UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Sabrina Dias Leite Cueva

**Análise Citogenética Clássica e Molecular para os Genes Aurora
Cinase A e B em células hematopoéticas e mesenquimais da
medula óssea de pacientes portadores de síndrome
mielodisplásica**

Ribeirão Preto – SP

2012

Sabrina Dias Leite Cueva

**Análise Citogenética Clássica e Molecular para os Genes Aurora
Cinase A e B em células hematopoéticas e mesenquimais da
medula óssea de pacientes portadores de síndrome
mielodisplásica**

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre
junto ao Departamento de Genética.

Orientadora:

Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

Ribeirão Preto

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Catálogo da Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

Leite-Cueva, Sabrina Dias

Análise Citogenética Clássica e Molecular para os Genes Aurora Cinase A e B em células hematopoéticas e mesenquimais da medula óssea de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica. Ribeirão Preto – São Paulo, 2012.

100 p. : il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética

Orientadora: Fontes, Aparecida Maria

1. células hematopoéticas 2. células mesenquimais 3. síndrome mielodisplásica. 4. aurora cinase

FOLHA DE APROVAÇÃO

Sabrina Dias Leite Cueva

**Análise Citogenética Clássica e Molecular para os Genes Aurora
Cinase A e B em células hematopoéticas e mesenquimais da
medula óssea de pacientes portadores de síndrome
mielodisplásica**

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre
junto ao Departamento de Genética.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico.....

A minha mãe Nair, pela confiança, amor, exemplo de força, superação de obstáculos nos momentos mais difíceis e pela dedicação na minha formação pessoal e profissional.

Aos meus queridos avôs e irmãos pela amizade, companheirismo e incondicional apoio em todos os momentos da minha vida.

Estarei sempre ao lado de vocês!!

Amo vocês!!!!!!!!!!!!!!

*Ao meu esposo Elvis, companheiro de todas as
horas, meu muito obrigado pelo seu apoio,
estímulo, amor, dedicação, paciência,
compreensão e, sobretudo por ter me estimulado
a continuar e superar todas as dificuldades.*

*A minha princesinha Raika por me
proporcionar sentir o maior e mais puro amor.*

Amo Vocês!!

AGRADECIMENTOS

Desejo registrar aqui meu profundo reconhecimento a todos aqueles que me encorajaram, aconselharam e guiaram para a concretização deste trabalho.

Ao meu pai Aguinaldo, que mesmo não estando entre nós, sei que sempre esteve ao meu lado e abençoou minhas decisões.

A minha mãe Nair, meus irmãos Diogo e Gustavo, João, meus avós, tios, tias e amigos por terem me apoiado em todos os caminhos que escolhi trilhar e pela compreensão, incentivo e amor que manifestaram ao longo da realização deste trabalho.

Para Elvis, meu esposo e amigo, obrigado pela compreensão, paciência, apoio, amor, por tudo.

A minha filha Raika que é o maior estímulo na minha vida pessoal e profissional.

A minha querida orientadora Professora Dra. Aparecida Maria Fontes pela sabedoria, paciência e pela confiança em mim depositada.

Ao Dr. Fábio Morato pela colaboração e valiosas sugestões, indispensáveis para este trabalho.

À Dra. Maria do Carmo Favarin, meu muito obrigado pela presteza, amizade e colaboração neste trabalho.

À Professora Dra. Belinda Pinto Simões pela imensa ajuda, e pelo apoio desde o início do projeto.

Aos Professores Dr. Roberto Passetto Falcão e Dr. Eduardo Magalhães Rego pelo exemplo de perseverança neste longo caminho da vida acadêmica e por dar-me a oportunidade de realizar meu trabalho no Laboratório de Hematologia HC-FMRP/USP.

Aos residentes da hematologia por toda ajuda e amizade.

Aos pacientes e doadores do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Hospital Amaral Camargo de Jaú-SP, que aceitaram participar deste trabalho, sem eles nada seria possível.

As secretarias do Departamento de Genética, Susie, Silvia e Maria Aparecida pela presteza e dedicação.

Ao Professor Dr. Ademilson Espencer pela sua amizade, conselhos e dedicação exemplar.

À equipe do Laboratório de Citogenética, especialmente: Dr. Luiz Gonzaga Tone, Aidê, Sonia, Lucimar Laureano, Maria Lucia Machado, obrigado pelo agradável convívio durante o período que estive com vocês e principalmente pela amizade.

À equipe do Laboratório de Hematologia, em especial: Ana Silvia, Adriana, Denise, Aglair, Bárbara, Amélia, Claudia, Beth, obrigado pela amizade, ajuda e pelo agradável convívio.

A todos os meus colegas do Laboratório de Hematologia e Citogenética, obrigado pelo convívio, apoio, conversas, aprendizado, colaboração, por tudo.

Às minhas queridas amigas: Carolina, Josiane e Mariana, pelo companheirismo e apoio nas horas mais difíceis e principalmente pelos almoços inesquecíveis.

Ao Prof Dr. Rodrigo Panepucci pelos conselhos, incentivo e amizade.

Ao colega Antonio Roberto Lucena Araujo pela grande ajuda, amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas pela gentil concessão da utilização dos Laboratórios de Citometria de Fluxo e Transferência Gênica do Hemocentro de Ribeirão Preto e também à sua equipe, em especial: Patrícia Palma, Camila, Danielle, Fernanda, Lucas e Ricardo, obrigado pela amizade, colaboração, dedicação e presteza.

Ao Dr. Antonio Alves Duarte e sua esposa Sandra, Rafael e Michelle, Ana Silvia e Paulo César, Marcela e Ricardo, Rafaela e Ricardo, amigos inesquecíveis que fiz durante essa fase da minha vida, obrigado pelos jantares e encontros maravilhosos.

As minhas eternas amigas Renata Rosa, Fabiana de Paula e Rejane Bahia que sempre compreenderam minha ausência e torceram por minha vitória.

A toda minha família e amigos que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado vibrando em cada conquista.

Aos meus sogros Rosa, José Pablo, meu cunhado José Carlos, meu querido amigo Juan, obrigado pela torcida e apoio.

A equipe de Citogenética do Instituto Hermes Pardini, em especial a Greicy Paiva, Keila Dias e Cristiane Saraiva que me ofereceram a oportunidade de trabalhar nesta área e com um grupo muito competente e que tem me dado muita força e ensinamentos.

Aos membros da Banca Examinadora, pela disponibilidade em analisar este trabalho, enriquecendo-o com suas críticas e sugestões.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro.

Ao INCTC e FAEPA pelo apoio e auxílio financeiro.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Leite-Cueva, S.D. “Análise Citogenética Clássica e Molecular para os Genes Aurora Cinase A e B em células hematopoéticas e mesenquimais da medula óssea de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica”. 2012. 100f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A síndrome mielodisplásica (SMD) é uma doença hematológica heterogênea, caracterizada por hematopoese anormal, displasia e instabilidade genômica, portanto, a análise citogenética é determinante no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento evolutivo da doença. Considerando que as células hematopoéticas (CHs) e as estromais mesenquimais multipotentes (CTMs) estão em estreita associação, estudos que visem à caracterização destas poderão contribuir para elucidar os mecanismos que governam a progressão tumoral e identificar novos alvos terapêuticos. **Objetivo:** Caracterizar e comparar as CHs e CTMs derivadas de pacientes através da citogenética convencional e molecular para os genes aurora cinase A e B. Avaliar as propriedades biológicas das CTMs derivadas de SMD e controles saudáveis. **Métodos:** o estudo iniciou-se com a avaliação clínica de 25 pacientes e 8 controles saudáveis doo HCFMRP-USP e HAC-Jaú. Em seguida, foi realizada a análise cariótica das CHs e CTMs da medula óssea pelo bandamento G e por FISH para os genes aurora A e B e o perfil imunofenotípico, bem como potencial de diferenciação em adipócito e osteócito das CTMs de pacientes portadores de SMD e controles saudáveis. **Resultados:** A avaliação clínica mostrou plaquetopenia (76%), neutropenia (100%), hemoglobina baixa (16%). A análise citogenética das CHs revelou cariótipo alterado em 13 pacientes (52%), com cariótipo complexo resultando em alterações numéricas e estruturais. Ao contrário, nas CTMs, o cariótipo se mostrou alterado em sete pacientes (28%) e um padrão de menor complexidade, apenas quatro pacientes apresentaram alterações nas duas populações celulares, porém, diferentes. Foram encontradas apenas alterações numéricas (sendo 86% monossomia e 14% ganho de cromossomo). As CHs e CTMs dos controles apresentaram cariótipos 100% normais. Na análise de *FISH* não foi evidenciada amplificação dos genes *AURKA* e *AURKB*. As CTMs dos pacientes e controles apresentaram-se semelhantes quanto à morfologia e potencial de diferenciação. Entretanto, as CTMs de pacientes mostraram-se alteradas para dois antígenos de superfície, CD90 e CD146, os quais mostraram níveis de expressão mais elevados nas amostras dos pacientes ($p=0,04$, $p=0,001$ respectivamente). **Conclusão:** Observou-se que as CTMs se encontram alteradas embora em menor frequência e diferindo das alterações encontradas nas CHs. Esses dados sugerem que as CTMs devem exercer importante papel na progressão tumoral e devem ser consideradas como alvos na busca de novas terapias e melhor esclarecimento dos mecanismos que governam a progressão tumoral. Apesar de não ter evidenciado amplificação dos genes *AURKA* e *AURKB* em SMD, estudos futuros que visem avaliar o nível de expressão dessas enzimas em pacientes portadores ou não de alterações citogenéticas poderão contribuir para a compreensão do envolvimento ou não desse gene com a evolução da doença. Além disso, não foi evidenciada associação de anemia profunda e citogenética alterada.

Palavras-chave: células hematopoéticas, células mesenquimais, síndrome mielodisplásica, aurora cinase

ABSTRACT

Leite-Cueva, S.D. "Classical Cytogenetic Analysis and Molecular for Genes Aurora kinase A and B in hematopoietic cells and mesenchymal bone marrow of patients with myelodysplastic syndrome"2012. 100f. Dissertation – Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto,2012.

The myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous hematologic disease characterized by abnormal hematopoiesis, dysplasia and genomic instability, therefore, cytogenetic analysis is crucial in the diagnosis, prognosis and monitoring of disease evolution. Whereas hematopoietic cells (CHs) and stromal multipotent mesenchymal (MSCs) are in close association studies aimed at the characterization of these may help to elucidate the mechanisms that govern tumor progression and identify novel therapeutic targets. Objective: To characterize and compare the CHs and MSCs derived from patients by conventional cytogenetics and molecular genes aurora kinase A and B. To evaluate the biological properties of MSCs derived from MDS and healthy controls. Methods: The study began with the clinical evaluation of 25 patients and eight healthy controls HCFMRP doo-USP and CH-Jau. Next, we performed a karyotypic analysis of CHs and MSCs from bone marrow by G-banding and FISH for aurora A and B genes and immunophenotypic profile and potential to differentiate into adipocytes and osteocytes of MSCs in patients with MDS and controls healthy. Results: The clinical evaluation showed thrombocytopenia (76%), neutropenia (100%), low hemoglobin (16%). The cytogenetic analysis revealed karyotype of CHs changed in 13 patients (52%), resulting in complex karyotype with numerical and structural changes. In contrast, in MSC, the karyotype was abnormal in seven patients (28%) and a pattern of lower complexity, only four patients had changes in both cell populations, however, different. Were found only numerical changes (monosomy being 86% and 14% gain in chromosome). The CHs and MSCs controls showed 100% normal karyotypes. In FISH analysis there was no evidence of gene amplification and AURKA AURKB. The MSCs of patients and controls were similar regarding the morphology and differentiation potential. However, the CTMs of patients proved to be changed to two surface antigens, CD90 and CD146, which showed higher expression levels in samples of patients ($p = 0.04$, $p = 0.001$ respectively). Conclusion: Furthermore, it was observed that the MSCs are changed although less frequently and differing from changes found in CHs. These data suggest that MSCs should play an important role in tumor progression and should be considered as targets in the search for new therapies and better explain the mechanisms that govern tumor progression. Although not shown AURKA amplification of genes in MDS and AURKB, future studies aimed at assessing the level of expression of these enzymes in patients with or without cytogenetic alterations may contribute to the understanding of the involvement or not of this gene with the disease. This study can not associate with profound anemia cytogenetic changes.

Keywords: hematopoietic cells, mesenchymal cells, myelodysplastic syndrome, aurora kinase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotos de esfregaço de medula óssea de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica.....	24
Figura 2 - Modelo de ação das Auroras Cinases A (AURKA) e B (AURKB) na mitose (Fase M) do ciclo celular	29
Figura 3 - Modelo de atuação das CTM na reconstituição do tecido lesionado.....	33
Figura 4 - Modelo de atuação das CTM na progressão tumoral em SMD.....	34
Figura 5 - Cariótipo com bandamento GTG das células hematopoéticas da amostra 3. Cariótipo 46,XX,inv(3)(q21q26).....	53
Figura 6 - Cariótipo com bandamento GTG das células hematopoéticas da amostra 1, evidenciando cariótipo 46,XX,del(20)(q11-qter)	53
Figura 7 - Cariótipo com bandamento GTG das células hematopoéticas da amostra 24, evidenciando cariótipo 47,XY,+5,+del(8)(q21),-14.....	54
Figura 8 - Cariótipo com bandamento GTG das células hematopoéticas da amostra 7, evidenciando cariótipo 47,XX,+9.....	54
Figura 9 - Cariótipo com bandamento GTG das células hematopoéticas da amostra 6 evidenciando cariótipo 45,X,del(17)(p12)	55
Figura 10 - Cariótipo com bandamento GTG das células hematopoéticas da amostra 17 evidenciando cariótipo 47,XX,+15.	55
Figura 11 - Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência (<i>FISH</i>) para <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> nas células hematopoéticas de SMD	56

Figura 12 - Caracterização morfológica das CTMs da amostra 12 derivada de paciente com SMD	57
Figura 13 - Potencial das CTMs de SMD de diferenciação em adipócitos	58
Figura 14 - Potencial das CTMs de SMD de diferenciação em osteócito	59
Figura 15 - Análise Imunofenotípica das CTMs da amostra 21 derivada de paciente com SMD na 3ª passagem	60
Figura 16 - Cariótipo com bandamento GTG das CTMs da amostra 2, evidenciando cariótipo 44,XY,-9,-12.....	63
Figura 17 - Cariótipo com bandamento GTG das CTMs da amostra 1, evidenciando cariótipo 45,X.....	63
Figura 18 - Cariótipo com bandamento GTG da CTMs da amostra 6. evidenciando cariótipo 43,XY,-13,-19,-22.....	64
Figura 19 - Cariótipo com bandamento GTG das CTMs da amostra 14, evidenciando cariótipo 45,XY,-7.....	64
Figura 20 - Cariótipo com bandamento GTG das CTMs da amostra 19, evidenciando cariótipo 44,XX,-6,-19.....	65
Figura 21 - Cariótipo com bandamento GTG das CTMs da amostra 18, evidenciando cariótipo 45,XY,-5.....	65
Figura 22 - Cariótipo com bandamento GTG das CTMs da amostra 21, evidenciando cariótipo 47,XY,+9.....	66
Figura 23 - Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência (<i>FISH</i>) para <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> nas CTMs derivadas de SMD.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação SMDs conforme determinado pela OMS.....	21
Tabela 2 - Sistema internacional de pontuação de prognóstico (IPSS): variáveis prognósticas de acordo com a porcentagem de blastos, cariótipo e citopenias, aplicado a pacientes com diagnóstico de SMD.....	22
Tabela 3 - Sistema internacional de pontuação de prognóstico (IPSS): Fator de risco, subgrupos, média de sobrevida e tempo de transformação em LMA.....	22
Tabela 4 - Caracterização das Auroras Cinases: localização, nível expressão, substratos e função.....	28
Tabela 5 - Características clínicas, laboratoriais dos casos de SMD estudados, admitidos no HC-FMRP-USP no período de março 2009 a dezembro de 2010.....	49
Tabela 6 – Características hematológicas dos indivíduos controles, estudados e admitidos no HC-FMRP-USP no período de março 2009 a dezembro de 2010	50
Tabela 7 - Perfil citogenético das células hematopoéticas e CTMs derivadas dos indivíduos controle (Bandamento GTG).....	51
Tabela 8 - Perfil citogenético das células hematopoéticas dos pacientes com SMD (bandamento GTG).....	52
Tabela 9 - - Perfil citogenético das CTMs de pacientes com SMD (bandamento GTG)	62

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>AURKA</i> -	gene do ciclo celular da família aurora quinase
<i>AURKB</i> -	gene do ciclo celular da família aurora quinase
<i>BAK</i> -	gene regulador de apoptose da família BCL-2.
<i>BAX</i> -	gene regulador de apoptose da família BCL-2.
<i>BCL-2</i> -	gene inibidor de apoptose
B7-H1	molécula família B7, é expressa em células apresentadoras de antígeno e proporciona sinais imunoestimulatórios e inibitórios as células T
CD -	marcadores celulares de antígenos específicos
CDK -	quinases dependentes de ciclinas
CH -	célula hematopoiética
<i>clAP1</i> -	gene inibidor de apoptose
CTH -	célula tronco hematopoética (<i>do inglês, Hematopoietic Stem Cell</i>)
CTM -	células tronco mesenquimal (<i>do inglês, Mesenchymal Stem Cell</i>)
DAPI -	4,6-diamidino-2-phenylindole
DNA -	ácido desoxirribunucleico
EDTA -	ácido etilenodiaminoteracético
FISH -	hibridação <i>in situ</i> por fluorescência
FITC -	isotiocianato de fluoresceína (<i>do inglês, fluorescein isothiocyanate</i>)
GTG -	coloração por Giemsa-Tripsina-Giemsa
HAC-SP	Hospital Amaral Camargo de Jaú- SP
HB -	hemoglobina
HCFMRP – USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo
HLA-DR -.	receptor de superfície celular de MHC classe II
<i>IAPs</i> -	proteínas inibidoras da apoptose
<i>INCENP</i> -	proteína centromérica
IPSS -	Sistema Internacional de Prognóstico (<i>do inglês, International Prognostic Scoring System</i>)
ISCN -	Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (<i>do inglês, The International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>)

ISCT -	Sociedade Internacional para Terapia Celular (do inglês, <i>International Society for Cellular Therapy</i>)
KCI -	solução cloreto de potássio
KDR	receptor de tirosina kinase tipo III
LMA -	leucemia mielóide aguda
MSH2-	proteína de reparo de DNA
MLL -	gene responsável pelo desenvolvimento e hematopoiese (do inglês, <i>myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia</i>)
MO -	medula óssea
NAIP -	gene inibidor de apoptose
OMS -	Organização Mundial de Saúde
PBS -	solução de tampão fosfato
PE -	fluorocromo ficoeritrina (do inglês, <i>phycoeritrin</i>)
PerCP -	fluorocromo complexo de proteínas de clorofila (do inglês, <i>peridinin chlorophyll</i>)
PMSL1	proteína de reparo de DNA
PTEN	gene supressor tumoral
RNA -	ácido ribonucléico
RNA _m -	RNA mensageiro
RPM -	rotações por minuto
RPMI -	meio de cultivo celular rico em sais inorgânicos e aminoácidos
RUNX1	fator de transcrição que regula diferenciação das células tronco hematopoéticas
SBF -	soro bovino fetal (do inglês, <i>Fetal Bovine Serum</i>)
SMD -	síndrome mielodisplásica
TGFβ -	gene do fator de crescimento da família beta
TNF- α –	receptor do gene TNF(do inglês, <i>tumor necrosis factor receptor</i>)
TP53 -	gene supressor tumoral P53
WBC -	células brancas, leucócitos (do inglês, <i>white blood cells</i>)
WPSS	Índice de Score Prognóstico baseado na classificação da OMS
XIAP -	gene supressor de apoptose
α-MEM-	meio de cultivo (do inglês, <i>Minimal Essential Medium Alpha</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Síndrome Mielodisplásica (SMD)	18
1.1.1. Histórico	18
1.1.2. Doença	18
1.1.3. Epidemiologia	19
1.1.4. Classificação	19
1.1.5. Características clínicas e diagnósticas	23
1.1.6. Alterações cromossômicas	25
1.1.7. Alterações gênicas	26
1.2. Aurora cinases	27
1.2.1. Auroras cinases A e B em neoplasias	29
1.3. Células estromais mesenquimais multipotentes	31
1.3.1. Histórico	31
1.3.2. Isolamento e cultivo	32
1.3.3. Propriedades biológicas	32
1.3.4. CTMs em SMD	34
2. OBJETIVOS	37
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	39
3.1. Casuística	40
3.2. Isolamento, cultivo e análise citogenética das células hematopoéticas	40
3.3. Isolamento, cultivo e expansão das CTMs	41
3.3.1. Caracterização das CTMs	42
3.3.1.1. Diferenciação das CTMs em adipócitos e osteócitos	42
3.3.1.2. Imunofenotipagem	43
3.3.2. Análise citogenética das CTMs	44
3.4. Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)	44

4. RESULTADOS.....	47
4.1. Perfil clínico dos pacientes portadores de SMD e indivíduos controles.....	48
4.2. Citogenética das CHs e CTMs de indivíduos controles	50
4.3. Caracterização citogenética das CHs dos pacientes com SMD	51
4.4. Hibridação “ <i>in situ</i> ” por Fluorescência (<i>FISH</i>) para <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> nas CHs.....	56
4.5. Células estromais mesenquimais multipotentes (CTMs).....	57
4.5.1. Caracterização morfológica das CTMs de pacientes com SMD e indivíduos controles	57
4.5.2. Potencial de diferenciação das CTMs dos pacientes com SMD e indivíduos controles	57
4.5.3. Perfil imunofenotípico das CTMs de pacientes com SMD e indivíduos controles	59
4.5.4. Caracterização citogenética das CTMs dos pacientes com SMD.....	62
4.5.5. Hibridação “ <i>in situ</i> ” por Fluorescência (<i>FISH</i>) para <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> nas CTMs	66
5. Discussão.....	68
6. Conclusão.....	76
7. Referências Bibliográficas.....	78
8. Anexos	94

1.INTRODUÇÃO

1.1. SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

1.1.1. Histórico

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) foi descrita em 1900 por Leube como “*leukanamie*”, uma doença que ocorre na célula tronco hematopoética (CTH) da qual se origina as células sanguíneas. A SMD foi inicialmente conhecida como uma anemia macrocítica que progredia para leucemia aguda. Décadas mais tarde, por volta de 1970, a terminologia “pré-leucemia” desvaneceu, pelo fato de não se tratar de uma pré-leucemia e sim de uma neoplasia hematológica. Desde esse período, o termo síndrome mielodisplásica tornou-se amplamente aceito e é usado até os dias atuais (Nimer, 2008; Komrokji, Zhang, e Bennett, 2010).

1.1.2. Doença

A SMD compreende um grupo heterogêneo de malignidades da célula tronco hematopoética (CTH) caracterizada por hematopoese anormal e displasia. Nos estágios iniciais, a principal causa das citopenias é o aumento da apoptose (morte celular programada) nas progênes da medula óssea. A expansão do clone anormal está associada à displasia morfológica de uma ou mais linhagens celulares da medula óssea, diferenciação comprometida, disfunção celular e instabilidade genômica (Mufti, 2004; Nimer, 2008; Bart e Deeg, 2010). A consequência da hematopoese ineficiente é a citopenia do sangue periférico que pode envolver as três linhagens hematopoética (eritróide, granulocítica, e megacariocítica) e risco aumentado de progressão para leucemia mielóide aguda (Koeffler, 1986; Mufti, 2004; Valent e cols, 2007; Nimer, 2008; Bejar e Ebert, 2010; Moria e cols, 2010).

A SMD pode ser de origem primária ou secundária. A primária, não tem etiologia elucidada, pode ocorrer concomitante a doença auto-imune e está associada à idade avançada, sexo masculino, uso abusivo de álcool, e infecções virais prévias (Pedersen-Bjergaard e cols, 1995; Mufti, 2004; Moraes e cols, 2009).

Alguns fatores considerados de risco para o desenvolvimento de SMD primária são mutações em genes que participam de vias de sinalização celular, tais como cinases (*AURKA*, *AURKB*), fosfatases e nos mecanismos de reparo de DNA, tais como *MLH1*, *MSH2*, *PMSL1*, *PMSL2* e *MSH6* (Chauffaille, 2006). A SMD secundária ocorre geralmente após exposição à terapia antineoplásica, agentes tóxicos e/ou mutagênicos e apresenta um curso clínico mais agressivo que a SMD primária (Corey e cols, 2007). O seu desenvolvimento, geralmente, ocorre de quatro a sete anos após a exposição inicial ao agente e corresponde a aproximadamente 10% do total de casos de SMD (Corey e cols, 2007).

1.1.3. Epidemiologia

A SMD representa a neoplasia hematológica mais comum em adultos com idade superior a 65 anos (Hall e Foucar, 2010). Por se tratar de uma doença que não é rotineiramente incluída na maioria dos registros de câncer, é possível apenas estimar que 15.000 - 20.000 novos casos sejam diagnosticados anualmente nos EUA. Baseando-se nos números limitados dos estudos Europeus, estima-se que a incidência varie de 2.1 para 12.6/casos/100.000/ano (Aul e cols, 1998; Mufti, 2004). Na incidência mundial estima-se de 3 a 5/100.000 habitantes/ano e que chegue a mais de 20/100.000 habitantes/ano devido ao aumento da expectativa de vida e aos fatores ambientais como radiação, tabagismo, pesticidas, solventes orgânicos e metais pesados (Rigolin e cols, 1998; Nisse e cols, 2001; Moraes e cols, 2009). No Brasil, a incidência de SMD ainda é desconhecida, mas estudos vêm sendo realizados junto às grandes instituições (Magalhães e cols, 2010).

1.1.4. Classificação

Os sistemas de classificação de SMD foram desenvolvidos com o intuito de avaliar o risco de transformação em leucemia mielóide aguda e sobrevida global. O primeiro sistema de classificação foi criado em 1982 pelo grupo internacional de

Hematologistas, Franco-Americano-Britânico (FAB) e baseava-se somente nas anormalidades morfológicas e percentagem de blastos (Bennett e cols, 1982; Brunning e cols, 2001). Designam-se por “blastos” as células mais jovens da medula óssea. Consideram-se de melhor prognóstico os pacientes que possuem um número mais baixo de blastos.

Em 2000 e 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma nova classificação criando uma maior homogeneidade dos grupos até então estabelecidos e que são usadas até o momento (Germinig e cols, 2000; Germinig e cols, 2006). Atualmente, abrangem sete subgrupos, como mostra a Tabela 1 (Moraes e cols, 2009; Komrokji, Zhang e Bennett, 2010).

A classificação é feita de acordo com a etiologia (primária ou secundária), características morfológicas do sangue periférico e medula óssea e análise citogenética. São considerados para isso: o número de citopenias, o tipo e o grau da displasia, o número de blastos, a presença ou não de sideroblastos em anel e a presença isolada da deleção do braço longo do cromossomo 5 (5q-) (Bennett e cols, 1982; Swerdlow e cols, 2008; Vardiman e cols, 2009). Os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde (Swerdlow e cols, 2008; Vardiman e cols, 2009) definiram os subtipos como: citopenia refratária com displasia de única linhagem (anemia refratária, neutropenia refratária e trombocitopenia refratária), anemia refratária com sideroblastos em anel, citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens, anemia refratária com excesso de blastos 1, anemia refratária com excesso de blastos 2, SMD inclassificável e SMD associada à deleção isolada do 5q. Os dados estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1- Classificação SMDs conforme determinado pela OMS.

Subgrupo	Achados em Sangue periférico	Achados em Medula óssea
Citopenias refratárias com displasia de única linhagem (CRDU): Anemia refratária (AR;) Neutropenia refratária (NR); Trombocitopenia refratária (TR)	Citopenia de uma linhagem ou bicitopenia ^a Blastos ausentes ou raros (< 1%) ^b	Displasia de uma linhagem: $\geq 10\%$ das células em uma linhagem mielóide < 5% de blastos < 15% de sideroblastos em anel
Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA)	Anemia Ausência de blastos	Displasia apenas na linhagem eritróide < 5% de blastos $\geq 15\%$ de sideroblastos em anel
Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens (CRDM)	Citopenia(s) Blastos ausentes ou raros (< 1%) Ausência de bastonete de Auer Monócitos < 1.000/mm ³	Displasia em $\geq 10\%$ das células em duas ou mais linhagens mielóides < 5% de blastos. Ausência de bastonete de Auer 15% de sideroblastos em anel
Anemia refratária com excesso de blastos-1 (AREB-1)	Citopenia(s) < 5% de blastos ^b Ausência de bastonete de Auer Monócitos < 1.000/mm ³	Displasia de única ou múltiplas linhagens 5 a 9% de blastos ^b Ausência de bastonete de Auer
Anemia refratária com excesso de blastos-2 (AREB-2)	Citopenia(s) 5 a 9% de blastos Bastonete de Auer presente ou não < 1x10 ⁹ /L de monócitos	Displasia de única ou múltiplas linhagens 5 a 19% de blastos Bastonete de Auer presente ou não ^c
Síndrome mielodisplásica-não classificável (SMD-NC)	Citopenias $\leq 1\%$ de blastos ^b	Displasia em < 10% das células em uma ou mais linhagem mielóide quando acompanhada de anormalidades citogenéticas presuntivas de SMD ^d < 5% de blastos
Síndrome mielodisplásica associada com del(5q) isolada	Anemia Contagem de plaquetas normal ou elevada Blastos ausentes ou raros (< 1%)	Normo a hiperplasia megacariocítica Núcleo hipolobulado < 5% de blastos Anormalidades citogenéticas: del(5q) isolada

^a Bicitopenia pode ser observada ocasionalmente. Casos com pancitopenia devem ser classificados como SMD-NC

^b Se a porcentagem de mieloblastos na MO for < 5%, mas existirem 2 a 4% de mieloblastos no SP, deve-se classificar como AREB-1.

Casos de CRDU e CRDM com 1% de mieloblastos no SP devem ser classificados como MDS-NC.

^c Casos com bastonete de Auer e < 5% de mieloblastos no SP e < 10% na MO devem ser classificados como AREB-2

^d Mais frequentes: -7 ou del(7q), -5 ou del(5q), i(17q) ou t(17p), del(11q), del(12p) ou t(12p), -13 ou t(13q), t(11;16)(q23;p13.3).

Fonte: Swerdlow e cols, 2008.

Devido à heterogeneidade da patogênese da SMD, em 1997, foi estabelecida uma classificação de risco baseada na estratificação dos pacientes em subgrupos de prognósticos distintos, conhecido como: “Sistema Internacional de Pontuação de Prognóstico” (do inglês, *International Prognostic Scoring System-IPSS*). Atualmente, esse é sistema empregado para avaliar o impacto prognóstico na sobrevida e chance de transformação em leucemia aguda. São 4 categorias de risco: baixo grau, grau intermediário 1, grau intermediário 2 e alto grau, e são baseadas na contagem

de células blásticas, citopenias e anormalidades cromossômicas (Tabela 2) (Mufti, 2004; Cazzola e Malcovati, 2010). Cada fator de risco é graduado e totalizado gerando uma pontuação que estima a sobrevida e o risco de transformação em LMA (Tabela 3) (Mufti, 2004).

Tabela 2 - Sistema internacional de pontuação de prognóstico (IPSS): variáveis prognósticas de acordo com a porcentagem de blastos, cariótipo e citopenias, aplicado a pacientes com diagnóstico de SMD.

Indicador de Prognóstico	0	0,5	1,0	1,5	2,0
% de Blastos na medula	<5	5-10	-	11-20	21-30
Cariótipo	Bom	Intermediário	Ruim	-	-
Citopenias	0/1	2/3	-	-	-

- Indica que não se aplica; Bom = normal, -Y, del(5q), del(20q); Ruim = complexo (≥ 3 anormalidades) ou anormalidades no cromossomo 7; e Intermediária = outras anormalidades. Fonte: Nimer, 2008.

Tabela 3 - Sistema internacional de pontuação de prognóstico (IPSS): Fator de risco, subgrupos, média de sobrevida e tempo de transformação em LMA.

Grupo de risco	Pontuação Total (Score)	Sobrevida média (anos)	Tempo para 25% de progressão para LMA
Baixo	0	5,7	9,4
Intermediário 1	0,5-1,0	3,5	3,3
Intermediário 2	1,5-2,0	1,2	1,1
Alto	$\geq 2,5$	0,4	0,2

Fonte: Nimer, 2008.

No entanto, o IPSS não é suficiente para auxiliar na escolha da intervenção terapêutica. Com o intuito de suprir as limitações do IPSS, Malcovati e cols (2007) desenvolveram um modelo de prognóstico dinâmico, o WPSS. Esse sistema utiliza a classificação da OMS, o cariótipo e a necessidade transfusional de hemácias (como um indicador de anemia sintomática) (Malcovati e cols, 2007). Porém, até hoje o IPSS, é o definidor na SMD e o sistema utilizado no tratamento do paciente e no estabelecimento de novos marcadores moleculares que reflitam a progressão da doença (Komrokji, Zhang e Bennett, 2010).

1.1.5. Características clínicas e diagnósticas

As manifestações clínicas mais comuns nos pacientes são fadiga, palidez, dispnéia, infecções devido à leucopenia, púrpura e complicações hemorrágicas, resultantes da plaquetopenia e disfunção plaquetária presentes na maioria dos indivíduos com SMD (Mufti, 2004; Nimer, 2008; Bart e Deeg, 2010). Como visto os sinais e sintomas são inespecíficos, sendo assim o diagnóstico laboratorial é determinante. A avaliação da medula óssea e do sangue periférico (morfologia, citogenética e citometria de fluxo) revela as características da doença e excluem outras patologias que apresentam citopenias periféricas (Moraes e cols, 2009).

Os pacientes geralmente são diagnosticados com anemia de causa desconhecida, displasia citológica de uma ou mais linhagens da medula óssea e podem ter aumento de mieloblastos de 5% a 19% (Komrokji, Zhang e Bennett, 2010). A descoberta ocorre por meio de exames rotineiros, pois, geralmente os pacientes são assintomáticos (Hall e Foucar, 2010).

As características morfológicas geralmente incluem insuficiência da medula óssea, diferenciação anormal com “alterações megaloblastóides”, megacariócitos atípicos, hiperplasia eritróide, defeito na maturação da série mielóide, aumento de blastos e sideroblastos em anel e alto risco de transformação para leucemia aguda (Steensma e cols, 2001; Hall e Foucar, 2010) (Figura 1). A medula é considerada displásica quando as alterações estão presentes em >10% das células de uma ou mais séries hematopoéticas (Moraes e cols, 2009).

Figura 1 - Fotos de esfregaço de medula óssea de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica. A – Célula gigante poliplóide segmentada B – Disgranulocipotoiose – células hipogranulares da granulocitopoiese; C- Eritroblastos com mitoses anormais. Presença de cromossomos aglomerados e fragmentados e D – Eritroblastos com alterações megaloblásticas. Forma binucleada na parte superior central. Retirado de: Atlas de Hematologia – Löffler e Rastetter

Na avaliação hematológica periférica é considerada a presença de citopenia(s) sustentada(s) por 4-8 semanas. As principais características do sangue periférico incluem monocitoses, anomalia de Pelger Huet, células mielóides ou eritróides imaturas circulantes e macrocitose (Nimer, 2008).

A imunofenotipagem é realizada para detectar expressões anormais de antígenos celulares relacionados à linhagem e maturação das diversas séries hemopoéticas e para verificar aumento de marcadores pró-apoptóticos (Loken e cols, 2008). A investigação de marcadores de série granulocítica, tais como, HLA-DR, CD33, CD13, CD11b, CD117, CD15, CD16 e CD45 é necessária, uma vez que, esta linhagem é a mais acometida nos pacientes com SMD (Loken e cols, 2008).

Outros testes normalmente realizados incluem a citoquímica das células da medula óssea (peroxidase, esterases) e citogenética (Yoshida, 1996; Mufti, 2004).

Apesar dos critérios diagnósticos serem definidos, ainda há muitos casos de citopenia em que o diagnóstico de SMD é difícil de ser estabelecido (ou excluído), devido a algumas situações de difícil diagnóstico como, por exemplo: pacientes com anormalidades cromossômicas e citopenia, sem displasia em medula óssea, ou paciente com anemia macrocítica com necessidade transfusional, perfil bioquímico

do ferro normal, sem deficiência vitamínica, sinal de displasia e anormalidades cromossômicas (Valent e cols, 2007; Wimazal e cols, 2007).

1.1.6. Alterações cromossômicas

As síndromes mielodisplásicas (SMDs) são causadas por transformações neoplásicas das células-tronco hematopoéticas (CTH) ou progenitoras mielóides, estas passam a ter suas funções alteradas e sofrem uma transformação para clone pré-maligno. Este clone associa-se a displasia morfológica, disfunção celular, aumento da liberação de citocinas inibitórias, diferenciação celular prejudicada e instabilidade genômica (Nimer, 2008).

A instabilidade genômica está presente em 30 a 50% dos pacientes com SMD primária e a análise citogenética tem sido um importante instrumento determinante no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento evolutivo da doença (Chauffaille, 2006).

A detecção de alterações cromossômicas deve ser feita por técnica convencional, o bandamento GTG (Giemsa-Tripsina-Giemsa) é a técnica mais comumente utilizada e é necessária a avaliação de 20 a 25 metáfases na medula óssea. Em casos de ausência ou pequeno número de células metafásicas para cariótipo convencional, a avaliação adicional por método de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) tem sido utilizada com o mesmo valor que o cariótipo convencional ou até mesmo para confirmar alterações gênicas visualizadas no bandamento (Valent e cols, 2007). A FISH por ser uma metodologia de alta resolução, aumentou as possibilidades de análises de alterações cromossômicas como ganhos, deleções e amplificações envolvidas em cânceres e outras doenças humanas. O método da FISH consiste no anelamento específico entre uma sonda de oligonucleotídeo com marcação fluorescente e a sequência de ácido nucléico pertencente à amostra analisada, assim possibilita a detecção de sequências específicas de DNA e RNA em cromossomos metafásicos ou núcleos interfásicos (Beatty, Mai e Squire, 2002).

As principais alterações na SMD incluem: nulissomia do cromossomo Y, deleções do braço longo dos cromossomos 5, 7, 20, monossomia do 7 e trissomia

do 8 (Bejar e Ebert, 2010). A trissomia do cromossomo 8, nulissomia do Y e a deleção do braço longo do cromossomo 20 [del(20q)] são consideradas desordens clonais apenas se estiverem acompanhadas por critérios morfológicos. A nulissomia do Y, por exemplo, pode ocorrer normalmente em homens mais velhos (Nimer, 2008).

Entre as alterações citadas convém destacar: 1) deleção do braço longo do cromossomo 5 [del(5q)] isolada, a qual está associada a melhor prognóstico e ocorrência de anemia macrocítica, plaquetas variáveis e baixa propensão à transformação em LMA (Pedersen, 1998; Benjamin, 2010; Garcia-Manero, 2010); e 2) deleção do braço longo do cromossomo 20 [del(20q)] que apresenta prognóstico favorável quando apresentada isolada ou com apenas mais uma anormalidade citogenética e está associada à baixa contagem de blastos. Por outro lado, se esta deleção estiver associada a um cariótipo complexo é um indicador de evolução da doença (Hasserjian e Dal Clin, 2011).

Do ponto de vista citogenético, a SMD caracteriza-se pela presença de anormalidades cromossômicas não balanceadas (deleções, monossomias, trissomias). Dessa forma, é provável que a perda ou inativação de genes supressores tumorais possa constituir no mecanismo primário de patogênese na SMD e a ativação de oncogenes seja um evento necessário à manutenção desse fenótipo. Diferentemente do que se observa na LMA, anormalidades cromossômicas balanceadas (translocações e inversões) são eventos raros na SMD (Nimer, 2008), além de muitos pacientes apresentarem cariótipos normais (Haase e cols, 2007; Bejar e Ebert, 2010).

1.1.7. Alterações gênicas

Como mencionado acima, no estágio inicial da SMD a hematopoese ineficiente é atribuída em parte a apoptose excessiva das células hematopoéticas. Por isso, proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) têm sido utilizadas como marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico de SMD, pois, com a evolução da doença o nível de apoptose decresce e pode levar ao desenvolvimento de LMA (Mihara e cols, 2006; Gianelli e cols, 2007). Essas proteínas IAPs incluem 8

membros e entre eles convém citar: NAIP (proteína inibidora de apoptose neuronal), cIAP1 (IAP1 citoplasmática) e survivina que são hiperexpressas em SMD e utilizadas como marcadores de distinção entre SMD e LMA *de novo* (Yamamoto e cols, 2004).

Também importantes são as proteínas da família Bcl-2, as quais em resposta a um dano celular funcionam como sentinelas, migram para a mitocôndria e alteram a interação entre as proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-X_L) e pró-apoptóticas (Bax e Bak). Como resultado, ocorre a liberação de moléculas solúveis que inibem proteínas inibidoras da apoptose e contribuem para o desenvolvimento da neoplasia (Youle e Strasser, 2008). De fato, em SMD estudos de expressão gênica em células-tronco hematopoéticas CD34+ mostraram alterações nos genes pró- e anti-apoptóticos ao longo da evolução da doença. Enquanto no estágio inicial estão presentes em maior quantidade as proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bak), durante a progressão da doença ocorre a hiperexpressão das proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-X_L) (Parker e cols, 2000).

Mutações em outros genes têm sido relatadas, como por exemplo: genes de cinases dependentes de ciclinas (CDK), TP53 (gene supressor tumoral), RUNX1 (Runt-related transcription fator 1), oncogene homólogo a v-ras (NRASD12), TET2 (tet oncogene Family member 2), PTEN (phosphatase and tensin homolog) (Gaglio, Dionne e Compton, 1997; Katayama, Brinkley e Sen, 2003).

As proteínas Auroras Cinases A e B representam outro tipo de gene que foi pouco investigado em SMD e desempenha importante papel no ciclo celular. Esses genes se mostraram hiperexpressos em diversos tumores e foi sugerido estarem associados com a instabilidade genômica durante a progressão tumoral (Musacchio e Salomon; 2007; Ye e cols, 2009).

1.2. Auroras Cinases

As auroras cinases representam uma família de serina/treonina cinases com papel crucial no ciclo celular em várias fases da mitose: alinhamento de cromossomos, segregação e citocinese (Dongjiu e cols, 2009). A família das auroras cinases inclui três membros designados Aurora A, B e C. Na Tabela 4 estão

sumarizadas suas propriedades, localização nos cromossomos, substratos, alteração encontrada em câncer e suas funções.

Tabela 4 – Caracterização das Auroras Cinases: localização, nível expressão, substratos e função.

	Localização Cromossômica	Alteração em Câncer	Proteína de Ligação/Substrato	Função
Aurora A	20q13	Amplificação Hiperexpressão	TPX2 AIP p53 PPI cdc20 RasGAP TACC3	Segmentação para microtúbulos Degradação Supressão do potencial de transformação Regulação + e - atividade cinase Degradação Inibição da atividade cinase Controle da dinâmica dos microtúbulos
Aurora B	17p13	Hiperexpressão	INCENP Histona H3 CENP-A RasGAP	Segmentação para centromeros Aumento da atividade cinase Segregação dos cromossomos Citocinese/ Segregação dos cromossomos Inibição da atividade cinase
Aurora C	19q13.43	Hiperexpressão	Não conhecido	

Adaptado de Katayama, Brinkley e Sen ,2003.

O gene da Aurora Cinase A (*AURKA*) está localizado no cromossomo 20q13 e sua ativação é necessária para entrada na mitose, maturação, separação dos centrossomos e montagem dos fusos e cinetócoros (Dongjiu e cols, 2009). Essa proteína apresenta oxilação nos níveis de expressão durante as fases do ciclo celular (Figura 2) (Bischoff e cols, 1998). Alterações nos níveis de expressão deste gene comprometem a continuidade do ciclo. A hipoexpressão de *AURKA* resulta na inibição da progressão do ciclo celular na fase G2/M (Du e Hannon, 2004). Por outro lado, a hiperexpressão de *AURKA* causa amplificação do centrossomo e resulta em segregação cromossômica ineficiente, com início prematuro da anáfase (Meraldi, Honda, e Nigg, 2002; Goepfert, e cols, 2002; Anand e cols, 2003).

O gene da Aurora Cinase B (*AURKB*) está mapeado no cromossomo 17p13. É uma proteína de localização dinâmica, que se localiza em diferentes sítios conforme

estão associadas com o crescimento e proliferação anormal das células neoplásicas e manutenção de instabilidade genômica (Ikezoe e cols, 2007; Yang e cols, 2007; Huang e cols, 2008; Lucena-Araujo e cols, 2010; Oliveira e cols, 2010).

Em SMD, há um único estudo que investigou uma possível associação entre nível de aurora cinase A e B em pacientes portadores de SMD e a evolução da doença (Ye e cols, 2009). Nesse estudo, os autores analisaram o nível de mRNA relativo a *AURKA* e *AURKB*, contagem de blastos e alterações citogenéticas em células CD34 de 20 pacientes portadores de SMD. Pode-se observar que mRNA *AURKA* e *AURKB* é hiperexpresso, mas não foi encontrado nenhuma correlação com os demais parâmetros analisados (Ye e cols, 2009).

Outra possível associação das auroras cinases é a instabilidade genômica. Em alguns trabalhos como em tumores de mama e carcinoma de bexiga existe amplificação de aurora cinase A e estes estão associados ao pior prognóstico (Denzinger e cols, 2007; Bodvarsdottir e cols, 2007).

Em nosso grupo, Oliveira e cols (2010) associaram o cariótipo complexo de um paciente com LMA e amplificação do gene *MLL* com a hiperexpressão de aurora cinases e sugeriram o papel desses genes na manutenção da instabilidade genômica. A *AURKA* é um componente chave, regulador da via TP53, com isso, sua hiperexpressão leva ao aumento da degradação do TP53, facilitando a transformação oncogênica (Oliveira, 2010).

Outro trabalho de nosso grupo, Lucena-Araujo e cols (2010) avaliaram a expressão de *AURKA* e *AURKB* em 70 pacientes com LMA de novo e identificaram uma associação entre a hiperexpressão de *AURKA* e *B* e citogenética desfavorável, bem como uma maior contagem de leucócitos no sangue periféricos desses pacientes. Uma vez que os autores observaram uma forte correlação entre achados citogenéticos desfavoráveis em pacientes com LMA de novo e altos níveis de expressão de *AURKA* e *AURKB* (risco relativo: 4.5, IC95%, 2.8 – 7.1) foi sugerido pelo grupo que determinados grupos de pacientes com características clínicas e biológicas definidas poderiam se beneficiar desses achados com novas estratégias terapêuticas que utilizem inibidores de aurora cinases (Lucena-Araujo, 2010).

No entanto, em leucemias não existem estudos que relatem amplificação gênica (Mountzios, Terpos e Dimopoulos, 2008). Assim, o intuito neste estudo é avaliar se existe amplificação do gene e correlacionar com a análise citogenética convencional.

Um segundo objetivo do presente estudo é a avaliação desses genes em outras células do microambiente tumoral, como por exemplo, as células estromais mesenquimais multipotentes, amplamente conhecida como célula tronco mesenquimal (CTMs).

Considerando que SMD é caracterizada por hematopoese anormal como resultado de alterações genéticas, epigenéticas e imunológicas nas células-tronco hematopoéticas e que estas estão em estreita associação com as CTMs: a proposta do presente estudo é caracterizar as células hematopoéticas (CHs) e células estromais mesenquimais multipotentes (CTMs) de pacientes portadores de SMD e identificar se ambas estão alteradas ou se alterações ocorrem apenas nas células hematopoéticas.

1.3. CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES

1.3.1. Histórico

Em 1867, Julius Cohnheim um patologista alemão, sugeriu a presença de células precursoras não-hematopoéticas na medula óssea (revisado por Prockop, 1997), porém, isso apenas se confirmou na década de 60 por Danis (1960) e Friedenstein (Friedenstein, Piatetzky-Shapiro e Petrakova, 1966).

Estas células desde a sua descrição original receberam diversos nomes de acordo com as suas características. Em 2005, que a Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT – do inglês, *International Society for Cellular Therapy*) propôs uma nova nomenclatura para designar a população de células fibroblastóides que crescem aderentes ao plástico, isoladas dos mais diversos tecidos e com capacidade de diferenciação multipotencial *in vitro* - células estromais mesenquimais multipotentes. Porém, o acrônimo CTM (MSC – do inglês, *Mesenchymal Stem Cell*) proposto com Dr. Arnold Caplan na década de 90 permanece com seu uso (Horwitz e cols, 2005).

1.3.2. Isolamento e cultivo

Inicialmente as CTMs foram identificadas na medula óssea e subseqüentemente isoladas a partir de diversos tecidos adultos e fetais (Phinney e Prockop, 2007; Covas e cols, 2008; Kastrinaki e cols, 2010).

Estas células são isoladas utilizando-se o método originalmente descrito por Friedenstein (Friedenstein, Gorskaja e Kulagina, 1976), através de sua capacidade de adesão a superfície plástica (Dominici e cols, 2006; Chamberlain e cols, 2007, Prata e cols, 2010). As CTMs por aderirem à placa de cultivo, podem ser isoladas e separadas das células tronco hematopoéticas, células não aderentes e após de repetidas passagens as CTMs podem ser consideradas relativamente isentas de células hematopoéticas (Colter e cols, 2000).

Porém, outros métodos de isolamento das CTMs podem ser mais promissores, devido permitirem a obtenção de uma população celular pura, como por exemplo, seleção positiva ou negativa por coluna ou citometria de fluxo (Gronthos e cols, 2003, Campioni e cols, 2003; Barry e cols, 1999; Alhadlaq e Mao, 2004; Tondreau e cols, 2004). Porém, nesse estudo optou-se pelo procedimento clássico de aderência ao plástico, uma vez que tendo como fonte a medula óssea, a obtenção de uma população pura é facilitada.

1.3.3. Propriedades Biológicas

A identidade fenotípica das CTMs não é única e a mesma compartilha antígenos expressos por múltiplas linhagens celulares (Alhadlaq e Mao, 2004). As CTMs se caracterizam pela negatividade aos marcadores endoteliais ou hematopoiéticos (CD31, KDR, CD14, CD34, CD45) e positividade para uma variedade de antígenos de superfície celular como Stro-1, CD73 (ecto 5 nucleotidase), CD90 (thy-1), CD105 (receptor de TGF- β III), CD140b e CD146 (Delorme e cols, 2008; Deschaseaux, Sensebe e Heymann, 2009).

Como o próprio nome diz as CTMs são multipotentes, ou seja, tem o potencial de se diferenciar em mais de um tipo celular. Em geral, as CTMs podem se

diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos (Pittenger e cols, 1999; Caplan e Bruder, 2001).

As CTMs são consideradas uma linhagem de células progenitoras somáticas, as quais estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo medula óssea, tecido adiposo, veia e artéria umbilical, cortex cerebral, pele, entre outros (Covas e cols, 2008). Além do caráter multipotente, apresentam o potencial de secretar um grande número de moléculas bioativas, como as moléculas de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas e receptores para fatores de crescimento e podem atuar em diferentes processos durante a regeneração tecidual: 1) imunomodulação; 2) anti-apoptose, 3) angiogênese; 4) crescimento e diferenciação da célula-tronco; 4) anti-fibrose e 6) quimo-atração (Figura 3), (da Silva-Meirrelles e cols, 2009).

Essas características sugerem que as CTMs são responsáveis pelo *turnover* e manutenção dos tecidos do organismo e tornaram-se foco de interesses de pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular (Monteiro e cols, 2009).

Figura 3 - Modelo de atuação das CTM na reconstrução do tecido lesionado. É proposto que as CTMs secretam um conjunto de fatores solúveis parácrinos que podem auxiliar na regeneração tecidual contribuindo em um dos processos acima mencionados: imunomodulação, anti-apoptose, angiogênese, crescimento da célula tronco ou progenitora tecidual, anti-fibrose e quimoatração. Retirado de da Silva-Meirrelles e cols, 2009.

1.3.4. CTMs em SMD

O estroma tumoral desempenha papel crítico na progressão tumoral. É conhecido que o estroma medular é constituído por fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais, células derivadas de células hematopoéticas (ex. linfócitos e monócitos) e células estromais mesenquimais multipotentes (CTMs). Estas últimas têm sido estudadas em SMD e recentemente, foi proposto um mecanismo pelo qual as CTMs e demais células do microambiente tumoral contribuem para a progressão tumoral em SMD (Figura 4), (Model, 2011).

De acordo com esse modelo, antígenos tumorais ativam linfócitos T. Esses, uma vez ativados, expressam PD-1 em sua superfície e aumentam a produção de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$, que também passam a ser hiper-expressos pelas células estromais. Essas citocinas ativam NF κ B e em seguida induzem a expressão de B7-H1 nos blastos de SMD. Essas interações entre moléculas PD-1 em linfócitos T e moléculas B7H1 nos blastos geram sinais bi-direcionais, os quais induzem a apoptose em linfócitos T e aumentam o potencial proliferativo dos blastos. Além disso, diversas outras citocinas são secretadas pelas células estromais mesenquimais multipotentes no contexto tumoral, que também contribuem para ativação de linfócitos T e blastos (Figura 4), (Model, 2011).

Figura 4 - Modelo de atuação das CTM na progressão tumoral em SMD. De acordo com esse modelo, alterações no microambiente tumoral, isto é, hiper-expressão das citocinas $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$ é o evento primário para a progressão da doença. A proliferação acentuada dos blastos pode ser decorrente de alterações genéticas secundárias nos blastos. Retirado e modificado de Model, 2011.

Portanto, estudos envolvendo a caracterização de CTMs devem ser investigados em SMD em busca de drogas anti-tumorais que bloqueiem a atuação das células hematopoéticas e mesenquimais. Os primeiros estudos se concentraram na caracterização cariotípica das CTMs. Blau e cols (2007) analisaram o cariótipo de 18 pacientes portadores de SMD e observaram alterações citogenéticas estruturais em 44% dos indivíduos. As principais alterações encontradas foram t(1;7), t(4;7), t(7;9), t(7;10), t(7;19) e t(15;17) e além disso não foram clonais. Observou-se ainda um perfil cariotípico distinto em CTMs comparado ao perfil das células tronco hematopoéticas sugerindo que essas alterações em CTMs são eventos de alterações gênicas secundárias. Esses dados foram também confirmados por Lopez-Villar e cols (2009) que também observaram perfil cariotípico distinto entre CTH e CTM. Esses pesquisadores observaram que em CTMs de SMD, as alterações genéticas por ganho gênico foram mais frequentes que as perdas, que foram encontrados em apenas 4 de 36 pacientes analisados.

Outro ponto importante foi à caracterização não apenas das alterações gênicas em CTMs como também suas propriedades biológicas. Nesse estudo, Lopez-Villar e cols (2009) estudaram as CTM de 36 pacientes portadores de SMD e observaram que em SMD essas células diferem das CTM de indivíduos saudáveis em 3 aspectos: a) potencial proliferativo menor; b) níveis menores dos antígenos de superfície CD105 e CD104 e c) potencial de diferenciação em adipócito e osteócito similar ao normal, mas um menor potencial de diferenciação em condrócito.

Por outro lado, estudos realizados por Klaus e cols (2010) mostraram resultados discordantes. Esse estudo envolveu 13 pacientes portadores de SMD e os autores mostraram que o potencial proliferativo e imunofenotípico das CTM de pacientes SMD são similares às CTM de indivíduos saudáveis. Uma possível explicação poderia ser a heterogeneidade dos pacientes portadores de SMD nesses diferentes estudos (Klaus, 2010).

A importância das interações bidirecionais entre o tumor e seu microambiente foi sugerida em 1889 por Stephen Paget com a teoria conhecida como *Hipótese da Semente e Solo* que postulou que as interações entre a semente (o tumor) e o solo (o microambiente tumoral) são determinantes para a progressão neoplásica (Langley e Fidler, 2011). Assim, muitas evidências sugerem que além das anormalidades intrínsecas das CTHs, a hematopoiese ineficiente pode também resultar em anormalidades no microambiente medular, incluindo desde desordem hematopoética

até interações estromais e desequilíbrio na produção de fatores de crescimento e inibidores hematopoéticos (Greenberg, 2005). Portanto, estudos adicionais que visem a caracterização das células-tronco hematopoéticas e células estromais mesenquimais multipotentes de pacientes portadores de SMD poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos que governam a progressão tumoral e, consequentemente, a identificação de novos alvos terapêuticos anti-tumorais.

Desta maneira, este estudo visa caracterizar as células hematopoéticas e as células estromais mesenquimais multipotentes de indivíduos portadores de SMD, ambas as células serão caracterizadas por citogenética convencional e molecular para os genes aurora cinase A e B. Além disso, será realizada a análise comparativa das propriedades biológicas das células CTM de indivíduos SMD com indivíduos saudáveis.

2. OBJETIVOS

- Avaliar o perfil citogenético das células hematopoéticas dos pacientes com SMD e compará-las com o perfil citogenético obtido das CTMs derivadas dessas amostras.
- Associar os achados da citogenética convencional com citogenética molecular (FISH) para os genes *AURKA* e *AURKB* nas CHs e CTMs.
- Avaliar as propriedades biológicas das CTMs dos pacientes com SMD e compara-las com as CTMs de indivíduos saudáveis.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram incluídas 25 amostras de medula óssea de pacientes com diagnóstico de SMD e idade maior ou igual a 18 anos, encaminhados ao serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (HCFMRP – USP), durante o período de 2009 a 2010. Os critérios de inclusão adotados neste trabalho foram: 1. Amostra ao diagnóstico, livre de qualquer tipo de tratamento; 2. Disponibilidade de células adequadas para as análises.

Para controle citogenético foram incluídas 8 amostras de medula óssea de doadores saudáveis (indivíduos controles), desprovidos de doença hematológica, com idade superior ou igual a 18 anos, independente de gênero, raça ou condição social e pertencente ao grupo de doadores de medula óssea do HCFMRP/USP e Hospital Amaral Camargo de Jaú (HAC)-SP. Todas as amostras foram obtidas somente após pacientes e doadores ou responsáveis concordarem em participar do estudo e assinarem o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” conforme o modelo em Anexo (Anexo A e B) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de acordo com o Processo HCRP nº 3823/2009 (Anexo C).

As amostras foram coletadas na ocasião do diagnóstico, por meio de punção da crista ilíaca e sob condições adequadas de assepsia. Foram coletados 4 mL de medula óssea em tubos a vácuo com heparina sódica. Este material foi utilizado para realização de análises citogenética e obtenção de CTMs.

3.2. Isolamento, cultivo e análise citogenética das células hematopoéticas

O estudo envolveu células hematopoéticas (medula total) de 25 pacientes portadores de SMD e 8 amostras controle. O cultivo das células hematopoéticas foi realizado em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina e L-glutamina, em câmara úmida, a 37° C com 5% de CO₂. As células foram submetidas ao cultivo em uma densidade de 1x10⁶ céls/ mL de meio por um período de 72 horas. Após o tempo decorrido eram adicionados 200 µL de

colcemid (0,15 µg/mL) e as culturas mantidas à 37°C por mais 15 minutos. A suspensão celular era transferida para um tubo cônico tipo *falcon* (capacidade para 15 mL), com auxílio de uma pipeta *Pasteur*, e centrifugada por 7 minutos a 1200rpm. Após a centrifugação, o *pellet* celular era ressuspendido em 5 mL de solução de KCl (0,075 M), previamente aquecida (37°C) e a amostra incubada em banho-maria (37°C) por 20 minutos. Em seguida, a amostra era centrifugada (7min/1200rpm) e o *pellet* celular submetido à solução fixadora (metanol e ácido acético, na proporção de 1:1). Eram realizadas 3 incubações com a solução fixadora, e após a última incubação, as células eram gotejadas sobre a superfície de uma lâmina previamente lavada. Foram preparadas pelo menos cinco lâminas de cada cultura. As lâminas foram mantidas à temperatura ambiente por um período de 24h, antes de se proceder ao bandamento cromossômico. O restante do material foi armazenado em freezer (-20°C) para a utilização na técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH).

O processo de bandamento cromossômico foi realizado com utilização de solução de tripsina (1%) (Sigma), diluída em PBS (5:45 mL, respectivamente). As lâminas foram imersas em solução de tripsina por um tempo variável de 8 ± 2 s, posteriormente enxaguadas em água corrente e submetidas à coloração com Giemsa por 5 minutos. Após a coloração, as lâminas estavam prontas para análise. Para cada paciente foram analisadas 20 (vinte) células em metáfase, com resolução estimada de 300 bandas, por conjunto haplóide e os cariótipos foram descritos de acordo com o ISCN (2009) (Shaffer, 2009). A análise citogenética foi realizada com o auxílio do microscópio Axio Imager M2 (Zeiss, Jena, Germany), e as imagens cariotípicas adquiridas com auxílio do software *BandView* version 5.5 (ASI, Carlsbad, CA, USA).

3.3. Isolamento, cultivo e expansão das CTMs

As CTMs foram isoladas das amostras de medula óssea dos pacientes com SMD (25 amostras) e dos indivíduos controles (8 amostras), em meio de cultivo pobre em glicose e altas concentrações de aminoácidos e proteínas (soro bovino fetal). Após contagem das células do aspirado medular, cerca de 1×10^6 cels/mL eram

submetidas ao cultivo em garrafas de 25 cm² em meio α -MEM (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) acrescido de antibióticos e enriquecido com 15% de soro bovino fetal (Fetal Bovine Serum Standard - HyClone™, Logan, UT, EUA). As células foram cultivadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. Após 3 ou 5 dias, era realizada a remoção das células não-aderentes e adicionado novo meio de cultivo. A cada 2 ou 3 dias, o meio de cultura era trocado e a cultura celular mantida até atingir a confluência de 70-90%.

Ao atingirem essa confluência, as CTMs eram submetidas o tratamento com 1 mL de tripsina-EDTA 1X (0,05% *Trypsin* 0,53 mM EDTA, Gibco™ Carlsbad, CA, EUA) por 2 a 4 minutos à 37°C. Após a inativação da tripsina, a suspensão celular era lavada, resuspensa em meio de cultura e plaqueadas a uma densidade de 5x10⁴ céls/ cm². Ao atingirem a 3ª passagem, as células eram submetidas às análises previstas.

3.3.1. Caracterização das CTMs

3.3.1.1. Diferenciação das CTMs em adipócitos e osteócitos

As CTMs foram induzidas à diferenciação em adipócitos e osteócitos. Para tanto, 1x10⁴ células foram plaqueadas sobre as lamínulas em placas de 24 poços. Após a aderência celular era adicionado 1 mL de meio de indução em adipócitos ou osteócitos. O meio de indução em adipócito foi: α -MEM, SBF, suplementado com dexametasona 0,1mM (Decadron injetável, Prodome, Campinas, SP, Brasil), insulina 2,5mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e indometacina 100mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O meio de indução de diferenciação em osteócito foi: α -MEM, SBF, suplementado com dexametasona 1 μ M, ácido ascórbico 20mM e β glicerolfosfato 1 M (Reagem, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

3.3.1.2. Imunofenotipagem

Na técnica de citometria de fluxo, a suspensão celular passa por um sistema de canais que gera um fluxo laminar de células. Um feixe de luz atinge estas células sofrendo desvios de acordo com as características físicas das mesmas: tamanho celular, granularidade, complexidade interna da célula.

Os anticorpos monoclonais utilizados são conjugados com três diferentes fluorocromos: ficoeritrina (PE, do inglês *phycoeritrin*), isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*), PerCP (do inglês *peridinin chlorophyll*). Controles positivos e negativos foram incluídos para a adequada calibração do aparelho, análise dos resultados e definição da positividade da amostra.

A marcação das células ocorreu após a cultura das CTMs atingir a terceira passagem, as mesmas foram tripsinizadas, centrifugadas e o sobrenadante foi descartado, restando aproximadamente 1,5 mL de meio, em seguida realizou-se a contagem celular. Para realizar a marcação das células com os anticorpos monoclonais é preciso um número mínimo de 5×10^5 de células por tubo, portanto, após a contagem realizou-se o ajuste no volume final da suspensão celular para que esta quantidade de célula estivesse em um volume de 100 μ l, na qual foram acrescidos 5 μ l de anticorpo marcado com um fluorocromo (FITC, PE ou PerCP). Após adição do anticorpo a amostra foi incubada no escuro por 15 minutos, em seguida foi lavada com 1X PBS, centrifugada e sobrenadante descartado, ao *pellet* de células foi acrescido 100 μ l de 1X PBS. Uma vez que a suspensão celular tenha sido marcada pela técnica descrita, procedeu-se à aquisição das intensidades de fluorescências no citômetro.

A imunofenotipagem de células foi realizada com a utilização de anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos de superfície da membrana da célula. Para a identificação dessas células foi montado um painel contendo os seguintes marcadores CD105 PE (*Serotherc, Oxford, Inglaterra*), CD73 PE, CD45 FITC, CD14 PE, CD34 FITC, CD90 PE, CD13 PE (*Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA*), CD140B PE, CD146 PE e CD31 FITC.

3.3.2. Análise citogenética das CTMs

Ao atingirem a confluência de 70-90% foi adicionado colcemid (0,15µg/mL) e a amostra mantida à 37°C por 4 horas. Após esse período foram submetidas ao tratamento com tripsina-EDTA 1X (0,05% *Trypsin* 0,53 mM EDTA, Gibco™ Carlsbad, CA, EUA) como descrito no item 3.3. Posteriormente, seguiu-se à preparação citogenética, conforme descrito para as células hematopoéticas (item 3.2), sendo que parte do material foi armazenado em freezer (-20°C) para a utilização na técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH). Para cada paciente foram analisadas 20 (vinte) células em metáfase, com resolução estimada de 300 bandas, por conjunto haplóide e os cariótipos foram descritos de acordo com o ISCN (2009) (Shaffer, 2009). A análise citogenética foi realizada com o auxílio do microscópio Axio Imager M2 (Zeiss, Jena, Germany), e as imagens cariotípicas foram adquiridas com auxílio do software *BandView* version 5.5 (ASI, Carlsbad, CA, USA).

3.4. Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)

Para a realização da técnica de *FISH* foram utilizadas as mesmas amostras utilizadas para preparação citogenética anteriormente descrita nos itens 3.2 e 3.3.2. Após fixação do material, com fixador (1 metanol: 1 ácido acético) foram preparadas duas lâminas de cada paciente e as mesmas foram deixadas em temperatura ambiente, para desidratação, por pelo menos 24 horas, antes de proceder ao processo de desnaturação.

Preparo da lâmina: O DNA alvo foi desnaturado, incubando-se as lâminas em solução de formamida (70%/2XSSC), durante 5 minutos à 72°C±2°C. Posteriormente as lâminas foram desidratadas em série de etanol (etanol 70%, 80% e 100%), durante 1 minuto em cada solução. As lâminas foram mantidas em etanol 100%, à temperatura ambiente, até o momento da hibridação com a sonda.

A sonda para *AURKA* (20q13), marcada com o fluorocromo *PlatinumBright550* (vermelho), detecta alterações no número de cópias da região correspondente a esse gene, como controle a região 20q11 foi marcada com o

fluorocromo *PlatinumBright495*(verde), facilitando a identificação do cromossomo bem como, possível ausência de cópia do gene avaliado. O padrão de sinal esperado em casos normais são dois sinais em verde e dois em vermelhos, respectivamente, controle e gene de interesse.

Do mesmo modo, a sonda para *AURKB* (17p13) foi marcada com o fluorocromo *PlatinumBright550* (vermelho), para detectar alterações no número de cópias da região correspondente a esse gene e para facilitar a identificação do cromossomo foi incluída uma sonda centromérica do cromossomo 17, marcada com o fluorocromo *PlatinumBright495*(verde).

As sondas obtidas comercialmente (*AURKA*: ON *AURKA*(20q13)/20q11 e *AURKB*: *AURKB* (17/p13)/SE17; Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands) possuem padrão de apresentação, sendo assim, o esperado são 2 sinais em vermelho, representando o gene de interesse e 2 sinais verdes, que são os controles da reação.

Preparação da sonda: Em um tubo eppendorf adicionou-se 2µL da sonda para cada lâmina. Em seguida, procedeu-se a desnaturação em banho termostático, à 72°C±2°C, durante 10 minutos e após, a sonda foi mantida à 72°C, até o momento da aplicação à lâmina.

Hibridação *in situ*: Uma vez preparada, a sonda foi colocada sobre a superfície da lâmina seca, já desnaturada, sendo essa coberta com lamínula (24x60mm) e selada com “cimento de borracha” (*rubber cement*). Os procedimentos de aplicação da sonda e lamínula foram realizados em um ambiente desprovido de luz direta, com a finalidade de se evitar a degradação da sonda. Após montagem das lâminas, as mesmas foram colocadas em uma “câmara úmida” e submetidas ao processo de hibridação, à 37°C, por 6-16 horas.

Após hibridação, as lâminas foram “lavadas” com a solução 1 (2XSSC/ 0,1% Tween 20) por 2 minutos em temperatura ambiente, e finalmente com solução 2 (0,4XSSC/0,3% Tween 20) durante 2 minutos a 72°C, sem agitação. Ao término das “lavagens”, desidratou-se a lâmina em etanol 70%, 85% e 100% por um minuto cada, deixou-se secar e sobre a superfície de cada lâmina foram adicionados 10µL de solução de DAPI e colocada uma lamínula (24x60mm) para proteção do espécime.

Para cada paciente foram analisados 200 (duzentos) núcleos interfásicos, cujos critérios descritos estão de acordo com o ISCN (2009) (Shaffer, 2009). A

análise pela técnica de FISH foi realizada com o auxílio do microscópio Axio Imager M2 (Zeiss, Jena, Germany), com filtros específicos para DAPI, FITC e TEXAS RED. As imagens foram adquiridas com utilização do software *FISHView* version 5.5 (ASI, Carlsbad, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Perfil Clínico dos Pacientes portadores de SMD e indivíduos controles

Os pacientes com diagnóstico de SMD utilizados para o desenvolvimento do presente trabalho apresentaram a seguinte distribuição: 16 (64%) do sexo feminino e 9 (36%) do sexo masculino com mediana de idade 72 anos (23 e 90 anos).

No momento da inclusão no estudo, os pacientes apresentaram valores medianos de hemoglobina, glóbulos brancos, neutrófilos e plaquetas, respectivamente de: 11,2 g/dL, 4.400/mm³, 2.200/mm³ e 96.000/mm³.

A análise citogenética das células hematopoéticas (CHs) da medula óssea por bandamento GTG foi possível em 24 das 25 amostras, sendo 13 (52%) alterados, 11 (44%) normais. Nas CTMs foi possível a análise do cariótipo em 23 das 25 amostras, sendo 16 (64%) normais e 7 (28%) alteradas.

Avaliando o risco dos pacientes de acordo com o IPSS estes foram subdivididos em: 8 pacientes com baixo risco, 13 com risco intermediário-1, 3 intermediário-2 e 1 paciente não classificável, devido à ausência de metáfases na amostra para avaliação. As características clínicas dos pacientes ao diagnóstico estão detalhadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Características clínicas, laboratoriais dos casos de SMD estudados, admitidos no HC-FMRP-USP no período de março 2009 a dezembro de 2010.

Amostra	Idade (Anos)	HB	WBC	Neutrofilo	Plaquetas	Citopenia	Blastos	Cariótipo	IPSS
1	72	13,4	7400	4900	42	1	< 5%	bom – del(20q)	baixo
2	73	11	13200	5800	536	2	<5%	bom (normal)	intermediário-1
3	41	13,4	4400	1900	23	1	< 5%	int – inv(3q)	intermediário-1
4	83	8,9	6100	3000	214	1	< 5%	bom (normal)	baixo
5	70	9	1700	700	55	3	< 5%	bom (normal)	intermediário-1
6	77	14,8	3600	1800	102	2	< 5%	int – del(17p)	intermediário-1
7	66	13,6	3200	1900	53	2	< 5%	int - +9	intermediário-1
8	70	10,1	4900	1800	99	3	11-20%	bom (normal)	intermediário-2
9	23	15,2	4000	2000	56	2	< 5%	int – dup(1q)	intermediário-1
10	90	10,5	5600	2400	228	1	< 5%	**	**
11	65	10	3600	2300	174	1	< 5%	bom (normal)	baixo
12	68	14,2	1900	1100	139	1	< 5%	bom (normal)	baixo
13	69	16,4	3000	900	88	2	< 5%	bom (normal)	intermediário-1
14	72	7,8	5200	3100	323	1	< 5%	int - add(17p)	intermediário-1
15	43	11,6	2700	800	259	1	< 5%	bom (normal)	baixo
16	74	11,7	2300	1800	36	2	< 5%	Ruim – del(7q)	intermediário-2
17	84	11,2	4400	2600	118	2	< 5%	int - +15	intermediário-1
18	73	15,8	7300	5200	96	1	< 5%	bom (normal)	baixo
19	77	10,8	6200	4300	169	1	< 5%	bom (normal)	baixo
20	54	13,3	8600	4100	77	1	< 5%	int – inv(3q)	intermediário-1
21	71	10,3	3000	1700	55	3	< 5%	int – del(13q)	intermediário-1
22	80	7	5100	2300	293	1	< 5%	bom (normal)	baixo
23	76	10	5000	3400	70	2	< 5%	int - +8	intermediário-1
24	26	9,9	2400	700	70	2	< 5%	int - +5,del(8q),-14	intermediário-1
25	74	12,6	4000	2200	33	1	< 5%	ruim -4,del(7p), del(12p)	intermediário-2
média	66,84	11,7	4752	2508	136,32	-	-	-	-
mediana	72	11,2	4400	2200	96				

WBC: white blood cells (leucócitos); HB: hemoglobina, Plaquetas: *1000/mm³, IPSS: *International Prognostic Scoring System*; int: intermediário

Foram estudados 8 indivíduos saudáveis utilizados como controle que tiveram suas amostras coletadas voluntariamente por ocasião da doação de medula óssea ou células mesenquimais, sob técnicas anestésicas que variam de acordo com o Serviço em que foi coletada a amostra (HC-FMRP ou HAC) e intuito da doação. A mediana de idade foi de 25 anos (15 a 42 anos), sendo 5 (62,5%) pacientes do sexo feminino e 3 (37,5%) do sexo masculino.

Os indivíduos controle apresentaram valores medianos de hemoglobina, glóbulos brancos, neutrófilos e plaquetas, respectivamente de: 11,6 g/dL, 10.400/mm³, 7.555/mm³ e 230.000/mm³.

A análise citogenética das CHs e CTMs por bandamento GTG foi possível nas 8 (100%) amostras. As características hematológicas dos indivíduos controle estão resumidas na Tabela 6.

Tabela 6 - Características hematológicas dos indivíduos controles, estudados e admitidos no HC-FMRP-USP no período de março 2009 a dezembro de 2010.

Amostra	Idade (Anos)	HB	WBC	Neutrofilo	Plaquetas
1	32	12,5	8500	8000	260
2	18	10,8	10200	6900	200
3	42	12,4	10600	7110	285
4	20	10,7	5900	3640	171
5	28	13,6	8000	5440	226
6	25	10,3	12000	11200	262
7	15	10,7	14900	10700	163
8	25	13,5	13400	12300	234
média	25,6	11,81	10438	8161,25	225,13
mediana	25	11,6	10400	7555	230

WBC: white blood cells (leucócitos); HB: hemoglobina, Plaquetas: $\times 1000/\text{mm}^3$

4.2 Citogenética das CHs e CTMs de indivíduos controles

A análise citogenética das CHs e CTMs dos 8 indivíduos controles mostrou cariótipo normal, sem alterações cromossômicas em todos os indivíduos (Tabela 7).

Tabela 7 -. Perfil citogenético das células hematopoéticas e CTMs derivadas dos indivíduos controle (Bandamento GTG).

Amostra	Citogenética CHs	Citogenética CTMs	Idade (Anos)
1	46,XY [20]	46,XY[15]	32
2	46,XY[20]	46,XY[20]	18
3	46,XX[20]	46,XX[12]	42
4	46,XX[20]	46,XX[16]	20
5	46,XX[20]	46,XX[14]	28
6	46,XX[20]	46,XX[18]	25
7	46,XY[20]	46,XY[13]	15
8	46,XX[20]	46,XX[12]	25

4.3. Caracterização citogenética das CHs dos pacientes com SMD

A análise citogenética das CHs dos pacientes estudados (n=25) apresentou a seguinte distribuição: 13 apresentaram cariótipo alterado (52%), 11 tiveram cariótipo normal (44%) e em 1 paciente (4%) não foi possível à obtenção do cariótipo, devido à ausência de células metafásicas para análise (Tabela 8). Em 7 pacientes foram encontradas alterações estruturais (amostras 1, 3, 9, 14, 16, 20 e 21), que incluem deleções, inversões, duplicações, adições e três pacientes apresentaram alterações numéricas (amostras 7, 17 e 23) como, por exemplo, trissomia dos cromossomos 5, 8, 9, 15, e monossomia do cromossomo 14. Outros três pacientes apresentaram alterações numéricas e estruturais (amostras 6, 24 e 25) (Tabela 8).

Tabela 8 - Perfil citogenético das células hematopoéticas dos pacientes com SMD (bandamento GTG).

Amostra	Citogenética
1	46,XX,del(20)(q11)[7]/46,XX[13]
2	46,XY[18]
3	46,XX,inv(3)(q21q26)[5]/46,XX[12]
4	46,XX[20]
5	46,XX[15]
6	45-46,X,-Y[6],del(17)(p12)[4]/46,XY[12]
7	47,XX,+9[6]/46,XX[14]
8	46,XY[20]
9	46,XX,dup(1)(q32q21)[7]/46,XX[8]
10	Ausência de metáfases para análise.
11	46,XX[17]
12	46,XX [14]
13	46,XY[20]
14	46,XY,add(17)(p12)[4]/46,XY[16]
15	46,XY[20]
16	46,XX,del(7)(q22q36)[3]/46,XX[13]
17	47,XX,+15[4]/46,XX[12]
18	46,XY[20]
19	46,XX[20]
20	46,XX,inv(3)(q21q26)[6]/46,XX[14]
21	46,XY,del(13)(q12q14)[3]/46,XY[16]
22	46,XX[20]
23	47,XX,+8[4]/46,XX[11]
24	47, XY, +5[3],+del(8)(q21)[4],-14[3]/46,XY[12]
25	45,XX,-4[3],del(7)(p15)[2],del(12)(p12)[3]/46,XX[10]

A seguir são apresentados os cariótipos ao diagnóstico das células hematopoéticas de seis pacientes com SMD, por meio do bandamento GTG, descritos conforme normas do ISCN, 2009.

As amostras 3 e 20 apresentaram o mesmo cariótipo: inversão do braço longo do cromossomo 3, descrita como 46,XX,inv(3)(q21q26). A figura 5 ilustra o cariótipo da amostra 3.

Figura 5 - Cariótipo com bandamento GTG das células hematopoéticas da amostra 3. Observa-se a inversão do braço longo do cromossomo 3 (indicado por seta). Esse cariótipo 46,XX,inv(3)(q21q26) foi observado também na amostra 20.

A Figura 6 representa o cariótipo por bandamento GTG das células hematopoéticas da amostra 1. Observa-se deleção do cromossomo 20 resultando no cariótipo: 46,XX,del(20)(q11-qter).

Figura 6 - Cariótipo com bandamento GTG das células hematopoéticas da amostra 1. Observa-se a presença de del(20)(q11-qter) (indicado por seta). Cariótipo: 46,XX,del(20)(q11-qter).

A Figura 7 representa o cariótipo das células hematopoéticas da amostra 24. Observa-se trissomia do cromossomo 5, +del(8)(q21) e monossomia do cromossomo 14. Resultando no cariótipo 47,XY,+5,+del(8)(q21),-14.

Figura 7 - Cariótipo com bandamento GTG das células hematopoéticas da amostra 24. Observa-se a presença de trissomia do cromossomo +5,+del(8)(q21),-14. (indicado por seta). Cariótipo: 47,XY,+5,+del(8)(q21),-14.

A Figura 8 representa o cariótipo 47,XX,+9 das células hematopoéticas da amostra 7. Observa-se a trissomia do cromossomo 9.

Figura 8 - Cariótipo com bandamento GTG das células hematopoéticas da amostra 7. Observa-se a presença de trissomia do cromossomo 9. (indicado por seta). Cariótipo: 47,XX,+9.

A Figura 9 representa o cariótipo 45,X,del(17)(p12) das células hematopoéticas da amostra 6. Observa-se nulissomia do cromossomo Y e perda de um segmento do cromossomo 17: del(17)(p12).

Figura 9 - Cariótipo com bandamento GTG das células hematopoéticas da amostra 6. Observa-se a presença de nulissomia Y, del(17)(p12). (indicado por seta). Cariótipo: 45,X,del(17)(p12).

A Figura 10 representa o cariótipo 47,XX,+15 das células hematopoéticas da amostra 17. Observa-se a trissomia do cromossomo 15.

Figura 10 - Cariótipo com bandamento GTG das células hematopoéticas da amostra 17. Observa-se a trissomia do cromossomo 15 (indicado por seta). Cariótipo: 47,XX,+15.

Portanto, observou-se uma grande diversidade no perfil cariotípico das CHs desses pacientes. Alguns pacientes apresentaram cariótipo com perda de cromossomos inteiros e outros com ganhos. Em outros pacientes os cariótipos se mostraram mais complexos resultando em ganhos cromossômicos, associados com

inversões, adições e deleções de regiões específicas. Com uma análise comparativa dos dados hematológicos (leucócitos, neutrófilos e plaquetas) é possível perceber que existe uma diferença significativa entre os pacientes com SMD e os indivíduos controle.

4.4. Hibridação “*in situ*” por Fluorescência (FISH) para *AURKA* e *AURKB* nas CHs.

Após a análise das alterações citogenéticas por bandamento GTG foi realizada a caracterização a nível molecular das regiões dos genes *AURKA* (20q13) e *AURKB* (17p13) por FISH em todos os pacientes. Não foi identificada a presença de amplificação para esses genes a nível molecular, uma vez que, em todos os pacientes foram detectados dois sinais de hibridação, tanto para o gene *AURKA* como para o gene *AURKB*. A figura 11 representa a análise de quatro amostras, sendo três dessas, amostras que apresentaram alteração estrutural por bandamento GTG nos cromossomos 17 e 20 (amostras 1, 6, 14) e uma que não apresentou alterações nessas regiões (amostra 24).

Figura 11 - Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH) das células hematopoéticas de SMD (amostras 1, 6, 14 e 24) utilizando sondas fluorescentes de DNA (fluorescência vermelha) para os genes *AURKA* (20q13) e *AURKB* (17p13). Em todos os casos são observados apenas quatro “spots”, os dois verdes são os controles da reação e os vermelhos são os genes avaliados. Os núcleos foram contra-corados por DAPI (fluorescência azul).

4.5. Células estromais mesenquimais multipotentes (CTMs)

4.5.1. Caracterização morfológica das CTMs de pacientes com SMD e indivíduos controles

As CTMs dos indivíduos controles assim como dos pacientes com SMD foram isoladas de todas as amostras e cultivadas até a 3ª passagem. As células dos indivíduos controles e pacientes com SMD apresentaram-se morfológicamente como células fibroblastóides e núcleos definidos (Figura 12A, B).

Figura 12 - Caracterização morfológica das CTMs derivada da amostra 12 em cultura (100X). A- CTMs na 1ª passagem, B- CTMs na 3ª passagem.

4.5.2. Potencial de diferenciação das CTMs dos pacientes com SMD e indivíduos controles

As CTMs indiferenciadas dos indivíduos controles e dos pacientes com SMD foram induzidas à diferenciação em adipócitos e osteócitos pelo cultivo em meio específico. Dessa forma, observou-se que as células isoladas e cultivadas de pacientes portadores de SMD apresentam potencial de diferenciação em adipócito e osteócito, assim como as CTMs de indivíduos controle.

Conforme demonstrado na figura 13 foi evidenciado os depósitos de gordura a partir do 15º dia de cultivo em indivíduos portadores de SMD (Figura 13A e 13B) e em indivíduos saudáveis (Figura 13C). Na figura 13D evidencia-se a ausência de diferenciação em adipócito na cultura controle que não foi submetida ao meio indutor de diferenciação.

Figura 13 - Potencial das CTMs de SMD de diferenciação em adipócitos. As CTMs foram cultivadas em α -MEM 15% SBF, suplementado com 0,1 mM dexametasona, 2,5 mg/mL insulina e 100 mM indometacina. Coloração sudan II – escarlate e hematoxilina de Harris. **A** - indivíduo com SMD (100X), **B**- indivíduo com SMD (10X), **C**- indivíduo controle (100X) e **D**: controle negativo para diferenciação, cultivado em α -MEM 15% SBF sem suplementos (63X).

As CTMs de indivíduos portadores de SMD (Figura 14A e 14B) e de indivíduos controle (Figura 14C) foram cultivadas em meio indutor de diferenciação osteocítica. Em seguida, foram submetidas à coloração por Von Kossa e hematoxilina de Harris. Podem-se observar os depósitos de cálcio nas culturas (A, B e C). A Figura 14D mostra o controle negativo.

Figura 14 – Potencial das CTMs de SMD de diferenciação em osteócito. As CTMs foram cultivadas em α -MEM 7,5% SBF, suplementado com 1 μ M dexametasona, 20mM ácido ascórbico e 1 M β -glicerolfosfato. Coloração Von Kossa e hematoxilina de Harris. **A e B** – indivíduos com SMD (10X), **C** – indivíduo controle (10X) e **D** – controle negativo para diferenciação, cultivado em α -MEM 7,5% SBF sem suplementos (10X).

4.5.3 Perfil imunofenotípico das CTMs de pacientes com SMD e indivíduos controles

O perfil imunofenotípico de pacientes portadores de SMD e controles foram obtidos por citometria de fluxo. Os resultados demonstram que as células isoladas de pacientes apresentaram um perfil fenotípico similar ao dos indivíduos saudáveis para 8 dos 10 antígenos analisados. Ou seja, as CTMs de indivíduos SMD e controle mostraram elevados níveis de expressão (>70%) dos antígenos CD13, CD105 e CD73 (Figuras 15A, B e C), níveis intermediários de expressão para o antígeno CD140b (Figura 15D) (30%) e ausência de expressão dos antígenos marcadores de células endoteliais (CD31) e hematopoéticos (CD14, CD45 e CD34), (Figuras 15E,

F, G e H). Entretanto, as CTMs de pacientes SMD mostraram níveis de expressão mais elevados para os antígenos de superfície CD146 ($p=0,001$) (Figura 15I) e CD90 ($p=0,04$) (Figura 15J) quando comparado com as CTMs de indivíduos controle.

Figura 15 - Análise Imunofenotípica das CTMs da amostra 21 derivada de paciente com SMD na 3ª passagem. A linha vermelha representa isotipo-controle, e a linha verde representa a expressão do marcador específico. As médias, desvios e os valores de “p” do teste estatístico dos 25 pacientes com SMD e 5 controles (CTRL) estão representados. As figuras A, B e C evidenciam elevados níveis de expressão (>70%) dos antígenos CD13, CD105 e CD73 nos pacientes com SMD e controles (**Figuras 15 A, B e C**) e a figura D evidencia níveis intermediários de expressão do antígeno CD140b (**Figura 15D**). As figuras E, F, G e H evidenciam ausência de expressão de marcadores endoteliais e hematopoéticos (CD31, CD14, CD45 e CD34) (**Figuras 15 E, F, G e H**). As figuras I e J evidenciam níveis de expressão mais elevados para os antígenos de superfície CD146 e CD90 nas CTMs de pacientes SMD do que nos indivíduos controle (**Figuras 15 I e J**) (SMD n=25 e CTRL n=5).

4.5.4. Caracterização citogenética das CTMs dos pacientes com SMD

As CTMs de pacientes portadores de SMD foram também caracterizadas quanto ao perfil cariotípico (n=25). Conforme demonstrado na tabela 9, 16 pacientes apresentaram cariótipo normal (64%), 6 pacientes (24%) com monossomia associada aos cromossomos 5, 6, 7, 9, 12, 13, 19, 22 e nulissomia de X e um paciente apresentou trissomia do cromossomo 9 (4%). Em duas amostras (8%) não foi possível a análise citogenética devido à ausência de células em metáfase.

Tabela 9 - Perfil citogenético das CTMs de pacientes com SMD (bandamento GTG).

Amostra	Cariótipo
1	45,X,-X[3]/46,XX[12]
2	44,XY,-9[3],-12[4]/46,XY[10]
3	46,XX[14]
4	46,XX[18]
5	46,XX[16]
6	43,XY,-13,-19,-22[3]/46,XY[14]
7	46,XX[20]
8	46,XY[18]
9	46,XX[15]
10	46,XX[12]
11	46,XX[13]
12	46,XX[17]
13	46,XY[20]
14	45,XY,-7[4]/46,XY[13]
15	46,XY[16]
16	46,XX[20]
17	Ausência de metáfases para análise.
18	45,XY,-5[4]/46,XY[16]
19	44,XX,-6[3],-19[3]/46,XX[13]
20	46,XX[12]
21	47,XY,+9[2]/46,XY[10]
22	Ausência de metáfases para análise.
23	46,XX[12]
24	46,XY[12]
25	46,XX[18]

A seguir são apresentados os cariótipos dos 7 pacientes que apresentaram alterações no cariótipo, conforme evidenciado por meio do bandamento GTG.

A Figura 16 representa o cariótipo das CTMs da amostra 2 que apresenta perda de 2 cromossomos resultando no perfil: 44,XY,-9,-12.

Figura 16 - Cariótipo com bandamento GTG das CTMs da amostra 2. Observa-se a presença de monossomia dos cromossomos 9 e 12 (indicado por seta). Cariótipo: 44,XY,-9,-12.

A Figura 17 representa o cariótipo das CTMs da amostra 1 que apresenta o perfil: 45,X.

Figura 17 - Cariótipo com bandamento GTG das CTMs da amostra 1. Observa-se a presença de monossomia do cromossomo X (indicado por seta). Cariótipo: 45,X.

A Figura 18 representa o cariótipo das CTM da amostra 6 que apresenta a perda de 3 cromossomos: 43,XY,-13,-19,-22.

Figura 18 - Cariótipo com bandamento GTG das CTMs da amostra 6. Observa-se a presença de monossomia dos cromossomos 13,19 e 22 (indicado por seta). Cariótipo: 43,XY,-13,-19,-22.

A Figura 19 representa o cariótipo das CTMs da amostra 14 que apresenta a monossomia do cromossomo 7, perfil: 45,XY,-7.

Figura 19 - Cariótipo com bandamento GTG das CTMs da amostra 14. Observa-se a presença de monossomia do cromossomo 7 (indicado por seta). Cariótipo: 45,XY,-7.

A Figura 20 representa o cariótipo das CTM da amostra 19 que apresenta a monossomia dos cromossomos 6 e 19, perfil: 44,XX,-6,-19.

Figura 20 - Cariótipo com bandamento GTG das CTMs da amostra 19. Observa-se a presença de monossomia dos cromossomos 6 e 19 (indicado por seta). Cariótipo: 44,XX,-6,-19.

A Figura 21 representa o cariótipo das CTMs da amostra 18 que apresenta a perda de 1 cromossomo, perfil: 45,XY,-5.

Figura 21 - Cariótipo com bandamento GTG das CTMs da amostra 18. Observa-se a presença de monossomia do cromossomo 5 (indicado por seta). Cariótipo: 45,XY,-5.

A Figura 22 representa o cariótipo das CTMs da amostra 21, que apresenta o ganho de um cromossomo resultando no perfil: 47,XY,+9.

Figura 22 - Cariótipo com bandamento GTG das CTMs da amostra 21. Observa-se a presença de trissomia do cromossomo 9. (indicado por seta). Cariótipo: 47,XY,+9.

4.5.5. Hibridação “*in situ*” por Fluorescência (FISH) para *AURKA* e *AURKB* nas CTMs

A análise de FISH para os genes *AURKA* e *AURKB* nas CTMs mostrou que ambos os genes estão presentes com 2 cópias, ou seja, ausência de amplificação nos diferentes pacientes (Figura 23). De fato, a análise do perfil cariotípico das CTMs por citogenética convencional mostrou ausência de alteração nos cromossomos 20q13 (*AURKA*) ou 17p13 (*AURKB*).

Portanto, os dados da citogenética convencional foram concordantes com a citogenética molecular em 100% das CTMs de indivíduos portadores de SMD, não há alteração no número de cópias dos genes *AURKA* e *AURKB*.

Figura 23 - Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH) das CTMs derivadas de SMD (amostras 2, 3, 6 e 8) utilizando sondas fluorescentes de DNA (fluorescência vermelha) para os genes *AURKA* (20q13) e *AURKB* (17p13). Em todos os casos são observados apenas quatro "spots", os dois verdes são os controles da reação e os vermelhos são os genes avaliados. Os núcleos foram contra-corados por DAPI (fluorescência azul).

5. DISCUSSÃO

O estudo das alterações citogenéticas em síndrome mielodisplásica é essencial no auxílio do diagnóstico, prognóstico, classificação, acompanhamento evolutivo, escolha terapêutica e melhor compreensão da biologia da doença. Este estudo envolveu a caracterização das alterações numéricas e estruturais por citogenética convencional, bem como, investigações sobre a ocorrência ou não de alterações no número de cópias dos genes aurora A e B em duas populações celulares da medula óssea de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica: as células hematopoéticas (CHs) e as células estromais mesenquimais multipotentes (CTMs).

Na análise de citogenética clássica das CHs dos 25 pacientes com SMD, 13 (52%) apresentaram alterações numéricas e/ou estruturais, sendo que em sete (amostras 1, 3, 9, 14, 16, 20 e 21) as alterações foram estruturais, três foram numéricas (amostras 7, 17 e 23) e três apresentaram estes dois tipos de alterações (amostras 6, 24 e 25). Em resumo, a citogenética convencional detectou anomalias cromossômicas numa percentagem similar à descrita na literatura (30-50%) (Naeim et al., 2008). Entre as alterações citogenéticas observadas várias já tinham sido descritas (Chauffaille, 2006): 1) cromossomo 7: deleção parcial do cromossomo 7; 2) cromossomo 8: trissomia 8, alteração numérica mais frequente em SMD e pode conferir maior risco à transformação leucêmica; 3) cromossomo 13: deleção 13q; 4) cromossomo 17: deleção do braço curto do cromossomo 17 (17p); 5) cromossomo 20: deleção do braço longo do cromossomo 20 (20q). Por outro lado, neste estudo não foram observadas alterações citogenéticas previamente associadas com SMD como por exemplo: 1) Cromossomo 5, com deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5 [del(5q-)], a qual pode atingir até 20% dos casos de SMD; 2) Cromossomo 11, com deleção das bandas próximas ao centrômero. À semelhança do estudo de Solé e cols (2005), as anormalidades cromossômicas trissomia do cromossomo 8, deleção do braço longo dos cromossomos 20 (20q-) e 7 (7q-) ocorreram isoladas e com uma frequência de 5.8%, 1.3% e 1.4% respectivamente, outras alterações apareceram com frequência não determinada, porém, foram semelhantes às anomalias deste estudo, tais como: +9, del(12p), del(13q) e nulissomia do Y, totalizando 47% de pacientes com cariótipo anormal. Outro estudo realizado por Solé e cols (2003) mostrou alterações estruturais e/ou numéricas, tais como: +8, -7, del(5q), i(17q), rearranjos nos cromossomos 11 (11p, 11q) e 12 (12p), com uma frequência de 48%. Em conjunto, esses dados sugerem a ausência de

uma anormalidade cromossômica específica para a SMD, uma vez que, muitas delas podem ser observadas em outras doenças hematológicas.

As diferenças encontradas nas alterações citogenéticas convencionais, em relação aos estudos previamente realizados podem ser explicadas, em parte, pelas 2 principais limitações do presente estudo: 1) maior frequência de mulheres (64%) com mediana de idade 68 anos, o que difere da publicação da Organização Mundial de Saúde em 2008 (Kouides e Bennett, 1996), em que a maior prevalência da doença é em indivíduos do sexo masculino e 2) ausência de purificação da célula-tronco hematopoética CD34+, com intuito de aumentar o número de células disponíveis, pois, a seleção por qualquer método reduziria significativamente as células que seriam necessárias aos experimentos, uma vez que, foram utilizadas amostras remanescentes de exames rotineiros do ambulatório. Por outro lado, alguns dados citogenéticos são concordantes com a literatura, o que sugere que estudos adicionais tornam-se necessários para a caracterização da complexidade cariotípica do paciente portador de SMD.

Observamos ainda que, dos 13 (52%) pacientes portadores de alterações cromossômicas nas CHs, 10 pacientes apresentaram cariótipos considerados de risco intermediário-1, um paciente apresentou cariótipo considerado de bom prognóstico e IPSS de baixo risco, 2 pacientes apresentaram cariótipo ruim e classificado, portanto, com IPSS de risco intermediário-2. Os outros 11 (44%) pacientes com SMD apresentaram cariótipo normal que é considerado de bom prognóstico, relacionando com os demais critérios hematológicos para classificação: 7 apresentaram IPSS de baixo risco, 3 apresentaram IPSS de risco intermediário-1 e apenas 1 apresentou IPSS de risco intermediário-2, devido à contagem aumentada de blastos entre 11-20%. Apenas um paciente (4%) não teve classificação do IPSS e análise citogenética possível devido à ausência de células metafásicas.

Outro ponto observado é que as anomalias cromossômicas ocorreram mesmo nos pacientes jovens, com idade entre 20-30 anos, de modo que a idade avançada não foi um fator de risco para o aumento da frequência de alterações citogenéticas. Estudos futuros envolvendo a técnica de hibridação genômica de alta resolução (HR-CGH) para a triagem de ganhos e perdas de DNA permitirão a identificação da alteração gênica específica, e dessa forma a compreensão dos genes envolvidos na progressão tumoral.

Além disso, a avaliação clínica do paciente mostrou uma diminuição da contagem de glóbulos brancos em 96% dos pacientes, de plaquetas em 76% dos pacientes e de neutrófilos em todos os pacientes, não sendo possível encontrar uma associação entre as características clínicas e as alterações citogenéticas. Os dados deste estudo demonstraram, ainda, um elevado percentual, com 56% (Hb <11,5 g/dL) de pacientes anêmicos já ao diagnóstico, sendo que destes 46% apresentavam também trombocitopenia inferior a 100.000 plaquetas/ μ L.

Outra limitação do presente estudo é a diferença de idade entre o grupo de pacientes e o grupo controle. A mediana de idade dos pacientes foi de 72 anos versus 25 anos do grupo controle. Isto se explica pela diferença de faixa etária em que a doença é mais incidente (principalmente em indivíduos com mais de 65 anos) (Kouides e Bennett, 1996) e a permitida para doação alogênica não-aparentada de medula óssea no Brasil (entre 18 e 55 anos). Portanto, o aumento da amostragem controle com doadores com idade mais avançada permitiria uma análise comparativa mais minuciosa do perfil clínico do paciente em relação a indivíduos saudáveis.

Na análise citogenética das CTMs derivadas dos pacientes com SMD, das 25 CTMs, 7 (28%) apresentaram alterações e todas foram numéricas, entre elas estão: monossomias dos cromossomos 5, 6, 7, 9, 12, 13, 19, 22, X, e trissomia do cromossomo 9. A presença de alterações numéricas, principalmente perdas cromossômicas, assim como os cromossomos envolvidos nestas células foram também encontradas por Flores-Figueroa e cols. (2005), porém, este tipo de alteração não é um fator comum entre os diversos estudos, pois, outros autores observaram alterações estruturais (Blau e cols, 2007). As alterações citogenéticas nas CTMs são controversas, uma vez que, alguns estudos mostram alterações estruturais (Blau e cols, 2007), outros numéricas (Flores-Figueroa e cols, 2005) e ainda os que relatam que estas células são desprovidas de anormalidades cromossômicas e funcionais (Awaya e cols, 2001; Soenen e cols, 2001). As perdas cromossômicas foram aleatórias, o que impossibilita associação direta com a SMD, porém, são bastante variáveis refletindo a predisposição para instabilidade genética comumente descrita na doença (Kastrinaki e cols, 2011).

Quando comparados os resultados citogenéticos obtidos com CHs e CTMs derivadas de pacientes com SMD não foram encontradas alterações em comum, uma vez que, as CHs apresentaram mais alterações estruturais (adições, inversões, deleções parciais) e as CTMs alterações numéricas (maioria monossomias), sendo

estes resultados condizentes com outros estudos (Blau e cols, 2007; Klaus e cols, 2010). As CHs e CTMs podem estar alteradas em resposta a fatores indutores de danos em diferentes estágios celulares, e estas células podem comportar aberrações cromossômicas independentes. Estas alterações poderiam ser resultado da deficiência no sistema de reparo do DNA, replicação do centrôssomo, instabilidade genética (Kramer, Neben e Ho, 2001) ou podem ter surgido das interações bidirecionais entre o tumor e seu microambiente.

Nas CTMs dos pacientes com SMD e indivíduos controles também foram avaliadas algumas outras características como: morfologia, potencial de diferenciação e imunofenótipo.

Assim como nesse estudo, os autores, Zhao e cols. (2007) e Mercier e cols. (2009) realizaram análises fenotípicas e funcionais em CHs e CTMs derivadas de medula óssea de pacientes com doenças hematológicas e não constataram diferenças quando comparados a indivíduos saudáveis (Zhao e cols, 2007; Mercier e cols, 2009).

Outros grupos encontram diferenças não apenas fenotípicas como citogenéticas (Flores-Figueroa e cols, 2005; Blau e cols, 2007; Carrara e cols, 2007). Estas alterações citogenéticas das CTMs indicam instabilidade genômica que pode facilitar o crescimento de clones malignos (Hideshima e cols, 2007) ou pode ser que sejam alterações irrelevantes com significado patofisiológico desconhecido (Klaus, 2010).

Quanto às características fenotípicas, as CTMs dos pacientes e controles foram expandidas, diferenciadas e imunofenotipadas e estas apresentaram semelhantes na capacidade proliferativa e morfologia, o mesmo verificado por Flores-Figueroa e cols. (Flores – Figueroa e cols, 2008), entretanto, contrários aos estudos de Lopez-Villar e cols, (Lopez-Villar e cols, 2009) e Klaus e cols (Klaus e cols, 2010). Estas divergências observadas entre os grupos podem ser devido a inúmeros fatores como: diferenças significantes de idade entre pacientes e controles, estágio da doença, defeito primário nas CTMs ou exaustão na replicação celular.

O potencial de diferenciação em adipócito e osteócito das CTMs dos pacientes com SMD e dos indivíduos controles foi semelhante, como descrito também por Lopez-Villar e cols (2009) e Klaus e cols (2010).

Baseado na imunofenotipagem, nossos resultados mostraram que as CTMs dos pacientes com SMD e dos controles não apresentaram diferenças para os

antígenos avaliados, apresentando níveis semelhantes e dentro das normalidades para os antígenos CD73, CD13, CD105 (>70%), níveis intermediários de expressão para o antígeno CD140b (30%) e ausência de expressão dos antígenos marcadores de células endoteliais (CD31) e hematopoéticos (CD14, CD45 e CD34). De fato, outros estudos também confirmaram estes resultados avaliando a presença e ausência de expressão de antígenos específicos (Pittenger e cols, 1999; Hung e cols, 2002). Porém, vale ressaltar que este estudo é o primeiro a evidenciar expressões aumentadas dos antígenos CD90 e CD146 nas CTMs de pacientes com SMD. O CD90 é uma molécula de matriz extracelular responsável pelo controle no recrutamento de leucócitos e condições inflamatórias do microambiente do tecido afetado (Schubert e cols, 2011). O CD146 é uma molécula de adesão celular que promove angiogênese, embora, ainda não esteja claro como ocorre sua ativação e função, mas associa-se ao fato de promover a angiogênese ao processo leucêmico o que justifica o aumento deste gene nas CTMs derivadas dos pacientes (Zheng e cols, 2009).

Na literatura encontramos inúmeros trabalhos que caracterizaram as CTMs por antígenos de superfícies comumente utilizados e as expressões são semelhantes entre pacientes com SMD e controles (Lopez-Villar e cols, 2009). As poucas divergências encontradas podem ser devidas a diversos fatores como a classificação clínica, IPSS, idade dos indivíduos avaliados, fatores epigenéticos, citogenética (Kastrinaki e cols, 2010, Klaus e cols, 2010).

Na SMD sabemos que os antígenos tumorais ativam os linfócitos T, estes quando ativado expressam PD-1 que leva a um aumento na produção de $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ que passam a ser expressos pelas CTMs. Essas citocinas ativam $NFK\beta$ induzindo expressão de B7H1 nos blastos, que aumenta o potencial proliferativo destes e leva os linfócitos T a apoptose, caracterizando a SMD. Esses fatores ($TNF\alpha$, $IFN\gamma$, $NFK\beta$) expressos pelas CTMs estão localizados nos respectivos cromossomos: 6p21.3, 12q14 e 4q24, porém, não é possível estabelecer relação com as alterações citogenética encontradas. Portanto, este processo de ativação em resposta aos antígenos tumorais juntamente com os resultados encontrados em nosso estudo faz com que outras análises nestas células sejam alvos de pesquisa em busca de outros componentes que elucidem os mecanismos da progressão tumoral e para identificar novos alvos terapêuticos anti-tumorais.

Foram avaliados também neste trabalho, dois genes da família aurora cinase, os quais possuem participação ativa no ciclo celular e tem sido evidenciado o aumento de expressão destas cinases em diversos tipos de tumores e doenças hematológicas associadas a progressão da neoplasia, porém não existe correlação da amplificação gênica com a instabilidade genômica e evolução tumoral (Mountzios, Terpos e Dimopoulos, 2008; Karthigeyan e cols, 2011).

No intuito de encontrar uma relação entre as características citogenéticas já obtidas das CHs e CTMs das SMDs, optou-se por realizar análise molecular por *FISH* para dois genes da família de aurora cinases (*AURKA* e *AURKB*). Estes genes atualmente têm sido estudados em diversos tumores devido a suas características de atuarem como oncogenes quando hiperexpressos (Karthigeyan e cols, 2011). Mas a amplificação destes genes também pode influenciar na agressividade do tumor (Mountzios, Terpos e Dimopoulos, 2008).

Na análise molecular por *FISH* das CHs, os 25 (100%) pacientes não apresentaram amplificação nos genes *AURKA* e *AURKB*, sendo este resultado concordante com o observado na análise citogenética por bandamento GTG em 21 (84%) pacientes os quais não apresentaram deleções das regiões cromossômicas 20q13 (*AURKA*) e 17p13 (*AURKB*) que envolvem estes genes. No entanto, em 3 (12%) pacientes (1, 6, 14) foi observada a deleção ou adição destas regiões ou proximais no bandamento GTG. Este resultado contraditório ao *FISH* é explicado devido à baixa resolução da análise por bandamento GTG o qual é aumentada ao nível gênico pelo *FISH* (Mcneil, 2000). Uma vez que, a *FISH* é específica para o gene e se baseia na complementariedade das bases, assim, pode-se concluir que tenha ocorrido deleções e adições envolvendo as regiões cromossômicas, porém estas alterações não atingiram as regiões correspondentes aos genes auroras cinases.

Na técnica de *FISH* todas as amostras de CTMs apresentaram-se normais para os genes aurora A e B, nos 25 (100%) pacientes e 8 (100%) controles, os genes avaliados estavam presentes em duas cópias, confirmando ausência de alterações nas regiões 20q13 e 17p13 correspondentes aos genes *AURKA* e *AURKB*, respectivamente, confirmando o resultado encontrado na citogenética convencional. Estes resultados seriam explicados pelo fato de que as alterações apresentadas nas CTMs não envolveram os cromossomos dos respectivos genes.

As CHs são derivadas de uma célula-tronco hematopoética (CTHs), que nas SMDs são células que sofreram mutação genética e levaram ao desenvolvimento da doença (Nimer, 2008). A expansão do clone anormal esta associada à displasia morfológica de uma ou mais linhagens celulares da medula óssea, diferenciação comprometida, disfunção celular e instabilidade cromossômicas (Bart e Deeg, 2010). Por outro lado, as CTMs foram mais estáveis, apresentando cerca de 2 vezes menos alterações citogenéticas, talvez por tratar-se de células inicialmente estáveis que com o evoluir da doença e contato com as células hematopoéticas sofreram alterações. Esta instabilidade genética gerada nas CTMs junto ao seu potencial de crescimento e diferenciação pode facilitar a proliferação de clones malignos (Hideshima e cols, 2007; Karaoz e cols, 2011).

Embora, não esteja totalmente claro como às interações bidirecionais entre o tumor e seu microambiente determinem a evolução da neoplasia, foi possível observar que as CTMs também se encontram alteradas sugerindo desempenharem importante papel na biologia da SMD, portanto, as CTMs devem ser consideradas como alvos na busca de novas terapias e melhor esclarecimento dos mecanismos que governam a progressão tumoral.

Além disso, nesse estudo não foi observada amplificação das auroras cinases A e B em SMD, portanto, estudos futuros que visem avaliar o nível de expressão dessas enzimas em pacientes portadores ou não de alterações citogenéticas poderão contribuir para a compreensão do envolvimento ou não desse gene com a evolução da doença.

6. CONCLUSÃO

A realização deste estudo foi capaz de concluir que:

- 1- Os tipos de alterações citogenéticas nas CHs foram variáveis, entretanto, a maioria foram alterações estruturais (translocações, adições, inversões, deleções) e não a perda de cromossomos totais como nas CTMs (monossomias).
- 2- Quando comparadas as CHs e CTMs derivadas de pacientes com SMD, verificamos que as alterações não são comuns e que as CHs são citogeneticamente mais instáveis.
- 3- A análise por *FISH* para os genes *AURKA* e *AURKB* nas CHs e CTMs não evidenciou alterações no número de cópias de DNA dos respectivos genes.
- 4- As propriedades biológicas das CTMs derivada dos pacientes com SMD diferem dos indivíduos controles apenas no aspecto imunofenotípico para os antígenos de superfície CD90 e CD146.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alhadlaq, A.; Mao, JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev.* 2004; 13:436-448.

Anand, S; Penrhyn-Lowe, S; et al. Aurora-A Amplification Overrides The Mitotic Spindle Assembly Checkpoint, Inducing Resistance To Taxol. *Cancer Cell.* 2003; 3:51 – 62.

Aul, C; Germing, U; Gattermann, N; Minning, H. Increasing incidence of myelodysplastic syndromes : real or fictitious? *Leukemia Research.* 1998; 22:93-100.

Awaya, N; Rupter, K; Bryant, E et al. Marrow stromal cells are not derived from the malignant clone in myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood.* 2001; 98 (Suppl. 1):1487a.

Bart, L.S. e Deeg, H. J. Myelodysplastic Syndromes. *Annu. Rev. Med.* 2010; 61:345–58.

Barry, FP.; Boynton, RE.; Haynesworth, S.; Murphy, JM.; Zaia, J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 265:134-139.

Beatty, B.; Mai, S.; Squire, JA. *FISH.* Toronto. Oxford University Press. 2002;255.

Bejar, R.; Ebert, B.L. The Genetic Basis of Myelodysplastic Syndromes. *Hematol Oncol Clin N Am.* 2010; 24 295–315.

Benjamin , L.E. Genetic deletions in AML and MDS. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 2010; 23: 457–461.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982 Jun;51(2):189-99.

Bernardo, ME; Zaffaroni, N *et al.* Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Research*. 2007; 67: 9142-9149.

Bischoff, JR; Anderson, L; et al. A Homologue of *Drosophila* Aurora Kinase is Oncogenic and Amplified In Human Colorectal Cancers. *Embo J*. 1998; 17: 3052 – 65.

Blau, O; Hofmann, WK; Baldus, CD; *et al.* Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp Hematol*. 2007; 35: 221-29.

Bodvarsdottir, S.K; Hilmarsdottir, H; Birgisdottir, V; Steinarsdottir, M;. Jonasson, J.G; Eyfjord, J.E. Aurora-A amplification associated with BRCA2 mutation in breast tumours. *Cancer Letters*. 2007; 248: 96–102.

Brunning R, Bennett JM, Flandrin G, Matutes E, Head DR, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. World Health Organization classification of tumours. Pathology & genetics. First ed. IARC PRes Lyon; 2001

Campioni, D.; Lanza, F.; Moretti, S.; Dominici, M.; Punturieri, M.; Pauli, S. et al. Functional and immunophenotypic characteristics of isolated CD105(+) and fibroblast(+) stromal cells from AML: implications for their plasticity along endothelial lineage. *Cytotherapy*. 2003; 5:66-79.

Caplan, Al.; Bruder, SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol. Med*. 2001; 7: 259-264.

Carrara, R.C.V.; Orellana, M.D.; Fontes, A.M.; Palma, P.V.B.; Kashima, S.; Mendes, M.R.; Coutinho, M.A.; Voltarelli, J.C.; Covas, D.T. Mesenchymal stem cells from patients with chronic myeloid leukemia do not express BCR-ABL and have absence of chimerism after allogeneic bone marrow transplant. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007; 40: 57-67.

Cazzola, M.; Malcovati, L. Prognostic Classification and Risk Assessment in Myelodysplastic Syndromes. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2010; 24: 459–468.

Chamberlain, G; Fox, J; Ashton, B; Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007; 25: 2739-49.

Chauffaille, M.L.L.F. Alterações moleculares em síndrome mielodisplásica. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2006;28(3):188-93.

Colter, DC; Class, R.; Digirolamo, CM.; Prockop, DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2000; 97(7): 3213-3218.

Corey, SJ; Minden, MD; Barber, DL; Kantarjian, H; Wang, JC; Schimmer, AD. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):118-29.

Covas, D.T. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146⁺ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental Hematology*. 2008; 36: 642-654.

da Silva-Meirelles, L.; Fontes, A.M; Cova, D.T; Caplan, A.L. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2009; 20: 419–427.

Delorme, B; Ringe, J; Gallay, N; *et al*. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood*. 2008; 111: 2631-35.

Denzinger, S; Stoehr, R; Schwarz, S; Eichenseher, N; Brockhoff, G; Obermann, E.C; Knuechel, R; Blaszyk, H; Hartmann, A; Wild, P.J. Low level STK15 amplification in histologically benign urothelium of patients with bladder cancer adversely predicts patient outcome following cystectomy, *Int. J. Oncol*. 2007; 31: 793–802.

Deschaseaux, F; Sensebe, L; Heymann, D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med*. 2009; 15a: 417-29.

Dominici, M; Le Blanc, K; Mueller, I; *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8: 315a-17.

Dongjiu,Y.; Garcia-Manero, G; Kantarjian, H. M; Xiao, L; Vadhan-Raj, S; Fernandez, M.H; Nguyen, MH; Medeiros, L.J; Bueso-Ramos, C.E. Analysis of Aurora kinase A expression in CD34+ blast cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *J Hematopathol*. 2009; 2:2-8.

Du, J; Hannon, GJ. Suppression of p160rock Bypasses Cell Cycle Arrest After Aurora-A/STK15 Depletion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004. 101:8975 – 80.

Flores-Figueroa, E; Montesinos, JJ *et al.* Functional analysis of myelodysplastic syndromes- derived mesenchymal stem cells. *Leukemia Research*. 2008; 32:1407-1416.

Flores-Figueroa, E; Rana-Trejo, RM; Gutierrez-Espindola, G; Perez-Cabrera, A; Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk Res*. 2005; 29: 215a-24.

Friedenstein, AJ.; Piatetzky-Shapiro, IL.; Petrakova, KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.*1966; 16(3):381-390.

Friedenstein, AJ; Gorskaja, JF; Kulagina, NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4: 267-74.

Gaglio, T; Dionne, MA; Compton, DA. Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes. *J Cell Biol*. 1997; 138: 1055–1066.

Garcia-Manero, G. Prognosis of Myelodysplastic Syndromes. *Hematology* 2010; 330-337.

Germing U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M, Aul C. Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk Res* 2000; 24:983-92.

Germing U, Strupp C, Kuendgen A, Isa S, Knipp S, Hildebrandt B, et al. Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2006; 91:1596-604.

Gianelli, U; Fracchiolla, NS; Cortelezzi, A; Pellegrini, C; Savi, F; Moro, A. *et al.* Survivin expression in "low-risk" and "high-risk" myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.* 2007; 86(3):185-9.

Goepfert, TM; Adigun, YE. *et al.* Centrosome Amplification and Overexpression of Aurora A Are Early Events in Rat Mammary Carcinogenesis. *Cancer Res.* 2002; 62:4115 – 22.

Greenberg, P. Pathogenetic mechanisms underlying myelodysplastic syndromes. In P. L. Greenberg (Ed.), *Myelodysplastic syndromes: Clinical and biological advances.* New York: Cambridge University Press. 2005; 63–93.

Gronthos, S.; Zannettino, AC.; Hay, SJ.; Shi, S.; Graves, SE.; Kortessidis, A. *et al.* Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell Sci.* 2003; 116:1827-1835.

Haase, D.; Germing, U.; Schanz, J. *et al.* New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood.* 2007;110(13):4385–95.

Hall, J.; Foucar, K. Diagnosing myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: laboratory testing strategies to exclude other disorders. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2010; 32, 559–571.

Hasserjian, RP; Dal Cin, P. Editorial Deletion of Chromosome 20q: Friend or foe? *Leukemia Research.* 2011 xxx:xxx–xxx.

Hideshima, T; Mitsiades, C; Tonon, G; Richardson, PG; Anderson, KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer*. 2007; 7:585-598.

Horwitz, E.; Le Blanc, K.; Dominici, M.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005; 7(5): 393-395.

Huang, X.F; Luo, S.K; Xu, J. et al. Aurora kinase inhibitory VX-680 increases Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in aurora-A-high acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008; 111:2854–2865.

Hung, SC; Chen, NJ; Hsieh, SL; et al. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells*. 2002; 20:249-258.

Ikezoe, T; Yang, J; Nishioka, C. et al. A novel treatment strategy targeting aurora kinases in acute myelogenous leukemia. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6:1851–1857.

Karaoz, E; Okçu, A; Gacar, G; Sanglam, O; Yuruker, S; Kenar, H. A comprehensive characterization study of human bone marrow MSCs with an emphasis on molecular and ultrastructural properties. *J. Cellular Physiology*. 2011; 226:1367-1382.

Karthigeyan, D; Prasad,S.B.B; Shandilya,J; Agrawal, S; Kundu, T.K. Biology of Aurora A Kinase: Implications in Cancer Manifestation and Therapy. *Medical Res. Reviews*. 2011; 5: 757-793.

Kastrinaki, MC; Pontikoglou, C; Klaus, M; Stravroulaki, E; Pavlaki, K; Papadaki, HA. Biologic characteristic of bone marrow mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes. *Curr Stem Cell Res. Ther*. 2011; 2: 122-130.

Katayama, H; Brinkley, WR; Sen, S. The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 2003, 22:451-464.

Klaus, M.; Stavroulaki, E., *et al.* Reserves, functional, immunoregulatory and cytogenetic properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with myelodysplastic syndromes. *Stem Cells and Development.* 2010; 19(7): 1043-1054.

Koeffler, HP. Myelodysplastic syndromes (preleukemia). *Semin Hematol.* 1986; 23:284–99.

Komrokji,R.S.; Zhang, L.; Bennett, J.M. Myelodysplastic Syndromes Classification and Risk Stratification. *Hematol Oncol Clin N Am.* 2010; 24: 443–457.

Kouides, PA; Bennett JM. Morphology and classification of the myelodysplastic syndromes and their pathologic variants. *Semin Hematol.* 1996; 33(2):95-110.

Kramer, A; Neben, K; Ho, A.D. Centrosome replication, genomic instability and cancer. *Leukemia.* 2001; 16:767-775.

Langley, R.R; Fidler, I.J. The seed and soil hypothesis revisited—The role of tumorstroma interactions in metastasis to different organs. *Int. J. Cancer:* 2011;128:2527–2535.

Loken, MR; Van de Loosdrecht A; Ogata, K; Orfao, A; Wells, DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leuk Res.* 2008;32(1):5-17.

Lopez-Villar, O; Garcia, JL; Sanchez-Guijo, FM; *et al.* Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome. *Leukemia*. 2009; 14: 664-72.

Lucena-Araujo, AR; Oliveira, FM. Leite-Cueva, SD.; Santos, GAS.; Falcão, RP; Rego, EM. High expression of AURKA and AURKB is associated with unfavorable cytogenetic abnormalities and high white blood cell count in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 2010; XXX-XXX.

Magalhaes, S; Madeira, T; Bittencourt, R. *et al.* Epidemiological and clinicopathological data from the Brazilian registry of patients with myelodysplastic syndromes and comparative analysis between different geographic areas. *American Society of Haematology* . 2010. Ref Type: Abstract

Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, la Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, *et al.* Timedependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2007 Aug 10;25(23):3503-10.

Mcneil, N; Ried, T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Exp Rev Mol Med*. periódico *on line*, set 2000. Acesso em 06 de abril de 2009. Disponível em: <http://www.ermm,cbcu.cam.ac.uk/00001940h.htm>.

Meraldi, P; Honda, R; Nigg, EA. Aurora-A Overexpression Reveals Tetraploidization As A Major Route To Centrosome Amplification In P53_{-/-} Cells. *Embo J*. 2002; 21:483 – 92.

Meraldi, P.; Honda, R.; Nigg, E.A. Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Cur Opin in Genet. & Develop*. 2004; 14:29-36.

Mercier, F.; Monczak, M.F.; Prchal, J.; Galipeau, J. Bone marrow mesenchymal stromal cells of patients with myeloproliferative disorders do not carry the JAK2-V617F mutation. *Experimental Hematology*. 2009; 37: 416-420.

Mihara, K; Chowdhury, M; Nakaju, N; Hidani, S; Ihara, A; Hyodo, H. *et al.* Bmi-1 is useful as a novel molecular marker for predicting progression of myelodysplastic syndrome and patient prognosis. *Blood*. 2006;107(1):305-8.

Model, G. Disease progression mechanism in myelodysplastic syndromes: Insight into the role of the microenvironment *Leukemia Research* xxx (2011) xxx– xxx

Moraes, A.C.R. *et al.* Síndromes mielodisplásicas: aspectos moleculares, laboratoriais e a classificação OMS 2008. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009; XX:XXX.

Moria, N; Yoshinagaa, K; Tomitaa, K.; Ohwashia, M; Kondoha, T; Shimuraa, H; Wanga, YH; Shisekia, M; Okadab, M; Motojia, T. Aberrant methylation of the RIZ1 gene in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Leukemia Res* 2010; XX:XXX.

Mountzios, G; Terpos, E; Dimopoulos, M.A. Aurora kinases as targets for cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*. 2008; 34: 175– 182.

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

Musacchio, A; Salomon; ED. The Spindle-Assembly Checkpoint in Space and Time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007.8:379-393.

Nimer, SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2008; 111:4841–51.

Nisse, C.; Haguenoer, J.M.; Grandbastien, B. et al. Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. *British Journal of Haematology*. 2001; 112:927-935.

Oliveira, FM.; Lucena-Araujo, AR.; Leite-Cueva, SD.; Santos, GAS.; Rego, EM.; Falcão, RP. Segmental amplification of MLL gene associated with high expression of AURKA and AURKB genes in a case of acute monoblastic leukemia with complex karyotype. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2010; 198: 62-65.

Parker, JE; Mufti, GJ; Rasool, F; Mijovic, A; Devereux, S; Pagliuca, A. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood*. 2000; 96(12):3932-8.

Pedersen B. 5q(-)survival: importance of gender and deleted 5q bands and survival analysis based on 324 published cases. *Leuk Lymphoma*. 1998; 31:325-334.

Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007; 25: 2896-902.

Pittenger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 133-47.

Prata, KL; Orrelana, MD; de Santis, GC; Kashima, S; Fontes, AM, Carrara, RC, Palma, PV; Neder, L; Covas, DT. Effects of high-dose chemotherapy on bone marrow

multipotent mesenchymal stromal cells isolated from lymphoma patients. *Exp Hematol.* 2010; 38(4):292-300.

Prockop, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997; 276 (5309): 71-74.

Rigolin, G.M.; Cuneo, A.; Roberti, M.G. et al. Exposure to myelotoxic agents and myelodysplasia: case-control study and correlation with clinicobiological findings. *British Journal of Haematology.* 1998; 103:189-197.

Shaffer, LG; Slovak ML; Campbell, LJ; editors. *ISCN 2009: an international system for human cytogenetic nomenclature 2009.* Basel: S. Karger, 2009.

Schubert, K; Polte, T; Bo'nisch, U; Schader, S; Holtappels, R; Hildebrandt, G; Lehmann, J; Simon, J.C; Anderegg, U; Saalbach, A. Thy-1 (CD90) regulates the extravasation of leukocytes during inflammation. *Eur. J. Immunol.* 2011. 41: 645–656.

Soenen, V.; Kotb, R.; Bonnet, ML, et al. Mesenchymal cells (MC) from patients with myelodysplastic syndromes (MDS) are devoid of cytogenetic abnormalities and support short and long-term hematopoiesis in vitro. *Blood.* 2001; 98 (Suppl.1): 3041a.

Solé, F.; Luño, E; Sanzo, C.; Espinet, B; Sanz, G.F; Cervera, J; Calasanz, M.J; Cigudosa, J.C; Millà, F.; Ribera, J.M; Bureo, E.; Martín, M.L; Arranz, E.; Florensa, L. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2005; 90:1168-1178

Solé, F., Prieto, F.; Badia, L; Woessner, S.; Florensa, L; Caballin, M.R; Coll, M.D; Besses, C; Sans-Sabrafen, J. Cytogenetic studies in 112 cases of untreated myelodysplastic syndromes. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1992; 64 (1): 12–20.

Steensma, D.P.; Hanson, C.A.; Letendre, L; Tefferi, A. Myelodysplasia with fibrosis: a distinct entity? *Leukemia Research*. 2001; 25:829-838.

Swerdlow, SH; Campo, E; Harris, NL; Jaffe, ES; Pileri, SA; Stein, H; Thiele, J; Vardiman, JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4 ed. 2008, Geneva: WHO Press. 439. 4^a edition ed. Lyon: International Agencyfor Research on Cancer; 2008.

Tondreau, T.; Lagneaux, L.; Dejeneffe, M.; Delforge, A.; Massy, M.; Mortier, C. et al. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy*.2004; 6:372-379.

Valent P, Horny HP, Bennett JM, 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;31(6):727-36.

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 Jul 30;114(5):937-51.

Wimazal F, Fonatsch C, Thalhammer R, Schwarzingen I, Mullauer L, Sperr WR, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) versus low risk MDS: the diagnostic interface. *Leuk Res* 2007 Nov;31(11):1461-8.

Yamamoto, K; Abe, S; Nakagawa, Y; Suzuki, K; Hasegawa, M; Inoue, M. *et al.* Expression of IAP family proteins in myelodysplastic syndromes transforming to overt leukemia. *Leuk Res.* 2004; 28(11):1203-11.

Yang, J; Yang, J; Ikezoe, T. et al. AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood.* 2007; 110:2034–2040.

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

Yoshida, Y. Physician education: myelodysplastic syndrome. *The oncologist.* 1996; 1:284-287.

Youle, RJ; Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):47-59.

Zhao, Z.G., Liang, Y.L.; Li, KAI, et al. Phenotypic and functional comparison of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of normal adults and patients with hematologic malignant diseases. *Stem Cell and Develop.* 2007; 16:637-648.

Zheng, C; Qiu, Y; Zeng, Q; Zhang, Y.; Di Lua; Yang, D.Feng, J; Yan,X. Endothelial CD146 is required for *in vitro* tumor-induced angiogenesis: The role of a disulfide

bond in signaling and dimerization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009; 41: 2163–2172.

8. ANEXOS

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DIRIGIDO AOS INDÍVIDUOS SAUDÁVEIS (CONTROLES)

Nome da Pesquisa:

“Perfil citogenético e de expressão de genes relacionados à instabilidade genômica em células mesenquimais estromais multipotentes de indivíduos portadores de síndrome mielodisplásica”

Pesquisador responsável:

Sabrina Dias Leite Cueva

Descrição da Pesquisa:

O (a) senhor (a) que é doador (a) de medula óssea do **Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto** está sendo convidado (a) a participar do projeto intitulado “Perfil citogenético e de expressão de genes relacionados à instabilidade genômica em células mesenquimais estromais multipotentes de indivíduos portadores de síndrome mielodisplásica”. Este projeto é realizado por mim, Sabrina Dias Leite Cueva, aluna de mestrado pelo departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- FMRP-USP.

O objetivo dessa pesquisa é verificar se dentre as células existentes na medula óssea dos pacientes que têm síndrome mielodisplásica há alguma alteração genética que possa estar relacionada com a doença, desta forma necessito amostra de indivíduos que não possuam doenças do sangue para utilizar como valores normais neste estudo. As pesquisas mais recentes nessa área ainda não estão concluídas, sendo, importante que novos estudos sejam desenvolvidos a fim de melhor esclarecer essa questão.

Caso o (a) Sr.(a) concorde em participar deste estudo, a pesquisa será realizada a partir do excedente da amostra de medula óssea coletada para os exames laboratoriais de rotina, anteriores ao transplante de medula óssea. A coleta é realizada por punção da crista ilíaca (osso da bacia) sob efeito de anestesia local e por profissional capacitado para diminuir o desconforto, dor e pequenos sangramentos que podem ocorrer no local da punção. **NENHUM OUTRO EXAME ADICIONAL QUE POSSA INCOMODAR O (A) SR. (A) SERÁ FEITO.**

Essa pesquisa não trará benefício imediato aos pacientes com leucemia ou aos doadores saudáveis, mas ajudará a entender como essas doenças surgem no sangue, possibilitando assim novas formas de tratamento no futuro. O (A) Sr. (a) será informado dos resultados dessa pesquisa por mim, **Sabrina Dias Leite Cueva**, verbalmente ou por escrito, conforme o seu interesse. Caso seja necessário para esclarecimentos ou dúvidas futuras, deixo a disposição meus telefones de contato: 16-91850778 (celular) ou 16- 36022303 (laboratório).

Eu, _____, declaro ter sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam neste documento, referente ao projeto de pesquisa intitulado “Perfil citogenético e de expressão de genes relacionados à

instabilidade genômica em células mesenquimais estromais multipotentes de indivíduos portadores de síndrome mielodisplásica”, que tem como pesquisador responsável **Sabrina Dias Leite Cueva**. Especificamente, fui orientado sobre o objetivo da pesquisa, os procedimentos a que serei submetido, os riscos e benefícios, bem como a ausência de despesas da minha parte. Declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- a) A garantia de receber esclarecimento a qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos e benefícios envolvidos na pesquisa;
- b) A liberdade de retirar meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento;
- c) A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade;
- d) O compromisso de que me será prestada informação atualizada ao longo do estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.

Por fim, declaro que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que livremente manifesto minha vontade em participar da referida pesquisa.

Ribeirão Preto, ____, de _____, de 200__.

Assinatura do paciente (ou responsável)

Sabrina Dias Leite Cueva- Mestranda - Departamento de Genética
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP
Laboratório de Hematologia e Citogenética
Tel: 16-3602 2610 ou 3602 2303 ou 16- 9185 0778

ANEXO B**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Nome da Pesquisa:

“Perfil citogenético e de expressão de genes relacionados à instabilidade genômica em células mesenquimais estromais multipotentes de indivíduos portadores de síndrome mielodisplásica”

Pesquisador responsável:

Sabrina Dias Leite Cueva

Descrição da Pesquisa:

A síndrome mielodisplásica é uma doença do sangue, que ocorre mais freqüentemente em pessoas idosas, porém, ainda não se conhece a incidência da síndrome mielodisplásica. Assim como existem tumores que se originam no pulmão, estômago, rins e vários outros órgãos do corpo, também podem surgir tumores no sangue, que são conhecidos como leucemias. Existem diversos tipos de leucemia e, apesar de ser uma doença muito estudada, ainda não se conhecem as suas causas.

O objetivo dessa pesquisa é o de tentar verificar se dentre as células existentes na medula óssea desses pacientes que têm síndrome mielodisplásica há alguma alteração genética que possa estar relacionada com a doença. As pesquisas mais recentes nessa área ainda não estão concluídas, sendo, dessa forma, importante que novos estudos sejam desenvolvidos a fim de melhor esclarecer essa questão.

Caso o (a) Sr.(a) concorde em participar deste estudo, a pesquisa será realizada a partir do excedente da amostra de medula óssea coletada para seus exames laboratoriais de rotina. A coleta é realizada por punção da crista ilíaca (osso da bacia) sob efeito de anestesia local e por profissional capacitado para diminuir o desconforto, dor e pequenos sangramentos que podem ocorrer no local da punção. **NENHUM OUTRO EXAME ADICIONAL QUE POSSA INCOMODAR O (A) SR. (A) SERÁ FEITO.**

Essa pesquisa não trará benefício imediato aos pacientes com leucemia, mas ajudará a entender como essas doenças surgem no sangue, possibilitando assim novas formas de tratamento no futuro. O (A) Sr. (a) será informado dos resultados dessa pesquisa por mim, **Sabrina Dias Leite Cueva**, verbalmente ou por escrito, conforme o seu interesse. Caso seja necessário para esclarecimentos ou dúvidas futuras, deixo a disposição meus telefones de contato: 16-91850778 (celular) ou 16-36022303 (laboratório).

O Hospital das Clínicas dispõe de todos os recursos necessários para o tratamento do tipo de leucemia que o Sr.(a) possui. Caso o (a) Sr.(a) não concorde em participar dessa pesquisa, **NÃO** haverá nenhuma alteração na forma do tratamento e o Sr.(a) não sofrerá prejuízos de qualquer natureza, devido a sua recusa na participação.

Eu, _____, declaro ter sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam neste documento, referente ao projeto de pesquisa intitulado “Perfil citogenético e de expressão de genes relacionados à instabilidade genômica em células mesenquimais estromais multipotentes de indivíduos portadores de síndrome mielodisplásica”, que tem como pesquisador responsável **Sabrina Dias Leite Cueva**. Especificamente, fui orientado sobre o objetivo da pesquisa, os procedimentos a que serei submetido, os riscos e benefícios, bem como a ausência de despesas da minha parte. Declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- a) A garantia de receber esclarecimento a qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos e benefícios envolvidos na pesquisa;
- b) A liberdade de retirar meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento;
- c) A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade;
- d) O compromisso de que me será prestada informação atualizada ao longo do estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.

Por fim, declaro que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que livremente manifesto minha vontade em participar da referida pesquisa.

Ribeirão Preto,____, de _____, de 20__.

Assinatura do paciente (ou responsável)

Sabrina Dias Leite Cueva
Mestranda - Departamento de Genética
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP
Laboratório de Hematologia e Citogenética
Tel: 16-3602 2610 ou 3602 2303 ou 16- 9185 0778

ANEXO C

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

CÓPIA

Ribeirão Preto, 30 de setembro de 2009

Ofício nº 3246/2009
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **"PERFIL CITOGÊNÉTICO E DE EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À INSTABILIDADE GENÔMICA EM CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS MULTIPOTENTES DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE LEUCEMIA MIELOÍDE CRÔNICA E SÍNDROME MIELODISPLÁSICA"** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 296ª Reunião Ordinária realizada em 28/09/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 3823/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
SABRINA DIAS LEITE CUEVA
APARECIDA MARIA FONTES
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto