (AML). The *Enhancer of Zeste Homolog 2* (*EZH2*) is the catalytic subunit of Polycomb repressive complex 2 (PRC2). It is a histone methyltransferase, that targets lysine 27 of histone 3. This methylated H3–K27 is usually associated with the silencing of genes that are involved in fundamental cellular processes, such as cell proliferation and differentiation. There are only few studies showing the status of *EZH2* expression in patients with MDS and they were performed in adult MDS patients. The aim of this study was to analyze the *EZH2* expression in pediatric patients with MDS and its association with karyotypes and evolution to acute myeloid leukemia (AML). We conducted the first study of *EZH2* expression in pediatric patients with MDS. Considering the *EZH2* expression levels in 42 patients and 17 healthy pediatric donors, it was possible to define three groups of expression in patients: low, intermediate, and high. The intermediate level encompassed patients with normal karyotypes, low level included patients with monosomy 7/del(7q) and high level included patients with trisomy 8 and del(11q) ($p < 0.0001$). Comparing the leukemic evolution, the low expression group presented disease evolution in 100% (8/8) of the cases, the intermediate expression group showed disease evolution in 4.34% (1/23) and in the high expression group, 63.63% (7/11) patients showed evolution from MDS to AML ($p < 0.0001$). It is important to note that low and high *EZH2* expression are associated with leukemic evolution, however low expression showed a stronger association with evolution from MDS to AML than the high expression. Our results suggest a scale of measure for *EZH2* expression in pediatric MDS, where aberrant *EZH2* expression may be a potential biomarker of disease evolution.

1. Introduction

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of clonal hematological neoplasms with a variable clinical features and diverse genetic and epigenetic alterations. The major clinical MDS characteristics are ineffective hematopoiesis, dysplasias, peripheral cytopenias, and an increased risk of transformation to acute myeloid leukemia (AML) [1]. MDS

is viewed as a disease of adults, particularly the elderly patients. Pediatric MDS is a rare disease, accounting for less than 5% of childhood hematologic malignancies [2–4].

In pediatric patients with MDS, the clonal cytogenetic alterations can be detected in 50–70% of the cases [5]. The most frequent chromosomal abnormalities are monosomy 7 and del(7q) [3]. The cytogenetic evaluation of a bone marrow sample from patients with MDS has become an integral part of

clinical care [5–7]. However, there is a percentage of patients with normal karyotypes. So, it is important a molecular characterization of genetic and epigenetic alterations associated with the evolution of the disease, which could help predict prognosis.

Most knowledge about molecular alterations in MDS was acquired from studies in adult patients and it has been observed the importance of epigenetic alterations in the MDS pathogenesis, since it is the most responsive disease to DNA methylation inhibitors drugs [8]. Epigenetic modifications play important biological roles because they regulate gene expression. There are two main epigenetic modifications: the DNA methylation and the chromatin modification, which are frequently associated to transcriptional gene repression. Among chromatin modifiers, Polycomb Group (PcG) proteins have been established as classical players of epigenetic regulation [9]. PcG proteins contain two core complexes: the maintenance polycomb repressive complex 1 (PCR1) and the initiation polycomb repressive complex 2 (PCR2). The *Enhancer of Zeste Homolog 2* (*EZH2*) is a histone methyltransferase. It is the catalytic subunit of PCR2 for tri-methylation of histone 3 at lysine 27 (H3K27me) by SET domain in its C-terminus, which silences target genes involved in various biological functions as cell cycle, cell proliferation and differentiation. PcG proteins are important epigenetic regulators and critical factors of pluripotency and differentiation of stem cells as well as aberrant gene expression during the malignant transformation [10].

Overexpression of *EZH2* is frequently observed in many cancer types, including prostate, breast, bladder, ovarian, lung, liver, gastric esophageal, pancreatic cancer, melanoma, and osteosarcoma. This overexpression in solid tumors is correlated with higher proliferation and poor prognosis. So, there are results suggesting that *EZH2* has a critical role in cancer progression and an epigenetic therapy that pharmacologically targets *EZH2* may constitute a novel approach to the treatment for some types of cancer [11, 12].

The biological functions of *EZH2* in different tumor cells are under intense investigation. In MDS and AML, both overexpression and loss-of-function mutations of *EZH2* gene suggest that it can function as an oncogene or as a tumor suppressor gene, respectively [10]. There are only few studies showing the status of *EZH2* expression in patients with MDS. These studies were done in adult patients. Xu and colleagues studied for the first time the Polycomb expression genes including *EZH2*. In this study, it was observed that overexpression of the *EZH2* gene is common in MDS and indicates poor prognosis [13]. However, Cabrera and colleagues observed underexpression of *EZH2* and its association with chromosome 7 alterations [–7/del(7q)] and poor prognosis in MDS [14].

The functions of *EZH2* and its mapping to the critical region for malignant myeloid disorders suggest that the *EZH2* gene may be involved in the pathogenesis of 7q35-q36 alterations [15]. Until now, there are no studies showing the expression of *EZH2* in pediatric patients with MDS. Therefore, the aim of this study was to analyze the *EZH2* gene expression in pediatric patients with MDS, concerning their association with karyotypes, MDS subtypes and evolution from MDS to AML, giving new insights into pediatric MDS pathogenesis.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Controls. Bone marrow cells were obtained from 42 patients with pediatric MDS between 2007 and 2016. The patients included 27 boys and 15 girls, with ages between 5 months and 18 years (the mean age was 8 years). The patients were diagnosed at the Hematology/Oncology Units of hospitals in Rio de Janeiro, Brazil: National Cancer Institute (INCA-RJ) and Martagão Gesteira Institute of Pediatrics and Child Development (IPPMG-UFRJ). Diagnosis and classification were done according to the revised criteria of Hasle and colleagues, 2003 and 2016 [16, 17]. Twenty-two patients were classified as refractory childhood cytopenia (RCC), fifteen as refractory anemia with excess of blasts (RAEB), and five as refractory anemia with excess of blasts in transformation (RAEB-t). None of the patients had been previously treated for a malignancy. Healthy bone marrow samples were obtained from 17 pediatric donors of bone marrow transplant (the mean age was 12 years). This study was approved by the Ethics Committee of the National Cancer Institute (INCA, Rio de Janeiro, Brazil) and all procedures performed followed the bioethics standard, according to resolution 466/12 of Health National Committee.

2.2. Cytogenetic Analysis. Karyotypes of bone marrow cells from the 42 pediatric patients with MDS were obtained from cultures in RPMI 1640, with 20% fetal calf serum (GIBCO) at 37°C for 24 hours. Cell cultures were pulsed with colcemid to a final concentration of 0.05 µg/mL at the final hour of incubation. Cells were subsequently harvested by standard procedures (hypotonic shock: 0,075 M) and fixed in methanol: acetic acid (3:1). GTG-banding was performed. Chromosomes were identified and arranged according to the International System for Cytogenetic Nomenclature, 2016 [18]. Fluorescence “in situ” hybridization (FISH) analyses were performed using dual color probe for chromosome 11 (LSI MLL dual color break apart rearrangement probe) according to the manufacturer's protocol, to confirm the del(11) (q23) with the allelic loss of *MLL/KMT2A*. We used the samples of cytogenetic cultures.

2.3. Analysis of *EZH2* Gene Expression by Real-Time Quantitative PCR. Analyses of *EZH2* mRNA level alterations in 42 pediatric patients with primary MDS and 17 healthy pediatric controls were carried out by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). Total mRNA was obtained from the 42 pediatric patients with MDS and 17 healthy individuals (donors) by TRIzol reagent (*Life Technologies*), according to the manufacturer's protocol and stored at –70°C. Two micrograms of total RNA was submitted to genomic DNA digestion with DNase amplification grade I (*Life Technologies*) to remove genomic DNA contaminant. The RNA was transcribed reversely to complementary DNA (cDNA) with Superscript II Reverse Transcriptase (*Life Technologies*) and Oligo-dT18 (*Life Technologies*) kits. Reactions were performed in 10 µl with final concentration of 1 × of Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen); 0.5 µM of each forward/reverse primers and completed 2.5 µl of cDNA diluted five folds. Reactions were carried out in Rotor Gene Q thermocycler (Qiagen), with hot-start stage step of 10 minutes at 95°C followed by 45 cycles

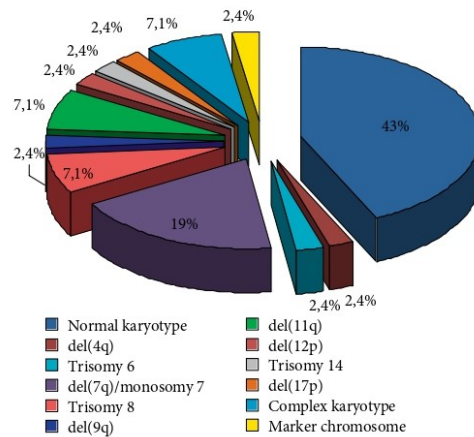


FIGURE 1: Frequency of chromosomal abnormalities in pediatric patients with primary MDS.

of 20 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, and 30 seconds at 72°C. The dissociation curve was used to determine the PCR efficiency, specificity of amplification and primer dimer formation. *B-actin* mRNA levels were used as a reference for normalization. The following primers sequence used were: *EZH2* Forward 5'-TTGTGACAGTTTCGTGCCCTTGT-3' and *EZH2* Reverse 5'-TGCTTGGTGTTCGACTGTTGCTT-3'; *B-actin* Forward 5'-TTCCTTCCTGGGCATGGAGTC-3' and *B-actin* Reverse 5'-AGACAGCACTGTGTTGGCGTA-3'. The relative expression levels of *EZH2* gene were calculated using the $\Delta\Delta C_T$ method.

2.4. Statistical Analysis. The statistical difference between *EZH2* expression in pediatric patients and donors (pediatric healthy individuals) was analyzed by Mann-Whitney test. This test was also used in the analyses of age groups (children versus adolescents), MDS subtypes (initial stage, RCC, versus advanced stages, RAEB and RAEB-t), karyotypes (normal karyotypes versus abnormal karyotypes) and *EZH2* expression in donors and low *EZH2* expression patients, donors and intermediate *EZH2* expression patients and donors and high *EZH2* expression patients. The Kruskal-Wallis test was used to verify the statistical difference between three groups defined according to the level of *EZH2* expression (low, intermediate and high). We also analyzed the levels of *EZH2* expression and the evolution of disease (from MDS to AML) through the chi-square test with Yates correction. The difference between low expression group and high expression group was analyzed by Fisher's exact test. A value of $p < 0.05$ was considered significant in all analyses.

3. Results

3.1. Clonal Chromosomal Abnormalities in Pediatric Patients with Primary MDS. Among a total of 42 pediatric patients with primary MDS, clonal chromosomal abnormalities

TABLE 1: Clinical and cytogenetics characteristics of pediatric patients with primary MDS.

Clinical characteristics	Number of Patients (%)
Age	
Mean of age: 8 years old (range from 5 months to 18 years)	42 (100%)
Sex	
Male	27 (64%)
Female	15 (36%)
MDS subtypes	
Initial subtype: RCC	22 (52%)
Advanced subtypes	
RAEB	15 (36%)
RAEB-t	5 (12%)
Karyotypes	
Normal	18 (43%)
Abnormal	24 (57%)
del(4q)	1 (2.4%)
Trisomy 6	1 (2.4%)
del(7q)	3 (7.1%)
Monosomy 7	5 (12%)
Trisomy 8	3 (7.1%)
del(9q)	1 (2.4%)
del(11q)	3 (7.1%)
del(12p)	1 (2.4%)
del(17p)	1 (2.4%)
Trisomy 14	1 (2.4%)
Marker chromosome	1 (2.4%)
Complex karyotype	3 (7.1%)

were detected in 24 patients (57%). The frequency of the chromosomal abnormalities in pediatric patients with primary MDS is shown in (Figure 1). The distribution of abnormal karyotypes according to MDS subtypes was: 23% (5/22) in RCC, 93% (14/15) in RAEB, and 100% (5/5) in RAEB-t. Cytogenetic results showed that patients with RCC presented normal karyotypes or single abnormalities as: del(4q), del(9p), del(11q), del(12p), and +mar. In the RAEB and RAEB-t subtypes, we observed single chromosomal abnormalities as +6, del(7q), -7, +8, del(11q), del(17p), +14, and complex karyotype. In the cases of del(11q), FISH analyses were performed showing the del(11) (q23) with allelic loss of *MLL/KMT2A*. The clinical and cytogenetic characteristics in pediatric patients with primary MDS is shown in Table 1.

3.2. Analysis of EZH-2 Gene Expression in Pediatric Patients with Primary MDS. The analysis of *EZH-2* gene relative expression levels in 42 pediatric patients with primary MDS showed a higher expression when compared to the controls (donors), which led to a statistically significant analysis ($p < 0.04$) (Mann-Whitney test) (Figure 2(a)). Analyzing the *EZH-2* relative expression levels according to the subtypes of MDS, being 22 patients classified at initial stage (RCC) and 20 patients classified at advanced stages (RAEB and RAEB-t), we

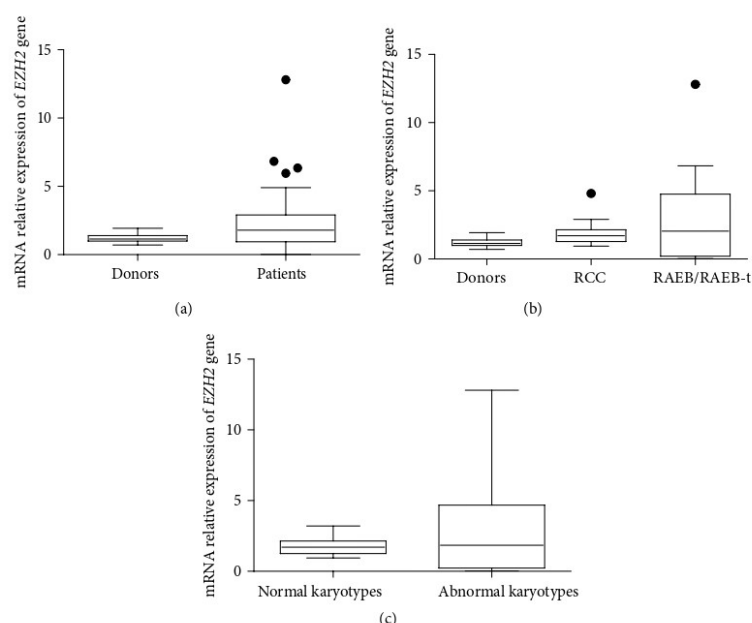


FIGURE 2: *EZH2* expression by qRT-PCR in pediatric patients with MDS. (a) *EZH2* expression from samples of healthy pediatric donors and pediatric patients with MDS. (b) Healthy pediatric donors and MDS subtypes. (c) Normal karyotypes versus abnormal karyotypes.

found no statistical significance (Figure 2(b)). The association of *EZH2* relative expression levels between patients with normal karyotypes and abnormal karyotypes did not show a statistical significance (Mann–Whitney test) (Figure 2(c)).

However, it is very interesting to note that analyzing the distribution of the expression levels of *EZH2* in patients and donors, it is clearly observed that there is a heterogeneous distribution in patients, while the distribution of expression levels in controls is more homogeneous. From this result, it was possible to define three distinct groups of *EZH2* expression. This analysis was based mathematically on quartiles [19]. Since the distribution of the *EZH2* expression in patients is skewed, we used the median as central measure and quartiles as dispersion measures, according to Zar, 2010 [19]. We found 1.8 for the median. The first quartile is 1 and the third quartile is 2.85. We divided the *EZH2* expression in patients into three groups: low, intermediate, and high. In order to compare *EZH2* expression of patients and donors, we also used the median and quartiles for the donors. In normal individuals (donors), the median was 1.15 and according to the classes of *EZH2* expression, the median at low level was 0.2, for intermediate level the median was 1.61 and for high expression, the median was 4.81 (Figure 3(a)). We observed a significant difference between the *EZH2* expression in donors and in low ($p < 0.0001$) (Figure 3(b)), intermediate ($p < 0.0057$) (Figure 3(c)) and high ($p < 0.0001$) (Figure 3(d)) *EZH2* expression groups. It was possible to suggest a scale of *EZH2* expression, where patients with *EZH2* expression belonging to the real interval [0,1) were

classified in the low group, the real interval [1,3) represented the intermediate group and the real interval [3,13) represented the high group. We have $n = 8$, $n = 23$, and $n = 11$ as the number of patients in each group, respectively (Table 2).

Then, we analyzed the association of *EZH2* expression levels with specific karyotypic patterns. Our results showed that intermediate *EZH2* expression level encompassed patients with normal karyotypes ($n = 18$), low level of expression included patients with monosomy 7 and del(7q) ($n = 8$) and high level of expression included patients with trisomy 8 ($n = 3$) and del(11q) ($n = 3$). We observed a statistical difference between these groups ($p < 0.0001$, Kruskal–Wallis test) (Figure 4). It is important to notice that karyotypes can be categorized using the scale of *EZH2* expression suggested in this work. More precisely, none patients with monosomy 7/del(7q) was in high expression group and none of patients with trisomy 8/del(11q) was in low expression group (Table 2). It is also important to observe that we found other karyotypes, as we can see in Figure 1, but we considered normal karyotypes, monosomy 7/del(7q) and trisomy 8/del(11q) for the association analysis with *EZH2* expression, because of the number of patients in these cytogenetic groups (Table 2).

We also investigated the *EZH2* relative expression levels and the evolution of the disease according to the three *EZH2* expression groups. The low expression group presented evolution of the disease in 100% of cases (8/8 patients), the intermediate expression group showed disease evolution in 4.34% patients (1/23) and in the high expression group, 63.63%

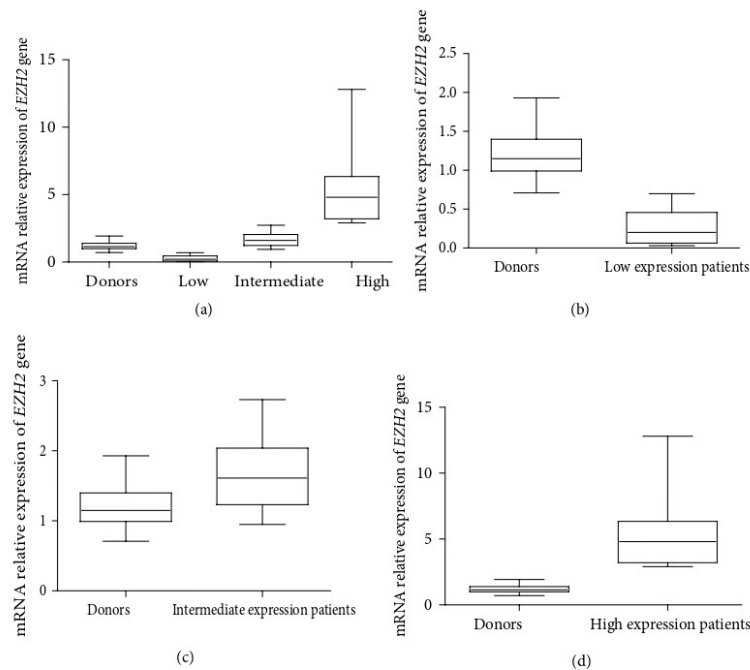


FIGURE 3: *EZH2* expression by qRT-PCR in pediatric patients with MDS. (a) *EZH2* expression levels: low, intermediate, high and donors. (b) Donors vs low expression patients. (c) Donors vs intermediate expression patients. (d) Donors vs high expression patients.

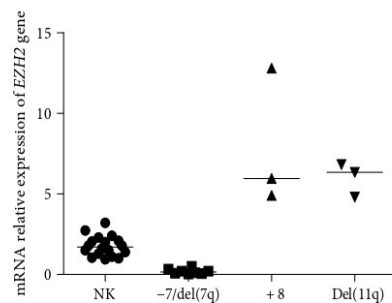


FIGURE 4: *EZH2* expression levels with specific karyotypic patterns: normal karyotypes (NK), -7/del(7q), +8, del(11q).

patients (7/11) showed evolution from MDS to AML. We verified through the chi-square test with Yates correction a statistical significance in this result ($p < 0.001$). It is important to note that the difference between low expression group (8/8) and high expression group (7/11) is not significant statistically ($p = 0.085$, Fisher's exact test). This result is very important, because it demonstrates that both groups, the low *EZH2* expression group and the high *EZH2* expression group, are

TABLE 2: Scale of measure for *EZH2* expression in pediatric MDS.

Scale of expression level of <i>EZH2</i>	[0,1)*	[1,3)**	[3,13)***
Defined groups	Low	Intermediate	High
Karyotypes	Monosomy 7/del(7q)	Normal karyotypes	Trisomy 8/del(11q)
Evolution MDS→AML (%)	100%	4.34%	63.63%

Notation in the form of * [0,1) to indicate the numbers between 0 and 1; ** [1,3) to indicate the numbers between 1 and 3; *** [3,13) to indicate the numbers between 3 and 13.

associated with evolution from MDS to AML. Moreover, our result suggests that it seems that the low expression group presents a more elevated risk of progression to AML, since there was a 100% of disease evolution in the cases studied. Our results suggest that this scale of measure for *EZH2* expression in pediatric MDS can give us a better understanding of the evolution from MDS to AML (Table 2). The associations of *EZH2* gene expression with clinical features, karyotypes and leukemic evolution in pediatric patients with primary MDS and p values are shown in Table 3.

TABLE 3: Association of *EZH2* gene expression with clinical features, karyotypes and leukemic evolution in pediatric patients with primary MDS.

Parameter	EZH2 gene expression (median)		p value	
Age of patients				
< 12 years old (children), n = 32	1.8		p < 0.4	
> 12 years old (adolescents), n = 10	2.7			
Pediatric patients (n = 42)	1.8		p < 0.04	
Pediatric healthy individuals (n = 17)	1.15			
MDS subtypes				
Initial stage (RCC) (n = 22)	1.7		p < 0.9	
Advanced stages (RAEB/RAEB-t) (n = 20)	2.9			
Karyotypes				
Normal (n = 18)	1.7		p < 0.8	
Abnormal (n = 24)	1.8			
Specific chromosomal pattern				
Normal karyotypes (n = 18)	1.7		p < 0.0001	
-7/del(7q) (n = 8)	0.2			
+8 (n = 3)	5.96			
del(11q) (n = 3)	6.35			
Levels of EZH2 expression				
Low (n = 8)	0.2		p < 0.0001	
Intermediate (n = 23)	1.61			
High (n = 11)	4.81			
Donors versus levels of EZH2 expression (groups)		Donors	Groups	
Donors (n = 17) vs. Low expression patients (n = 8)		1.15	0.2	p < 0.0001
Donors (n = 17) vs. Intermediate expression patients (n = 23)		1.15	1.61	p < 0.0057
Donors (n = 17) vs. High expression patients (n = 11)		1.15	4.81	p < 0.0001
Evolution of disease (MDS →AML) versus levels of EZH2 expression		Low (8/8)		p < 0.0001
		Intermediate (1/23)		
		High (7/11)		
Evolution of disease (MDS →AML) versus levels of EZH2 expression		Low (8/8)		p = 0.085
		High (7/11)		

4. Discussion

The molecular pathogenesis of pediatric MDS remains poorly understood due to its rarity, high heterogeneity and complexity of the disease. Until now, few studies have evaluated the expression of *EZH2* in MDS. Xu and colleagues evaluated the expression of the *EZH2* gene in bone marrow samples from 54 adult patients with MDS using the qRT-PCR methodology. The authors verified increased expression of *EZH2* and two other Polycomb genes, *BMI1* and *RING1*, in these patients. In this study, it is interesting to note that cytogenetic analysis showed, as main numerical chromosomal abnormality, the trisomy 8 and it was not detected the alterations in chromosome 7 (monosomy 7 and del 7q). The authors suggested that increased expression of Polycomb genes, including the *EZH2*, is an event related to poor prognosis in MDS [13]. On the other hand, Cabrero and colleagues studied the expression of *EZH2* in 78 adult patients with MDS. According to this study, patients who presented alterations in chromosome 7, such as monosomy 7 and 7q deletion, showed a significantly lower level of expression when compared to controls, diploid patients and other chromosomal abnormalities [including del(5q), +9,

+16, +8, del(11q), -Y, t(7;20), inv3, del(20q)]. In this study, the underexpression of *EZH2* and alterations of chromosome 7 were associated with poor prognosis [14]. McGraw and colleagues studied *EZH2* protein expression by immunohistochemistry in 33 MDS patients. It was observed that *EZH2* expression was significant lower in -7/del(7q) compared to those patients without these chromosomal alterations [20]. Xu and colleagues showed that the genomic loss of *EZH2* [-7 and del(7q)] leads to low *EZH2* expression in MDS and it is associated with shorter survival and increased AML transformation [21]. However, Sashida and colleagues showed that *EZH2* loss promotes development of MDS, but attenuates its predisposition to leukemic transformation [22]. Thus, it is possible to note that studies regarding the role of *EZH2* in MDS in adult patients are still controversial.

We conducted the first study of *EZH2* expression in pediatric patients with MDS. In our study, we observed a statistically significant difference in the expression of *EZH2* between the group of patients and the group of controls. Patients showed an *EZH2* expression distribution ranging from 0.03 to 12.8 and controls showed an *EZH2* expression distribution ranging from 0.71 to 1.93. So, the *EZH2* expression distribution observed in

patients is more heterogeneous than that in the controls. From this observation, it was possible to define three distinct groups of expression (low, intermediate, and high) using the median as central measure for the study. These results suggest a scale of measure for *EZH2* expression in pediatric MDS.

Analyzing the expression levels of *EZH2* in pediatric patients with MDS and the evolution of disease, we observed that the low expression group presented evolution of the disease in 100% of the cases, the intermediate expression group showed disease evolution in 4.34% patients, and in the high expression group, 63.63% patients showed evolution from MDS to AML. This result was significant ($p < 0.0001$). Thus, our results suggest that aberrant expression of *EZH2* is associated with leukemic transformation, being a biomarker of disease evolution. It is important to note that low and high expression levels were associated with leukemic evolution; however, low expression showed a stronger association with evolution from MDS to AML than the high expression.

Regarding the evolution from MDS to AML, Mc Graw and colleagues suggested the *EZH2* protein analysis by immunohistochemistry may be a molecular tool for discriminating disease outcome or transformation risk [20]. In our study, we also observed the importance of *EZH2* expression results in MDS. So, studies based on *EZH2* expression may have relevant clinical implications and may be incorporated as an additional laboratory test using also the real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Accumulating studies have demonstrated that *EZH2* participates in various biological processes and displays different modes of action [10]. These results showed that the clinical impact of aberrant *EZH2* expression on the progression of MDS is complex and appears to be associated with other events such as the presence of a specific chromosomal abnormality. This hypothesis may be re-inforced because in MDS there are different molecular evolution pathways associated with specific cytogenetic abnormalities [23, 24]. Based on these results, it is necessary new studies to clarify the signaling pathways in the three groups of *EZH2* expression and studies involving a larger number of patients. Some studies have been reported the molecular pathways associated with *EZH2* [10, 20, 25]. Xu and colleagues demonstrated that genomic loss of *EZH2* contributes to overexpression of the *HOX* gene clusters in MDS by reducing H3K27me3 [21].

Overexpression of *EZH2* has been found in different cancer types [26]. *EZH2* was found to be overexpressed in MDS tumor cells associated with methylation of tumor suppressor gene cyclin dependent kinase inhibitor 2B ($p15^{INK4B}$) compared with tumor cells that $p15^{INK4B}$ is not methylated. This association between *EZH2* and $p15^{INK4B}$ was not observed in other PcG genes (*EED*, *SUZ12*, *BMI-1* and *RING1*), suggesting that *EZH2* is involved in the methylation of $p15^{INK4B}$ gene [13]. Methylation in $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ were observed in pediatric MDS suggesting that these genes may play an important role during evolution from MDS to AML [2]. Recently, Ye and Li demonstrated in a systematic meta-analysis the important role of $p15^{INK4B}$ in the development, progression, and poor prognosis of MDS [27].

In prostate cancer, there is a positive feedback mechanism between *Myc* and *EZH2*, where *Myc* overexpression is associated with increased *EZH2* and *EZH2* could also induce *Myc* overexpression. *Myc* is a transcription factor that regulates cell proliferation. It has been considered as an important factor of the increase expression of *EZH2* by repressing microRNAs expression (miR26a and miR26b). The initiation and evolution of prostate cancer is associated with overexpression of *Myc* and *EZH2* [28]. In other tumors, like medulloblastoma, cooperation between *Myc* and *EZH2* was also observed, where higher *Myc* levels were associated with increased *EZH2* and pharmacological blockade of *EZH2* is a potential therapeutic strategy for aggressive medulloblastoma [29]. Different mechanisms are involved in *c-Myc* deregulation expression in hematological neoplasms, such as chromosome rearrangements, amplification and epigenetic mechanisms. Increased expression of *EZH2* by *c-Myc* has been described in AML. As observed in solid tumors, in hematological neoplasms, there is also an association between *c-Myc* deregulation and *EZH2* overexpression [30]. In chromosome 8, region q24 is located the gene *cMyc*. In our study, we observed an association of trisomy 8 and an overexpression of *EZH2*, associated in evolution of disease. It was already observed that trisomy 8 cells in MDS have amplification intrachromosomally of *c-Myc* [31]. Therefore, it is possible, like in other types of cancer that *c-Myc* and *EZH2* overexpression cooperate in the pathogenesis of MDS, mainly during evolution to AML.

It has been described that imbalance between Polycomb (PcG) and Trithorax (TrxG) expressions is involved in development of diseases, as cancer. The PcG proteins usually maintain the repression of gene expression and TrxG proteins act in the opposite way [32]. *KMT2A* (*MLL*) gene is located in region q23 in chromosome 11 and it is an important member of TrxG family, involved in pediatric acute leukemia pathogenesis [33]. Abnormalities in the balance between PcG and TrxG may be associated with leukemia pathogenesis [32]. In our study, we found an association of del(11q), involving the loss of *KMT2A* allele, and an overexpression of *EZH2*. Our results suggest that a possible mechanism involved in the evolution of disease in this case may be related with an imbalance between the expression of *EZH2* and *KMT2A* genes.

The *EZH2* aberrant expression in cancer cells may result from different mechanisms involved in poor prognosis with evolution of disease. Therefore, further investigation is necessary to a better understanding of the mechanisms associated with low and high expression of *EZH2* during the pathogenesis of MDS.

EZH2 is a master regulator of chromatin and accumulated evidence suggests that it is involved in aberrant transcriptome in cancer cells. Thus, *EZH2* is a potent target for cancer therapy and *EZH2* inhibitors have been under pre-clinical and clinical investigations [25]. However, as demonstrated in other studies, the *EZH2* may have tumor suppressive and oncogenic functions in MDS and in AML. It is also demonstrated that *EZH2* has a dual role in the same disease, acting in different phases of the AML. This dual function has potential therapeutic implications [34, 35]. Analyzing our results of *EZH2* expression in pediatric patients with MDS, it is also possible to suggest the dual role of *EZH2* and this result has clinical implications, regarding the

evolution of disease and also to aid the choice of the treatment, reinforcing the importance of incorporate additional laboratory tests to analyze the *EZH2* expression. Since this study was the first to investigate the association of aberrant expression of *EZH2* with karyotypes and disease evolution in pediatric patients with MDS, a more number of studies are necessary to confirm our results and the relevant contribution of *EZH2* in the pathogenesis of pediatric MDS.

5. Conclusions

We conducted the first study of *EZH2* expression in pediatric patients with MDS. Considering the *EZH2* expression levels in patients and healthy pediatric donors, it was possible to define three groups of expression in patients: low, intermediate, and high. The intermediate level encompassed patients with normal karyotypes, low level included patients with monosomy 7/del(7q) and high level included patients with trisomy 8 and del(11q) ($p < 0.0001$). Comparing the leukemic evolution, it was important to note that low and high *EZH2* expression were associated with leukemic evolution. However, the low expression showed a stronger association with evolution from MDS to AML than the high expression. Our results provides new insights about the pediatric MDS pathogenesis with the focus on the aberrant expression of *EZH2*, suggesting a scale of measure for *EZH2* expression in pediatric MDS, where aberrant *EZH2* expression may be a potential biomarker of disease evolution.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are included within the article and the original data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This study was supported by Instituto Nacional de Câncer (INCA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

References

- [1] S. C. Jhanwar, "Genetic and epigenetic pathways in myelodysplastic syndromes: A brief overview," *Advances in Biological Regulation*, vol. 58, pp. 28–37, 2015.
- [2] E. F. Rodrigues, C. B. Santos-Rebouças, M. M. G. Pimentel et al., "Epigenetic alterations of p15 (INK4B) and p16 (INK4A) genes in pediatric primary myelodysplastic syndrome," *Leukemia & Lymphoma*, vol. 51, no. 10, pp. 1887–1894, 2010.
- [3] M. W. Wlodarski, S. S. Sahoo, and C. M. Niemeyer, "Monosomy 7 in pediatric myelodysplastic syndrome," *Hematology/Oncology Clinics of North America*, vol. 32, no. 4, pp. 729–743, 2018.
- [4] F. Locatelli and B. Strahm, "How I treat myelodysplastic syndrome of childhood," *Blood*, vol. 131, no. 13, pp. 1406–1414, 2018.
- [5] D. C. de Souza, C. de Souza Fernandez, A. Camargo et al., "Cytogenetic as an important tool for diagnosis and prognosis for patients with hypocellular primary myelodysplastic syndrome," *Biomed Research International*, vol. 2014, 10 pages, Article ID 542395, 2014.
- [6] U. Bacher, W. Kern, T. Alpermann, S. Schnittger, C. Haferlach, and T. Haferlach, "Prognoses of MDS subtypes RARS, RCMD and RCMD-RS are comparable but cytogenetics separates a subgroup with inferior clinical course," *Leukemia Research*, vol. 36, no. 7, pp. 826–831, 2012.
- [7] N. Kawankar, F. Jijina, K. Ghosh, and B. R. Vundinti, "Cytogenetic and comparative genomic hybridization study of Indian myelodysplastic syndromes," *Cancer Epidemiology*, vol. 35, no. 4, pp. e1–5, 2011.
- [8] J. P. Issa, "The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease," *Blood*, vol. 121, no. 19, pp. 3811–3817, 2013.
- [9] T. S. Fernandez, A. Mencia, and C. S. Fernandez, "Epigenetics in cancer: the myelodysplastic syndrome as a model to study epigenetic alterations as a diagnostic and prognostic biomarkers," In: T. K. Khan, Ed., *Biomarker*, InTech Open, Croatia. 1st edition, pp. 19–48, 2012.
- [10] L. Gan, Y. Yang, Q. Li, Y. Feng, T. Liu, and W. Guo, "Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential," *Biomarker Research*, vol. 6, p. 10, 2018.
- [11] H. Yamaguchi and M. C. Hung, "Regulation and role of EZH2 in cancer," *Cancer Research and Treatment*, vol. 46, no. 3, pp. 209–222, 2014.
- [12] R. Sun, J. Shen, Y. Gao et al., "Overexpression of EZH2 is associated with the poor prognosis in osteosarcoma and function analysis indicates a therapeutic potential," *Oncotarget*, vol. 7, no. 25, pp. 38333–38346, 2016.
- [13] F. Xu, X. Li, L. Wu et al., "Overexpression of the EZH2, RING1 and BMI1 genes is common in myelodysplastic syndromes: relation to adverse epigenetic alteration and poor prognostic scoring," *Annals of Hematology*, vol. 90, no. 6, pp. 643–653, 2011.
- [14] M. Cabrero, Y. Wei, H. Yang et al., "Down-regulation of EZH2 expression in myelodysplastic syndrome," *Leukemia Research*, vol. 44, pp. 1–7, 2016.
- [15] C. Cardoso, C. Mignon, G. Hetet, B. Grandchamps, M. Fontes, and L. Colleaux, "The human EZH2 gene: genomic organisation and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders," *European Journal of Human Genetics*, vol. 8, no. 3, pp. 174–180, 2000.
- [16] H. Hasle, C. M. Niemeyer, J. M. Chessells et al., "A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases," *Leukemia*, vol. 17, no. 2, pp. 277–282, 2003.
- [17] H. Hasle, "Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood," *Hematology American Society of Hematology Education Program*, vol. 2016, no. 1, pp. 598–604, 2016.

- [18] J. McGowan-Jordan, A. Simons, and M. Schmid, Ed., *ISCN 2016: an international system for human cytogenetic nomenclature*, Karger, Basel, 2016.
- [19] J. H. Zar, *Biostatistical Analysis*, Pearson Education Inc, New Jersey, USA pp. 33–44, 5th edition, 2010.
- [20] K. L. McGraw, J. Nguyen, N. H. Al Ali et al., "Association of EZH2 protein expression by immunohistochemistry in myelodysplasia related neoplasms with mutation status, cytogenetics and clinical outcomes," *British Journal of Haematology*, vol. 184, no. 3, pp. 450–455, 2019.
- [21] F. Xu, L. Liu, C. K. Chang et al., "Genomic loss of EZH2 leads to epigenetic modifications and overexpression of the HOX gene clusters in myelodysplastic syndrome," *Oncotarget*, vol. 7, no. 7, pp. 8119–8130, 2016.
- [22] G. Sashida, H. Harada, H. Matsui et al., "EZH2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation," *Nature Communications*, vol. 5, p. 4177, 2014.
- [23] T. de Souza Fernandez, M. H. Ornellas, L. O. Carvalho, D. Tabak, and E. Abdelhay, "Chromosomal alterations associated with evolution from myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia," *Leukemia Research*, vol. 24, no. 10, pp. 839–848, 2000.
- [24] A. Pellagatti, M. Cazzola, A. Giagounidis et al., "Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells," *Leukemia*, vol. 24, pp. 756–764, 2010.
- [25] M. Yamagishi and K. Uchamaru, "Targeting EZH2 in cancer therapy," *Current Opinion in Oncology*, vol. 29, no. 5, pp. 375–381, 2017.
- [26] L. Gan, Y. Yang, Q. Li, Y. Feng, T. Liu, and W. Guo, "Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential," *Biomarker Research*, vol. 6, no. 1, , 2018.
- [27] F. Ye and N. Li, "Role of p15 (INK4B) methylation in patients with myelodysplastic syndromes: a systematic meta-analysis," *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, vol. 19, pp. e259–e265, 2019.
- [28] G. Kuser-Abali, A. Alptekin, and B. Cinar, "Overexpression of MYC and EZH2 cooperates to epigenetically silence MST1 expression," *Epigenetics*, vol. 9, no. 4, pp. 634–643.
- [29] M. Natsumeda, Y. Liu, S. Nakata et al., "Inhibition of enhancer of zest homologue 2 is a potential therapeutic target for high-MYC medulloblastoma," *Neuropathology*, vol. 39, no. 2, pp. 71–77, 2019.
- [30] L. Herviou, G. Cavalli, G. Carton, B. Klein, and J. Moreau, "EZH2 in normal hematopoiesis and hematological malignancies," *Oncotarget*, vol. 7, no. 3, pp. 2284–2296, 2016.
- [31] T. S. Fernandez, M. L. M. Silva, J. Souza, M. T. Paula, and E. Abdelhay, "cMyc amplification in a case of Progression from MDS to AML (M2)," *Cancer Genetics and Cytogenetics*, vol. 86, no. 2, pp. 183–184, 1996.
- [32] S. J. Geisler and R. Paro, "Trithorax and Polycomb group-dependent regulation: a tale of opposing activities," *Development*, vol. 142, pp. 2876–2887, 2015.
- [33] A. C. Winters and K. M. Bernt, "MLL-rearranged leukemias— an update on science and clinical approaches," *Frontiers in Pediatrics*, vol. 5, , 2017.
- [34] R. C. Skoda and J. Schwaller, "Dual roles of EZH2 in acute myeloid leukemia," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 216, no. 4, pp. 725–727, 2019.
- [35] F. Basheer, G. Giotopoulos, E. Meduri et al., "Contrasting requirements during disease evolution identify EZH2 as a therapeutic target in AML," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 216, no. 4, pp. 966–981, 2019.

Apoptosis in myelodysplasia: Association with patient age, bone marrow cellularity and karyotypes

Daiane C. de Souza,¹ Adriana C. Camargo,² Eliane F. Rodrigues,¹ Mércia M. Campos,³ Tatiana F. Alvarenga,⁴ Cecília de S. Fernandez,⁵ Elaine S. da Costa,⁶ Teresa de S. Fernandez^{1*}

Abstract

Background: Myelodysplastic syndrome (MDS) comprises a heterogeneous group of clonal hematopoietic stem cell diseases, characterized by dysplasias and apoptosis in bone marrow (BM) and cytopenias in peripheral blood. In this study, we analyzed apoptosis in MDS to verify associations with patient age, bone marrow cellularity and karyotypes and to investigate the role of apoptosis in MDS pathogenesis. **Methods:** Bone marrow cells were collected from 81 patients with primary MDS, of which 60 were adults and 21 children. BM cells were also collected from 10 healthy donors for bone marrow transplants, 5 adults and 5 children, as controls. The patients and controls came from public onco-hematology institutions in Rio de Janeiro. The percentage of apoptotic BM cells was assessed by flow cytometry using two combinations: annexin V-FITC/CD34PE/CD45PerCP and annexin V-FITC/CD14PE/CD45PerCP in BM cells. Cytogenetic analysis was performed by G-banding. **Results:** The comparison between adult and pediatric patients showed that these patients show a similar behavior with regard to apoptotic cells percentages in BM samples. Apoptosis occurs independently of BM cellularity, being more prominent in patients with hyper/normocellular BM. Patients with normal karyotypes, del(5q), del(17p) had higher apoptosis rates than patients with del(11q) and complex karyotypes. Cells committed to a differentiation program were associated with high rates of apoptosis, suggesting that apoptosis may be a consequence of inefficient hematopoiesis, such that the hematopoietic system may eliminate dysplastic cells at the beginning of the disease. **Conclusions:** Our results suggest that apoptosis is an important characteristic of BM cells from adult and pediatric MDS patients and may be a consequence of inefficient hematopoiesis. In addition, we suggest that apoptosis is not the main mechanism associated with hypocellular MDS, and it occurs preferentially in MDS cases of hyper/normocellular BM and is associated with a good prognosis.

Keywords: Myelodysplastic syndrome; Apoptosis; Patient age; Bone marrow cellularity; Karyotypes.

Introduction

Apoptosis or programmed cell death is an essential physiological process that plays a critical role in development and tissue homeostasis. Apoptotic cells

1. Laboratório de Citogenética, Centro de Transplante de Medula Óssea, Instituto Nacional de Câncer (INCA). Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
2. Instituto de Hematologia Arthur Siqueira Cavalcanti (Hemorio). Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
3. Laboratório de Imunologia, Centro de Transplante de Medula Óssea, Instituto Nacional de Câncer (INCA). Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
4. Departamento de Patologia, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
5. Instituto de Matemática e Estatística da Universidade Federal Fluminense (UFF). Niterói, RJ, Brazil.
6. Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Correspondence address:

Centro de Transplante de Medula Óssea, Laboratório de Citogenética
Praça Cruz Vermelha, 23, 6º andar
Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
CEP: 20230-130.
E-mail: teresafernandez@inca.gov.br
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1299-4666>

BJHBS, Rio de Janeiro, 2022;21(1):21-30

DOI: 10.12957/bjhbs.2022.68177

Received on 17/05/2021. Approved on 22/02/2022.

may be characterized by specific morphological and biochemical changes, including cell shrinkage, chromatin condensation and internucleosomal cleavage of genomic DNA.¹ Apoptosis is involved in a wide range of pathological conditions. Cancer is one of the scenarios where little apoptosis occurs. The apoptosis signaling pathway plays an important role in the treatment of cancer because it is a target of many treatment strategies.^{2,3}

Myelodysplasia or myelodysplastic syndrome (MDS) encompasses a group of clonal stem cell disorders characterized by dysplasias and apoptosis in bone marrow (BM), which lead to cytopenias in peripheral blood and a risk of progression to acute myeloid leukemia (AML). Peripheral cytopenias are known hallmark of MDS and they are associated with ineffective hematopoiesis, a condition in which the

Original article

BM is unable to produce and deliver adequate numbers of mature cells to the peripheral blood. Cumulative evidence indicates that this apparent paradox is caused by premature intramedullary cell death via apoptosis.⁴ Some studies consider apoptosis in MDS as a defect that causes cytopenias in the peripheral blood, and apoptosis to be deregulated.^{4,6} However, other studies point to apoptosis as a mechanism whereby the hematopoietic system is able to abrogate defective and/or potentially harmful clones.^{9,10} Apoptosis in MDS remains unclear.¹¹

MDS is viewed as a disease of adults, particularly the elderly. Pediatric MDS is an uncommon disorder, comprising less than 5% of hematopoietic malignancies.^{12,13} In children, MDS appears with distinct clinical and laboratory characteristics when compared with adults, which may reflect specific biological issues related to MDS during childhood.¹⁴ However, studies do not show the frequency of apoptosis in pediatric patients or if this process is similar when compared with BM cells from adult MDS patients. Another important point, focusing on apoptosis, concerns BM cellularity in MDS patients. The BM in primary MDS patients is usually hypercellular or normocellular. Nevertheless, between 10% and 20% of patients can present hypocellular BM.¹⁵⁻¹⁷ Many studies involving apoptosis in MDS have been conducted in patients with hypercellular BM. In hypocellular MDS, it is unclear if apoptosis has some influence in this low cellularity. Goal and colleagues¹⁸ suggested that hypocellularity in MDS could be explained by excessive apoptosis, but they also suggested that there is another sub-group of patients who may have a stem-cell failure defect since they show no evidence of apoptosis.

In primary MDS, independently of cellularity in the BM, the cytogenetic pattern is characterized mainly by partial or total loss of chromosomes.¹⁹ Few studies show an association between apoptosis and karyotypes. The presence of del(5q) and trisomy 8 have been associated with a reduction in the rate of apoptosis in MDS.^{20,21} The aim of this study was to analyze apoptosis in primary MDS in order to verify if there are associations with patient age, bone marrow cellularity and karyotypes and to investigate the role of apoptosis in MDS pathogenesis.

Materials and methods

Patients and controls

Bone marrow cells were collected from 81 patients with primary MDS. These patients included 34

males and 47 females. There were 60 adult patients, with the mean age of 54 years, ranging from 21-86 years, and 21 pediatric patients, with the mean age of 10 years, ranging from 5 months to 18 years. The patients were diagnosed at the following public hematology/oncology centers in Rio de Janeiro, Brazil: Bone Marrow Transplant Center (in Portuguese, Centro de Transplante de Medula Óssea, CEMO-INCA), Hematology Service (in Portuguese, Instituto Nacional do Câncer, INCA), Arthur Siqueira Cavalcanti Hematology Institute (in Portuguese, HEMORIO) and Martagão Gesteira Pediatric and Puericulture Institute (IPPMG). The criteria for inclusion of the patients were the presence of dysplastic cells and the percentage of blasts according to the bone marrow analysis and immunophenotyping. The diagnosis was based on clinical history, morphological, cytochemical studies, immunophenotypic and cytogenetic analyses. None of the patients had been previously treated for a malignancy. The pediatric patients included individuals aged 18 years or less, while adult patients were those aged 19 years or more. The pediatric patients were classified according to Hasle and colleagues.²² Seventeen pediatric patients were classified as having refractory cytopenia (RC) and four as having refractory anemia with excess of blasts (RAEB). The classification of adult patients was in accordance with the French-American British (FAB) Co-operative Group.²³ Forty-six adult patients were classified as having refractory anemia (RA), eleven patients as RAEB and three as RAEB in transformation (RAEB-t). The cellularity of the bone marrow was analyzed by means of biopsy. The age-related normal values of bone marrow cellularity (%) were: infant (1 month to 1 year): 80-90%; child: 60-80%; adult: 40-70%; and ≥70 years: 30-40%.²⁴⁻²⁶ The bone marrow samples from pediatric and adult MDS patients were sent to the Cytogenetic and Immunology Laboratories of CEMO-INCA, at the time of diagnosis. The cytogenetic analyses were conducted at the Cytogenetic Laboratory (CEMO-INCA) and the immunophenotyping and apoptosis experiments were conducted at the Immunology Laboratory (CEMO-INCA). The interpretation and discussion of apoptosis were performed at IPPMG-UF RJ, using the Infinicyt software program (Cytognos, Salamanca, Spain). Bone marrow samples from 10 healthy individuals, donors for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), were used as a control group for apoptosis experiments. The controls included 5 healthy pediatric donors and 5 healthy adult donors. This study was

reviewed and approved by the Ethics Committees of the National Cancer Institute (CEP#3401739), the Arthur Siqueira Cavalcanti Hematology Institute (HEMORIO) (CEP#063/05) and the IPPMG-UFRJ (CEP#08926213.9.0000.5264), and was conducted in conformity with the Declaration of Helsinki.

Apoptosis analysis by flow cytometry

To determine the percentage of apoptotic cells, we used fresh bone marrow cells from MDS patients and healthy individuals. Initially, it was used red blood lysis solution (RBC) for 5 minutes. After centrifugation, the supernatant was withdrawn. The bone marrow cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS). Next, cells were divided into two aliquots (1×10^6) and stained with two different antibody combinations: CD34-PE/CD45-PerCP and CD14-PE/CD45-PerCP (BD Biosciences) for 15 minutes in the dark. In the following step, PBS was added and cells were centrifuged during 5 minutes. Finally, the cells were incubated with annexin-V-FITC and propidium iodide (PI) (Apoptosis Detection Kit II, BD Biosciences) for 20 minutes at room temperature protected from light, according to manufacturer's instructions. A total of 200,000 events were acquired using a FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, USA) and analyzed using the Infinicyt software program (Cytognos, Salamanca, Spain).

Cytogenetic study

Karyotypes of bone marrow cells were obtained from cultures in RPMI 1640, with 20% fetal calf serum (GIBCO) at 37 °C for 24 hours. Cell cultures were pulsed with colcemid to a final concentration of 0.05 µg/mL for the final hour of incubation. Cells were subsequently harvested by standard procedures (hypotonic shock: 0.075M) and fixed in methanol: acetic acid (3:1). GTG banding was performed. Chromosomes were identified and arranged according to the International System for Cytogenetic Nomenclature, 2016.²⁷

Statistical analysis

The associations of the percentage of apoptosis between healthy individuals and MDS patients, patient age (adult and pediatric patients), bone marrow cellularity, disease subtype, cell populations (considering immature cells, CD34⁺, and mature, CD34⁺) and karyotypes were performed using the Mann-Whitney test. Our sample was considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Apoptosis analysis in bone marrow cells of primary MDS patients

The percentage of apoptotic cells in total BM cells from MDS patients (median: 9.9%; range 1.7%-55.4%, 81 patients) was significantly higher than the percentage from healthy BM donors (4.3%; 2.6%-5.7%, 10 individuals), $p < 0.0001$ (Figure 1A). Considering age, rates of apoptosis in BM cells were similar in MDS adults (9.9%; range 1.7%-55.4%) and pediatric patients (9.5%; 2.9%-36%), $p < 0.9$ (Figure 1B). Taking into account MDS BM cellularity, cases with hyper/normocellular BM had increased percentages of apoptotic cells (12.2%, range 1.7% to 55.4%) compared to healthy donors 4.3% (range 2.6%-5.7%), $p < 0.0001$. Interestingly, MDS patients with hypocellular BM also had more apoptotic cells (8.6%; 2.9%-25.8%) than healthy donors, $p < 0.0004$. Our results showed an increased rate of apoptosis in patients with MDS, independently of the cellularity of the BM. Furthermore, MDS patients with hyper/normocellular BM had a higher apoptosis rate than MDS cases with hypocellular BM ($p < 0.01$) (Figure 1C).

Analysis of apoptosis and MDS subtypes

In our sample, of the 81 patients analyzed, 63 patients were classified as RA/RC, 15 as RAEB and 3 as RAEB-t. Analyzing the apoptosis according to each subtype of disease, it was observed that patients in early stages (RA/RC) had significantly higher rates of apoptosis (11.3%; 2.8%-55.4%) than patients in more advanced stages (RAEB and RAEB-t), with a median percentage of apoptosis of 7.2% (range 1.7%-18.9%), $p < 0.006$ (Figure 2A).

In patients in the early stages of the disease (RA/RC), cases with hyper/normocellular BM had a higher median percentage of apoptosis (14.2%; range 2.8%-55.4%) than patients with hypocellular BM (8.6%; range 3.2%-25.8%), ($p < 0.007$) (Figure 2B). In the later stages of the disease (RAEB and RAEB-t), patients with hyper/normocellular BM had a similar median percentage of apoptosis (6.5%; range 1.7%-18.9%) to hypocellular BM cases (7.8% apoptosis, range 2.9%-13.6%), $p < 0.9$ (Figure 2C).

Apoptosis on bone marrow hematopoietic progenitor cells (CD34⁺ cells) and bone marrow cells committed to differentiate lineages (CD34⁺ cells)

An apoptosis analysis was performed on different cell populations to determine whether the pluripotent

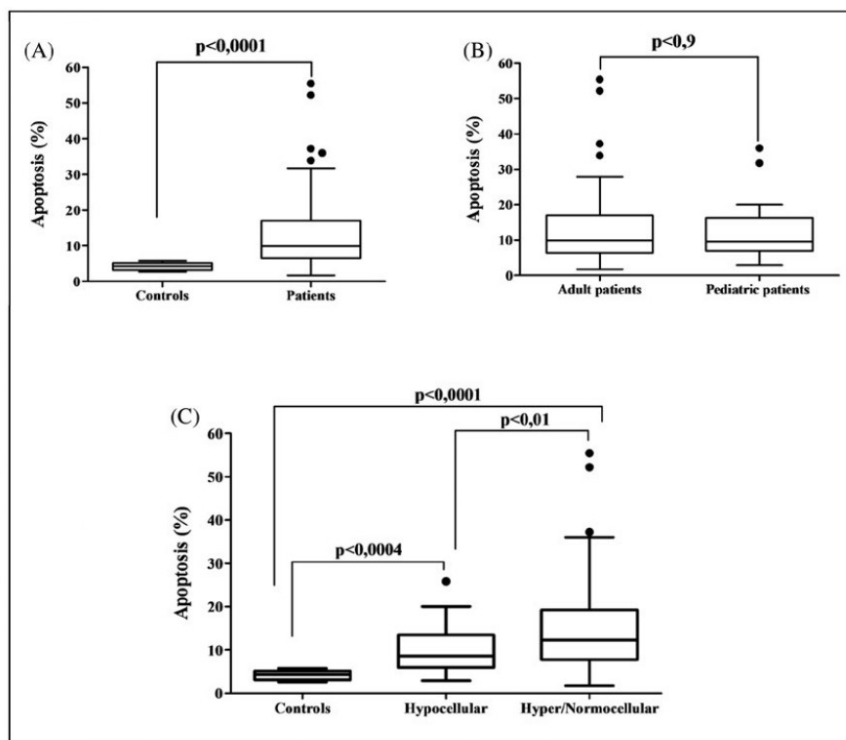


Figure 1. (A) Percentage of apoptotic cells: controls versus MDS patients; (B) Percentage of apoptotic cells: adults MDS patients versus pediatric MDS patients. (C) Percentage of apoptotic cells: controls versus hypocellular BM, controls versus hyper/normocellular BM, hypocellular BM versus hyper/normocellular BM. The results are shown in box-plot graphics in linear scale, showing the median, range, and the dots represent outliers

Source: The authors (2022).

stem cells (CD34⁺ cells) or the cells already committed to differentiation were in apoptosis. This analysis showed that apoptosis occurs in CD34⁺ cells. However, the percentage of apoptosis is higher in cells already involved in a cell differentiation program. This can be seen in the healthy individuals and patients, independent of BM cellularity. We observed that more mature cells had a median percentage value of apoptosis equal to 9.6% (range 1.7%-53.6%), while progenitor cells (CD34⁺) showed a median percentage of apoptosis equal to 0.14% (range 0%-1.9%). Thus, the cells already committed to the program of cell differentiation had a higher percentage of apoptosis ($p < 0.0001$) (Figure 3).

We used flow cytometry to analyze the percentage of apoptosis in specific hematopoietic cell populations according to the cellularity of bone marrow. We observed that lymphocytes are the cells with the lowest percentage of apoptosis compared with other hematopoietic cell populations, with median percentage value of apoptosis equal to 5.47% (range 0.37%-50.03%) in cases of hypocellular BM and 10.7% (range 0%-46.96%) in hyper/normocellular BM. Nucleated red blood cells (NRBC), granulocytic and monocytic cells showed higher apoptosis rates compared with both CD34⁺ cells and lymphocytes. NRBC showed a median percentage value of apoptosis

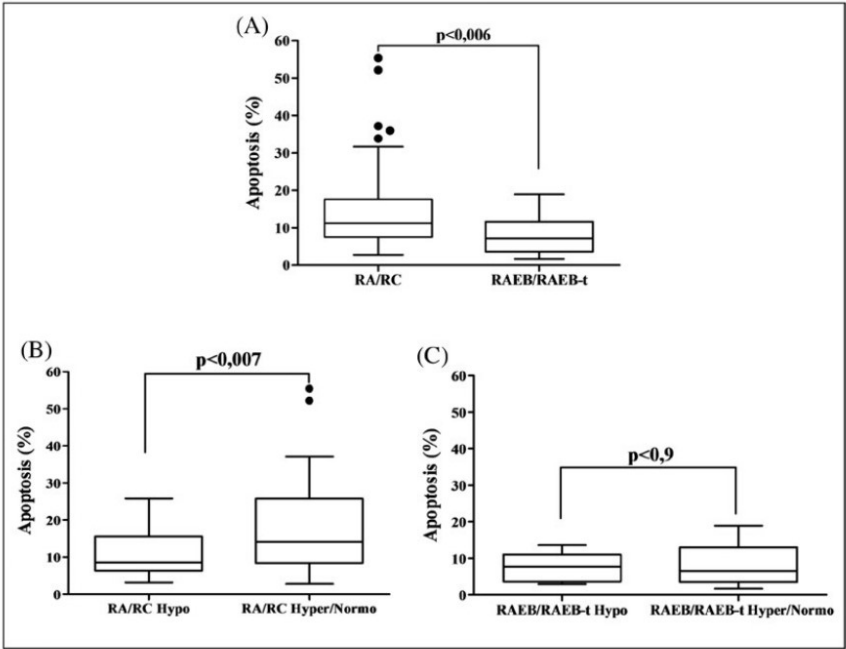


Figure 2. Analysis of apoptosis in bone marrow cells in different MDS subtypes. (A) Percentage of apoptosis: early stages (RA/RC) versus advanced stages (RAEB and RAEB-t). (B) Percentage of apoptosis: RA/RC Hypocellular BM versus RA/RC hyper/normocellular BM. (C) Percentage of apoptosis RAEB/RAEB-t Hypocellular BM versus RAEB/RAEB-t hyper/normocellular BM. The results are shown in box-plot graphics in linear scale, showing the median, range, and the dots represent outliers

Source: The authors (2022).

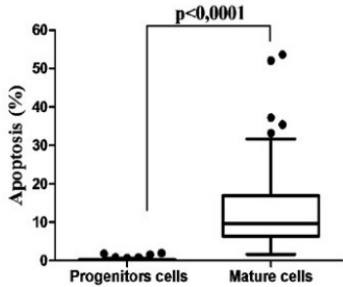


Figure 3. Percentage of apoptosis in progenitor cells versus mature cells from MDS patients. The results are shown in box-plot graphic in linear scale, showing the median, range, and the dots represent outliers

Source: The authors (2022).

of 43.1% (range 2.26%-87.17%) in hypocellular BM and 28.6% (range 0-91%) in hyper/normocellular BM. The granulocyte population had a median percentage value of apoptosis of 8.24% (range 3%-71.8%) in hypocellular BM and a median percentage value of apoptosis 12% (range 1.45%-90.71%) in hyper/normocellular BM. Monocytic populations showed a median percentage value of apoptosis of 24% (range 2%-100%) and 50.33% (range 1.78%-95.9%) in hypocellular and hyper/normocellular BM, respectively (Figure 4).

Comparison of the percentage of apoptotic bone marrow cells according to karyotypes

The analysis of the percentage of apoptosis and the karyotypes showed: the median percentage of apoptosis in normal karyotypes (n=34) was 9.1% (range 1.7%-55.4%); the median percentage of apoptosis in del(5q) (n=5) was 16.9% (range 2%-19.3%); in the case of patients with del(11q) (n=4) the median percentage of apoptosis was 6.4% (range 3.2%-8.2%); the del(17p) (n=8) had a median percentage of apoptosis of 12% (range 2.9%-15.6%) and patients with complex karyotypes (n=3) presented a median percentage of apoptosis of 3.7% (range 2.8%-4.9%). Patients with normal karyotypes, del(5q) and del(17p), presented higher apoptosis rates. Patients with del(11q) and complex karyotypes showed a decrease in apoptosis (Figure 5). The comparison of apoptosis in these two karyotype groups was statistically significant, $p < 0.004$.

Discussion

Apoptosis has been presented as part of primary MDS pathogenesis.²⁸⁻³⁰ Although many studies focus on MDS apoptosis, a review of the literature showed that little is known about apoptosis in pediatric primary MDS and about the difference in apoptosis between pediatric and adult patients.^{9,28,31,32} In our study, we initially compared the presence of apoptosis in patients with primary MDS versus healthy individuals, which showed an increase of apoptosis in MDS patients. Then, we compared apoptosis rates in BM samples from adult and pediatric MDS patients, which were found to be similar, suggesting that MDS-related apoptosis is a process that is independent of the age. In relation to the apoptosis rate according to the BM cellularity in MDS patients, we observed a higher apoptosis in hyper/normocellular BM cases. Our results suggest that, despite having an increased percentage of apoptosis when compared to healthy individuals, the

hypocellular BM of some MDS patients is probably not caused solely by apoptosis, and that other factors may be associated, such as, for example, alterations in the cell proliferation program of hematopoietic stem cells, in which the presence of a molecular alteration could induce silencing or decrease of the expression in one or more genes related to the cell proliferation program. The cause of hypocellular MDS is not completely understood. Serio and colleagues³³ reported that hypocellular MDS patients showed a severe deficit of immature hematopoietic progenitor cells, measured as secondary colony-forming cells (CFC), compared to healthy individuals, which would imply that immature hematopoietic stem cell compartment is affected by disease processes in hypocellular MDS. The damage to marrow hematopoietic progenitors occurring in hypocellular MDS may be explained by different immune-mediated mechanisms. Clinically, the strongest evidence for immune-mediated hematopoietic suppression in some hypocellular MDS is the response to immunosuppression, including mainly cyclosporine and anti-thymocyte globulin.

The high incidence of apoptosis is a remarkable feature observed in early stage of the MDS, while a decrease in apoptosis is observed in more advanced subtypes.^{7,29} In our study, patients with RA/RC, independently of BM cellularity, showed a higher percentage of apoptosis when compared with patients with RAEB/RAEB-t. Some studies attributed the decrease in apoptosis rates of patients in advanced stages to increased levels of BCL2 protein and other anti-apoptotic proteins.^{27,28} Increased expression of BCL2 protein has also been associated with increased resistance to apoptosis and leukemic transformation, and therefore a poor prognosis.³²

The literature contains discussions on which cells would be entering in the apoptosis program, whether the progenitor cells or cells already committed to a cell differentiation program.^{7,29} In our study, we observed a significant difference between apoptosis in cells already committed to a cell differentiation program and progenitor cells. Our results suggest that apoptosis is more intense in cells already committed to a cell differentiation program, maybe as an attempt of patients' own BM to remove dysplastic cells at beginning of the disease, as cited by Corey and colleagues.⁷ According to Raza and colleagues²² the immature CD34⁺ cells are stimulated to proliferate, while their later differentiated daughters are induced to undergo apoptosis accounting for the clinical syndrome of pancytopenia.

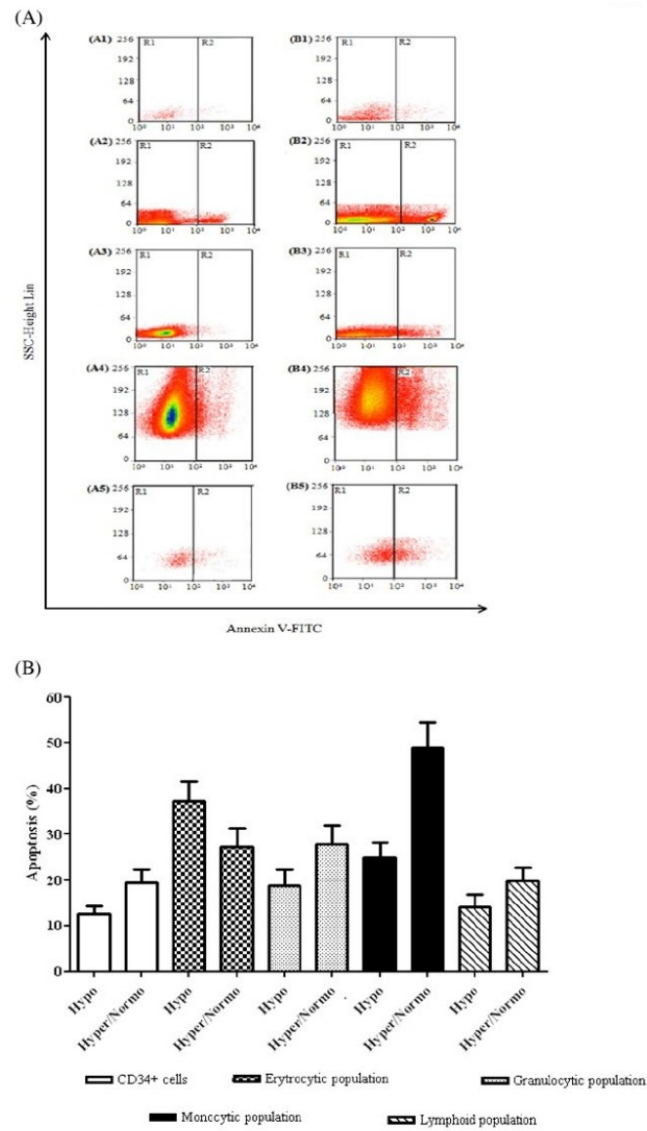


Figure 4. (A) Apoptosis analysis in specific hematopoietic cell populations in MDS patients by flow cytometry. In column A, sample of hypocellular BM MDS and in column B, sample of hypercellular BM MDS. Apoptotic cells are in gate R2. A1 and B1 are CD34⁺ cells; A2 and B2 erythrocytic population; A3 and B3 lymphoid population; A4 and B4 granulocytic population; A5 and B5 monocytic population. (B) Comparison of apoptosis between specific hematopoietic cell populations in BM of hypocellular and hyper/normocellular MDS patients

Source: The authors (2022).

Original article

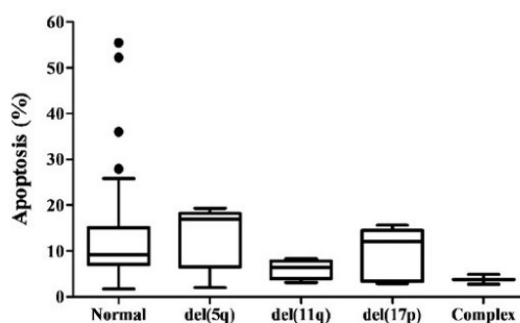


Figure 5. Association between the percentage of apoptosis and the karyotype in MDS patients. The results are shown in box-plot graphic in linear scale, showing the median, range, and the dots represent outliers

Source: The authors (2022).

Few studies have been conducted to try to identify an association between apoptosis and karyotypes of MDS patients. Washington and colleagues²⁰ and Sloan and colleagues²¹ associated the presence of del(5q) and trisomy 8 with a reduction in the rate of apoptosis in MDS. In our study, MDS patients with normal karyotypes, del(5q) and del(17p) had significantly higher apoptosis rates than MDS cases with del(11q) and complex karyotypes.

An intriguing question related to apoptosis in MDS is a possible association with the paradox of the disease (BM usually hypercellular with peripheral blood cytopenias), in which apoptosis was the cause of ineffective hematopoiesis^{8,34,35} or apoptosis would be related to the paradigm of the disease, where the presence of dysplasias (failure of maturation of hematopoietic cells) would lead to apoptosis as a physiological process, where the hematopoietic system would be trying to eliminate clones with dysplastic defects in early stages of the disease.^{10,36,37} Thus, in this latter case, defects in differentiation or in maturation would be the cause of ineffective hematopoiesis, not apoptosis. Our results suggest that apoptosis may be a consequence of inefficient hematopoiesis. Therefore, apoptosis in primary MDS is related to the disease paradigm. In addition, we suggest that apoptosis is not the main mechanism associated with hypocellular MDS, and occurs preferentially in primary MDS cases of hyper/normocellular that are associated with a good

prognosis. To our knowledge, this is the first study analyzing the percentage of apoptosis in BM of patients with primary MDS and their associations with patient age, BM cellularity and different karyotypic patterns.

Conclusions

The BM cells committed to differentiate (CD34⁺ cells) had a higher percentage of apoptosis than BM hematopoietic progenitor cells (CD34⁺ cells). Patients with normal karyotypes, del(5q) and del(17p) had higher apoptosis rates in comparison to patients with del(11q) and complex karyotypes. Apoptosis is an important characteristic of BM cells in adult and pediatric MDS patients, where the hematopoietic system would be trying to eliminate cells with dysplastic defects in the early stage of the disease.

Potential conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Brazilian Ministry of Health (National Institute of Cancer, INCA, Brazil). The authors thank the pathologist, Dr. Cristiane Milito, from UFRJ, for her contribution to the revision of the MDS diagnosis.

References

- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001;92:57-70. doi: 10.1016/s0163-7258(01)00159-0
- Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:1-14. doi: 10.1186/1756-9966-30-87
- Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int J Mol Sci*. 2015;16:2942-55. doi: 10.3390/ijms16022942
- Yoshida Y. A new look at apoptosis in MDS; an uneasy neighbor. *Leuk Res* 2007; 31:1617-19. doi: 10.1016/j.leukres.2007.06.003
- Invernizzi R. The role of apoptosis in myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2002;87:337-339.
- Candelaria M, Dueñas-Gonzalez A. Therapy-related myelodysplastic syndrome. *Expert Opin Drug Saf*. 2015;12:1-11. doi: 10.1517/14740338.2015.1014340
- Corey SJ, Minden MD, Barber DL, et al. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:118-29. doi: 10.1038/nrc2047
- Boudard D, Vasselon C, Berthéas MF, et al. Expression and prognostic significance of Bcl-2 family proteins in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*. 2002;70:115-25. doi: 10.1002/ajh.10108
- Parker JE, Mufti GJ, Rasool F, et al. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood*. 2000;96:3932-3938. doi: 10.1182/blood.V96.12.3932
- List AF. New approaches to the treatment of myelodysplasia. *Oncologist*. 2002;7(Suppl 1):39-49. doi: 10.1634/theoncologist.7-suppl_1-39
- Pleyer L, Valent P, Greil R. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in normal and dysplastic hematopoiesis-masters of survival and clonality? *Int J Mol Sci*. 2016;17(7):1009. doi: 10.3390/ijms17071009
- Niemeyer CM, Baumann I. Myelodysplastic Syndrome in Children and Adolescents. *Semin Hematol*. 2008;45:60-70. doi: 10.1053/j.seminhematol.2007.10.006
- Elghetany MT. Myelodysplastic Syndromes in Children: A Critical Review of Issues in the Diagnosis and Classification of 887 Cases from 13 Published Series. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:1110-1116. doi: 10.5858/2007-131-1110-MSICAC
- Polychronopoulou S, Panagiotou JP, Kossiva L, et al. Clinical and morphological features of paediatric myelodysplastic syndromes: a review of 34 cases. *Acta Paediatr*. 2004;93:1015-1023. doi: 10.1111/j.1651-2227.2004.tb02708.x
- Tuzuner N, Cox C, Rowe JM, et al. Hypocellular myelodysplastic syndromes (MDS): new proposals. *Br J Haematol*. 1995;91:612-617. doi: 10.1111/j.1365-2141.1995.tb05356.x
- Tomonaga M, Nagai K. Hypocellular Myelodysplastic Syndromes and Hypocellular Acute Myeloid Leukemia: Relationship to Aplastic Anemia. In: *The Myelodysplastic Syndromes: Pathobiology and Clinical management*, USA: Marcel Dekker Inc;2002. p.121-138
- Yue G, Hao S, Fadare O, et al. Hypocellularity in myelodysplastic syndrome is an independent factor which predicts a favorable outcome. *Leuk Res*. 2008;32:553-58. doi: 10.1016/j.leukres.2007.08.006
- Goyal R, Qawi H, Ali I, et al. Biologic characteristics of patients with hypocellular myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 1999;23:357-364. doi: 10.1016/s0145-2126(98)00187-8
- de Souza DC, Fernandez CS, Camargo A, et al. Cytogenetic as an important tool for diagnosis and prognosis for patients syndrome. *Biomed Res Int*. 2014;2014:542395. doi: 10.1155/2014/542395
- Washington LT, Jilani I, Estey E, et al. Less apoptosis in patients with 5q-syndrome than in patients with refractory anemia. *Leuk Res*. 2002;26: 899-902. doi: 10.1016/s0145-2126(02)00039-5
- Sloand EM, Pfannes L, Chen G, et al. CD34 cells from patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome (MDS) express early apoptotic markers but avoid programmed cell death by up-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood*. 2007;109:2399-2405. doi: 10.1182/blood-2006-01-030643
- Hasle H, Niemeyer CM, Chessels JM, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia*. 2003;17:277-282. doi: 10.1038/sj.leu.2402765
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the Classification of the Myelodysplastic Syndrome. *Br J Haematol*. 1982;51:189-199. doi: 10.1111/j.1365-2141.1982.tb02771.x
- Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005;90:1128-32.
- Proytcheva M. Bone marrow evaluation for pediatric patients. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2013;35: 283-289. doi: 10.1111/ijlh.12073
- Foucar K. *Bone Marrow Pathology*. 2nd ed. ASCP Press, Chicago. 2001
- McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M, editors. *ISCN 2016: an international system for human cytogenetic nomenclature*. Basel: Karger; 2016.
- Raza A, Mundle S, Shetty V, et al. Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. *Int J Hematol*. 1996;63:265-278. doi: 10.1016/0925-5710(96)00455-0
- Ogata K. Myelodysplastic syndromes: recent progress in diagnosis and understanding of their pathophysiology. *J Nippon Med Sch*. 2006;73:300-307. doi: 10.1272/jnms.73.300
- Tormo M, Marugán I, & Calabuig M. Myelodysplastic syndromes: an update on molecular pathology. *Clin Transl Oncol*. 2010;12:652-661. doi: 10.1007/s12094-010-0574-9
- Davis RE, Greenberg PL. Bcl-2 expression by myeloid precursors in myelodysplastic syndromes: relation to disease progression. *Leuk Res*. 1998;22:767-777. doi: 10.1016/s0145-2126(98)00051-4
- Raza A, Galili N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:849-59. doi: 10.1038/nrc3321
- Serio B, Risitano AM, Giudice V, et al. Immunological Derangement in Hypocellular Myelodysplastic Syndromes. *Transl Med UniSa*. 2014;8:31-42.
- Parcharidou A, Raza A, Economopoulos T, et al. Extensive apoptosis of bone marrow cells as evaluated by the in situ end-labelling (ISEL) technique may be the basis for ineffective haematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 1999;62:19-26. doi: 10.1111/j.1600-0609.1999.tb01109.x
- Boudard D, Sordet O, Vasselon C, et al. Expression and activity of caspases 1 and 3 in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2000;14:2045-2051. doi: 10.1038/sj.leu.2401959

Original article

36. Yoshida Y, Anzai N, Kawabata H. Apoptosis in myelodysplasia: a paradox or paradigm. *Leuk Res.* 1995;19: 887-891. doi: 10.1016/0145-2126(95)00100-x
37. Parker JE, Fishlock KL, Mijovic A, et al. "Low-risk" myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ratio of pro-versus anti-apoptotic bcl-2-related proteins. *Br J Haematol.* 1998;103:1075-82. doi: 10.1046/j.1365-2141.1998.01114.x

ANEXO A - Carta do Comitê de Ética do HUPE



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Rio de Janeiro, 12 de março de 2008

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof^a. Patrícia Maria C. O. Duque
Para: Aut. Tatiana Fonseca Alvarenga
Orient. Prof^a. Maria Helena F. O. de Souza

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (2001-CEP/HUPE) "ANÁLISE MORFOLÓGICA E CITOGENÉTICA DE MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA PRIMÁRIA" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º 196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.


Prof^a. Patrícia Maria C. O. Duque
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B - Carta do Comitê de Ética do INCA



A(o): Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas
Pesquisador(a) Principal

Rio de Janeiro, 3 de maio de 2011.

Registro CEP nº 62/10 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)

Título do Estudo: Estudo das Alterações Citogenéticas e Moleculares em Pacientes Adultos e Pediátricos com Síndrome Mielodisplásica Primária no Estado do Rio de Janeiro: Investigação de Biomarcadores de Diagnóstico e de Prognóstico

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo a composição do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer que analisou e aprovou o estudo acima especificado.

Adriana Scheliga
Alessandra Oliveira Marins
Ana Lúcia Amaral Eisenberg
Ana Valéria Paranhos Miceli
André Marcelo Machado Soares
Carlos Henrique D Silva
Célia Helena Fernandes Costa
Cláudio Gustavo Stefanoff
Cristiano Guedes Duque
Danielle Nogueira Ramos
Eliana Teixeira Maranhão
Héliton Spindola Antunes
Ivan da Costa Marques
Maria de Fátima Batalha de Menezes
Michele Quarti
Paulo Alexandre Mora
Rosane Vianna Jorge
Urquilei dos Santos Pinheiro
Walter Esteves Piñeiro
Wilza Barbosa Felipe

Médica Oncologista Clínica HC I – Coordenadora
Enfermeira do Serv. de Pesq. Clínica - CGTC
Médica Patologista – DIPAT
Psicóloga do Serviço de Psicologia - HC I
Teólogo / Filósofo Extra INCA
Médico HC IV – Coordenador Substituto
Enfermeira da Oncologia – HC I
Coordenador do Laboratório do BNT - CGTC
Médico Oncologista - HCI
Doutora em Epidemiologia e Bioestatística - CONPREV
Fisioterapeuta do Serviço de Fisioterapia – HC I
Dentista do Serviço de Pesquisa Clínica - CGTC
Matemático Extra INCA
Enfermeira da Divisão de Enfermagem – HC I
Enfermeira - Extra INCA
Médico Oncologista - HCII
Doutora em Química Biológica da Divisão de Farmacologia - CGTC
Representante de Usuários – CES/RJ
Advogado Extra INCA
Enfermeira da Comissão de Infecção Hospitalar - HC III

Atenciosamente,

Dr. Carlos Henrique D. Silva
Coordenador Substituto do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA