



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

2018

**ANA RITA DE  
CADIMA REIS**

**Alterações genéticas em células isoladas na  
Síndrome Mielodisplásica**

## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**ANA RITA DE  
CADIMA REIS**

**Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome  
Mielodisplásica**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Augusto Paiva, Coordenador da Unidade de Gestão Operacional de Citometria do Serviço de Patologia Clínica – CHUC, Equiparado a Prof. Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e coorientação científica da Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio e amor incondicional.

## **o júri**

presidente

Prof. Doutor Mário Guilherme Garcês Pacheco professor auxiliar com agregação,  
Universidade de Aveiro

Doutora Emília Nobre Barata Roxo Cortesão, Assistente, Centro Hospitalar e  
Universitário de Coimbra

Doutor Artur Augusto Paiva, Coordenador da Unidade de Gestão Operacional, Centro  
Hospitalar e Universitário de Coimbra

## agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração e encorajamento de algumas pessoas, que merecem o meu sincero agradecimento.

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador, Doutor Artur Paiva, pelos ensinamentos transmitidos, orientação prestada, disponibilidade e paciência transmitida ao longo de todo o percurso.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, a minha coorientadora agradeço todo o apoio e incentivo prestado, à amizade e carinho transmitido ao longo dos anos e ajuda constante na leitura crítica da dissertação.

Ao Drº Fernando Rodrigues, Diretor do Serviço de Patologia Clínica dos CHUC por me ter deixado realizar este trabalho no laboratório.

À Drª Marta Pereira e Drº Gilberto Marques, especialistas de Hematologia e Patologia Clínica, respetivamente, agradeço todo o companheirismo e permanente disponibilidade em ensinar e ajudar.

À Drª Carmen Sierra, pela total disponibilidade na colaboração do tratamento estatístico dos resultados.

À Carolina Ribeiro, uma amiga que sempre me ouviu, ajudou e que nunca me deixou desistir.

Aos meus pais, por acreditarem sempre em mim e nunca me deixarem desistir dos meus objetivos, pela compreensão, pela cumplicidade, pelo amor e presença.

À minha família pelo apoio incondicional mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu gato “Xuco Daniel”, pelo carinho e companheirismo nas inúmeras horas solitárias.

Aos meus amigos, por todo o carinho, encorajamento e amizade.

Aos meus colegas do Laboratório de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica dos CHUC, por estarem sempre disponíveis permitindo a realização deste trabalho.

A todos o meu sincero OBRIGADA!

*“(…) Eles não sabem, nem sonham,  
que o sonho comanda a vida,  
que sempre que um homem sonha  
o mundo pula e avança  
como bola colorida  
entre as mãos de uma criança.”*

António Gedeão

## palavras-chave

Síndrome Mielodisplásica; citogenética; FACS; FISH; alterações genéticas; células isoladas.

## resumo

**Introdução:** A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é um grupo heterogêneo de neoplasias clonais da medula óssea. Embora extremamente complexa, a sua fisiopatologia envolve inúmeros mecanismos genéticos, epigenéticos e mediados pelo sistema imune que levam a uma falha no equilíbrio normal entre a proliferação celular, diferenciação celular e apoptose. É caracterizada por uma hematopoiese ineficaz com alterações na proliferação e diferenciação mieloide das células estaminais hematopoiéticas. Manifesta-se por uma displasia morfológica nas células de diferentes linhas hematopoiéticas, por uma medula óssea normalmente hiper celular e por citopenias periféricas de gravidade variável e que podem progredir para uma leucemia mieloide aguda. As anomalias citogenéticas estão presentes em cerca de 50% dos casos de SMD primária, que incluem: a deleção do braço longo do cromossoma 5 (5q<sup>-</sup>), deleção do braço longo do cromossoma 7 e monossomia do 7 (-7/7q<sup>-</sup>), trissomia do 8, deleção do braço longo do cromossoma 20 (20q<sup>-</sup>) e ausência do cromossoma Y(-Y).

**Objetivos:** Avaliar a presença das alterações cromossômicas acima descritas nas células CD34<sup>+</sup> (blastos) purificadas, bem como, nos eritroblastos, células de linha a neutrófilo e monocítica, permitindo perceber melhor o tamanho do clone SMD em cada linha e se este se relacionava com a maior ou menor severidade das citopenias; se uma maior percentagem de células com uma alteração genética ocorria nos subtipos mais graves de SMD (EB1 e EB2) e qual/quais as alterações genéticas que afetavam uma maior percentagem de células. Devido à maior sensibilidade desta estratégia, foi também um objetivo desta tese, identificar quais as alterações genéticas primárias e secundárias em casos com um cariótipo complexo.

**Metodologia:** O grupo de estudo foi constituído por amostras de medula óssea de 30 doentes com diagnóstico de SMD e com pelo menos uma das alterações genéticas acima mencionadas, dos 203 casos estudados e com suspeita de SMD. Pesquisou-se a existência de alterações genéticas por hibridização *in situ*, por fluorescência (FISH) em diferentes populações celulares purificadas (células CD34<sup>+</sup>, eritroblastos, monócitos e neutrófilos) por FACS.

**Resultados:** Nos 203 casos com suspeita de SMD, 30 (15%) dos casos apresentavam pelo menos uma alteração cromossômica. Observou-se uma maior percentagem de células CD34<sup>+</sup> e de células das diferentes linhas hematopoiéticas estudadas onde se observou a presença de uma determinada alteração genética no subgrupo SMD-EB2. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, apenas 5 dos 30 casos analisados apresentavam mais do que uma alteração genética. Nestes, e com base na percentagem de células afetadas, os resultados sugerem que a 5q<sup>-</sup>, 7q<sup>-</sup> e -Y parecem corresponder a alterações genéticas primárias e a 20q<sup>-</sup> e +8 a secundárias. Neste estudo não se observou qualquer relação entre a percentagem de células afetadas (com uma alteração genética) de uma determinada linha e o grau da citopenia.

**Conclusão:** Demonstrou-se a importância da realização do estudo das alterações genéticas por FISH principalmente em células CD34<sup>+</sup> purificadas, permitindo obter uma maior sensibilidade na deteção dessas mesmas alterações genéticas, ter uma ideia do tamanho do clone SMD nessas células e da hematopoiese displásica e, por outro lado, perceber quais foram as alterações genéticas primária e secundárias em casos de cariótipo complexo.

## keywords

Myelodysplastic Syndrome; cytogenetic; FACS; FISH; Genetic alterations; isolated cells

## abstract

**Introduction:** Myelodysplastic Syndrome (MDS) is a heterogeneous group of clonal neoplasms of the bone marrow. Although extremely complex, the pathophysiology involves numerous genetic mechanisms, epigenetic and mediated by the immune system that lead to a failure in the normal balance between cell proliferation, cell differentiation and apoptosis. It is characterized by ineffective hematopoiesis with changes in myeloid proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells. It is manifested by a morphological dysplasia in cells of different hematopoietic lineages, by a hypercellular bone marrow and by peripheral cytopenias of varying severity and which may transform into acute myeloid leukemia. Cytogenetic abnormalities are present in about 50% of primary MDS cases including: deletion of the long arm of chromosome 5 (5q-), deletion of the long arm of chromosome 7 and monosomy of 7 (-7 \ 7q-), trisomy 8, deletion of the long arm of chromosome 20 (20q-) and absence of the Y chromosome (-Y).

**Aims:** To evaluate the presence of the chromosomal abnormalities described above in the purified CD34 + cells (blasts), as well as in the erythroblasts, neutrophil and monocytic cells allowing a better understanding of the size of the SMD clone in each lineage and its relation to the it was related to the degree of cytopenias; if a higher percentage of cells with genetic changes occurred in the more severe subtypes of MDS (EB1 and EB2) and which genetic abnormalities affect a higher percentage of cells. Due to the greater sensitivity of this strategy, it was also a goal of this thesis, to identify the primary and secondary genetic alterations in cases with a complex karyotype.

**Methodology:** The study group consisted of bone marrow samples from 30 patients diagnosed with MDS and at least one of the aforementioned genetic alterations from the 203 cases studied and with suspected MDS. We investigated the existence of genetic alterations by fluorescence in situ hybridization (FISH) in different purified cell populations (CD34 + cells, erythroblasts, monocytes and neutrophils) by FACS.

**Results:** In 203 cases with suspected MDS, 30 (15%) of the cases had at least one chromosomal abnormality. A higher percentage of CD34 + cells and cells of the different hematopoietic lines studied were observed when the presence of a certain genetic alteration in the subgroup SMD-EB2 was observed. According to the results obtained, only 5 of the 30 cases analyzed presented more than one genetic alteration. In these, and based on the percentage of affected cells, the results suggest that 5q-, 7q- and -Y appear to correspond to primary and 20q- and +8 to secondary genetic alterations. In this study, no relationship was observed between the percentage of affected cells (with a genetic alteration) of a given line and the degree of cytopenia.

**Conclusion:** Our results show, on one hand, the importance of investigating genetic alterations by FISH in purified CD34 + cells, allowing a greater sensitivity in the detection of these genetic alterations, evaluating the size of the SMD clone in these cells and the dysplastic hematopoiesis and, on the other hand, to analyze which the primary and secondary genetic alterations were found in cases of complex karyotype.



## ÍNDICE

Lista de Figuras .....	11
Lista de Tabelas .....	12
Lista de Abreviaturas .....	13
1. Síndrome Mielodisplásica .....	15
1.1. Epidemiologia e Etiologia .....	15
1.2. Fisiopatologia da Síndrome Mielodisplásica .....	16
1.3. Características Clínicas e Laboratoriais .....	17
1.4. Alterações genéticas na Síndrome Mielodisplásica .....	18
1.5. Alterações citogenéticas na Síndrome Mielodisplásica .....	20
1.5.1. Deleção do braço longo do cromossoma 5 .....	22
1.5.2. Deleção do braço longo do Cromossoma 7 ou Monossomia do 7 (7q <sup>-</sup> /-7) .....	23
1.5.3. Deleção do braço longo do cromossoma 20 (20q <sup>-</sup> ) .....	24
1.5.4. Trissomia do 8 (+8) .....	24
1.5.5. Perda do Cromossoma Y (-Y) .....	25
1.6. Nova classificação segundo a OMS 2016 .....	25
1.6.1. SMD com displasia unilinha .....	27
1.6.2. SMD com displasia multilinha .....	27
1.6.3. SMD com sideroblastos em anel (SMD-RS) .....	27
1.6.4. SMD com excesso de blastos (SMD-EB) .....	28
1.6.5. SMD com deleção 5q isolada .....	29
1.6.6. SMD inclassificáveis .....	29
1.7. Prognóstico e tratamento .....	29
2. Objetivos .....	32
3. Material e Métodos .....	33
3.1. Caracterização da amostra e parâmetros analíticos essenciais ao processo de seleção .....	33
3.2. Separação das diferentes populações celulares da medula óssea .....	34
3.3. Hibridização <i>In Situ</i> por fluorescência das amostras isoladas .....	34
3.4. Análise estatística dos resultados .....	36

4. Resultados .....	37
5. Discussão .....	47
6. Conclusões e perspectivas futuras .....	52
7. Referências Bibliográficas .....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Potenciais mecanismos celulares envolvidos na fisiopatologia das SMD (adaptado de Cortesão, 2015) .....	16
<b>Figura 2:</b> Caracterização da população estudada relativamente ao sexo e idade .....	33
<b>Figura 3:</b> Classificação da população de doentes de acordo com a OMS (2016) .....	38
<b>Figura 4:</b> Frequência das alterações genéticas por FISH nas células CD34+ purificadas da medula óssea nos subgrupos de SMD .....	38
<b>Figura 5:</b> Imagens de FISH com um exemplo da normalidade e anormalidade encontrada (A- FISH em células de interfase normais com a sonda <i>CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe Kit</i> ; B- FISH em células de interfase com alteração genética de +8; C- FISH em células de interfase normais com a sonda <i>Vysis LSI EGRI/D5S23: D5S721, Vysis D7S486/Cep 7</i> e com alteração genética de 5q- e 7q-; D-FISH em células de interfase normais com a sonda <i>Vysis D20S108</i> ; E- FISH em células de interfase e com alteração genética de 20q-; F- FISH em células de interfase normal e com alteração genética da perda do cromossoma Y) .....	43
<b>Figura 6:</b> Número de casos com 1, 2, 3 e 4 alterações genéticas em cada um dos subgrupos estudados .....	44
<b>Figura 7:</b> % de células com uma determinada alteração genética em cada população separada, bem como, de acordo com o subtipo de SMD .....	45
<b>Figura 8:</b> Correlação entre valor de uma determinada citopenias e a percentagem de células com uma determinada alteração genética nessa mesma linha, ou nos blastos .....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Caraterísticas displásicas segundo a OMS* .....	18
<b>Tabela 2:</b> Mutações genéticas comuns nas SMD (encontradas em pelo menos 5% dos casos) .....	20
<b>Tabela 3:</b> Alterações cromossômicas recorrentes na SMD no momento do diagnóstico* .....	22
<b>Tabela 4:</b> Classificação das SMD (OMS-2016)* .....	26
<b>Tabela 5:</b> Índice de prognóstico internacional revisto (IPSS-R) para as SMD* .....	30
<b>Tabela 6:</b> Prognóstico das anomalias cromossômicas e taxa de sobrevivência e transformação para LMA dos doentes com SMD primária* .....	30
<b>Tabela 7:</b> Padrões de hibridização e sua representação esquematizada .....	36
<b>Tabela 8:</b> Frequência das alterações genéticas por FISH nas células CD34+ purificadas da medula óssea .....	37
<b>Tabela 9:</b> Casos classificados como <b>SMD 5q- isolada</b> . % de células que apresentavam a alteração genética 5q- .....	39
<b>Tabela 10:</b> Casos classificados como <b>SMD U/M</b> . % de células que apresentavam uma determinada alteração genética .....	40
<b>Tabela 11:</b> Casos classificados como <b>SMD-EB-1</b> . % de células que apresentavam uma determinada alteração genética .....	41
<b>Tabela 12:</b> Casos classificados como <b>SMD-EB-2</b> . % de células que apresentavam uma determinada alteração genética .....	42
<b>Tabela 13:</b> Casos com a presença de mais do que uma alteração genética nas células CD34+ purificadas .....	44

## LISTA DE ABERVIATURAS E SÍMBOLOS

-5	Monossomia do 5
-7	Monossomia do 7
-Y	Ausência do Y
+8	Trissomia do 8
20q-	Deleção do braço longo do cromossoma 20
5q-	Deleção do braço longo do cromossoma 5
7q-	Deleção do braço longo do cromossoma 7
BD	<i>Becton Dickinson</i>
CGH	Hibridização genómica comparativa
CHUC	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
del	Deleção
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Hg	Hemoglobina
Ins	Inserção
iso	Isocromossoma
Inv	Inversão
IPSS	Índice de prognóstico internacional
IPSS-R	Índice de prognóstico internacional revisto
LDH	Lactato desidrogenase
LMA	Leucemia mieloide aguda
mAb	Anticorpos monoclonais
MO	Medula Óssea
mRNA	Ácido ribonucleico mitocondrial
Neg	Negativo
Neu (Va)	Neutrófilos (Valor absoluto)
NP	Nonidet p-40
OMS	Organização mundial de saúde

p	Braço curto do cromossoma
q	Braço longo do cromossoma
PAS +	Ácido periódico de <i>Schiff</i> positivo
PC	Ficoeritrina cianina
PE	Ficoeritrina
PerCP-Cy5.5	Peridina Clorofila proteína-Cianina 5.5
Pla	Plaquetas
PO	<i>Pacific Orange</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SMD U/M	Síndrome Mielodisplásica com displasia unilinha e multilinha
SMD-EB	Síndrome Mielodisplásica com excesso de bastos
SMD-RS	Síndrome Mielodisplásica com sideroblastos em anel
SP	Sangue periférico
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SSC	Citrato de Sódio Salino
t	Translocação
Va	Valor absoluto
WPSS	Índice de prognóstico internacional baseado na classificação da OMS

## 1. Síndrome Mielodisplásica

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é um grupo heterogéneo de neoplasias clonais da medula óssea (MO). Esta é normalmente hipercelular e é caracterizada por uma hematopoiese ineficaz com alterações na proliferação e diferenciação mielóide a partir das células estaminais. Ocorre com displasia morfológica nas células hematopoiéticas, e com citopenias periféricas de gravidade variável, podendo facilmente progredir para uma leucemia mielóide aguda (LMA) (Baratono et al. 2015; Ciabatti et al. 2017; Swerdlow et al. 2017).

### 1.1. Epidemiologia e Etiologia

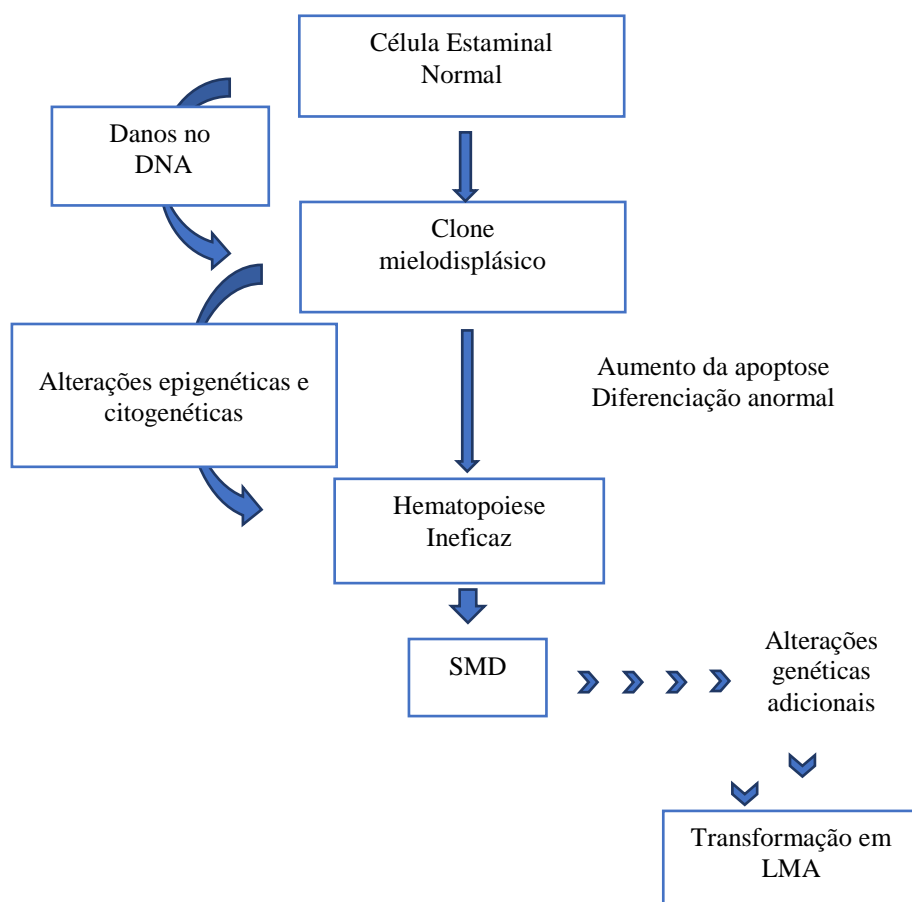
A SMD pode ser classificada como *de novo*, devido à exposição a agentes químicos tais como o benzeno, pesticidas, tabagismo e história familiar de neoplasias hematopoéticas, ou secundária quando resulta da exposição a agente mutagénicos, como a radioterapia e quimioterapia, afetando cerca de 10 a 15% dos doentes em tratamento das diversas patologias hematológicas. Algumas patologias hematológicas hereditárias, tais como a anemia de Fanconi, disqueratose congénita, síndrome de *Shwachman-Diamond*, anemia de *Diamond—Blackfan* e anemia aplásica adquirida estão associadas a um aumento do risco para desenvolver uma SMD. É considerada uma doença multifatorial, sendo desencadeada por diversos fatores e ocorre maioritariamente em indivíduos mais idosos e do sexo masculino (Baratono et al. 2015; Arber et al. 2016; Swerdlow et al. 2017).

A taxa de incidência da SMD é de 4,9: 100.000 indivíduos por ano. É rara em crianças, adolescentes e adultos jovens, com uma taxa de incidência de 0,1:100.000 em pessoas com idades inferiores a 40 anos. Em indivíduos com idades compreendidas entre 70 e 79 a incidência é de 20:100.000 e sobe para 59,8:100.000 em indivíduos com idade superior ou igual a 80 anos. No entanto, devido à falta de notificação desta patologia na maioria dos registos de cancro, estima-se que a verdadeira incidência anual em pacientes com idade superior a 65 anos, possa estar mais próxima dos 75 casos por 100.000 habitantes (Baratono et al. 2015; Arber et al. 2016; Greenberg et al. 2017; Swerdlow et al. 2017).

Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome Mielodisplásica

## 1.2. Fisiopatologia da Síndrome Mielodisplásica

A fisiopatologia das SMD é extremamente complexa. Tem origem no progenitor hematopoiético primitivo. A mutação iniciadora ou a via molecular que está implicada ainda é desconhecida. Sabe-se que o processo envolve mecanismos genéticos, epigenéticos e mediados pelo sistema imune, que levam a uma falha no equilíbrio entre a proliferação celular, diferenciação celular e apoptose. Estes fatores contribuem para o fenótipo desta doença, levando a uma hematopoiese desordenada e disfuncional. Quando isto acontece há um aumento na proliferação celular na medula óssea, resultando numa medula hipercelular. No entanto, quando as células não se diferenciam adequadamente há um aumento da taxa de apoptose. Apesar de a medula ser hipercelular, menos células maduras saem para a corrente sanguínea, resultando assim em citopenias e aumentando a suscetibilidade para ocorrer transformação para LMA (Dussiau and Fontenay 2017; Shallis, Ahmad, and Zeidan 2018).



**Figura 1:** Potenciais mecanismos celulares envolvidos na fisiopatologia das SMD (adaptado de (Cortesão 2014))

Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome Mielodisplásica



### 1.3. Características Clínicas e Laboratoriais

As SMD são assintomáticas e conhecidas pela sua enorme heterogeneidade, havendo necessidade de estudos laboratoriais e clínicos extensos para a sua caracterização e prognóstico. Os doentes apresentam sintomas que são geralmente secundários às citopenias periféricas causadas pela falha da medula óssea (MO), como por exemplo, cansaço, dispneia do sono, infecção, hemorragia, entre outros. O diagnóstico é realizado através da análise do sangue periférico (SP) e da MO (aspirado de medula, biopsia óssea, citogenética e citometria de fluxo) (Cortesão 2014; Raza and Galili 2012; Baratono et al. 2015; Gadji and Rangel Pozzo 2018).

Os *cutoff's* utilizados no Índice de prognóstico internacional revisto (IPSS-R), ano de 2012, das citopenias estabelecidas para a estratificação de risco têm sido tradicionalmente usados para definir o valor das mesmas para o diagnóstico de SMD. A maioria dos doentes com SMD tem pelo menos uma citopenia abaixo do seguinte limiar: concentração de hemoglobina  $< 10\text{g/dL}$ , contagem de plaquetas  $< 100 \times 10^9/\text{L}$  e contagem absoluta de neutrófilos  $< 1,8 \times 10^9/\text{L}$  (Arber et al. 2016; Swerdlow et al. 2017).

O critério morfológico mínimo para o diagnóstico de SMD é a existência de displasia em  $\geq 10\%$  das células (Tabela 1), em pelo menos uma das três linhagens celulares mieloides (eritróide, granulocítica e megacariocítica). Contudo, estas características são muito semelhantes às de outras patologias mieloides. Uma citopenia inexplicada e persistente na ausência de displasia não deve ser interpretada como SMD, a menos que tenha alterações genéticas específicas (Arber et al. 2016; Swerdlow et al. 2017).

**Tabela 1:** Caraterísticas displásicas segundo a OMS\*

<b>Caraterísticas displásicas</b>	
<b>Diseritropoiese</b>	<u>Alterações nucleares:</u>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ <i>Nuclear budding</i></li> <li>◦ Pontes internucleares</li> <li>◦ Cariorrexis</li> <li>◦ Multinuclear</li> <li>◦ Megaloblastose</li> </ul>
<b>Disgranulopoiese</b>	<u>Alterações Citoplasmáticas:</u>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Sideroblastos em anel</li> <li>◦ Vacuolização</li> <li>◦ Ácido periódico de Schiff positivo (PAS +)</li> </ul>
<b>Dismegacariopoiese</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Anisocitose marcada</li> <li>◦ Hipossegmentação nuclear (pseudo–Pelger-Huet)</li> <li>◦ Hipersegmentação nuclear</li> <li>◦ Diminuição dos grânulos</li> <li>◦ Agranularidade</li> <li>◦ Grânulos pseudo-Chediak-Higashi</li> <li>◦ Bastonetes de Auer</li> <li>◦ Corpos de Dohle</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Micromegacariócitos</li> <li>◦ Hipolobularidade nuclear</li> <li>◦ Fragmentação nuclear</li> </ul>

\* Tabela adaptada de (Swerdlow et al. 2017)

A citometria de fluxo é cada vez mais importante no diagnóstico das SMD mas, na ausência de critérios pré-estabelecidas pela OMS no ano de 2016, não pode estabelecer um diagnóstico primário (Swerdlow et al. 2017).

#### **1.4. Alterações genéticas na Síndrome Mielodislásica**

As anomalias genéticas conduzem à transformação de uma célula hematopoiética normal numa célula clonal. Quando o progenitor hematopoiético é afetado pelas primeiras mutações, as linhagens mieloides e linfoides também irão ser afetadas. Estas anomalias são definidas pela presença de alterações cromossómicas e genéticas, que levam à perda, ganhos ou translocações. O tipo de mutação e a combinação com os mecanismos

Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome Mielodislásica

epigenéticos podem ser responsáveis pela heterogeneidade dos fenótipos e o desenlace da doença. A heterogeneidade fenotípica está ainda ligada a diversos eventos genéticos que envolvem reguladores epigenéticos, modificadores de cromatina, fatores de splicing, fatores de transcrição e alterações na via de sinalização (Dussiau and Fontenay 2017; Shallis, Ahmad, and Zeidan 2018; Wang et al. 2018).

Dos 50% dos casos de SMD onde estão presentes as alterações citogenéticas, foram identificados cerca de 80-90% dos casos com mutações somáticas em mais de 50 genes. As mutações mais recorrentes encontradas em doentes com SMD, incluem (Dussiau and Fontenay 2017; Kennedy and Ebert 2017; Swerdlow et al. 2017) (Tabela 2):

- a. splicing do RNA (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2F1*, *ZRSR2*); esta mudança ocorre ao nível dos aminoácidos e encontra-se alterada em cerca de 60% dos doentes. O primeiro gene a ser implicado foi o *SF3B1* que se encontra mutado em 80% dos doentes com sideroblastos em anel;
- b. alterações epigenéticas: metilação do DNA (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1 / IDH2*) e a modificação dos histomas (*ASXL1*, *EZH2*) são a segunda classe mais comum. A metilação do DNA é a adição de um grupo metil ao DNA, que ocorre nos sítios CpG (regiões nas quais uma citosina e uma guanina são ligadas por um fosfato), levando assim a um mecanismo de silenciamento. As metiltransferases do DNA (DNMTs), são enzimas responsáveis pela metilação do DNA e que se encontram altamente expressas na LMA e noutras neoplasias mieloides.
- c. Mutações nos genes de coenzimas (*SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*, *STAG1* e *STAG2*); podem ser encontradas em 11-17% das SMD de baixo risco e alto risco, respetivamente. A mutação ocorre de modo a interromper o papel do complexo de estabilização do RNA;
- d. Mutações nos genes de fatores de transcrição (*RUNX1*, *GATA2*); estão relacionados com a ativação da expressão génica durante a diferenciação hematopoiética;
- e. Mutação no gene *TP53*, desempenha um papel fundamental na coordenação da resposta ao stress celular e danos no DNA. As alterações neste gene são normalmente encontradas em 40% dos doentes com SMD submetidos a quimioterapia. Ocorrem frequentemente no segundo alelo do braço pequeno do cromossoma 17 e estão relacionadas com a trombocitopenia. Quando associada a um cariótipo complexo é de mau prognóstico.

Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome Mielodisplásica

**Tabela 2:** Mutações genéticas comuns nas SMD (encontradas em pelo menos 5% dos casos)

Gene Mutado	Via patológica	Frequência (%)	Impacto no prognóstico
<i>SF3B1</i> <sup>a)</sup>	<i>splicing</i> RNA	20-30	Favorável
<i>TET2</i> <sup>a)</sup>	Metilação do DNA	20-30	b)
<i>ASXL1</i> <sup>a)</sup>	Modificação das histonas	15-20	Desfavorável
<i>SRSF2</i> <sup>a)</sup>	<i>splicing</i> RNA	~15	Desfavorável
<i>DNMT3A</i>	Metilação do DNA	~10	Desfavorável
<i>RUNX1</i>	Fator de transcrição	~10	Desfavorável
<i>U2AF1</i> <sup>a)</sup>	<i>splicing</i> RNA	5-10	Desfavorável
<i>TP53</i> <sup>a)</sup>	Supressor tumoral	5-10	Desfavorável
<i>EZH2</i>	Modificação das histonas	5-10	Desfavorável
<i>ZRSR2</i>	<i>splicing</i> RNA	5-10	b)
<i>STAG2</i>	Complexo de coenzima	5-7	Desfavorável
<i>IDH1/IDH2</i>	Metilação do DNA	~5	b)
<i>CBL</i> <sup>a)</sup>	Via de sinalização	~5	Desfavorável
<i>NRAS</i>	Fator de transcrição	~5	Desfavorável
<i>BCOR</i> <sup>a)</sup>	Fator de transcrição	~5	Desfavorável

a) Estas alterações foram observadas em células hematopoiéticas clonais de indivíduos saudáveis (hematopoiese clonal de potencial indeterminado).  
b) Prognóstico neutro.

\* tabela adaptada de (Swerdlow et al. 2017)

### 1.5. Alterações citogenéticas na Síndrome Mielodisplásica

As alterações genéticas encontradas nas SMD podem ser caracterizadas pela perda ou ganho de material genético sob a forma de deleção, monossomia e trissomias parciais (menos frequente) ou totais. Esta perda ou ganho pode ser resultado de translocações desequilibradas ou rearranjos, observadas em doentes com múltiplas alterações cromossômicas (Haase 2008; Baratono et al. 2015). No entanto, os cariótipos não informativos continuam a preocupar e ocorrem em cerca de 20% dos doentes com SMD. Cerca de 80% dos doentes apresentam alterações clonais e 20-70% dos restantes apresentam um cariótipo normal (Baratono et al. 2015). As anormalidades citogenéticas recorrentes são normalmente intersticiais e estão presentes em 40-50% dos casos

Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome Mielodisplásica

(Swerdlow et al. 2017). As alterações genéticas mais frequentes associadas à SMD incluem: a deleção do braço longo do cromossoma 5 (5q<sup>-</sup>), deleção do braço longo do cromossoma 7 e monossomia do 7 (7q<sup>-</sup>/-7), trissomia do 8 (+8), deleção do braço longo do cromossoma 20 (20q<sup>-</sup>), ausência do cromossoma Y (-Y). Embora sejam raros, é possível encontrar outro tipo de anomalias nas SMD (Tabela 3). A -Y, +8 e 20q<sup>-</sup> foram descritas em condições não neoplásicas. Quando ocorrem como alteração única e na ausência de critérios morfológicos, não são consideradas alterações definitivas de SMD (Swerdlow et al. 2017; Gadji and Rangel Pozzo 2018).

O desenvolvimento de tecnologias poderosas de citogenética molecular durante as últimas décadas, como o cariótipo convencional, hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), hibridização genômica comparativa (CGH), várias técnicas de genotipagem, sequenciação de DNA e RNA, têm permitido a compreensão e conhecimento de mecanismos moleculares que estão na base do início e prospeção de doenças neoplásicas (Chauffaille 2006; Baratono et al. 2015). A citogenética clássica foi durante muito tempo a única ferramenta de diagnóstico de patologias neoplásicas. Baseia-se na análise dos cromossomas em metáfase, permitindo avaliar de uma maneira geral todos os cromossomas envolvidos na genômica humana. Contudo, as dificuldades para obter metáfases de qualidade é uma desvantagem desta técnica (Haase 2008; Riegel 2014). O FISH (técnica usada nesta dissertação), é uma técnica da citogenética molecular que visa detectar anomalias cromossômicas, localizando sequências de DNA específicas de núcleos em interfase e metáfase. Tem como vantagem: a rapidez, sensibilidade e especificidade, uma vez que em poucas horas é possível obter um resultado analítico. No entanto, o elevado custo e especificidade constituem uma das principais desvantagens desta técnica. A informação sobre estas alterações, fornecem ao clínico elementos importantes para a caracterização da patologia, permitindo seguir a doença, a resposta à terapêutica, detecção da doença residual e possível remissão (Waters, Barlow, and Gould 1998; Haase 2008; Taştemir et al. 2011; Riegel 2014).

**Tabela 3:** Alterações cromossômicas recorrentes na SMD no momento do diagnóstico\*

Alterações Cromossômicas	Frequência (%)	
	SMD (no geral)	SMD relacionada com a terapia
<b>Desequilibradas</b>		
Ganho do cromossoma 8 <sup>a)</sup>	10	
Perda do cromossoma 7 ou del(7q)	10	50
del(5q)	10	40
del(20q) <sup>a)</sup>	5-8	
Perda do cromossoma Y <sup>a)</sup>	5	
Isocromossoma 17 ou t(17p)	3-5	25-35
Perda do cromossoma 13 ou del(13q)	3	
del(11q)	3	
del(12p) ou t(12p)	3	
del(9q)	1-2	
Indic(X)(q13)	1-2	
<b>Equilibradas</b>		
t(11;16)(q23.3;p1.3)		3
t(3;21)(q26.2;q22.1)		2
t(1;3)(p36.3;q21.2)	1	
t(2;11)(p21;q23.3)	1	
Inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3q26.2)	1	
t(6;9)(p23;q34.1)	1	

a) Como alteração cromossômica única, na ausência de critérios morfológicos, a + 8, del (20q) e perda do cromossomo Y não são consideradas evidências definitivas de SMD; as citopenias persistentes de origem indeterminada e outras alterações mostradas nesta tabela são consideradas evidências prováveis de SMD, mesmo na ausência de características morfológicas definitivas.

\* tabela adaptada de (Swerdlow et al. 2017)

### 1.5.1. Deleção do braço longo do cromossoma 5

A deleção do braço longo do cromossoma 5 (5q-) é das alterações genéticas mais frequentes. Ocorre em cerca de 10% dos pacientes com SMD e 40% em doentes com SMD secundária (Baratono et al. 2015). Segundo Giagounidis (2013), a monossomia do 5 não

Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome Mielodisplásica

existe como categoria citogenética, já que resulta de rearranjos desequilibrados muito complexos. Embora ainda não seja claro o seu mecanismo, a exposição a carcinogénicos foi descrita em doentes que apresentam alterações do cromossoma 5 e 7 (Haase 2008; Swerdlow et al. 2017; Shallis, Ahmad, and Zeidan 2018). As características morfológicas associadas a esta alteração genética são: anemia refratária, macrocitose, trombocitose, leucopenia leve, hipoplasia da linha eritróide e granulócita (apesar desta ser discreta ou mesmo ausente), megacariópoiese (múltiplos núcleos separados, hipobulação, microcariócitos e megacariócitos com características monolobulados com núcleo redondo) (Haase 2008; Baratono et al. 2015). A 5q- tem uma região mínima de deleção de ~209 Kb, situada entre as bandas 5q31-33. A região 5q33 está associada a um fenótipo de SMD mais ligeiro, enquanto que a 5q31 está associada a uma SMD *de novo* e mais agressiva. Estudos de mapeamento genómico da região crítica de deleção identificaram cerca de 41 genes supressores tumorais, reguladores de transcrição, citocinas e fatores de crescimento (Gadji and Rangel Pozzo 2018; Shallis, Ahmad, and Zeidan 2018). A mutação no gene *TP53* surge independente do fator de prognóstico e está associada à 5q- (Swerdlow et al. 2017; Gadji and Rangel Pozzo 2018). Clinicamente é de bom prognóstico (IPSS-R de 4,8 anos), no entanto, quando associada a um cariótipo complexo é de mau prognóstico, podendo rapidamente evoluir para LMA (Baratono et al. 2015).

### 1.5.2. Deleção do braço longo do Cromossoma 7 ou Monossomia do 7 (7q<sup>-</sup>/-7)

A -7/7q<sup>-</sup> como única anomalia é observada em cerca de 4-8% dos doentes com SMD *de novo*, com uma frequência de 50% em crianças e 55% em doentes com SMD secundária (Baratono et al. 2015; Gadji and Rangel Pozzo 2018). A -7/7q<sup>-</sup> está associada a uma predisposição para desenvolver neoplasias mieloides, como a Anemia de Fanconi, neurofibromatose tipo 1 e neutropenia congénita severa. É a alteração citogenética que mais afeta a medula óssea, caracterizada por citopenias refratárias graves e propensão para infeções graves (Baratono et al. 2015). Foram identificadas pelo menos duas regiões distintas de deleção, a banda 7q22 e as regiões mais teloméricas 7q31-32 (estão associados múltiplos genes, que desempenham um papel importante na leucogénese) e 7q36. A 7q31 tem uma região de deleção mínima de ~308 kb. Esta alteração cromossómica está

associada a um prognóstico intermédio, mas quando associada a outras alterações cromossómicas, como por exemplo a um cariótipo complexo, é de mau prognóstico (Baratono et al. 2015). O supressor tumoral que está presente na região 7q, continua sem identificação. O único gene que se encontra localizado na 7q22.1 é o *AUX1*, está envolvido no ciclo celular e é expresso de um modo diferente nas diferentes neoplasias mieloides (Gadji and Rangel Pozzo 2018).

### **1.5.3. Deleção do braço longo do cromossoma 20 (20q<sup>-</sup>)**

A deleção do braço longo do cromossoma 20 é uma alteração recorrente nas neoplasias mieloides. Ocorre em cerca de 5% dos SMD e 7% das SMD secundárias. Está morfológicamente associada a uma displasia da linha eritróide e megacariocítica. As deleções são sempre intersticiais embora a região crítica da deleção esteja situada entre as bandas 20q11 e 20q12. A mais comum é a del(20)(q11.2q13.3) com um tamanho de ~201 kb, seguindo-se da del(20)(q11.2q13.1). Esta alteração cromossómica está associada a um prognóstico de baixo risco, mas quando associada a um cariótipo complexo, é de mau prognóstico (Baratono et al. 2015).

### **1.5.4. Trissomia do 8 (+8)**

A trissomia do 8 ocorre em cerca de 10% dos casos de SMD. Esta alteração é mais frequente em doentes com SMD do que com LMA. Ainda é difícil compreender o significado desta alteração genética, porque normalmente está associada a outras alterações. A progressão para LMA pode ocorrer em cerca de metade dos doentes com esta alteração isolada e pode ser encontrada em outros genes do cromossoma 8, como o *MYC* e em vários genes apoptóticos. Doentes com SMD *de novo* apresentam melhor resposta terapêutica. Está associada a um prognóstico de risco intermédio, com uma sobrevida de 2,7 anos (Baratono et al. 2015; Gadji and Rangel Pozzo 2018).



### **1.5.5. Perda do Cromossoma Y (-Y)**

Um estudo realizado em 1992 pela *UK Cancer Genetics Groups*, observou que a perda do Cromossoma Y (-Y) está presente em 7,7% dos doentes com uma doença neoplásica e em 10,7% com SMD. O significado desta alteração, ainda é desconhecido, mas sabe-se que está associada ao envelhecimento. É a única alteração cromossómica que confere muito bom prognóstico com uma média de sobrevida de 5,4 anos (Baratono et al. 2015; Gadji and Rangel Pozzo 2018).

### **1.6. Nova classificação segundo a OMS 2016**

Nas últimas décadas, houve vários sistemas de classificação das SMD, de modo a uniformizar os critérios de diagnóstico, prognóstico e o risco de evolução para LMA. Segundo a nova classificação das SMD pela OMS em 2016 (Tabela 4), houve necessidade de incorporar as características clínicas, morfológicas, imunofenotipagem, citogenética e genética molecular, de grande significado para o diagnóstico das SMD (Baratono et al. 2015; Arber et al. 2016; Swerdlow et al. 2017). A caracterização da SMD engloba vários subtipos distintos, definidos pelo número de citopenias encontradas em fase inicial, o número de linhagens mieloides que manifestam displasia (singular ou múltiplas), a presença de sideroblastos em anel (>15% ou <5% na presença da mutação do *SF3B1*) e as percentagens de blastos no sangue periférico e na medula óssea. Na classificação atual, apenas uma alteração citogenética, a (5q-), é usada para definir um subtipo específico de SMD. A mutação *SF3B1* está associada à SMD com sideroblastos de anel. Embora a progressão para LMA seja o curso natural de muitos casos de SMD, a percentagem de doentes que progride varia entre os diferentes subtipos, havendo uma maior probabilidade de progressão em doentes com mieloblastos aumentados (Arber et al. 2016; Swerdlow et al. 2017).

**Tabela 4:** Classificação das SMD (OMS-2016)\*

Classificação das SMD	Número de displasias	Número de citopenias <sup>a</sup>	Sideroblastos em anel (%)	Blastos no sangue Periférico (SP) e MO (%)	Citogenética convencional por cariótipo
<b>SMD com displasia unilinha</b>	1	1-2	<15/ <5 <sup>b</sup>	MO <5; SP <1 Ausência de bastões de Auer	Qualquer uma, a não ser que preencha os critérios para SMD com del(5q) isolada
<b>SMD com displasia multilinha</b>	2-3	1-3	<15/ <5 <sup>b</sup>	MO <5; SP <1 Ausência de bastões de Auer	Qualquer uma, a não ser que preencha os critérios para SMD com del(5q) isolada
<b>SMD com sideroblastos em anel (SMD-RS):</b>					
<b>SMD-RS com displasia unilinha</b>	1	1-2	≥15%/<5% <sup>b</sup>	MO <5; SP <1 Ausência de bastões de Auer	Qualquer uma, a não ser que preencha os critérios para SMD com del(5q) isolada
<b>SMD com displasia multilinha</b>	2-3	1-3			
<b>SMD com excesso de blastos (SMD-EB)<sup>c</sup></b>					
<b>SMD-EB-1</b>	0-3	1-3	Alguma ou Nenhuma	MO 5-9 ou SP 2-4 Ausência de bastões de Auer MO 10-19 ou SP 5-19 ou bastões de Auer	Del(5q) isolada ou outra alteração cromossômica, exceto a del(7q)-7
<b>SMD-EB-2</b>					
<b>SMD com deleção 5q isolada</b>	1-3	1-2	Alguma ou Nenhuma	MO <5; SP <1 Ausência de bastões de Auer	Qualquer
<b>SMD inclassificáveis:</b>					
<b>Com 1% de blastos no SP</b>	1-3	1-3	Alguma ou Nenhuma	MO <5, SP =1 <sup>c</sup> Ausência de bastões de Auer	Qualquer
<b>Displasia numa só linhagem celular ou Pancitopenia</b>	1	3	Alguma ou Nenhuma	MO <5; SP <1 Ausência de bastões de Auer	Que define anormalidade da SMD <sup>d</sup>
<b>Baseada numa citogenética anormal</b>	0	1-3	<15%		
<b>Citopenias refratária em Crianças (Entrada Provisória)</b>	Crianças com menos de 2% de blastos no sangue periférico e menos de 5% na medula óssea, mas que apresentam displasia em mais de duas linhagens celulares.				

a) Citopenias definidas com concentração de hemoglobina < 10g/dL, contagem de plaquetas <100x10<sup>9</sup>/L e contagem absoluta de neutrófilos < 1,8x10<sup>9</sup>/L. A SMD pode apresentar-se com uma anemia leve ou trombocitopenia acima destes valores; Monócitos no sangue periférico devem ser <1 x 10<sup>9</sup>/L.

b) Se a mutação *SF3B1* estiver presente.

c) Tem de haver pelo menos 1% de blastos em duas análises diferentes.

d) Ver tabela 3

\* tabela adaptada de (Swerdlow et al. 2017)

### 1.6.1. SMD com displasia unilinha

A SMD com displasia unilinha engloba casos que apresentam citopenias inexplicáveis ou bicitopenia, com >10% de displasia numa das linhagens mielóides. Encontra-se presente em 7-20% dos casos e atinge maioritariamente adultos entre os 65-70 anos. As alterações cromossômicas incluem a 20q-, +8, alteração dos cromossomas 5 e 7. Apesar de ser limitada a uma linhagem celular afetada, as mutações que afetam as células tronco hematopoiéticas, afetam todas as linhagens celulares envolvidas. As mutações somáticas têm sido identificadas em 60-70% dos casos. Os genes mais comumente mutados e associados a este subtipo são o *TET2* e a *ASXL* (Swerdlow et al. 2017).

### 1.6.2. SMD com displasia multilinha

Na SMD com displasia multilinha, a percentagem de blastos é <1% no sangue periférico e <5% na medula óssea. Os bastões de *auer* estão ausentes e a contagem de monócitos (valor absoluto) é <1x10<sup>9</sup>/L. Ocorre em indivíduos mais velhos, com idades entre 67-70 anos, havendo uma maior incidência nos homens. As alterações genéticas clonais mais frequentes incluem a trissomia do 8, monossomia do 7 e do 5, deleção do braço longo do cromossoma 7 e 5, deleção do braço longo do cromossoma 20 e cariótipos complexos em 50% dos doentes deste subtipo. A sequenciação completa do genoma, mostrou que mais de metade dos doentes deste subtipo apresentavam as mesmas mutações dos genes que os doentes com SMD com excesso de blastos e LMA. Estes incluem mutações dos genes do complexo de coenzimas (*STAG2*), modificadores de cromatina (*ASXL1*), fatores de transcrição (*RUNX1*), moléculas de sinalização (*CBL*), supressores tumorais (*TP53*) e modificadores de DNA (*TET2*) (Swerdlow et al. 2017).

### 1.6.3. SMD com sideroblastos em anel (SMD-RS)

A SMD-RS é caracterizada por citopenias, displasia morfológica e sideroblastos em anel, que geralmente representam ≥15% dos precursores eritróides na medula óssea. Há uma mutação genética associada a este subtipo, *SF3B1*, que na sua presença, o diagnóstico pode ser feito com apenas ≥5% de sideroblastos em anel. Os mieloblastos representam

Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome Mielodisplásica

<5% na medula óssea e <1% no sangue periférico. É classificado quando os critérios de SMD 5q- isolado não são preenchidos. É responsável por 3-11% dos casos e ocorre principalmente em idosos entre os 60-73 anos, havendo uma frequência semelhante entre homens e mulheres. A SMD-RS com displasia multilinha é mais comum e representa 13% dos casos, com uma distribuição etária similar. Há um aumento dos percursoros eritróides com displasia, incluindo segmentação nuclear e características megaloblásticas. Os granulócitos e os megacariócitos não mostram displasia. No caso de haver uma SMD com sideroblastos em anel que apresente excesso de blastos no sangue periférico e medula óssea, esta deve ser classificada como SMD com excesso de blastos. A mutação genética, *SF3B1*, está presente em 80-90% dos casos de SMD-RS com displasia unilinha e 30-80% dos casos de SMD-RS com displasia multilinha. Também podem estar presentes em <10% dos casos, mutações em genes causadores de splicing, como por exemplo: *SRSF2*, *U2AF1* e *ZRSR2* e em genes que podem ser afetados pela metilação do DNA como *TET2* e *DNMT3A* (Swerdlow et al. 2017).

#### **1.6.4. SMD com excesso de blastos (SMD-EB)**

A SMD com excesso de blastos é caracterizada pela presença de 5-19% de blastos na medula óssea ou 2-19% no sangue periférico. Devido às diferenças de sobrevida e evolução para LMA, estas tiveram de ser subdivididas em: SMD-EB-1 (definido por 5-9% de blastos na medula óssea e 2-4% de blastos no sangue periférico) e SMD-EB-2 (definido por 10-19% de blastos na medula óssea e 5-19% de blastos no sangue periférico). A presença de bastões de *auer* define o caso como SMD-EB-2, independentemente do número de blastos. Afeta indivíduos com mais de 50 anos e é responsável por 40% dos casos de SMD. A medula óssea é geralmente hiperclular e frequentemente tem displasia nas três linhagens mielóides. As alterações citogenéticas estão presentes em 30-50% dos casos, incluindo +8, -5, 5q-, -7, 7q-, 20q- e os cariótipos complexos também podem ser observados. As mutações que afetam o *splicing do mRNA* são exclusivas deste subtipo a menos que ocorram em doentes com cariótipo complexo ou mutação no gene *TP53*. O excesso de blastos define o fenótipo da doença independentemente da mutação, realçando assim, a importância da contagem do número de blastos para a estratificação do risco (Swerdlow et al. 2017).

Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome Mielodisplásica

### **1.6.5. SMD com deleção 5q isolada**

A SMD com 5q- isolada é caracterizada por uma anemia (com ou sem outras citopenias), em que a alteração citogenética 5q- ocorre isoladamente ou com outra alteração que não seja a monossomia do 7 ou deleção do braço longo do cromossoma 7. Ocorre mais frequentemente em mulheres, com idade média de 67 anos (Swerdlow et al. 2017).

### **1.6.6. SMD inclassificáveis**

As SMD inclassificáveis englobam todas as SMD que não preenchem os critérios para as categorias mencionadas anteriormente. Abrangem casos com comportamento clínico heterogêneo, por exemplo, doentes com bicitopenia apesar de displasia numa só linhagem celular. Apresentam menor tempo de sobrevida do que pacientes com uma citopenia, contrariamente aos doentes com uma citopenia e displasia multilinha, que têm tempos de sobrevida mais longos do que os doentes com bicitopenia. Tem uma incidência de 6,3% e não engloba alterações morfológicas específicas (Swerdlow et al. 2017).

## **1.7. Prognóstico e tratamento**

A importância das características citogenéticas como indicadores prognósticos na SMD foi demonstrada pelo Índice de prognóstico internacional (IPSS) em 1997, tendo sido atualizado recentemente em 2012. Este avalia doentes não tratados e classificados segundo a OMS (a nova classificação da OMS 2016, não inclui o prognóstico). Baseia-se em três variáveis principais: percentagem de blastos na MO, alterações citogenéticas e número de citopenias periféricas, e prevê a sobrevida e risco de progressão para LMA (Bejar et al. 2012; Greenberg et al. 2012; Metzger, Reis-Alves, and Lorand-Metze 2017)

Em 2007 foram consideradas novas variáveis, levando à inclusão da displasia multilinha, dependência de transfusão, lactato desidrogenase (LDH), ferritina,  $\beta$ 2-microglobulina, fibrose medular e comorbidades. Em 2012, o IPSS-R determinou 5 grupos de risco citogenético: muito baixo, baixo, intermédio, alto e muito alto. Consegue prever

distintamente a sobrevida e evolução para LMA (Tabelas 5 e 6). A frequência das alterações genéticas aumenta com a gravidade da doença, assim como a sua transformação em LMA (Greenberg et al. 2012; Swerdlow et al. 2017; Baratono et al. 2015; Metze, Reis-Alves, and Lorand-Metze 2017).

**Tabela 5:** Índice de prognóstico internacional revisto (IPSS-R) para as SMD\*

Variáveis de Prognóstico	0	0,5	1	1,5	2	3	4
<b>Citogenética</b>	Muito baixo	\	Baixo	\	Intermédio	Alto	Muito alto
<b>Blastos (%)</b>	≤ 2	\	>2-<5	\	5-10	>10	\
<b>Hemoglobina</b>	≥10 g/dl	\	8-<10	<8	\	\	\
<b>Plaquetas</b>	≥100x10 <sup>9</sup> L	50-<100	<50	\	\	\	\
<b>Neutrófilos (contagem absoluta)</b>	≥0,8 x10 <sup>9</sup> L	<0,8	\	\	\	\	\
\ - Não aplicável;							

\*adaptado de (Greenberg et al. 2012)

**Tabela 6:** Prognóstico das anomalias cromossômicas e taxa de sobrevida e transformação para LMA dos doentes com SMD primária\*

Prognóstico dos subgrupos (Tabela 2)	Grupo de risco	Alterações cromossômicas	Sobrevida (Média)	Transformação em LMA (Média; 25% dos doentes)
<b>Muito baixo (0)</b>	≤1,5	-Y, Del(11q)	5,4	Não alcançado
<b>Baixo (1)</b>	>1,5-3	Normal, Del(5q), Del(12p), Del(20q), dupla incluindo Del(5q)	4,8	9,4
<b>Intermédio (2)</b>	>3-4,5	Del(7q), +8, +19, i(17q), qualquer alteração simples ou dupla de clones independentes	2,7	3,5
<b>Alto (3)</b>	>4,5-6	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), dupla incluindo a -7/del(7q), complexo (3 alterações)	1,5	1,7
<b>Muito alto (4)</b>	>6	Complexo (mais de três alterações)	0,7	0,7

\*adaptado de (Greenberg et al. 2012)

Os subtipos de SMD incluídos nesta classificação podem ser geralmente caracterizados em três categorias de risco, com base no tempo de sobrevida e de evolução para a LMA (Swerdlow et al. 2017):

- a. O grupo de baixo risco contém SMD com displasia de linhagem única, SMD com sideroblastos em anel com displasia unilinha e SMD 5q- isolado.
- b. O grupo de risco intermédio contém SMD com displasia multilinha e SMD com sideroblastos em anel com displasia multilinha.
- c. O grupo de alto risco é categorizado pelo subtipo SMD com excesso de blastos.

Cada vez mais é importante a inclusão de dados mutacionais para melhorar a capacidade de estratificação do risco, porque a quantidade e o tipo de mutações genéticas individuais estão fortemente associados ao desenlace da SMD. Muitos genes comumente mutados foram associados a um prognóstico desfavorável na SMD, enquanto que a mutação no gene *SF3B1* está associada a um prognóstico mais favorável. A mutação do gene *TP53* na SMD está associado a doença muito agressiva e com menor sobrevida em doentes submetidos a transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas (Swerdlow et al. 2017).

Apesar dos avanços da ciência neste campo, o único tratamento eficaz das SMD continua a ser o transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas. No entanto, este torna-se complicado devido à idade avançada e à inexistência de dadores compatíveis, impossibilitando assim o tratamento. As terapêuticas usadas em SMD são personalizadas e têm em conta vários fatores: o subtipo de SMD (a lenalidomida e a talidomia, aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da Síndrome 5q-), a categoria do IPSS-R (alto ou baixo risco), a idade, o estado físico e as comorbidades de cada doente (Bejar et al. 2012; Swerdlow et al. 2017).

## 2. Objetivos

A presença de alterações genéticas assume-se fundamental para o diagnóstico e prognóstico das SMD. A separação de diferentes subpopulações celulares da medula óssea com um elevado grau de pureza, nomeadamente a população das células CD34+ (células progenitoras hematopoiéticas), uma vez que a SMD é uma doença clonal da célula *stem* hematopoiética, pode contribuir para o aumento da sensibilidade do FISH na avaliação da presença de alterações genéticas associadas a esta patologia:

Neste sentido, foram objetivos desta tese:

- Identificar a presença de alterações cromossómicas por FISH em células isoladas por *cell sorting*; nomeadamente nas células progenitoras hematopoiéticas (CD34+), nos neutrófilos, monócitos e eritroblastos, permitindo identificar em cada população celular o tamanho do clone SMD e perceber se essa alteração genética se encontrava numa só linhagem hematopoiética ou se afetava todas as linhas.
- Perceber, nos casos de SMD onde ocorre a presença de mais do que uma alteração genética, qual a que parece ocorrer primariamente.
- Verificar se há um clone SMD mais representado numa determinada linha está associado a uma citopenia mais marcada.

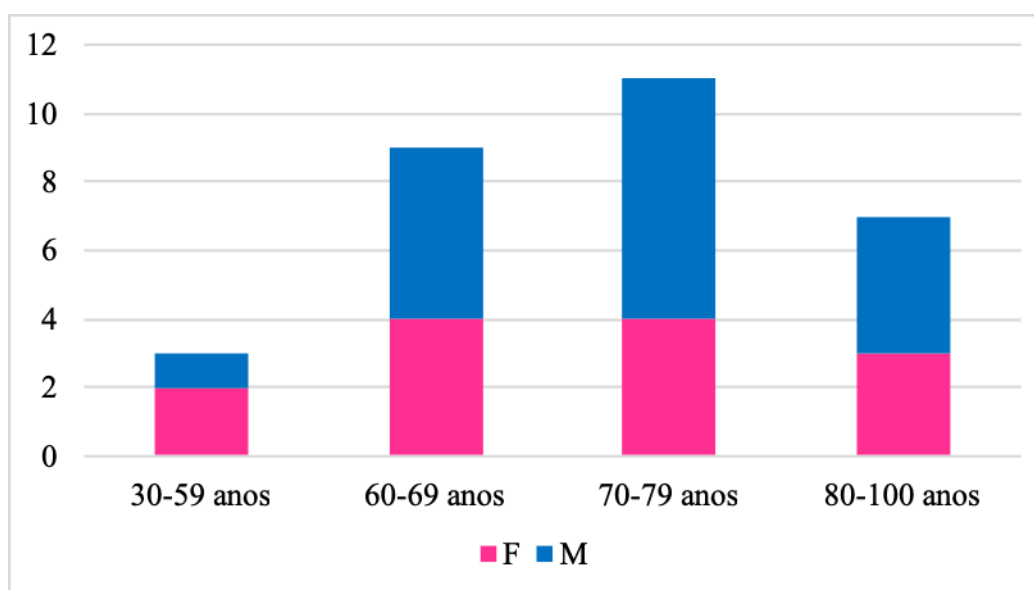


### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Caraterização da amostra e parâmetros analíticos essenciais ao processo de seleção

O estudo desta dissertação foi aprovado pelo Diretor de Serviço do Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

O presente estudo foi realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), entre Janeiro de 2015 e Dezembro de 2017. Um grupo de amostragem de 203 indivíduos foi considerada para o estudo das alterações cromossómicas por FISH, em células isoladas (células CD34+, eritroblastos, monócitos e neutrófilos) com suspeita de SMD. Destes, apenas 37 doentes cumpriam os critérios deste estudo: a presença, de uma alteração genética em células purificadas por citogenética molecular, não podiam ter outras doenças associadas e tinham de cumprir todos os critérios para o diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica. Destes 37 doentes 7 foram excluídos pelo fato de pertencerem a outros hospitais. Os restantes 30 foram classificados segundo a OMS (2016), em que 17 indivíduos são sexo masculino e 13 indivíduos do sexo feminino, com idades compreendidas entre 34 a 88 anos numa média de 70,5 anos (Figura 2).



**Figura 2:** Caraterização da população estudada relativamente ao sexo e idade

### 3.2. Separação das diferentes populações celulares da medula óssea

Em cada amostra, procedeu-se à separação celular das seguintes populações: células CD34+, eritroblastos, monócitos e neutrófilos.

A separação celular foi realizada usando o equipamento BD FACS Aria III da *Becton Dickinson (BD)*. O método selecionado é relativamente vantajoso, dado que permite obter populações celulares com elevado grau de pureza, com base na complexidade e tamanho celulares e na fluorescência emitida. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais (mAb) específicos para a população em estudo. No caso das células separadas para SMD foram usados os anticorpos CD34 PerCP-CY5-5 (*Beckman Coulter*, Califórnia, EUA); CD36 FITC (BD, Nova Jersey, EUA); CD33 PE (*Beckman Coulter*, Califórnia, EUA); CD45 PO (BD, Nova Jersey, EUA); CD117 PC7 (*Beckman Coulter*, Califórnia, EUA).

### 3.3. Hibridização *In Situ* por fluorescência das amostras isoladas

A técnica por FISH utiliza sondas fluorescentes que permite detetar uma deleção ou ganho de um *locus* específico em células de interfase. Esta foi realizada de acordo com o protocolo padrão do Laboratório de Citogenética Molecular, que engloba três passos: pré-hibridização, hibridização e pós-hibridização. O método consiste em centrifugar as amostras durante 10 minutos a 1180xg, sendo o sobrenadante retirado cuidadosamente. O *pellet* (5µl) foi colocado sobre a lâmina de forma à obtenção da quantidade suficiente de células para proceder à hibridização. Após secagem, as lâminas foram fixadas no *Thermobrite<sup>tm</sup> StatSpin®*, durante 5 minutos, a 37°C. Posteriormente, colocaram-se as lâminas numa solução de Carnoy (metanol e ácido acético glacial a 100% da EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur), numa proporção de 50:50 entre 20 a 40 minutos. Após secagem das lâminas e as sondas se encontrarem à temperatura ambiente, foram colocados 5µl de sonda sobre a lamela, que foi posteriormente colocada sobre a parte da lâmina de interesse, pressionando com cuidado. As lâminas foram hibridizadas no *Thermobrite<sup>tm</sup> StatSpin®* a 80°C durante 4 minutos e a 37°C *overnight*.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com a solução de lavagem 1,

Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome Mielodisplásica

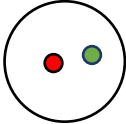
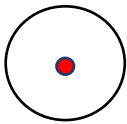
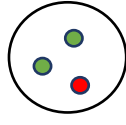
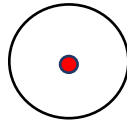

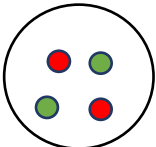
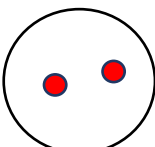
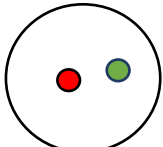
(0,4xSSC\0,3%NP-40, mistura de 20x SSC, NP-40 e água destilada) por 2 min a 72°C e posteriormente com a solução de lavagem 2 (2xSSC\0,1%NP-40, mistura de 20x SSC, NP-40 e água destilada), durante 1 min, à temperatura ambiente. Por fim, os núcleos das células foram marcados com um contra corante de azul com 7µl de DAPI II para induzir contraste celular. As preparações foram armazenadas numa arca a -20°C até se proceder à leitura.

As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência – *Zeiss Axio Imager Z1*- equipado com quatro filtros de diferentes comprimentos de onda (*dapi, gold, green e aqua*). Os resultados foram obtidos num sistema computadorizado de análise de imagem – *Metafer 4* da *Metasystem*, no qual foram contadas, em média, 100 células por lâmina. O painel de sondas utilizado foi o seguinte:

- *Vysis LSI EGR1/D5S23: D5S721 Dual Color Probe Set*, para as regiões 5q31 e 5q15.2 (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EUA) (*Dual-Color*);
- *Vysis D7S486/Cep 7 FISH Probe Kit*, para a região 7q31 e para o centrómero do cromossoma 7 (Locus D7Z1, 7q11.1-q11.1) (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EUA) (*Dual-Color*);
- *Vysis D20S108 FISH Probe Kit*, para a região 20q12 (*single-Color*) (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EUA);
- *CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe Kit*, para o centrómero do cromossoma 8 (região 8q11.1-q11.1) (*single-Color*) (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EUA);
- *CEP X SpectrumOrange / CEP Y SpectrumGreen DNA Probe Kit (dual-Color)* (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EUA).

Os valores de *cutoffs*, definidos no Laboratório de Citogenética Molecular dos CHUC consideram que abaixo de 10%, as análises são consideradas negativas. A interpretação dos resultados foi efetuada com base nas descrições do fornecedor e diferenciadas em vários padrões (Tabela 7).

**Tabela 7:** Padrões de hibridização e sua representação esquematizada

Padrões de hibridização	Esquema representativo da célula	
<b>Monossomia</b>	 <i>Dual-Color</i>	 <i>Single-Color</i>
<b>Deleção</b>	 <i>Dual-Color</i>	 <i>Single-Color</i>
<b>Trissomia</b>	 <i>Single-Color</i>	
<b>Normal</b>	 <i>Dual-Color</i>	 <i>Single-Color</i>
	 <i>Dual-Color</i> <i>(CEP X/ CEP Y)</i>	

### 3.4. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi efetuada com recurso ao *Software Microsoft Excel*, para elaboração das tabelas e gráficos, cálculo das médias e desvio padrão. Para analisar se houve diferenças estatística entre grupos, recorreu-se ao *SPSS Statistic 20*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4. Resultados

A técnica por FISH permitiu verificar que 85% dos doentes não tinham qualquer alteração genética associada a SMD. Nos 203 doentes com suspeita de SMD, nos quais foram estudadas as alterações genéticas mais frequentes em SMD, a frequência de doentes com alterações genéticas foi de 15%. A deleção do cromossoma 20 foi a alteração genética mais comum, estando presente em 14 dos 30 doentes (34,1%); a deleção do braço longo do cromossoma 5 foi a segunda mais frequente, tendo sido detetada em 11 casos (26,8%), sendo a deleção 5q- isolada observada em 4 dos 30 doentes (9,7%). A terceira alteração genética mais frequente foi a trissomia do 8 em 7 em dos 30 (17,1%) casos analisados. A deleção do braço longo do cromossoma 7 foi observada em 5 dos 30 doentes (12,2%). Por último, a perda do cromossoma Y foi observada em 4 dos 30 (9,8%) casos estudados (Tabela 8).

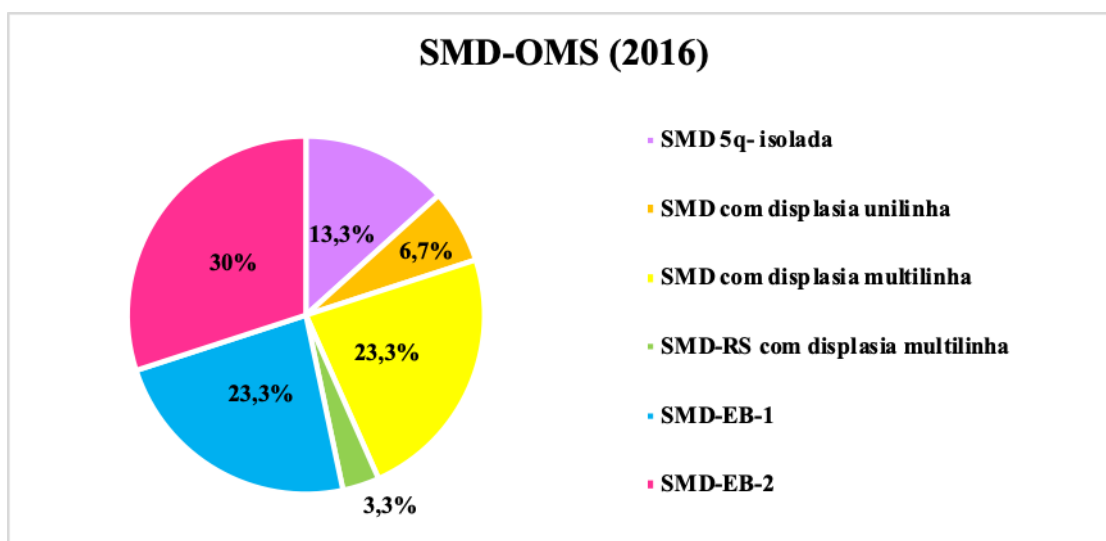
**Tabela 8:** Frequência das alterações genéticas por FISH nas células CD34+ purificadas da medula óssea

<b>Alterações genéticas</b>	<b>Casos com alterações genéticas (n=41) <sup>a)</sup></b>	<b>Frequência (%)</b>
<b>5q-</b>	11	26,8
<b>7q-/-7</b>	5	12,2
<b>20q-</b>	14	34,1
<b>+8</b>	7	17,1
<b>-Y</b>	4	9,8

**a) Apesar do número de casos ser 30, há doentes onde se verificou mais do que uma alteração genética n=41**

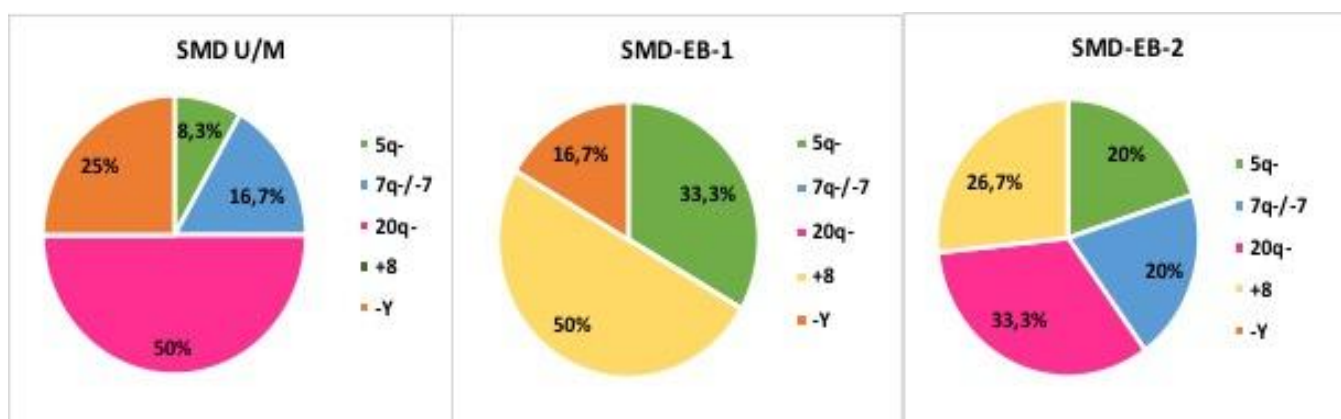
Nas Tabelas 9-12 encontram-se descritos todos os resultados obtidos durante o estudo. Os 30 doentes foram caracterizados segundo a classificação da OMS (2016). (Figura 3): 6,7% dos doentes foram diagnosticados com **SMD com displasia unilinha** (n=2), 23,3% com **SMD com displasia multilinha** (n=7), 3,3% com **SMD-RS com**

**displasia multilinha** (n=1), 23,3% com **SMD-EB-1** (n=7); 30% com **SMD-EB-2** n=9); 13,3% com **SMD 5q- isolada** (n=4).



**Figura 3:** Classificação da população de doentes de acordo com a OMS (2016)

Na figura 4 está representado a frequência de cada alteração genética nos diferentes subgrupos de SMD estudados com exceção do grupo com 5q- isolado.



**Figura 4:** Frequência das alterações genéticas por FISH nas células CD34+purificadas da medula óssea nos subgrupos de SMD

Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome Mielodisplásica

No sentido de criar subgrupos de SMD com um número de casos mais representativos foram criados os seguintes grupos: **grupo SMD 5q- isolada** (n= 4); **grupo SMD U/M**, comporta todos os doentes que estão inseridos nos subtipos SMD com displasia unilinha e multilinha e SMD-RS com displasia multilinha (n= 10); **grupo SMD-EB-1**, que inclui todos os doentes deste subtipo de SMD (n= 7) e por último o **grupo SMD-EB-2**, que inclui todos os doentes do subtipo SMD-EB-2 (n= 9). Os casos em que a percentagem de células com uma determinada alteração genética foi inferior a 10% (*cutoff* praticado no laboratório de citogenética molecular do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra), foi atribuída um resultado “negativo” (Tabelas 9-12).

**Tabela 9:** Casos classificados como SMD 5q- isolada. % de células que apresentavam a alteração genética 5q-.

Casos	Idade/ Sexo	Hg (g/dL) <sup>a)</sup>	Neu (Va) <sup>a)</sup>	Pla (L) <sup>a)</sup>	Linhagem Celular <sup>b)</sup>	Alterações genéticas (%) <sup>c)</sup>				
						5q-	7q-/-7	20q-	+8	-Y
C2	77/M	15	3	74	CD34+	Na	Na	Na	Na	Na
					Eritroblastos	Na	Na	Na	Na	Na
					Monócitos	Neg	Na	Na	Na	Na
					Neutrófilos	15	Neg	Neg	Neg	Neg
C18	77/M	12,6	2,42	183	CD34+	37	Neg	Neg	Neg	Neg
					Eritroblastos	Neg	Na	Na	Na	Na
					Monócitos	Neg	Na	Na	Na	Na
					Neutrófilos	Neg	Na	Na	Na	Na
C20	62/M	8,6	2	189	CD34+	11	Neg	Neg	Neg	Neg
					Eritroblastos	Neg	Na	Na	Na	Na
					Monócitos	Neg	Na	Na	Na	Na
					Neutrófilos	Neg	Na	Na	Na	Na
C26	69/F	8,7	5,7	345	CD34+	25	Neg	Neg	Neg	Na
					Eritroblastos	19	Na	Na	Na	Na
					Monócitos	54	Na	Na	Na	Na
					Neutrófilos	35	Na	Na	Na	Na

a) Hg (g/dl), valor da concentração de hemoglobina em g/dL; Neu(Va), valor absoluto dos neutrófilos; Pla(L), quantidade de plaquetas por L; b) Linhagem celular isolada por citometria de fluxo; c) Neg = negativo; Na = não aplicável ao estudo, alterações que não foram pesquisadas.

**Tabela 10:** Casos classificados como **SMD U/M**. % de células que apresentavam uma determinada alteração genética.

Casos	Idade/ Sexo	Hg (g/dl) <sup>a)</sup>	Neu (Va) <sup>a)</sup>	Pla (L) <sup>a)</sup>	Linhagem Celular <sup>b)</sup>	Alterações genéticas (%) <sup>c)</sup>				
						5q-	7q-/-7	20q-	+8	-Y
<b>C5</b>	63/M	<b>9,6</b>	3,8	355	CD34+	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>70</b>
					Eritroblastos	Na	Na	Na	Na	<b>70</b>
					Monócitos	Na	Na	Na	Na	<b>75</b>
					Neutrófilos	Na	Na	Na	Na	<b>70</b>
<b>C7</b>	45/M	12,9	<b>1,8</b>	<b>99</b>	CD34+	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>30</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>
					Eritroblastos	Na	Na	<b>16</b>	Na	Na
					Monócitos	Na	Na	<b>N</b>	Na	Na
					Neutrófilos	Na	Na	<b>15</b>	Na	Na
<b>C10</b>	81/M	15,1	<b>1,2</b>	<b>83</b>	CD34+	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>62</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>
					Eritroblastos	Na	Na	<b>47</b>	Na	Na
					Monócitos	Na	Na	<b>70</b>	Na	Na
					Neutrófilos	Na	Na	<b>56</b>	Na	Na
<b>C13</b>	78/F	10,6	<b>1,5</b>	<b>56</b>	CD34+	<b>Neg</b>	<b>97</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	Na
					Eritroblastos	Na	<b>71</b>	Na	Na	Na
					Monócitos	Na	<b>90</b>	Na	Na	Na
					Neutrófilos	Na	<b>70</b>	Na	Na	Na
<b>C21</b>	69/F	10,4	2,2	<b>62</b>	CD34+	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>12</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>
					Eritroblastos	Na	Na	<b>11</b>	Na	Na
					Monócitos	Na	Na	<b>Na</b>	Na	Na
					Neutrófilos	Na	Na	<b>20</b>	Na	Na
<b>C22</b>	81/M	10,9	2,3	<b>65</b>	CD34+	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>47</b>
					Eritroblastos	Na	Na	Na	Na	<b>12</b>
					Monócitos	Na	Na	Na	Na	<b>61</b>
					Neutrófilos	Na	Na	Na	Na	<b>82</b>
<b>C23</b>	75/M	14,2	<b>1,6</b>	<b>58</b>	CD34+	<b>75</b>	<b>16</b>	<b>75</b>	<b>Neg</b>	<b>70</b>
					Eritroblastos	Na	Na	<b>68</b>	Na	Na
					Monócitos	Na	<b>24</b>	<b>74</b>	Na	<b>83</b>
					Neutrófilos	<b>16</b>	Na	Na	Na	<b>24</b>
<b>C24</b>	80/M	10,5	4	<b>51</b>	CD34+	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>20</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>
					Eritroblastos	Na	Na	<b>22</b>	Na	Na
					Monócitos	Na	Na	<b>17</b>	Na	Na
					Neutrófilos	Na	Na	<b>16</b>	Na	Na
<b>C29</b>	64/M	11,9	<b>0,43</b>	116	CD34+	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>20</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>
					Eritroblastos	Na	Na	<b>16</b>	Na	Na
					Monócitos	Na	Na	<b>12</b>	Na	Na
					Neutrófilos	Na	Na	<b>10</b>	Na	Na
<b>C3</b>	70/F	12,5	<b>0,4</b>	213	CD34+	Na	Na	Na	Na	Na
					Eritroblastos	Na	Na	<b>18</b>	Na	Na
					Monócitos	Na	Na	Na	Na	Na
					Eritroblastos	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>18</b>	<b>Neg</b>	Na

a) Hg (g/dl), valor da concentração de hemoglobina em g/dL; Neu(Va), valor absoluto dos neutrófilos; Pla(L), quantidade de plaquetas por L; b) Linhagem celular isolada por citometria de fluxo; c) Neg = negativo; Na = não aplicável ao estudo, alterações que não foram pesquisadas.



**Tabela 11:** Casos classificados como **SMD-EB-1**. % de células que apresentavam uma determinada alteração genética

Casos	Idade/ Sexo	Hg (g/dl) <sup>a)</sup>	Neu (Va) <sup>a)</sup>	Pla (L) <sup>a)</sup>	Linhagem Celular <sup>b)</sup>	Alterações genéticas <sup>c)</sup>				
						5q-	7q-/-7	20q-	+8	-Y
<b>C6</b>	82/M	11,8	<b>0,5</b>	158	CD34+	Na	Na	Na	Na	Na
					Eritroblastos	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>29</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>
					Monócitos	Na	Na	<b>18</b>	Na	Na
					Neutrófilos	Na	Na	<b>16</b>	Na	Na
<b>C8</b>	74/F	<b>7,8</b>	<b>1,3</b>	23	CD34+	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>20</b>	Na
					Eritroblastos	Na	Na	Na	<b>17</b>	Na
					Monócitos	Na	Na	Na	<b>35</b>	Na
					Neutrófilos	Na	Na	Na	<b>Neg</b>	Na
<b>C11</b>	68/F	<b>8,4</b>	3,1	65	CD34+	<b>96</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>21</b>	Na
					Eritroblastos	<b>50</b>	Na	Na	<b>Neg</b>	Na
					Monócitos	<b>82</b>	Na	Na	<b>24</b>	Na
					Neutrófilos	Na	Na	Na	<b>Neg</b>	Na
<b>C17</b>	67/M	<b>9,2</b>	<b>1,5</b>	45	CD34+	Na	Na	Na	Na	Na
					Eritroblastos	Na	Na	Na	Na	Na
					Monócitos	Na	Na	<b>19</b>	Na	Na
					Neutrófilos	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>18</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>
<b>C19</b>	64/F	<b>5,7</b>	1,6	203	CD34+	<b>97</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	Na
					Eritroblastos	<b>72</b>	Na	Na	Na	Na
					Monócitos	<b>13</b>	Na	Na	Na	Na
					Neutrófilos	<b>88</b>	Na	Na	Na	Na
<b>C25</b>	88/F	<b>4,9</b>	2,4	475	CD34+	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>16</b>	Na
					Eritroblastos	Na	Na	Na	<b>11</b>	Na
					Monócitos	Na	Na	Na	<b>Neg</b>	Na
					Neutrófilos	Na	Na	Na	<b>Neg</b>	Na
<b>C27</b>	77/M	<b>7,9</b>	<b>0,92</b>	<b>89,4</b>	CD34+	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>52</b>
					Eritroblastos	Na	Na	Na	Na	<b>29</b>
					Monócitos	Na	Na	Na	Na	<b>Neg</b>
					Neutrófilos	Na	Na	Na	Na	<b>22</b>

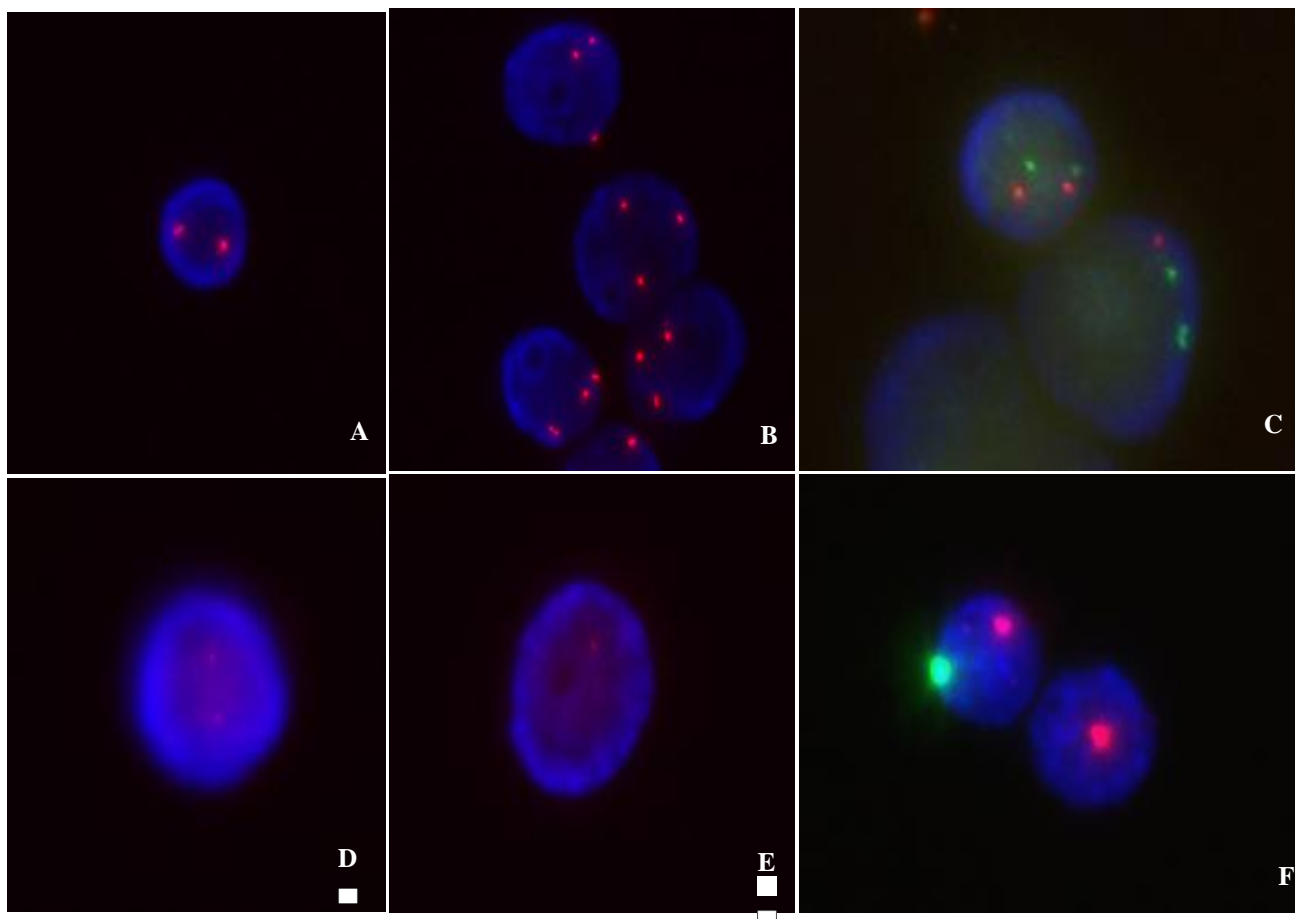
a) Hg (g/dl), valor da concentração de hemoglobina em g/dL; Neu(Va), valor absoluto dos neutrófilos; Pla(L), quantidade de plaquetas por L; b) Linhagem celular isolada por citometria de fluxo; c) Neg = negativo; Na = não aplicável ao estudo, alterações que não foram pesquisadas.

**Tabela 12:** Casos classificados como **SMD-EB-2**. % de células que apresentavam uma determinada alteração genética

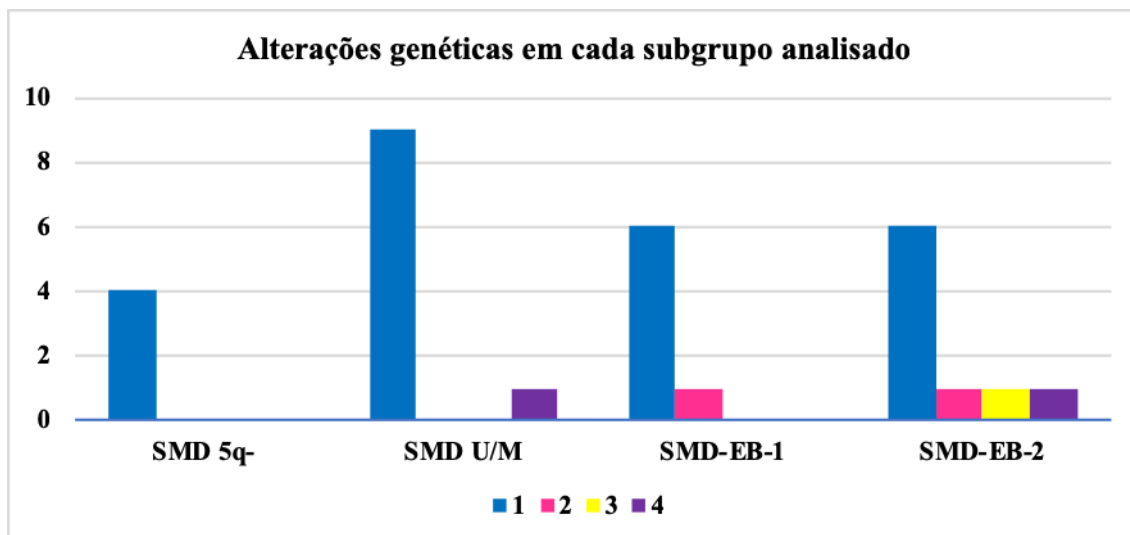
Casos	Idade/ Sexo	Hg (g/dl) <sup>a)</sup>	Neu (Va) <sup>a)</sup>	Pla (L) <sup>a)</sup>	Linhagem Celular <sup>b)</sup>	Alterações genéticas (%) <sup>c)</sup>				
						5q-	7q-/-7	20q-	+8	-Y
<b>C4</b>	67/M	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	CD34+	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>92</b>	<b>Neg</b>
					Eritroblastos	Na	Na	Na	Na	Na
					Monócitos	Na	Na	Na	Na	Na
					Neutrófilos	Na	Na	Na	<b>64</b>	Na
<b>C9</b>	75/M	<b>8,1</b>	<b>0,25</b>	434	CD34+	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>73</b>	<b>Neg</b>
					Eritroblastos	Na	Na	Na	<b>19</b>	Na
					Monócitos	Na	Na	Na	<b>65</b>	Na
					Neutrófilos	Na	Na	Na	<b>67</b>	Na
<b>C12</b>	77/M	<b>8,3</b>	<b>1</b>	<b>57</b>	CD34+	<b>Neg</b>	<b>60</b>	<b>55</b>	<b>70</b>	<b>Neg</b>
					Eritroblastos	<b>Neg</b>	<b>55</b>	<b>86</b>	<b>55</b>	Na
					Monócitos	Na	Na	Na	Na	Na
					Neutrófilos	Na	Na	Na	Na	Na
<b>C14</b>	74/F	<b>8,6</b>	<b>1,2</b>	<b>53</b>	CD34+	<b>90</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	Na
					Eritroblastos	<b>58</b>	Na	Na	Na	Na
					Monócitos	Na	Na	Na	Na	Na
					Neutrófilos	<b>73</b>	Na	Na	Na	Na
<b>C15</b>	74/M	14,2	<b>1,6</b>	<b>58</b>	CD34+	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>30</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>
					Eritroblastos	Na	Na	<b>37</b>	Na	Na
					Monócitos	Na	Na	<b>32</b>	Na	Na
					Neutrófilos	Na	Na	<b>Neg</b>	Na	Na
<b>C16</b>	83/F	<b>9,7</b>	<b>0,66</b>	<b>86,6</b>	CD34+	<b>75</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	Na
					Eritroblastos	<b>83</b>	Na	Na	Na	Na
					Monócitos	<b>90</b>	Na	Na	Na	Na
					Neutrófilos	<b>97</b>	Na	Na	Na	Na
<b>C28</b>	34/F	<b>8,6</b>	<b>1,7</b>	<b>36</b>	CD34+	<b>Neg</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>Neg</b>	Na
					Eritroblastos	Na	Na	<b>35</b>	Na	Na
					Monócitos	Na	Na	Na	Na	Na
					Neutrófilos	Na	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	Na	Na
<b>C30</b>	80/F	<b>9,4</b>	<b>0,8</b>	<b>87</b>	CD34+	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>25</b>	<b>Neg</b>	Na
					Eritroblastos	Na	Na	<b>20</b>	Na	Na
					Monócitos	Na	Na	<b>15</b>	Na	Na
					Neutrófilos	Na	Na	<b>12</b>	Na	Na
<b>C31</b>	40/F	<b>9,6</b>	<b>0,1</b>	336	CD34+	<b>80</b>	<b>70</b>	<b>53</b>	<b>80</b>	Na
					Eritroblastos	Na	Na	Na	Na	Na
					Monócitos	Na	Na	Na	Na	Na
					Neutrófilos	<b>77</b>	<b>Neg</b>	<b>55</b>	<b>14</b>	Na

a) Hg (g/dl), valor da concentração de hemoglobina em g/dL; Neu(Va), valor absoluto dos neutrófilos; Pla(L), quantidade de plaquetas por L; b) Linhagem celular isolada por citometria de fluxo; c) Neg = negativo; Na = não aplicável ao estudo, alterações que não foram pesquisadas.

Na Figura 5 evidenciam-se alguns exemplos de células com a presença de alterações genéticas pela técnica de FISH.



**Figura 5:** Imagens de FISH com um exemplo da normalidade e anormalidade encontrada (A- FISH em células de interfase normais com a sonda *CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe Kit*; B- FISH em células de interfase com alteração genética de +8; C- FISH em células de interfase normais com a sonda *Vysis LSI EGR1/D5S23: D5S721, Vysis D7S486/Cep 7* e com alteração genética de 5q- e 7q-; D- FISH em células de interfase normais com a sonda *Vysis D20S108*; E- FISH em células de interfase e com alteração genética de 20q-; F- FISH em células de interfase normal e com alteração genética da perda do cromossoma Y)



**Figura 6:** Número de casos com 1, 2, 3 e 4 alterações genéticas em cada um dos subgrupos estudados

Fomos perceber se em função da severidade da doença se observava um maior número de casos com a presença de concomitante de mais do que uma alteração genética. Como se evidência na figura 6, a quantidade de alterações genéticas encontradas estão de acordo com gravidade do subtipo de SMD, em que no subgrupo SMD-EB-2, 3 dos 9 casos apresentavam mais do que uma alteração genética.

De modo a caracterizar melhor os cinco casos, com mais que uma alteração genética evidenciados na figura 6, fomos verificar a frequência de células CD34+ afetadas com cada uma das alterações genéticas, de modo a perceber se poderíamos perceber quais as alterações genéticas primárias e secundárias (Tabela 13).

**Tabela 13:** Casos com a presença de mais do que uma alteração genética nas células CD34+ purificadas

Casos	SMD-OMS (2016)	5q- (%)	7q-/7 (%)	20q- (%)	+8 (%)	-Y (%)
C23	SMD U/M	75	16	75	Neg	70
C11	SMD-EB-1	96	Neg	Neg	21	Na
C12	SMD-EB-2	Neg	60	55	70	Neg
C28	SMD-EB-2	Neg	20	30	Neg	Na
C31	SMD-EB-2	80	70	53	80	Na

Neg = negativo; Na = não aplicável ao estudo, alterações que não foram pesquisadas.

Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome Mielodisplásica

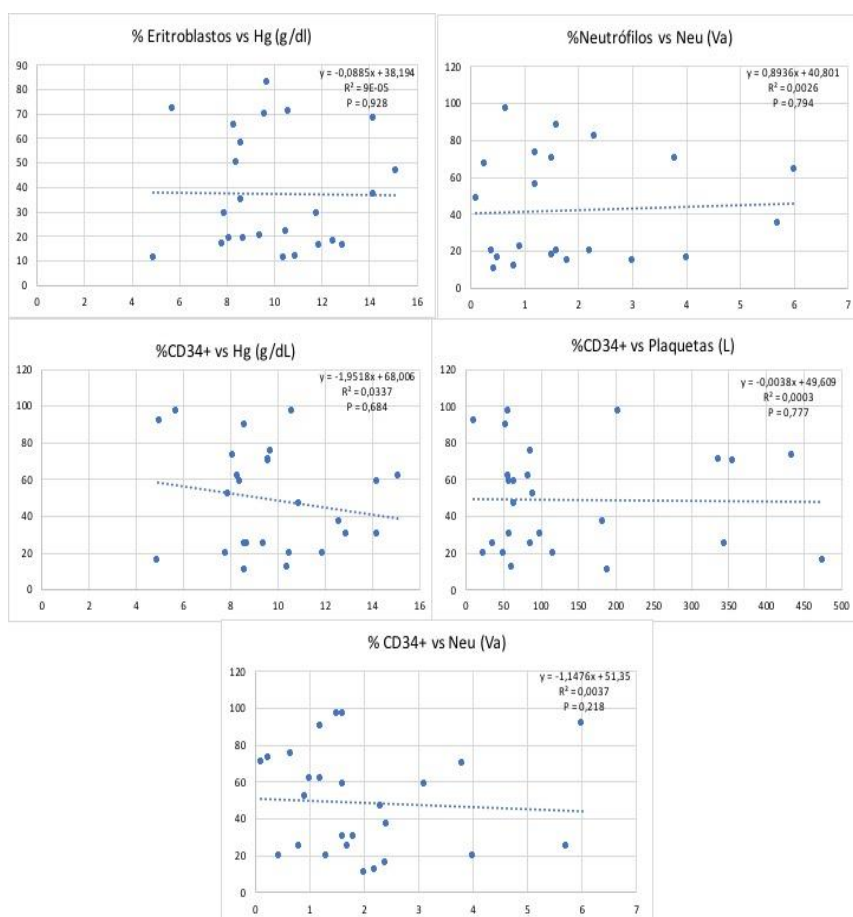
Fomos depois avaliar a % de células com uma determinada alteração genética em cada população celular estudada, bem como, nos diferentes grupos de SMD em estudo (Figura 7).



**Figura 7:** % de células com uma determinada alteração genética em cada população separada, bem como, de acordo com o subtipo de SMD

De uma maneira geral observa-se uma maior percentagem de células afetadas com uma determinada alteração genética no subgrupo da OMS SMD-EB2, quer nas células CD34+ quer nas células das diferentes linhas hematopoiéticas estudadas. Relativamente à percentagem de células afetadas de acordo com a alteração genética presente, observa-se que a deleção 20q e a trissomia do 8 parecem ser as que apresentam uma menor frequência de células afetadas, quer no compartimento CD34+ da medula óssea quer nas células das linhas do neutrófilo, monocítica e eritroide (Figura 7).

Quando se correlacionou a percentagem de neutrófilos afetados, com o valor absoluto dos neutrófilos no sangue periférico; a percentagem de eritroblastos, com a hemoglobina verificou-se que essa correlação não ocorria, obtendo-se um  $p > 0,05$ . O mesmo sucedeu para as células CD34+ e o valor absoluto de neutrófilos e de plaquetas e a concentração da hemoglobina ( $p > 0,05$ ).



**Figura 8:** Correlação entre valor de uma determinada citopenias e a percentagem de células com uma determinada alteração genética nessa mesma linha, ou nos blastos.

Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome Mielodisplásica

## 5. Discussão

A SMD consiste num grupo heterogéneo de doenças clonais da célula estaminal hematopoiética, caracterizada pela presença de citopenias e displasia em uma ou mais linhagens celulares. Apresenta-se com uma hematopoiese ineficaz, alterações genéticas recorrentes e elevado risco de progressão para LMA (Swerdlow et al. 2017). Sendo uma doença com uma enorme heterogeneidade clínica e molecular, o seu diagnóstico e classificação torna-se um grande desafio.

A seleção dos 30 casos com diagnóstico de SMD incluídos neste estudo dentro do universo de 203 casos com suspeita de SMD, foi efetuada tendo por base a presença de uma das alterações genéticas que fazem parte do perfil de SMD que o laboratório de FISH utiliza (5q-, 7q-, 20q-, +8 e -Y).

A população do estudo evidenciou maior incidência desta patologia no sexo masculino (17/30) em relação ao sexo feminino (13/30) com um pico de incidência entre os 60-79 anos. Swerdlow (2017), refere que devido à subnotificação das SMD na maioria dos registos oncológicos, que a incidência de casos de SMD seja de cerca 75:100.000 habitantes em indivíduos com >65 anos, tendo o presente estudo revelado média de idades semelhantes.

Anomalias genéticas estão presentes em 50% dos casos com diagnóstico de SMD, de acordo com estudos realizados em citogenética convencional e FISH (Visconte, Tiu, and Rogers 2014; Jhanwar 2015; Saumell et al. 2015). O cariótipo convencional é o método padrão para o estudo das alterações genética neste grupo de patologias. No entanto, cerca de 20% destes casos não são informativos, levando o clínico a optar por outras técnicas moleculares, nomeadamente, a hibridização *in situ* por fluorescência (Ciabatti et al. 2017). O estudo das alterações genéticas por FISH evidenciou a presença de 15% de casos com alterações genéticas nos 203 estudados. A frequência do número de casos com alterações genéticas de SMD primária neste estudo, não pode ser comparada com as descritas na literatura. Os casos reportados são com base em estudos de cariótipo convencional, em que são registadas todas as alterações genéticas encontradas nos 23 pares de cromossomas. Nestes 203 casos avaliados, estão incluídos muitos onde não se confirmou o diagnóstico de SMD, pelo que a frequência obtida está subvalorizada.

De um modo geral a alteração genética 5q- foi a segunda mais observada (11/30), tendo-se verificado a sua presença nos blastos e nas células das diferentes linhas hematopoiéticas (eritrócitos, monócitos e neutrófilos). Os resultados aqui reportados estão de acordo com um estudo realizado por Giagounidis (2006), em que a deleção 5q- foi encontrada nas três linhagens estudadas (eritrócitos, granulócitos e megacariócitos), justificando assim que as células mantêm a sua capacidade de diferenciação. Neste mesmo estudo quando comparou a presença de 5q- e +8, verificou, que esta última, se encontrava mais comprometida ao progenitor mieloide em comparação com a 5q-. A trissomia 8 tem sido considerada uma alteração genética de aparecimento tardio durante a fisiopatologia da doença aparecendo já num progenitor hematopoiético comprometido à linha mieloide e menos numa célula CD34+ indiferenciada (Nilsson et al. 2000; A. A. N. Giagounidis, Germing, and Aul 2006; A. Giagounidis and Haase 2013; Zahid et al. 2017). Um estudo realizado por Saumell (2015), sobre a presença da +8 por cariótipo convencional e FISH em células isoladas (granulócitos, linfócitos T e células da mucosa oral), demonstrou que a percentagem de granulócitos com a presença da trissomia do 8 era superior à observada nas outras duas populações celulares.

Neste estudo a -Y foi a menos frequente, tendo-se sido observada em 9,8% dos casos, o que já foi também verificado por outros autores. Este achado vai ao encontro ao estudo referido por Wong (2008) e Zahid (2017), que referem que esta alteração está relacionada com o envelhecimento. Embora esta alteração esteja associada à SMD e à LMA é improvável que a perda deste cromossoma seja a principal causa do aparecimento da SMD, ocorrendo secundariamente a uma mutação aleatória. Estes autores afirmam que os doentes com esta alteração possam vir a desenvolver SMD mais tarde. É cada vez mais frequente e é a única que confere um prognóstico muito bom ao doente (segundo o IPSS-R). No presente estudo esta encontrou-se com uma maior incidência no grupo SMD U/M. Ciabatti, também refere que essa deleção pode ser encontrada em 5% dos indivíduos idosos saudáveis do sexo masculino, estando associada a outras comorbidades como doenças autoimunes, doenças neurodegenerativas ou neoplasias (Ciabatti et al. 2017).

Segundo Greenberg (2012), a 20q- é um evento precoce primário a várias patologias hematológicas. A ocorrência desta alteração isolada é um marcador de



prognóstico favorável em doentes com SMD e com menor risco de progressão para LMA. Conforme referido por Padhi (2013), esta alteração genética está associada a uma displasia mínima que envolve as linhas eritroide e/ou megacariócítica. Quando está associada a outras alterações genéticas isso é sugestivo de instabilidade genética e parece cursar com a presença de displasia multilinha e um aumento de blastos. Quando se encontra isolada os doentes têm contagens de plaquetas significativamente menores ( $<100 \times 10^9/L$ ). Segundo este estudo, 14% dos doentes com 20q- isolada progrediram para LMA comparado com os 11% dos doentes que tinha esta alteração associada a outra alteração genética e os 24% que tinham mais de duas alterações associadas à 20q- (Gupta et al. 2007; Braun et al. 2011; Greenberg et al. 2012; Padhi et al. 2013).

De fato, os 7 dos 11 casos em que se detetou a presença da 20q- isolada apresentavam plaquetas  $<100 \times 10^9/L$ . A 20q- associada a mais que duas alterações genéticas, foi verificada em 4 dos 5 casos com mais que uma alteração genética (Tabela 13), indo ao encontro ao estudo mencionado por Padhi (2013).

Em vários estudos realizados sobre as alterações cromossômicas do cromossoma 7 nas SMD, são concordantes que a -7 é alteração mais comum do cromossoma 7, conferindo-lhe um pior prognóstico quando comparada com a 7q- (Cordoba et al. 2012; Greenberg et al. 2012; Hussain et al. 2012; Arber et al. 2016). Segundo Cordoba (2012), estudos por cariótipo apontam para várias alterações cromossômicas que envolve o cromossoma 7 em cerca de 20% dos doentes com SMD (incluem deleção 7q-, p-7 ou translocações que envolvem o cromossoma 7). Estas alterações foram comumente encontradas, em doentes com SMD com displasia multilinha e em SMD-EB, havendo uma maior prevalência da monossomia do 7. Num estudo realizado por Dimitriou (2016), em cultura celular de células progenitoras de granulócitos e de macrófagos (GM), verificou-se que a -7 está mais presente nas células de linha granulocítica e monocítica do que nas de linha eritróide.

Segundo Arber (2016), a -Y, +8 e 20q- foram descritas em condições não neoplásicas. Quando ocorrem como alteração isolada na ausência de critérios morfológicos, não são consideradas alterações concretas de SMD.

A frequência de cada alteração genética observada nos 30 casos de SMD incluídos neste estudo não pode ser comparada com as descritas na literatura, uma vez que estes casos foram selecionados porque apresentavam pelo menos 1 alteração genética e não representam a globalidade de casos diagnosticados com SMD (tabela 8).

Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome Mielodisplásica

Contudo, quando se pretendeu verificar a frequência das alterações genéticas por FISH nas células CD34+ purificadas da medula óssea nos subgrupos de SMD, o estudo mostrou uma maior incidência da 20q- na SMD U/M e SMD-EB-2. Enquanto que na SMD-EB-1, há um maior impacto da +8 (Figura 4).

Relativamente aos casos onde se observou a presença concomitante de mais do que uma alteração genética. De fato, de acordo com os dados obtidos, apenas 5 dos 30 casos analisados apresentavam mais que uma alteração genética (figura 6). Esta prevalência vai ao encontro ao descrito por outros autores (Swerdlow et al. 2017; Baratono et al. 2015).

Nos casos onde ocorre a presença de mais do que uma alteração genética, e através da percentagem de células CD34+ afectadas, e apesar de serem apenas 5 casos, as alterações genéticas 5q- parece corresponder sempre a uma alteração genética primária independentemente da classificação da OMS, enquanto que as outras alterações genéticas estudadas podem ocorrer tanto como primárias como secundárias (Tabela 13).

A hibridização *in situ* por fluorescência em células progenitoras hematopoiéticas purificadas parece de facto ser uma mais valia na deteção das alterações genéticas em SMD, uma vez que é nessa população celular que se verifica uma percentagem superior de células com a presença de uma determinada alteração genética, quando comparada com as observadas nos neutrófilos, monócitos e eritroblastos purificados (Figura 7), particularmente para a 5q- e -Y (Saitoh et al. 1998; Nilsson et al. 2000, 2002; Cherry et al. 2012; Wang et al. 2018; Saumell et al. 2015). Nilsson (2002), num estudo realizado em doentes com síndrome 5q- levado a cabo em células CD34+/CD38-, afirmou que a 5q- tem origem na célula-tronco hematopoiética pluripotente, representando assim um evento precoce. O grupo SMD-EB-2 é o subtipo onde se observa uma maior percentagem de células CD34+ (blastos) com uma determinada alteração genética, o que também se observava nas células de linha a neutrófilo, monocítica e eritroide, demonstrando claramente que o clone SMD é maioritária, originando uma vincada hematopoiese displásica e conseqüentemente uma rápida progressão para LMA, o que está de acordo com estudos realizados por Giagounidis (2013).

Os *cutoff's* utilizados no IPSS-R das citopenias estabelecidas para a estratificação de risco têm sido tradicionalmente usados para definir o valor das mesmas para o diagnóstico de SMD e a maioria dos pacientes com SMD tem pelo menos uma citopenia abaixo deste limiar (concentração de hemoglobina  $< 10\text{g/dL}$ , contagem de plaquetas  $< 100 \times 10^9/\text{L}$  e contagem absoluta de neutrófilos  $< 1,8 \times 10^9/\text{L}$ ). No entanto, um diagnóstico de SMD pode ainda ser feito em doentes com concentrações mais elevadas de hemoglobina (concentração de hemoglobina  $< 13\text{g/dL}$  nos homens ou  $< 12\text{g/dL}$  nas mulheres) ou de trombocitopenia (plaquetas  $< 150 \times 10^9/\text{L}$ ), caso as alterações morfológicas e citogenéticas estejam presentes (Greenberg et al. 2012). Este fato levou-nos a tentar perceber se haveria alguma relação entre o valor das citopenias periféricas e a percentagem de células com uma determinada alteração genética nas linhas onde se observava essas citopenias. Essa relação não foi observada neste estudo, o que de alguma maneira pode estar associado ao reduzido número de casos e ao facto de se terem juntado todos os casos independentemente da alteração genética presente.

De acordo com Raza (2012), as citopenias resultam, pelo menos em parte, do aumento da morte celular por apoptose. Segundo Arber (2016), não há uma correlação clara entre a citopenia e a displasia identificada. Procederam ao estudo comparativo entre a concentração de hemoglobina e o valor percentual de eritroblastos afetados, entre o valor de neutrófilos afetados e o valor absoluto de neutrófilos e verificou-se então, que não existia correlação entre eles.

## **6. Conclusões e perspectivas futuras**

Nesta dissertação demonstrou-se a importância da realização do estudo das alterações genéticas por FISH principalmente em células CD34+ purificadas, permitindo obter uma maior sensibilidade na detecção dessas mesmas alterações genéticas, ter uma ideia do tamanho do clone SMD nessas células e da hematopoiese displásica e, por outro lado, perceber quais foram as alterações genéticas primária e secundárias em casos de cariótipo complexo. Estes achados, numa amostragem maior, podem vir a contribuir para uma melhor definição do prognóstico de cada doente, mesmo dentro do mesmo subgrupo prognóstico definido pelo IPSS-R, onde ainda ocorre heterogeneidade clínica.

## 7. Referências Bibliográficas

- Arber, D.A., A. Orazi, R. Hasserjian, M.J. Borowitz, M.M. Beau Le, C.D. Bloomfield, M. Cazzola, and J.W. Vardiman. 2016. “The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia.” *Blood* 127 (20):2391–2406. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.
- Baratono, S, Reese AB., R Hehlmann, Stephen Tait, Douglas Green, Sophia Yohe, David Gisselsson, et al. 2015. “Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells.” *Methods* 4, (3):275–82. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-074-4>.
- Bejar, Rafael, Kristen E. Stevenson, Bennett A. Caughey, Omar Abdel-Wahab, David P. Steensma, Naomi Galili, Azra Raza, et al. 2012. “Validation of a Prognostic Model and the Impact of Mutations in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes.” *Journal of Clinical Oncology* 30 (27):3376–82. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.7379>.
- Braun, Thorsten, Stéphane de Botton, Anne Laure Taksin, Sophie Park, Odile Beyne-Rauzy, Valérie Coiteux, Rosa Sapena, et al. 2011. “Characteristics and Outcome of Myelodysplastic Syndromes (MDS) with Isolated 20q Deletion: A Report on 62 Cases.” *Leukemia Research*, 35(7), 863 - 867 <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.02.008>.
- Chauffaille, Maria de Lourdes L. F. 2006. “Alterações Cromossômicas Em Síndrome Mielodisplásica.” *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 28 (3):182–87. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842006000300006>.
- Cherry, Athena M., Marilyn L. Slovak, Lynda J. Campbell, Kathy Chun, Virginie Eclache, Detlef Haase, Claudia Haferlach, et al. 2012. “Will a Peripheral Blood (PB) Sample Yield the Same Diagnostic and Prognostic Cytogenetic Data as the Concomitant Bone Marrow (BM) in Myelodysplasia?” *Leukemia Research* 36 (7):832–40. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.03.013>.
- Ciabatti, Elena, Angelo Valetto, Veronica Bertini, Maria Immacolata Ferreri, Alice Guazzelli, Susanna Grassi, Francesca Guerrini, et al. 2017. “Myelodysplastic Syndromes: Advantages of a Combined Cytogenetic and Molecular Diagnostic Workup.” *Oncotarget*, 8(45), 79188-79200. doi:10.18632/oncotarget.16578

- Cordoba, Iris, José R. González-Porras, Benet Nomdedeu, Elisa Luño, Raquel De Paz, Esperanza Such, Mar Tormo, et al. 2012. “Better Prognosis for Patients with Del(7q) than for Patients with Monosomy 7 in Myelodysplastic Syndrome.” *Cancer* 118 (1):127–33. <https://doi.org/10.1002/cncr.26279>.
- Cortesão, Emília. 2014. “Caracterização Clínica e Molecular da Síndrome Mielodisplásica - Implicações e Diagnóstico”. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra.
- Dimitriou, Marios, Petter S. Woll, Teresa Mortera-Blanco, Mohsen Karimi, David C. Wedge, Helen Doolittle, Iyadh Douagi, Elli Papaemmanuil, Sten Eirik W. Jacobsen, and Eva Hellström-Lindberg. 2016. “Perturbed Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Hierarchy in Myelodysplastic Syndromes Patients with Monosomy 7 as the Sole Cytogenetic Abnormality.” *Oncotarget*, 7(45), 72685-72698. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12234>.
- Dussiau, Charles, and Michaela Fontenay. 2017. “Mechanisms Underlying the Heterogeneity of Myelodysplastic Syndromes.” *Experimental Hematology*, 58: 17 - 26. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2017.10.004>
- Gadji, Macoura, and Aline Rangel Pozzo. 2018. “From Cellular Morphology to Molecular and Epigenetic Anomalies of Myelodysplastic Syndromes.” *Genes, Chromosomes & Cancer*. <https://doi.org/10.1002/gcc.22689>.
- Giagounidis, Aristoteles A.N., Ulrich Germing, and Carlo Aul. 2006. “Biological and Prognostic Significance of Chromosome 5q Deletions in Myeloid Malignancies”. 2006. *Clinical Cancer Research*, 12 (1) 5-10. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1437>.
- Giagounidis, Aristoteles, and Detlef Haase. 2013. “Morphology, Cytogenetics and Classification of MDS”. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 26(4), 337-353. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2013.09.004>.
- Greenberg, Peter L., Heinz Tuechler, Julie Schanz, Guillermo Sanz, Guillermo Garcia-Manero, Francesc Solé, John M. Bennett, et al. 2012. “Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes.” *Blood*, 120(12), pp. 2454-2465. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-420489>.

- Greenberg, Peter L, Richard M Stone, Aref Al-Kali, Stefan K Barta, Rafael Bejar, John M Bennett, Hetty Carraway, et al. 2017. “Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.” *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* : JNCCN 15 (1):60–87.  
<https://doi.org/10.6004/JNCCN.2017.0007>.
- Gupta, Raavi, Chad P. Soupir, Vandita Johari, and Robert P. Hasserjian. 2007. “Myelodysplastic Syndrome with Isolated Deletion of Chromosome 20q: An Indolent Disease with Minimal Morphological Dysplasia and Frequent Thrombocytopenic Presentation.” *British Journal of Haematology*, 139(2):265-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06776.x>.
- Haase, Detlef. 2008. “Cytogenetic Features in Myelodysplastic Syndromes.” *Annals of Hematology*, pp.515-526. <https://doi.org/10.1007/s00277-008-0483-y>.
- Hussain, Fareeda Taher Nazer, Edward P. Nguyen, Sania Raza, Ryan Knudson, Animesh Pardani, Curtis A. Hanson, Daniel Van Dyke, and Ayalew Tefferi. 2012. “Sole Abnormalities of Chromosome 7 in Myeloid Malignancies: Spectrum, Histopathologic Correlates, and Prognostic Implications.” *American Journal of Hematology*, Vol. 87, No. 7, 07.2012, p. 684-686  
<https://doi.org/10.1002/ajh.23230>.
- Jhanwar, Suresh C. 2015. “Genetic and Epigenetic Pathways in Myelodysplastic Syndromes: A Brief Overview.” *Advances in Biological Regulation*, 58: 38-37.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.11.002>.
- Kennedy, James A., and Benjamin L. Ebert. 2017. “Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome.” *Journal of Clinical Oncology*, 20;35(9):968-974. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.0806>.
- Metze, Konradin, Suiellen Reis-Alves, and Irene Lorand-Metze. 2017. “The World Health Organisation Classification of Myelodysplastic Syndromes Contains Prognostically Relevant Information beyond the Prognostic Scores IPSS-R or WPSS.” *European Journal of Cancer*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.11.030>.
- Nilsson, Lars, Ingrid Åstrand-Grundström, Kristina Anderson, Ingrid Arvidsson, Peter
- Alterações genéticas em células isoladas na Síndrome Mielodisplásica

- Hokland, David Bryder, Lars Kjeldsen, et al. 2002. "Involvement and Functional Impairment of the CD34+CD38-Thy-1+hematopoietic Stem Cell Pool in Myelodysplastic Syndromes with Trisomy 8." *Blood* 100 (1):259–67. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0188>.
- Nilsson, Lars, Ingbritt Åstrand-Grundström, Ingrid Arvidsson, Björn Jacobsson, Eva Hellström-Lindberg, Robert Hast, and Sten E W Jacobsen. 2000. "Isolation and Characterization of Hematopoietic Progenitor/Stem Cells in 5q-Deleted Myelodysplastic Syndromes: Evidence for Involvement at the Hematopoietic Stem Cell Level." *Blood* 96 (6):2012–21.
- Padhi, Somanath, Renu G Boy Varghese Varghese, Manjiri Dilip Phansalkar, and Rajlaxmi Sarangi. 2013. "Isolated Deletion of the Long Arm of Chromosome 20 [Del(20q12)] in Myelodysplastic Syndrome: A Case Report and Literature Review." *Singapore Medical Journal* 54 (9):185-9. <https://doi.org/10.11622/smedj.2013119>.
- Raza, Azra, and Naomi Galili. 2012. "The Genetic Basis of Phenotypic Heterogeneity in Myelodysplastic Syndromes." *Nature Reviews Cancer*, 12(12):849-859. <https://doi.org/10.1038/nrc3321>.
- Riegel, Mariluce. 2014. "Human Molecular Cytogenetics: From Cells to Nucleotides." *Genetics and Molecular Biology*, 37(1), 194-209. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572014000200006>.
- Saitoh, K, I Miura, N Takahashi, and a B Miura. 1998. "Fluorescence in Situ Hybridization of Progenitor Cells Obtained by Fluorescence-Activated Cell Sorting for the Detection of Cells Affected by Chromosome Abnormality Trisomy 8 in Patients with Myelodysplastic Syndromes." *Blood*, 92(8):2886-92
- Saumell, Sílvia, Francesc Solé, Leonor Arenillas, Julia Montoro, David Valcárcel, Carme Pedro, Carmen Sanzo, et al. 2015. "Trisomy 8, a Cytogenetic Abnormality in Myelodysplastic Syndromes, Is Constitutional or Not?" *PLoS ONE*, 10(6):e0129375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129375>.
- Shallis, Rory, Rami Ahmad, and Amer M. Zeidan. 2018. "The Genetic and Molecular Pathogenesis of Myelodysplastic Syndromes." *European Journal of Haematology*. <https://doi.org/10.1111/ejh.13092>.
- Swerdlow, Steven, Elias Campo, Nancy Lee Harris, Elaine S Jaffe, Stefano A Pileri,



Harald Stein, Jurgen Thiele, et al. 2017. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Revised 4<sup>th</sup> Edition. *International Agency for Research on Cancer*. Lyon

D. Taştemir, O. Demirhan, E. Gürkan, E. Tunç and N. İnandıklıoğlu, "Applications of Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) for Detecting Genetic Changes in Hematological Malignancies," *Journal of Cancer Therapy*, Vol. 2 No. 2, 2011, pp. 125-134. doi: 10.4236/jct.2011.22014.

Visconte, Valeria, Ramon V. Tiu, and Heesun J. Rogers. 2014. "Pathogenesis of Myelodysplastic Syndromes: An Overview of Molecular and Non-Molecular Aspects of the Disease." *Blood Research*, 49: 216-227  
<https://doi.org/10.5045/br.2014.49.4.216>.

Wang, Cong, Yan Yang, Sujun Gao, Jingcheng Chen, Jinyuan Yu, Han Zhang, Mingxi Li, Xingying Zhan, and Wei Li. 2018. "Immune Dysregulation in Myelodysplastic Syndrome: Clinical Features, Pathogenesis and Therapeutic Strategies." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 122:123–32.  
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.12.013>.

Waters, J J, A L Barlow, and C P Gould. 1998. "J J Waters, A L Barlow, C P Gould." *In Situ*, *J. Clin. Pathol: Mol Pathol*, 51 pp. 62–70.

Wong, Anna K., Belle Fang, Ling Zhang, Xiuqing Guo, Stephen Lee, and Rhona Schreck. 2008. "Loss of the Y Chromosome: An Age-Related or Clonal Phenomenon in Acute Myelogenous Leukemia/Myelodysplastic Syndrome?" *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 132 (8):1329–32.  
[https://doi.org/10.1043/1543-2165\(2008\)132\[1329:LOTYCA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/1543-2165(2008)132[1329:LOTYCA]2.0.CO;2).

Zahid, M. F., Malik, U. A., Sohail, M., Hassan, I. N., Ali, S., & Shaukat, M. (2017). Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes: An Overview. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, 11(3), 231-239. <https://doi.org/10.1179/102453311X12940641877966>.

