



Instituto Politécnico de Coimbra
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra
Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



Alterações genéticas em síndromes mielodisplásicas: definição da sequência de aparição de ditas alterações genéticas mediante técnica de FISH interfásica em diferentes compartimentos de células hematopoiéticas da medula óssea

Catarina Isabel Amaral Lopes

Coimbra

2011



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

Alterações genéticas em síndromes mielodisplásicas: definição da sequência de aparição de ditas alterações genéticas mediante técnica de FISH interfásica em diferentes compartimentos de células hematopoiéticas da medula óssea

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Alberto Órfão, do Centro de Investigação do Cancro de Salamanca e co-orientação do Mestre António José Gabriel, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Catarina Isabel Amaral Lopes

Coimbra

2011

Agradecimentos

Para a realização desta tese de dissertação agradeço o apoio prestado pelos orientadores e co-orientadores, nomeadamente ao Professor Doutor Alberto Órfão e Mestre António José Gabriel, bem como o auxílio de todos os colaboradores do Centro de Histocompatibilidade do Centro para a realização de toda a componente prática deste trabalho, particularmente à Dra. Luísa Pais, ao Doutor Artur Paiva, à Mestre Ana Henriques e Paula Laranjeira.

**Constituição do
Juri**

Prof. Doutor Artur Augusto Paiva

Equiparado a Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Prof. Doutora Ana Bela Sarmento Ribeiro

Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Prof. Doutor Alberto Órfão

Professor Catedrático do Departamento de Medicina da Universidade de Salamanca

Mestre António José dos Santos Gabriel

Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Resumo

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são um grupo de distúrbios clonais caracterizadas por uma hematopoiese ineficaz evoluindo 20-30% dos casos para Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA). São descritas diferentes alterações citogenéticas (del 5q, del 7q, -Y, del 20q e trissomia 8) em cerca de 50-60% dos pacientes com SMD primário e até 80% nos secundários, preponderantes para o desenvolvimento da patologia, bem como avaliação prognóstica, monitorização da resposta terapêutica e avaliação da sobrevida e risco de evolução para leucemia. Diferentes metodologias são utilizadas no estudo citogenético, nomeadamente a técnica de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH) Interfásica, que apresenta uma maior sensibilidade e aplicabilidade.

Foi objectivo desta tese de dissertação a identificação das alterações citogenéticas mais frequentes em cada linha celular estudada (células CD34+, neutrófilo, monócito, eritrócito, linfócito, basófilo, mastócito, eosinófilo e célula plasmática) bem como procurar estabelecer uma linha orientadora do ponto de vista da sequência de aparição das referidas alterações genéticas nos diferentes compartimentos celulares.

Foram estudadas 42 amostras de medula óssea de doentes com SMD, dos quais 10 são CRDM, 11 são AREB-I, 15 são AREB-II, 4 são Síndromes mieloproliferativas SMP/SMD, uma amostra com displasia ligeira e uma amostra classificada como LMA secundária a SMD, sendo 5 do sexo feminino e 37 do sexo masculino. Efetuou-se uma separação celular por *cell sorting* das populações celulares de interesse e posteriormente realizou-se um protocolo de FISH para a identificação das dita alterações genéticas.

Os resultados deste estudo sugerem uma incidência relativamente significativa das diferentes alterações citogenéticas nas distintas linhas celulares de cada amostra. De modo particular, são observados alguns casos que sugerem um aparecimento secundário das alterações citogenéticas estudadas ao longo da maturação celular. Nos casos de CRDM parece surgir inicialmente a deleção 5q e 7q e numa fase posterior a perda do cromossoma Y e a deleção 20q. Por sua vez, nos casos de AREB, parece surgir em primeiro lugar a deleção 7q seguida da deleção 5q e da trissomia 8, aparecendo raramente a perda do cromossoma Y e do 20q. Os resultados apontam para a ocorrência de alterações genéticas em mielodisplasia e em distintas linhas celulares com implicações ao nível do prognóstico, avaliação da resposta terapêutica e sobrevida dos doentes.

Palavras-Chave: alterações citogenéticas, síndromes mielodisplásicas, técnica de FISH interfásica

Abstract

The myelodysplastic syndromes (MDS) are a group of clonal disorders characterized by impaired hematopoiesis and 20-30% evolves for Acute Myeloblastic Leukemia (AML). There are recognized different cytogenetic features (del 5q, del 7q, -Y, del 20q and trisomy 8) in about 50-60% of primary myelodysplastic syndromes and until 80% of secondary MDS, prevalent for pathogenesis, prognostic evaluation, therapeutic and overall survival analysis and risk of leukemic transformation.

Different methods are used for cytogenetic study, namely Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH), which is more sensitive and with more applications.

The aim of this thesis was the identification of the most frequent cytogenetic alterations in each cellular line (CD34+ cells, neutrophil, monocyte, erythrocyte, lymphocyte, basophil, mast cell, eosinophil and plasma cell) and establish a guideline for the time of appearance of such cytogenetic alterations in the different compartments of bone marrow hematopoietic cells from myelodysplastic syndromes patients.

For this purpose 42 MDS bone marrow samples were studied: 10 were RCMD, 11 RAEB-I, 15 RAEB-II, 4 MPS/MDS, one sample with slight dysplasia and one sample classified as AML secondary to myelodysplasia, 5 of them female and 37 male. After a cell sorting procedure, to obtain different cellular populations, a hybridization protocol was performed to identify the studied cytogenetic anomalies.

The results pointed to a relative incidence of cytogenetic alterations in the different cell lines studied. Distinctly, some cases suggested a secondary appearance of the referred cytogenetic alterations along cellular maturation. In RCMD cases it seems to initially arise the deletion of 5q and 7q, and at a later stage the loss of Y chromosome and 20q. In turn, in RAEB cases the first genetic abnormality appearing is the deletion of 7q followed by the deletion of 5q and trisomy 8, and rarely the loss of Y chromosome and 20q.

These results pointed for the occurrence of cytogenetic features in patients with myelodysplasia and in distinct cellular lines providing new insights in terms of additional relevant clinical and prognostic information.

Keywords: cytogenetic, myelodysplastic syndromes, Interphase FISH

Índice

Índice	i
Lista de figuras	ii
Lista de tabelas	iii
Introdução	1
Objectivos	6
Material e Métodos	7
Resultados	9
Discussão	25
Conclusão	27
Bibliografia	28

Lista de figuras

Figura 1: Imagens obtidas pelo protocolo FISH para o estudo das alterações citogenéticas (deleção 5q e monossomia 7) por comparação com situações de ausência de alterações citogenéticas (adaptado de MaKishima H, *et al*, 2010)

Figura 2: Representação esquemática da sequência de aparição das alterações citogenéticas para os casos clínicos de CRDM (n = 10)

Figura 3: Representação esquemática da sequência de aparição das alterações citogenéticas para os casos clínicos de AREB (n = 26)

Lista de tabelas

Tabela 1: Dados obtidos pela técnica de FISH Interfásica para o estudo das alterações citogenéticas (delecção 7q, delecção 5q, trissomia 8, perda do cromossoma Y e delecção 20q) na linha a célula CD34+, neutrófilo, monócito, eritrócito, linfócito, eosinófilo, basófilo, mastócito e célula plasmática de 42 amostras de medula óssea de doentes com síndromes mielodisplásicas

Tabela 2: Indicação das amostras de medula óssea de doentes com síndromes mielodisplásicas com evidência de aquisição secundária da alteração citogenética delecção 20q e trissomia 20q na linha a neutrófilo

Introdução

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são um grupo heterogêneo de neoplasias clonais caracterizadas por uma hematopoiese ineficaz, combinando uma medula hiperativa com uma ou mais citopenias periféricas, displasia em uma ou mais das principais linhas celulares mielóides e instabilidade genética, em que 20-30% dos casos evoluem para Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) (1-12).

De acordo com a sua etiologia são designadas de primárias (*de novo*) ou secundárias quando na sequência de um evento mutagénico (1).

O sistema de classificação que vinha a ser utilizado até 2001 era a FAB (French American British), que assentava principalmente na citomorfologia, tendo mais recentemente a Organização Mundial de Saúde introduzido novos subgrupos reconhecendo, para além da morfologia, as características imunofenotípicas, genéticas e clínicas na definição de novas entidades de neoplasias clonais (1-3, 5,6,9,10).

Na prática clínica, os sistemas de classificação são de maior utilidade quando combinados com outros orientados para o prognóstico, nomeadamente o sistema IPSS (*International Prognostic Scoring System*). Este sistema é baseado na percentagem de blastos da medula óssea, alterações citogenéticas e número de citopenias periféricas e estratifica os pacientes em quatro grupos com risco distinto de sobrevida e transformação leucémica (1,2,4-6,10-14). Estudos recentes reportam a falta de aplicabilidade e a limitação deste sistema, no que respeita à exclusão de alguns subgrupos representativos de uma parte significativa de doentes com mielodisplasia tendo sido proposto um novo modelo de avaliação de risco com inclusão de novos critérios (IPSS- R) (6,15).

A citogenética desempenha um papel preponderante não só para o diagnóstico, classificação e predição prognóstica, mas também para a detecção dos mecanismos moleculares subjacentes à patologia e na escolha e monitorização terapêutica (11,16,17).

Diferentes alterações cromossómicas têm sido identificadas em cerca de 50-60% dos doentes com SMD primário e até 80% nos secundários (17).

A ocorrência de lesões genéticas contribui para a patogénese desta entidade pelo aumento da sobrevida das células progenitoras hematopoiéticas alteradas, desenvolvimento displásico em diferentes linhas celulares, aumento do potencial apoptótico e alterações na instabilidade genómica (7,18,19).

As síndromes mielodisplásicas estão geralmente associadas a perda de material cromossómico, quer por monossomia, deleção ou translocações desproporcionadas; de

modo menos frequente ocorre ganho de material genético na forma de trissomias totais ou parciais.

Destas alterações as mais frequentes são: a perda do braço longo do cromossoma 5 (del 5q), a deleção 7q, a deleção 20q, a trissomia 8 (+8) e perda do cromossoma Y (3,16-18,20-23).

Do ponto de vista prognóstico, as alterações citogenéticas estão organizadas em três grupos de risco, nomeadamente: as que conferem bom prognóstico (presença de cariótipo normal, deleção 5q, deleção 20q e perda do cromossoma Y); mau prognóstico (designadamente a ocorrência de cariótipo complexo, ou seja existência de mais de 3 alterações e que surge em 30% dos casos; assim como deleção 7q e monossomia 7 enquanto alteração isolada ou em associação a outras) e prognóstico intermédio (que inclui todas as outras alterações) (3,16,20,22,24,25).

Deleções intersticiais do braço longo (q) do cromossoma 5, a del 5q, com ou sem alterações cariotípicas adicionais, são as alterações cromossómicas mais frequentes nas síndromes mielodisplásicas, presentes em cerca de 30% dos doentes, dos quais 14% representam a alteração isolada, 5% com outra anomalia adicional e 11% como parte de cariótipo complexo (26,27).

O síndrome 5q-, definido pela Organização Mundial de Saúde como entidade patológica distinta, é caracterizada pela deleção 5q isolada e menos de 5% de blastos na medula óssea. Esta situação clínica apresenta predominância do sexo feminino, megacariócitos hipolobulados, anemia macrocítica refractária e contagem plaquetar normal ou aumentada. Apresenta prognóstico favorável nas síndromes mielodisplásicas primárias e baixo risco de evolução para leucemia mieloblástica aguda (17,26,28).

Na maioria dos doentes, a deleção estende-se da região 5q12 a 5q35, contendo vários genes envolvidos na regulação da hematopoiese, nomeadamente citocinas e seus receptores, reguladores do ciclo celular, factores de transcrição, mediadores de vias de sinalização celular e genes supressores tumorais embora a sua existência ainda não esteja completamente comprovada, e cuja haploinsuficiência contribui para a patogénese desta entidade patológica.

Um dos genes mais relevantes identificados na região cromossómica 5q32 é o gene RPS14 que codifica para a subunidade ribossómica S14, uma pequena proteína essencial para a montagem das subunidades ribossómicas. A diminuição na expressão deste gene compromete a eritropoiese e contribui, deste modo para o fenótipo das síndromes mielodisplásicas (3,8,17,18,20,28-30).

A frequência desta alteração, assim como outras alterações cromossómicas nas síndromes mielodisplásicas, reforçam a ideia de que não se tratam de eventos aleatórios mas sim reflexo de evolução clonal e um processo patogénico faseado, segundo o qual, lesões genéticas primárias, adquiridas ou causadas por mutação espontânea no compartimento das células hematopoiéticas, promovem a aquisição de lesões genéticas secundárias, caracterizadas por perdas ou ganhos de regiões cromossómicas específicas. Estes eventos posteriores, por sua vez, afectam o ciclo celular, a transcrição e a actividade supressora tumoral, providenciando uma capacidade expansiva do clone e evolução leucémica.

Na medula óssea de pacientes com síndrome 5q-, a deleção é encontrada nas três principais linhas hematopoiéticas (eritroblastos, precursores granulocíticos e megacariócitos), consistente com a transformação da célula progenitora hematopoiética. Várias linhas de estudo reforçam a ideia do compartimento das células progenitoras como origem da deleção 5q (28).

Por sua vez, alterações envolvendo o cromossoma 7 ocorrem em cerca de 20% dos casos e incluem geralmente deleção parcial do braço longo (del7q), a perda total do cromossoma 7 (monossomia 7) e que confere pior prognóstico, ou ainda translocações implicando este cromossoma (31,32).

Clinicamente estas alterações são indicadores de maior susceptibilidade a infecções, pior resposta terapêutica e redução da sobrevida dos doentes (31).

Em cerca de 80% destas alterações, as deleções 7q ocorrem fundamentalmente em duas regiões, a 7q22 e 7q31, com a conseqüente perda de múltiplos genes implicados na patogénese de neoplasias mielóides, principalmente genes supressores tumorais (8,17,18,20,31).

É referido em vários estudos a capacidade da deleção 7q nas síndromes mielodisplásicas evoluir para a perda completa deste cromossoma, igualmente associado à progressão da doença (31).

A trissomia 8, a mais comum, é frequentemente associada às síndromes mielodisplásicas, ocorrendo em cerca de 10% dos casos clínicos. Enquanto alteração isolada surge em 2/3 dos casos e é relativamente frequente noutras patologias hematológicas. Considerada de prognóstico intermédio, vários autores sugerem uma reorganização do próprio sistema dada a heterogeneidade das alterações encontradas neste grupo de risco. Nas síndromes mielodisplásicas, a trissomia 8 ocorre adicionalmente a outras alterações em aproximadamente 5% dos casos e cujo impacto clínico não é completamente conhecido (22).

A incidência, predominante no sexo feminino, tende a aumentar com a idade e depende adicionalmente de prévia exposição a agentes genotóxicos e morfologia celular; enquanto alteração genética isolada é mais frequente nas síndromes mielodisplásicas primárias.

O impacto patogénico desta alteração permanece inconclusivo, contudo vários mecanismos de alteração da expressão génica são referenciados em diferentes estudos, possivelmente resultante do efeito-dose gerado pela trissomia, com a consequente sobre expressão de genes anti-apoptóticos e aumento da proliferação e sobrevivência celulares. É geralmente aceite que a trissomia 8 nas síndromes mielodisplásicas é uma alteração adquirida, estando presente apenas nas células neoplásicas (17,18,33-35).

Vários estudos desenvolvidos em síndromes mielodisplásicas revelam a ocorrência desta alteração no compartimento mielóide, incluindo frequentemente granulócitos, monócitos, megacariócitos e eritroblastos (34).

No que respeita a outra alteração igualmente frequente em mielodisplasia, a deleção do braço longo do cromossoma 20 (del20q), ocorre em cerca de 4% dos casos clínicos.

Geralmente estende-se da região cromossómica 20q11.2 à 20q12, hipoteticamente contendo genes supressores tumorais, cuja perda confere capacidade proliferativa (8,17,18,36-39).

Trata-se de uma alteração citogenética primária em patologias mielóides, aparecendo geralmente de modo isolado, ou enquanto evento inicial em cariótipos isolados e envolve a linha mielóide preferencialmente precursor eritroide e megacariocíticos (37,38).

Fortes evidências apontam para o facto de que a ocorrência tardia desta alteração cromossómica durante a evolução da doença é um indicador de instabilidade genómica e poderá estar associado a pior prognóstico (18).

De modo menos relevante, a perda isolada do cromossoma Y surge em 10% dos casos clínicos de síndromes mielodisplásicas, tratando-se de um evento fundamentalmente dependente da idade e não associado a distúrbios hematológicos.

O mecanismo subjacente a esta alteração ainda não é claro, conhecendo-se poucos genes neste cromossoma com expressão patogénica no desenvolvimento de neoplasias hematológicas (17,18,40).

A perda do cromossoma Y é também reconhecida em vários tumores sólidos, não se encontrando correlação entre a extensão da perda deste cromossoma e a progressão e a agressividade tumoral.

Dada a elevada heterogeneidade no campo da patogénese molecular, um melhor conhecimento dos mecanismos de desregulação genica subjacente adquire cada vez mais relevância na abordagem clínica desta neoplasia hematológica (17).

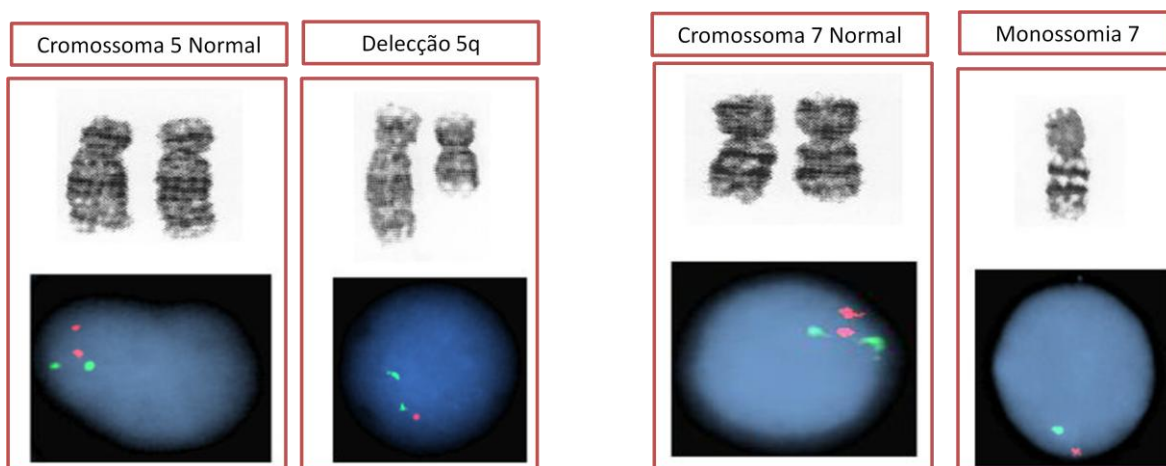
Apesar da análise citogenética convencional ser o método de referência, novas técnicas mais sensíveis são aplicadas no estudo de neoplasias hematológicas designadamente o FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*).

Genericamente este procedimento baseia-se na hibridização de material genético do doente em estudo com sondas de DNA marcadas com fluorocromos para a posterior identificação de sequências genómicas específicas (como se observa na figura 1).

Existem diferentes aplicações e variantes desta metodologia, contudo, a principal vantagem da técnica de FISH interfásica é a capacidade de análise cromossómica em todos os tipos celulares, embora, limitada ao conhecimento prévio das regiões genómicas em estudo para a selecção adequada e específica das sondas de DNA (10,41-45). Permite igualmente a identificação de clones com baixo índice mitótico e pequenas deleções cromossómicas não detectadas pela análise citogenética convencional (46).

Trata-se de uma técnica muito útil na definição e monitorização de alterações cromossómicas adquiridas subjacentes a neoplasias hematológicas bem como na monitorização terapêutica e remissão da doença, superando a citogenética convencional na identificação de tais alterações genéticas (46,47).

Figura 1: Imagens obtidas pelo protocolo FISH para o estudo das alterações citogenéticas (deleção 5q e monossomia 7) por comparação com situações de ausência de alterações citogenéticas (adaptado de MaKishima H, *et al*, 2010)



Objectivos

Este estudo teve como objectivos a identificação das alterações citogenéticas mais frequentes, em populações de células purificadas da medula óssea de doentes com síndromes mielodisplásicas, mediante uma técnica de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH). Pretendeu-se, mediante a aplicação deste protocolo em diferentes compartimentos de células hematopoiéticas da medula óssea obtidos por *cell sorting*, estabelecer uma linha orientadora no sentido da sequência de aparição das alterações citogenéticas correlacionando-a com a classificação da Organização Mundial de Saúde das Síndromes Mielodisplásicas.

Material e Métodos

População

Para a técnica de FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*) Interfásica, foram estudadas 42 amostras de medula óssea de doentes com síndromes mielodisplásicas, sendo 5 do sexo feminino e 37 do sexo masculino, efectuando-se uma separação celular por *cell sorting* das populações celulares de interesse para o estudo, com posterior armazenamento numa mistura de metanol e ácido acético (Solução de Carnoy) a -20°C. As amostras seleccionadas para o estudo foram enviadas do Centro de Investigação do Cancro de Salamanca tendo sido obtido o consentimento informado dos doentes implicados. Em relação à classificação da Organização Mundial de Saúde para as Síndromes Mielodisplásicas, das 42 amostras estudadas, 10 são CRDM (Citopenia Refractária com Displasia Multilínea), 11 são AREB-1 (Anemia Refractária com Excesso de Blastos), 15 são AREB-2 e 4 são Síndromes Mieloproliferativas/Síndromes Mielodisplásicas. Há ainda a considerar uma amostra com indicação de displasia ligeira e uma amostra de LMA secundária a SMD.

Estudo das alterações citogenéticas (del 5q, del 7q, +8, -Y, del 20q) por técnica de FISH Interfásica em diferentes linhas celulares em doentes com Síndromes Mielodisplásicas

O estudo das diferentes alterações citogenéticas nas síndromes mielodisplásicas foi realizado pela técnica de FISH interfásica, seguindo-se, para o efeito um protocolo de hibridização.

Em primeiro lugar, as células são centrifugadas durante 10 minutos a 3000 rpm, o sobrenadante é retirado para outro tubo eppendorf e as células são bem agitadas. De seguida pipetam-se 1 a 2 gotas das células em suspensão dentro do quadrado previamente desenhado nas lâminas de polilissina, com a observação simultânea da densidade das células ao microscópio. De seguida, o sobrenadante é novamente adicionado às células e estas guardadas a -20°C.

Deixam-se secar bem as lâminas e são mergulhadas numa mistura em partes iguais de metanol e ácido acético durante 10 minutos.

Depois de secas, adicionam-se 8µl da sonda diluída correspondente (LSI EGR1/D5S23, D5S721Dual Colour para a alteração 5q31; LSI D7S486 Spectrum Orange/CEP 7 Spectrum Green para a alteração 7q31; LSI D20S108 para a alteração 20q12; CEP 8 para a trissomia 8 e CEP Y para a perda do cromossoma Y) sobre as células fixadas, tapa-se com uma lamela (22x22mm), enrolam-se as lâminas em parafilm e são colocadas imediatamente na placa de hibridização (ThermoBrite® da Abbott Molecular e o Hibridizer® da Dako Cytomation) previamente ligada no programa correcto.

Posteriormente são preparadas as soluções de lavagem, aquecendo-se, em primeiro lugar um jarro com a solução 0,4X SSC/0,4%NP-40 no banho a 72°C, e outro jarro à temperatura ambiente com a solução 2X SSC/0,1%NP-40.

As lâminas são retiradas da placa de hibridização, é removido o parafilm envolvente e a lamela e são colocadas durante 2 minutos na solução que está no banho a 72°C e de seguida colocadas durante 1 minuto na solução à temperatura ambiente.

Por fim, deixam-se secar bem as lâminas e adicionam-se 10µl de Vectashield®, tapando-se, posteriormente com uma lamela (25x40mm) tendo o cuidado de não deixar bolhas de ar. As lâminas devem ser guardadas a -20°C durante pelo menos 1 hora antes de serem visualizadas ao microscópio de fluorescência e os resultados são interpretados a partir do perfil de marcação das sondas.

Resultados

A técnica de FISH interfásica permitiu o estudo das alterações citogenéticas mais frequentemente encontradas em síndromes mielodisplásicas, nomeadamente a deleção 7q, deleção 5q, trissomia do cromossoma 8, perda do cromossoma Y e deleção 20q. Os resultados obtidos em diferentes linhas celulares (células CD34+, neutrófilo, monócito, eritrócito, linfócito, basófilo, mastócito, eosinófilo e célula plasmática) das 42 amostras estudadas (5 do sexo feminino e 37 do sexo masculino) estão resumidos na tabela 1.

Verifica-se nas várias amostras que a ocorrência de alterações citogenéticas nas células CD34+ é acompanhada da mesma ocorrência nas células comprometidas às diferentes linhas celulares mielóides. Tratam-se portanto de eventos primários adquiridos desde logo na célula mais primitiva.

No entanto observam-se exceções, em que, nas amostras indicadas na tabela 2 são identificadas alterações citogenéticas, nomeadamente a deleção 20q (excepcionalmente ocorre um caso de trissomia 20q na linha a neutrófilo) nas células comprometidas a linha a neutrófilo e que não surgem na linha a célula CD34+. Tratam-se, neste caso de eventos adquiridos secundariamente.

Importa referenciar a ocorrência de algumas formas ditas aberrantes a estas alterações estudadas, nomeadamente tetrassomia do cromossoma 8, dissomia do cromossoma Y e trissomia 20q, em vez da deleção, situação mais frequente. Esta situação surge numa amostra classificada como LMA secundária a uma mielodisplasia.

Na linha a linfócito não foram identificadas as alterações citogenéticas estudadas, reforçando a incidência e o papel das referidas alterações na linha mielóide.

Nos casos estudados de linha a basófilo e mastócito, nas formas mais agressivas de mielodisplasia, a deleção 7q considerada de mau prognóstico é a mais frequente. No entanto importa salientar que se trata de poucos casos, não sendo representativos da população estudada.

Nas amostras estudadas que apresentam mais do que uma alteração citogenética, verifica-se para os casos de Citopenia Refractária com Displasia Multilínea (CRDM), que parece surgir em primeiro lugar a deleção 5q de modo isolado ou em associação com a deleção 7q (em alguns casos é sugestivo o aparecimento quase simultâneo destas duas alterações), enquanto numa fase posterior surge a perda do cromossoma Y e a deleção 20q de modo menos representativo, como se verifica no esquema da figura 2.

Por sua vez, nos casos de Anemia Refractária com Excesso de Blastos (AREB-1 e 2), representados esquematicamente na figura 3 parece destacar-se a deleção 7q enquanto evento inicial; no entanto, aparece fortemente marcada a deleção 5q em associação a esta alteração citogenética, enquanto numa fase mais tardia surge a trissomia 8. Menos frequentemente surgem a perda do cromossoma Y e a deleção 20q.

Tabela 1: Dados obtidos pela técnica de FISH Interfásica para o estudo das alterações citogenéticas (delecção 7q, delecção 5q, trissomia 8, perda do cromossoma Y e delecção 20q) na linha a célula CD34+, neutrófilo, monócito, eritrócito, linfócito, eosinófilo, basófilo, mastócito e célula plasmática de 42 amostras de medula óssea de doentes com síndromes mielodisplásicas

NºAmostra/ Class.OMS	Sexo	Linha celular a	Alterações Cromossómicas				
			7q31	5q31	Cr8	CrY	20q12
1 (CRDM)	M	<i>Célula CD34+</i>	N ⁽¹⁾	N	94%Trissomia	58% Delecção	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	84%Trissomia	68% Delecção	N
		<i>Monócito</i>	N	N	90%Trissomia	56% Delecção	N
		<i>Eritrócito</i>	N	N	88%Trissomia	67% Delecção	N
2 (CRDM)	M	<i>Célula CD34+</i>	Sem células ⁽²⁾	67% Delecção	Sem células	Sem células	Sem células
		<i>Neutrófilo</i>	N	70% Delecção	N	11% Delecção	N
		<i>Monócito</i>	N	64% Delecção	N	13% Delecção	N
		<i>Eritrócito</i>	N	49% Delecção	N	57% Delecção	N
		<i>Linfócito</i>	N	N	N	N	N
3 (CRDM)	M	<i>Célula CD34+</i>	63% Delecção	80% Delecção	Sem células	Sem células	Sem células
		<i>Neutrófilo</i>	70% Delecção	43% Delecção	N	N	54% Delecção
		<i>Monócito</i>	72% Delecção	50% Delecção	N	N	26% Delecção
		<i>Basófilo</i>	43% Delecção	43% Delecção	Sem células	Sem células	Sem células
		<i>Eosinófilo</i>	57% Delecção	62% Delecção	N	N	57% Delecção

Alterações Cromossómicas							
NºAmostra/ Class.OMS	Sexo	Linha celular a	7q31	5q31	Cr8	CrY	20q12
4 (CRDM)	M	<i>Célula CD34+</i>	79.5% Delecção	74% Delecção	N	8% Delecção	11% Delecção
		<i>Neutrófilo</i>	25% Delecção	23%Delecção	N	11% Delecção	N
		<i>Monócito</i>	N	N	N	11% Delecção	N
		<i>Eritrócito</i>	76% Delecção	71% Delecção	N	N	17% Delecção
5 (CRDM)	M	<i>Cél.CD34+ DR+</i>	22% Delecção	22% Delecção	N	N	N
		<i>Cél.CD34+ DR-</i>	96% Delecção	80% Delecção	N	22% Delecção	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	N	N	N
		<i>Monócito</i>	N	N	N	N	N
		<i>Eritrócito</i>	79% Delecção	74% Delecção	N	N	N
6 (CRDM)	M	<i>Célula CD34+</i>	93% Delecção	40% Delecção	N	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	92% Delecção	N	N	N	N
		<i>Monócito</i>	97% Delecção	N	N	N	N
		<i>Eritrócito</i>	98% Delecção	N	N	N	N
		<i>Linfócito</i>	N	N	N	N	N
7 (CRDM)	M	<i>Célula CD34+</i>	N	85% Delecção	N	N	51% Delecção
		<i>Neutrófilo</i>	N	95% Delecção	N	N	88% Delecção
		<i>Monócito</i>	Sem células	26% Delecção	Sem células	Sem células	17% Delecção
		<i>Eritrócito</i>	N	83% Delecção	N	N	81% Delecção

Alterações Cromossómicas

NºAmostra/ Class.OMS	Sexo	Linha celular a	7q31	5q31	Cr8	CrY	20q12
8 (CRDM)	M	<i>Célula CD34+</i>	Sem células	71% Delecção	Sem células	Sem células	Sem células
		<i>Neutrófilo</i>	N	17.5% Delecção	N	N	N
		<i>Monócito</i>	N	14% Delecção	N	N	N
		<i>Basófilo</i>	N	32.5% Delecção	N	N	N
9 (CRDM)	F	<i>Célula CD34+</i>	17% Delecção	77% Delecção	N	/	N
		<i>Neutrófilo</i>	17% Delecção	57% Delecção	N	/	N
		<i>Monócito</i>	16% Delecção	53% Delecção	N	/	N
		<i>Eritrócito</i>	13% Delecção	28% Delecção	N	/	N
		<i>Eosinófilo</i>	14% Delecção	62% Delecção	N	/	N
10 (CRDM)	M	<i>Célula CD34+</i>	Sem células	N	Sem células	Sem células	8% Delecção
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	N	N	17% Delecção
		<i>Monócito</i>	N	N	N	N	13% Delecção
		<i>Eritrócito</i>	N	N	N	N	Sem células
		<i>Eosinófilo</i>	N	N	N	N	30% Delecção
11 (AREB-1)	M	<i>Célula CD34+</i>	95% Delecção	99% Delecção	N	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	93% Delecção	95% Delecção	N	N	13%Trissomia
		<i>Eritrócito</i>	76% Delecção	83% Delecção	N	N	N
		<i>Mastócito</i>	95% Delecção	99% Delecção	N	N	N
		<i>Basófilo</i>	86% Delecção	94% Delecção	N	N	N
		<i>Cél.Plasmática</i>	N	N	N	N	N

Alterações Cromossómicas

NºAmostra/ Class.OMS	Sexo	Linha celular a	7q31	5q31	Cr8	CrY	20q12
12 (AREB-1)	M	<i>Célula CD34+</i>	N	96% Delecção	N	100% Delecção	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	91% Delecção	N	92% Delecção	N
		<i>Monócito</i>	N	97% Delecção	N	96% Delecção	N
		<i>Eritrócito</i>	N	77% Delecção	N	58% Delecção	N
		<i>Basófilo</i>	N	93% Delecção	N	81% Delecção	N
13 (AREB-1)	F	<i>Célula CD34+</i>	64% Delecção	86% Delecção	N	/	N
		<i>Neutrófilo</i>	36% Delecção	23% Delecção	N	/	N
		<i>Monócito</i>	66% Delecção	60% Delecção	N	/	N
		<i>Eritrócito</i>	82% Delecção	75% Delecção	N	/	N
14 (AREB-1)	F	<i>Célula CD34+</i>	99% Delecção	93% Delecção	N	/	N
		<i>Neutrófilo</i>	65% Delecção	98% Delecção	N	/	N
		<i>Monócito</i>	79.3%Delecção	70% Delecção	N	/	N
15 (AREB-1)	M	<i>Célula CD34+</i>	69% Delecção	Sem células	Sem células	Sem células	82% Delecção
		<i>Neutrófilo</i>	40% Delecção	N	N	N	38% Delecção
		<i>Monócito</i>	91% Delecção	N	N	N	68% Delecção

Alterações Cromossómicas

NºAmostra/ Class.OMS	Sexo	Linha celular a	7q31	5q31	Cr8	CrY	20q12
16 (AREB-1)	M	<i>Célula CD34+</i>	N	66% Delecção	75%Trissomia	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	51% Delecção	85%Trissomia	N	N
		<i>Monócito</i>	N	57% Delecção	72%Trissomia	N	N
		<i>Eritrócito</i>	N	61% Delecção	85%Trissomia	N	N
17 (AREB-1)	M	<i>Célula CD34+</i>	Sem células	91% Delecção	Sem células	Sem células	Sem células
		<i>Neutrófilo</i>	N	97% Delecção	N	N	N
		<i>Monócito</i>	Sem células	76% Delecção	Sem células	Sem células	Sem células
		<i>Eritrócito</i>	N	71% Delecção	N	N	N
18 (AREB-1)	F	<i>Célula CD34+</i>	Sem células	89% Delecção	95%Trissomia	/	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	70% Delecção	70%Trissomia	/	N
		<i>Eritrócito</i>	N	78% Delecção	78%Trissomia	/	N
		<i>Basófilo</i>	Sem células	78% Delecção	Sem células	/	Sem células
		<i>Linfócito</i>	Sem células	N	Sem células	/	Sem células
19 (AREB-1)	M	<i>Célula CD34+</i>	81% Delecção	N	N	N	81%Delecção
		<i>Neutrófilo</i>	60% Delecção	N	N	N	97%Delecção
		<i>Monócito</i>	50% Delecção	N	N	N	88%Delecção
		<i>Eritrócito</i>	60% Delecção	N	N	N	71.4%Delecção

Alterações Cromossómicas

NºAmostra/ Class.OMS	Sexo	Linha celular a	7q31	5q31	Cr8	CrY	20q12
20 (AREB-1)	M	<i>Célula CD34+</i>	N	N	N	N	96% Delecção
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	N	N	96% Delecção
		<i>Monócito</i>	N	N	N	N	84% Delecção
		<i>Eritrócito</i>	N	N	N	N	Sem células
		<i>Linfócito</i>	Sem células	Sem células	Sem células	Sem células	N
21 (AREB-1)	M	<i>Célula CD34+</i>	84% Delecção	90% Delecção	N	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	N	N	N
		<i>Monócito</i>	N	N	N	N	N
		<i>Eritrócito</i>	N	N	N	N	N
22 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	88% Delecção	92% Delecção	N	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	95% Delecção	88% Delecção	N	N	N
		<i>Linfócito</i>	N	N	N	N	N
		<i>Basófilo</i>	90% Delecção	81% Delecção	N	N	N
23 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	99% Delecção	97% Delecção	93%Trissomia	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	95% Delecção	92% Delecção	91%Trissomia	N	N
		<i>Eritrócito</i>	90% Delecção	82% Delecção	89%Trissomia	N	N

Alterações Cromossómicas							
NºAmostra/ Class.OMS	Sexo	Linha celular a	7q31	5q31	Cr8	CrY	20q12
24 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	52% Delecção	N	N	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	N	N	N
		<i>Monócito</i>	11% Delecção	N	N	N	N
		<i>Eritrócito</i>	N	N	N	N	N
		<i>Linfócito</i>	N	N	N	N	N
25 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	N	90% Delecção	N	90% Dissomia	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	86% Delecção	N	76% Dissomia	N
		<i>Monócito</i>	N	92% Delecção	N	73% Dissomia	N
		<i>Eritrócito</i>	N	N	N	N	N
26 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	95% Delecção	95% Delecção	N	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	92% Delecção	87% Delecção	N	N	N
		<i>Monócito</i>	87% Delecção	85% Delecção	N	N	N
		<i>Eritrócito</i>	47% Delecção	49% Delecção	N	N	N
27 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	N	92% Delecção	69%Trissomia	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	98% Delecção	79%Trissomia	N	N
		<i>Monócito</i>	N	100%Delecção	86%Trissomia	N	N
		<i>Eritrócito</i>	N	88% Delecção	59%Trissomia	N	N

Alterações Cromossómicas

NºAmostra/ Class.OMS	Sexo	Linha celular a	7q31	5q31	Cr8	CrY	20q12
28 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	N	N	75%Trissomia	N	97%Delecção
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	83%Trissomia	N	94%Delecção
		<i>Monócito</i>	N	N	72%Trissomia	N	88%Delecção
		<i>Eritrócito</i>	N	N	74%Trissomia	N	98%Delecção
29 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	N	99% Delecção	29%Trissomia	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	87% Delecção	15%Trissomia	N	N
		<i>Monócito</i>	Sem células	N	N	Sem células	Sem células
		<i>Eritrócito</i>	N	78% Delecção	13%Trissomia	N	N
30 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	91% Delecção	91% Delecção	N	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	88% Delecção	88% Delecção	N	N	N
		<i>Monócito</i>	94% Delecção	72.5%Delecção	N	N	N
		<i>Eritrócito</i>	80% Delecção	55% Delecção	N	N	N
		<i>Basófilo</i>	75% Delecção	61% Delecção	N	N	N
31 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	64% Delecção	80% Delecção	N	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	61% Delecção	88% Delecção	N	N	N
		<i>Eritrócito</i>	76.5%Delecção	85% Delecção	N	N	N

Alterações Cromossómicas

NºAmostra/ Class.OMS	Sexo	Linha celular a	7q31	5q31	Cr8	CrY	20q12
32 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	N	N	N	30%Delecção	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	N	N	N
		<i>Eritrócito</i>	N	N	N	N	N
		<i>Basófilo</i>	N	N	N	N	N
33 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	98%Monossomia	N	N	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	82% Monossomia	N	N	N	N
		<i>Monócito</i>	84% Monossomia	N	N	N	N
		<i>Eritrócito</i>	N	N	N	N	N
34 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	N	N	N	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	N	N	15%Delecção
		<i>Monócito</i>	N	N	N	N	N
		<i>Eritrócito</i>	N	N	N	N	N
35 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	N	N	82%Trissomia	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	92%Trissomia	N	N
		<i>Eritrócito</i>	N	N	85%Trissomia	N	N

Alterações Cromossômicas

NºAmostra/ Class.OMS	Sexo	Linha celular a	7q31	5q31	Cr8	CrY	20q12
36 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	70% Delecção	47.5%Delecção	N	N	60% Delecção
		<i>Neutrófilo</i>	65% Delecção	60% Delecção	N	N	63.3%Delecção
		<i>Eritrócito</i>	67.5% Delecção	45% Delecção	N	N	55.5% Delecção
		<i>Basófilo</i>	54% Delecção	55% Delecção	N	N	56.9% Delecção
37(SMP/SMD)	M	<i>Cél.Plasmática</i>	29% Tetrassomia	47% Delecção	42% Tetrassomia	37% Dissomia	32% Tetrassomia
38(SMP/SMD)	M	<i>Célula CD34+</i>	N	N	N	52% Nulissomia	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	N	56% Nulissomia	N
		<i>Monócito</i>	N	N	N	59% Nulissomia	N
		<i>Eritrócito</i>	N	N	N	46% Nulissomia	N
39(SMP/SMD)	M	<i>Célula CD34+</i>	Sem células	Sem células	85%Trissomia	Sem células	Sem células
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	70%Trissomia	N	N
		<i>Monócito</i>	N	N	79%Trissomia	N	N
		<i>Eritrócito</i>	N	Sem células	Sem células	Sem células	Sem células
		<i>Eosinófilo</i>	N	N	82%Trissomia	N	Sem células

NºAmostra/ Class.OMS	Sexo	Linha celular a	Alterações Cromossômicas				
			7q31	5q31	Cr8	CrY	20q12
40(SMP/SMD)	F	<i>Célula CD34+</i>	Sem células	Sem células	Sem células	/	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	N	/	N
		<i>Monócito</i>	N	N	N	/	N
		<i>Eritrócito</i>	N	N	N	/	N
		<i>Célula CD38+</i>	N	N	N	/	N
41(Displasia Lig.)	M	<i>Cél.CD19+CD22+</i>	N	N	Sem células	Sem células	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	7% Monossomia	92% Nulissomia	N
		<i>Monócito</i>	N	N	18% Monossomia	85% Nulissomia	N
		<i>Eritrócito</i>	N	N	2% Monossomia	78% Nulissomia	N
42(LMA sec. SMD)	M	<i>Célula CD34+</i>	N	N	90% Tetrassomia	69% Dissomia	33% Trissomia
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	87% Tetrassomia	87% Dissomia	14% Trissomia
		<i>Linfócitos</i>	N	N	N	N	20% Trissomia

- (1) Casos clínicos em que não são identificadas as alterações citogenéticas;
- (2) Casos clínicos em que não estão disponíveis populações celulares para o estudo das alterações citogenéticas

Tabela 2: Indicação das amostras de medula óssea de doentes com síndromes mielodisplásicas com evidência de aquisição secundária da alteração citogenética deleção 20q e trissomia 20q na linha a neutrófilo

NºAmostra/ Class.OMS	Sexo	Linha celular a	Alterações Cromossómicas				
			7q31	5q31	Cr8	CrY	20q12
11 (AREB-1)	M	<i>Célula CD34+</i>	95% Deleção	99% Deleção	N	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	93% Deleção	95% Deleção	N	N	13%Trissomia
		<i>Eritrócito</i>	76% Deleção	83% Deleção	N	N	N
		<i>Mastócito</i>	95% Deleção	99% Deleção	N	N	N
		<i>Basófilo</i>	86% Deleção	94% Deleção	N	N	N
		<i>Cél.Plasmática</i>	N	N	N	N	N
34 (AREB-2)	M	<i>Célula CD34+</i>	N	N	N	N	N
		<i>Neutrófilo</i>	N	N	N	N	15%Deleção
		<i>Monócito</i>	N	N	N	N	N
		<i>Eritrócito</i>	N	N	N	N	N

Figura 2: Representação esquemática da sequência de aparição das alterações citogenéticas para os casos clínicos de CRDM (n = 10)

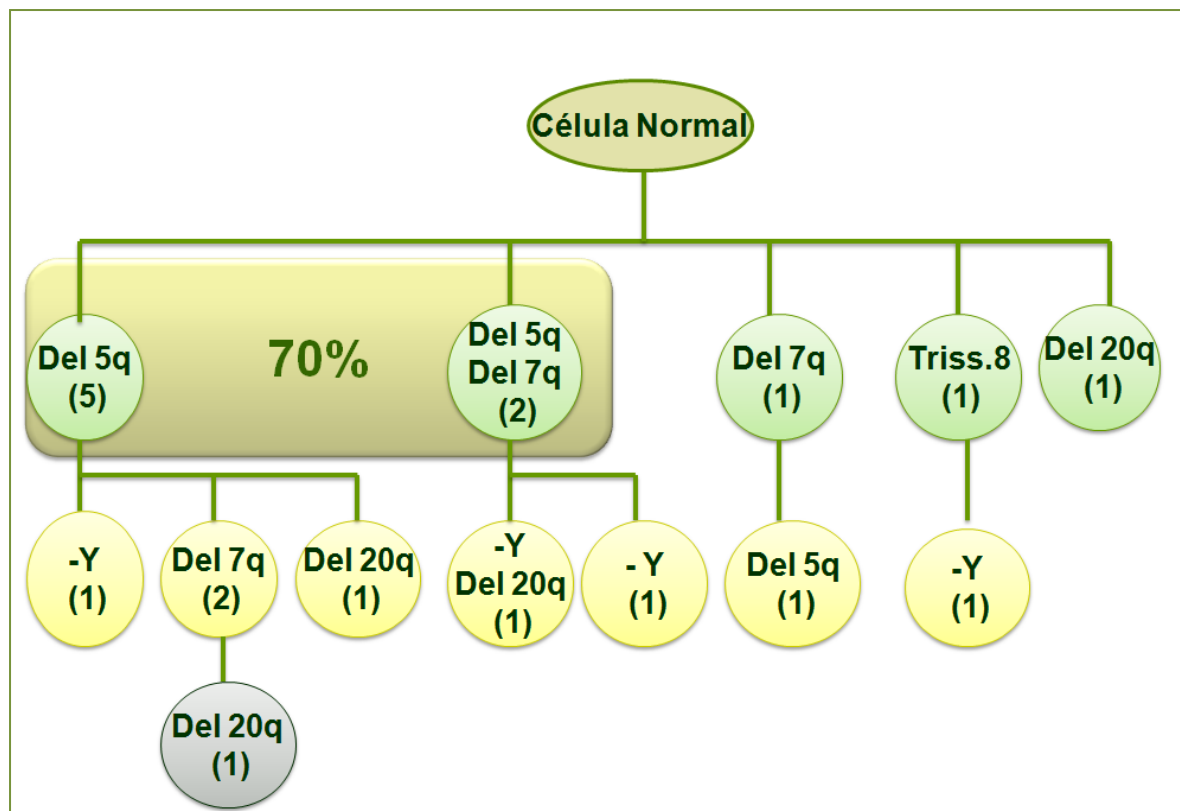
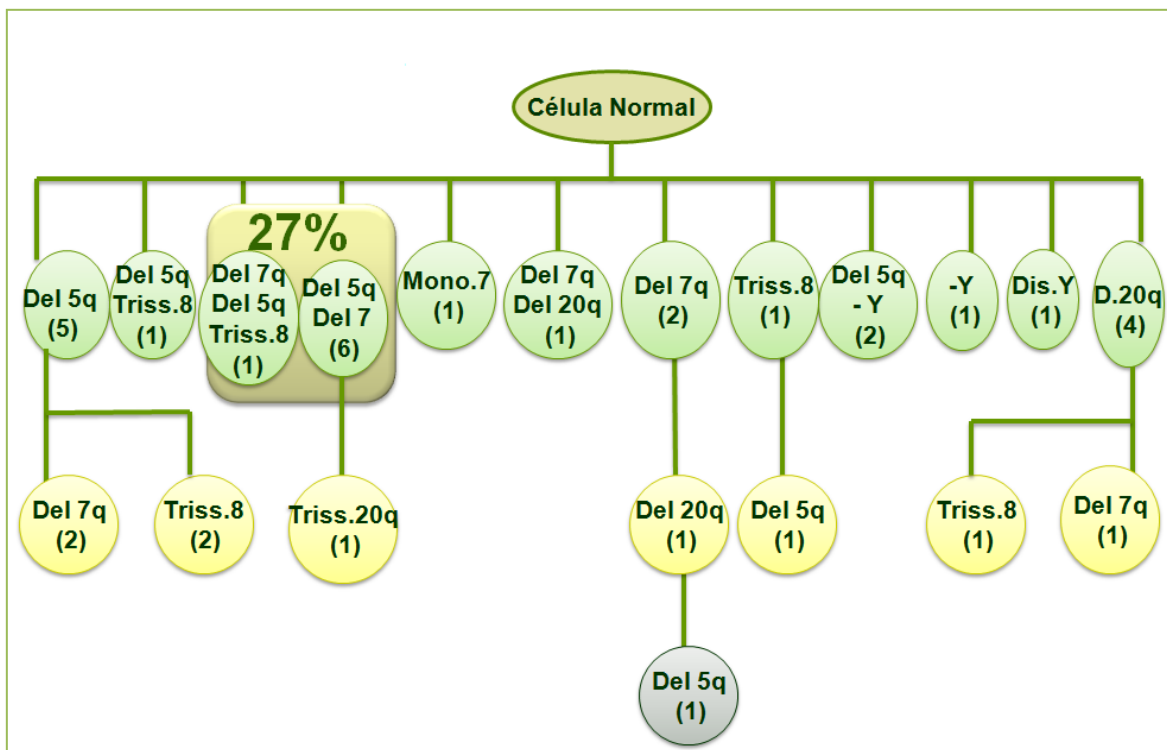


Figura 3: Representação esquemática da sequência de aparição das alterações citogenéticas para os casos clínicos de AREB (n = 26)



Discussão

Pela observação dos resultados apresentados, constata-se que nas diferentes amostras estudadas, as alterações citogenéticas estão presentes na maioria dos doentes em estudo. Geralmente se surgem na linha celular mais primitiva, ocorrem também nas células comprometidas às diferentes linhas mielóides, tratando-se deste modo de eventos primários. Excepcionalmente e apenas em duas amostras ocorrem alterações “ditas” secundárias uma vez que surgem na linha a neutrófilo e não são identificadas nas células CD34+, o que condiciona uma pior resposta e evolução.

Estas observações vão ao encontro do que é descrito no estudo de Giagounidis *et al* (28), embora restrito a algumas alterações citogenéticas, nomeadamente a deleção 5q, que refere a ocorrência deste evento, primariamente ao nível das células CD34+ de linha mielóide, aparecendo posteriormente ao nível das três principais linhas hematopoiéticas mielóides, nomeadamente eritroide, granulocítica e megacariocítica. Tal facto é consistente com a transformação da célula progenitora hematopoiética, representando um evento citogenético precoce em mielodisplasia.

De um modo geral a alteração citogenética mais encontrada nas diferentes linhas celulares é a deleção 5q. Este achado vai ao encontro do que é referenciado na literatura como o estudo de Mallo *et al* (27), que refere a deleção 5q como a mais frequentemente encontrada em doentes com mielodisplasia.

De acordo com a informação obtida parece ser possível estabelecer uma linha orientadora no sentido da sequência de aparição das alterações citogenéticas estudadas nas diferentes linhas hematopoiéticas da medula óssea. Assim, e para os casos de CRDM, parece surgir inicialmente a deleção 5 q de modo isolado na maioria dos casos ou em associação à deleção 7q e numa fase posterior a perda do cromossoma Y e a deleção 20q.

Estas observações vão ao encontro do estudo descrito por Haase *et al* (20), que associa a deleção 5q em mielodisplasia a um prognóstico favorável, contudo modificado significativamente pela ocorrência de alterações cariotípicas adicionais, com a consequente diminuição da sobrevida dos doentes.

Como verificado nos resultados apresentados, nos casos de Citopenia Refractária com Displasia Multilínea (CRDM), a perda do cromossoma Y aparece com relativa frequência nas células CD34+, bem como nas células comprometidas à linha a neutrófilo, monócito e eritroide, quando comparado com os restantes subgrupos da OMS. Estas observações vão ao encontro ao estudo de Bejar *et al* (18) e Li-Jun *et al* (40), que

apontam para o papel desta deleção não ser ainda completamente conhecido em mielodisplasia no que respeita aos mecanismos patogénicos, estando geralmente associado a prognóstico favorável.

Por sua vez, nos casos clínicos de AREB, surgem em primeiro lugar as alterações do cromossoma 7. No entanto verifica-se a forte presença da deleção 5q que de modo diferente do grupo clínico descrito anteriormente aparece frequentemente associada a outras alterações cariotípicas particularmente à deleção 7q. Como eventos tardios surgem os casos de trissomia 8, sendo raros os casos em que surge a perda do cromossoma Y e a deleção 20q, o que parece relacionar-se com uma evolução mais agressiva da doença pela sequência de aparição das alterações citogenéticas, uma vez que a deleção 7q é considerada de mau prognóstico.

Estas observações vão ao encontro do estudo de Cordoba *et al* (32), que associa a ocorrência de alterações cariotípicas envolvendo o cromossoma 7 como de mau prognóstico em mielodisplasia conferindo uma menor sobrevida desde o diagnóstico e um risco aumentado de evolução para leucemia mieloblástica aguda.

Adicionalmente, e relativamente ao aparecimento tardio da deleção 20q durante a progressão da doença, vai ao encontro do estudo desenvolvido por Bejar *et al* (18), que o associam a um indicador de instabilidade genómica podendo estar associado a pior prognóstico.

Conclusão

Pela análise dos resultados obtidos, este trabalho revela a presença de alterações citogenéticas de modo significativo ao nível do compartimento das células CD34+. Destaca-se a presença marcada da deleção 5q31 como primeira alteração citogenética na grande maioria dos doentes com CRDM. Por outro lado no grupo clínico dos AREB são evidentes as alterações do cromossoma 7 como primeiro evento, estando, no entanto fortemente presente a deleção 5q31 associada a estas alterações cariotípicas.

A realização deste trabalho de investigação torna possível a avaliação de compartimentos celulares afetados através do estudo das alterações citogenéticas em populações de células hematopoiéticas purificadas da medula óssea com a aplicação do protocolo de hibridização FISH Interfásico, podendo, deste modo contribuir para a avaliação do prognóstico, monitorização da resposta terapêutica, sobrevida dos doentes e risco de evolução para Leucemia Mieloblástica Aguda.

No entanto, o estudo carece de uma amostra mais abrangente que permita um maior conhecimento destas alterações, estando também condicionado pelas informações disponibilizadas para cada caso estudado.

Bibliografia

1. Valent P, Horny HP, Bennett J, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* 2007. Doi:10.1016/j.leukres.2006.11.009
2. Steensma DP, Bennett JM. The Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc* 2006;81(1):104-130
3. Tormo M, Marugán I, Calabuig M. Myelodysplastic syndromes: un update on molecular pathology. *Clin Transl Oncol* 2010;12:652-661
4. Myelodysplastic Syndromes (MDS) [editorial]. *Leuk Res* 2005;1-24
5. List AF, Vardiman J, Issa JPJ, DeWitte TM. Myelodysplastic Syndromes. *Hematology* 2004;297-317
6. Cazzola M, Malcovati L. Prognostic classification and risk assessment in myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin N Am* 24 2010; 24: 459-468
7. Look AT. Molecular pathogenesis of MDS. *Hematology* 2005;156-160
8. Hirai H. Molecular mechanisms of myelodysplastic syndromes. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33(4):153-160
9. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114(5):947-951
10. Steensma DP, List AF. Genetic testing in the myelodysplastic syndromes: molecular insights into hematologic diversity. *Mayo Clin Proc.* 2005;80(5):681-698
11. Deeg HJ, Bowen DT, Gore SD, Haferlach T, Le Beau MM, Niemeyer C. Myelodysplastic syndromes. Springer
12. Manero GG. Prognosis os myelodysplastic syndromes. *Hematology* 2010:330-337

13. Cazzola M, Malcovati L. Myelodysplastic syndromes – coping with ineffective hematopoiesis. *N Engl J Med* 2005; 352(6):536-538
14. Steensma DP. The changing classification of myelodysplastic syndromes: what's in a name? *Hematology* 2009:645-655
15. Kantargian H, O'Brien S, Ravandi F, Cortes J, Shan J, Bennett JM, et al. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. *Cancer* 2008;113(6):1351-1361
16. Pozdnyakova O, Miron PM, Tang G, Walter O, Raza A, Woda B, et al. Cytogenetic abnormalities in a serie of 1029 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Cancer* 2008;113(12):3331-3340
17. Nagoshi H, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M. Cytogenetic and Molecular Abnormalities in Myelodysplastic Syndrome. *Curr Mol Med* 2011;11(8):1-8
18. Bejar R, Ebert BL. The genetic basis of myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin N Am* 2010; 24: 295-315
19. Bjergaard JP, Andersen MT, Andersen MK. Genetic Pathways in the Pathogenesis of Therapy-Related Myelodysplasia and Acute Myeloid Leukemia. *Hematology* 2007:392-397
20. Haase D, Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 2008; 87:515-526
21. Bain BJ. *Leukaemia Diagnosis*. 4th edition 2010
22. Belli CB, Bengió R, Aranguren PN, Sakamoto F, Flores MG, Watman N, et al. Partial and total monosomal karyotypes in myelodysplastic syndromes: Comparative prognostic relevance among 421 patients. *Am. J. Hematol.* 2011:1-6
23. Mallo M, Luño E, Sanzo C, Cervera J, Haase D, Schanz J, et al. Clinical impact of the clone size in MDS cases with monosomy 7 or 7q deletion, trisomy 8, 20q deletion and loss of Y chromosome. *Leuk Res* 2011;35:834-836

24. Armand P, Deeg HJ, Kim HT, Lee H, Armistead P, Lima M, et al. Multicenter Validation Study of a Transplantation-Specific Cytogenetics Grouping Scheme for Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45(5):877-885
25. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007;110(13):4385-4395
26. Haferlach C, Bacher U, Tiu R, Maciejewski JP, List A. Myelodysplastic syndromes with del (5q): indications and strategies for cytogenetic testing. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;187:101-111
27. Mallo M, Cervera J, Schanz J, Such E, Manero GG, Luño E, et al. Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia* 2011;25:110-120
28. Giagounidis A, Germing U, Aul C. Biological and Prognostic Significance of Chromosome 5q Deletions in Myeloid Malignancies. *Clin Cancer Res* 2006; 12(1):5-10
29. Davids MS, Steensma DP. The molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Cancer Biol Ther* 2010;10(4):1-11
30. Jadersten M, Lindberg EH. New clues to the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Exp Cell Res* 2010;316:1390-1396
31. Brezinová J, Zemanová Z, Ransdorfová S, Pavlistová L, Babická L, Housková L, et al. Structural aberrations of chromosome 7 revealed by a combination of molecular cytogenetic techniques in myeloid malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;173:10-16

32. Cordoba I, González-Porras JR, Nomdedeu B, Luño E, Paz R, Such E, et al. Better Prognosis for Patients With Del(7q) Than for Patients With Monosomy in Myelodysplastic Syndrome. *Cancer* 2011
33. Panani AD. Cytogenetic Findings in Adult Greek Myelodysplastic Syndrome Patients: Predominance of Single Trisomy 8. *In vivo* 2006;20:115-118
34. Paulsson K, Johansson B. Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Pathol Biol* 2007;55:37-48
35. Sloand EM, Pfannes L, Chen G, Shah S, Solomou EE, Barrett J, et al. CD34 cells from patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome (MDS) express early apoptotic markers but avoid programmed cell death by up-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood* 2007;109(6):2399-2405
36. Brezinová J, Zemanová Z, Ransdorfová S, Sindelárová L, Sisková M, Neuwirtová R, et al. Prognostic significance of del (20q) in patients with hematological malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;160:188-192
37. Mullier F, Daliphard S, Garand R, Dekeyser M, Cornet Y, Luquet L, et al. Morphology, cytogenetics, and survival in myelodysplasia with del(20q) or ider(20q): a multicenter study. *Ann Hematol* 2011
38. MacKinnon RN, Selan C, Wall M, Baker E, Nandurkan H, Campbell LJ. The Paradox of 20q11.21 Amplification in a Subset of Cases of Myeloid Malignancy with Chromosome 20 Deletion. *Genes Chromosomes & Cancer* 2010;49:998-1013
39. MacKinnon R, Duivenvoorden HM, Campbell LJ. Unbalanced translocations of 20q in AML and MDS often involve interstitial rather than terminal deletions of 20q. *Cancer Genet* 2011;204:153-161
40. Li-jun Z, Sim SE, Xing Y, Shi-bo Li. Molecular genetic evidence of Y chromosome loss in male patients with hematological disorders. *Chin Med J* 2007;120(22):2002-2005

41. Skonieczka K, Duszenko E, Wyrowinska E, Haus O. Usefulness of classic cytogenetic testing compared to fluorescence in situ hybridization in genetic diagnosis of 58 patients with myelodysplastic syndromes. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2009;119(6):366-370
42. Guilbert ND, Herry A, Bris MJ, Guéganic N, Bovo C, Morel F, et al. Interphase FISH Does Not Improve the Detection of DEL (5q) and DEL (20q) in Myelodysplastic Syndromes. *Anticancer Res* 2011;31:1007-1010
43. Mallo M, Arenillas L, Espinet B, Salido M, Hernández JM, Lumbreras E, et al. Fluorescence *in situ* hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 5q-. *Haematologica* 2008;93(7):1001-1008
44. Makishima H, Rataul M, Gondek LP, Huh J, Cook JR, Theil KJ, et al. FISH and SNP-A karyotyping in myelodysplastic syndromes: improving cytogenetic detection of del(5q), monosomy 7, del(7q), trisomy 8, and del(20q). *Leuk Res* 2010;34(4):447-453
45. Vorsanova SG, Yurov YB, Iourov IY. Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic Technologies. *Mol Cytogenet* 2010; 3(1):1-15
46. Costa D, Valera S, Carrió A, Arias A, Muñoz C, Rozman M, et al. Do we need to do fluorescence in situ hybridization analysis in myelodysplastic syndromes as often as we do?. *Leuk Res* 2010
47. Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB, et al. Guidance for Fluorescence *in Situ* Hybridization Testing in Hematologic Disorders. *J Mol Diagn* 2007;9:134-143