UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDA BORGES DA SILVA

Uso do *Single Nucleotide Polymorphism Array* (SNP-A) na investigação de alterações citogenéticas em pacientes com síndromes mielodisplásicas

Ribeirão Preto – SP

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDA BORGES DA SILVA

Uso do *Single Nucleotide Polymorphism Array* (SNP-A) na investigação de alterações citogenéticas em pacientes com síndromes mielodisplásicas

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”)

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular.

Orientadora: ***Profa. Dra. Fabíola Traina***

Ribeirão Preto – SP

2016

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 a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Da Silva, Fernanda Borges

Uso do *Single Nucleotide Polymorphism Array* (SNP-A) na investigação de alterações citogenéticas em pacientes com síndromes mielodisplásicas – Ribeirão Preto, 2014.

99 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientadora: Traina, Fabíola

1.Síndrome mielodisplásica 2.citogenética convencional

3. SNP-A 4. anormalidades cromossômicas

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
  (Bolsa de mestrado – maio/2015 a novembro/2016)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP - USP)
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP)
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular (INCTC)
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
  (FAEPA - HCFMRP - USP).

Nome: Da Silva, Fernanda Borges

Título: Uso do *Single Nucleotide Polymorphism Array* (SNP-A) na investigação de alterações citogenéticas em pacientes com síndromes mielodisplásicas.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração Oncologia clínica, células tronco e terapia celular.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr: _____

Instituição: _____Julgamento:_____

Assinatura: _____

Prof.Dr: _____

Instituição: _____Julgamento:_____

Assinatura: _____

Prof.Dr: _____

Instituição: _____Julgamento:_____

Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais e tio José Divino, com amor, admiração e extrema gratidão por toda compreensão e incansável apoio em todas as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu maior e mais puro amor, por ser meu guia e fortaleza em todos os momentos, e por me conceder sabedoria para alcançar os meus ideais.

À minha orientadora Profa. Dra. Fabíola Traina, agradeço a oportunidade, confiança e por ter se tornado uma grande amiga. Obrigada pela orientação deste trabalho, extrema contribuição para minha formação acadêmica, e exemplo de dedicação, ética e competência.

Ao Prof. Dr. Roberto Passeto Falcão, Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego, Profa. Dra. Belinda Pinto Simões, Prof. Dr. Rodrigo T. Calado, agradeço a oportunidade de realização deste projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular, em especial aos Professores Coordenadores e secretários, obrigada pelo apoio acadêmico e oportunidade da realização do meu curso de mestrado.

Ás queridas funcionárias da citogenética, por quem tenho imenso carinho, Virgínia Lipoli, Diva Hodniki e Ivana Barizza, agradeço a grande contribuição ao meu aprendizado. Obrigada pela paciência, cuidado e carinho dedicados a mim.

Á minha querida amiga e companheira de lar Ana Paula Nunes, que se tornou uma grande irmã, obrigada pelo apoio, por fazer os meus dias mais felizes, e por ser minha família em Ribeirão Preto.

Aos meus amigos e pós-graduandos do laboratório de hematologia, Bruna Fenerich, Mariane Cristina, André Pinto, João Agostinho, Jaqueline Fernandes, Fernanda Gutierrez, Flávia Donaires, Juan, Diego, Renata Scopim, João Paulo Lopes, Gustavo Borges. Obrigada pela amizade e torcida em cada conquista e etapa alcançada por mim, e por dividirem comigo esta fase da minha vida.

Agradecimento especial ao tio José Divino, obrigada pelo imensurável apoio dedicado a mim, por ter participado de toda trajetória de minha formação e ter contribuído para a realização desse sonho, serei eternamente grata.

Aos meus pais Belchior Antônio da Silva e Eleuza Borges da Silva, obrigada por terem feito de suas vidas a luta necessária para as conquistas dos meus ideais, vocês são a base de tudo. Obrigada pela estrutura familiar que norteou e apoiou minha vida, minhas escolhas e minhas conquistas. Vocês, minhas irmãs Dani e Paula, meu cunhado Eduardo e minha sobrinha Lavínia, minha amada avó Geronima, tio Odo, tio Manoel e tia Ilza por quem tenho imenso carinho, meus tios e primos queridos, que são sem dúvida o que eu tenho de mais importante em minha vida. Obrigada pelo amor incondicional e pelo incentivo marcante para que este sonho se realizasse.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

DA SILVA, FB. **Uso do *Single Nucleotide Polymorphism Array* (SNP-A) na investigação de alterações citogenéticas em pacientes com síndromes mielodisplásicas.** 2016, 99f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

As síndromes mielodisplásicas (SMD) constituem um grupo heterogêneo de doenças hematológicas de origem clonal, caracterizado por hematopoese ineficaz, citopenia e risco de evolução para leucemia mieloide aguda (LMA). As anormalidades citogenéticas adquiridas são marcadores prognósticos bem estabelecidos em SMD. No entanto, a técnica de citogenética metafásica apresenta limitações, incluindo baixa resolução e necessidade de divisão celular, sendo que defeitos cromossômicos podem não ser detectados. Tecnologias baseadas em microarranjo (*array*) de DNA, como o *Single Nucleotide Polymorphism Array* (SNP-A), são importantes para avaliação do genoma normal e neoplásico. O SNP-A foi desenvolvido para o estudo de todo o genoma, apresenta uma resolução superior a citogenética metafásica convencional, pode ser realizado em células na interfase, e detecta alterações cromossômicas não visualizadas pela citogenética metafásica. Além disso, o SNP-A fornece dados de genotipagem para detecção de perda neutra de heterozigose, também denominada de dissomia uniparental somática. Regiões cromossômicas com deleção, perda neutra de heterozigose ou ganho são comuns em pacientes com neoplasias hematológicas e sugeriu genes candidatos a supressores de tumor e oncogenes. O objetivo do presente estudo foi a caracterização da coorte de pacientes com suspeita clínica de SMD e o uso integrado do método de citogenética convencional e SNP-A no serviço de hematologia da nossa instituição na investigação de alterações citogenéticas em pacientes com SMD e doenças relacionadas. Durante o período do estudo, foram recebidas um total de 114 amostras de pacientes com suspeita clínica de SMD. A análise clínica, morfológica e citogenética permitiu confirmar o diagnóstico de SMD ou doenças relacionadas em 43 pacientes (SMD [n=34], SMD/NMP [n=5], LMA com alterações mielodisplásicas [n=4]). Vinte e um pacientes foram classificados como citopenia idiopática de significado indeterminado (CISI) e 50 indivíduos apresentaram outros diagnósticos. SNP-A foi realizado em 17 pacientes com SMD e doenças relacionadas. Dentre os pacientes selecionados para o SNP-A, anormalidades cromossômicas foram observadas em 6/17 (35%) casos pelo cariótipo convencional e em 8/17 (47%) casos pela

técnica de SNP-A. SNP-A não detectou quatro alterações cromossômicas previamente identificadas pela citogenética convencional: duas translocações balanceadas e duas alterações numéricas. SNP-A confirmou os demais achados identificados pela citogenética convencional e detectou um total de 32 novas lesões (1 ganho, 19 perdas e 12 UPDs) em 6 pacientes com SMD ou doenças relacionadas. SNP-A pode complementar a citogenética convencional na detecção de anormalidades cromossômicas em neoplasias mieloides.
Palavras-chave: Síndrome mielodisplásica, citogenética convencional, SNP-A, anormalidades cromossômicas.

ABSTRACT

DA SILVA, FB. **Use of *Single Nucleotide Polymorphism Array* (SNP-A) in the investigation of cytogenetics abnormalities in patients with myelodysplastic syndromes.** 2016, 99f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of clonal hematopoietic diseases, characterized by inefficient hematopoiesis, peripheral blood cytopenias and a risk to progress to acute myeloid leukemia (AML). Acquired chromosomal abnormalities have prognostic value in MDS. However, metaphase cytogenetics has some limitations including low resolution and the requirement of cell division, and chromosomal abnormalities may not be detected. New technologies based on array, the Single Nucleotide Polymorphism Array (SNP-A), are able to evaluate the whole genome. The SNP-A has superior resolution compared to metaphase cytogenetics, may be used in interphase cells, and may detect chromosomal abnormalities not detected by metaphase cytogenetics. In addition, the SNP-A read-out includes genotyping calls and hybridization signal strength, corresponding to gene copy number, allowing detecting copy neutral loss of heterozigosity (CN-LOH), also known as uniparental dissomy (UPD). Deletions, copy neutral loss of heterozigosity or gain are frequent in patients with haematopoietic neoplasms and has already suggested the location of tumor suppressor genes and oncogenes. The aim of this study was to characterize the cohort of patients with clinical suspicion of MDS and to establish the integrative use of the conventional cytogenetic and the SNP-A in the investigation of chromosomal abnormalities in patients with MDS and related diseases followed at our institution. The clinical, morphological and cytogenetic evaluation allowed us to confirm the diagnosis of MDS or related disease in 43 patients (MDS [n=34], MDS/MPN [n=5], AML with myelodysplastic changes [n=4]). Twenty-one patients were diagnosed with idiopathic cytopenia with undetermined significance (ICUS) and 50 patients had other diagnosis. SNP-A were performed in 17 patients with MDS and related disease. Chromosomal abnormalities were observed in 6/17 (35%) cases by metaphase cytogenetics, and in 8/17 (47%) of the cases by SNP-A. SNP-A did not detected two balanced translocations and two numerical alterations previously observed by metaphase cytogenetics. SNP-A confirmed all the other findings observed by metaphase cytogenetics and SNP-A detected a total of 32 new lesions (1 gain, 19

losses and 12 UPDs) in 6 MDS and related diseases. SNP-A may complement metaphase cytogenetics to improve the detection of chromosomal abnormalities in myeloid neoplasms.
Keywords: Myelodysplastic syndromes, metaphase cytogenetics, SNP-A, chromosomal abnormalities

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

SMD – síndrome mielodisplásica

SMD/NMP – síndrome mielodisplásica/neoplasia mieloproliferativa

AR – anemia refratária

ARSA – anemia refratária com sideroblastos em anel

ARSA-T - anemia refratária comsideroblastos em anel e trombocitose

CRDU – citopenia refratária com displasia de única linhagem

CRDU-AR – citopenia refratária com displasia de única linhagem- anemia refratária

CRDU-TR – citopenia refratária com displasia de única linhagem- trombocitopenia refratária

CRDM – citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens

CRDM-SA – citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens com sideroblastos em anel

AREBt – anemia refratária com excesso de blastos em transformação

AREB – anemia refratária com excesso de blastos

LMMC – leucemia mielomonocítica crônica

LMA – leucemia mieloide aguda

LMA/SMD – leucemia mieloide aguda com alterações mielodisplásicas

LMC – leucemia mieloide crônica

LMCa – leucemia mieloide crônica atípica

LMMJ – leucemia mielomonocítica juvenil

MM – mieloma múltiplo

LLA – leucemia linfoide aguda

LLC – leucemia linfoide crônica

AA – anemia aplástica

CISI – citopenia idiopática de significado indeterminado

FAB – Franco Américo Britânico

OMS – organização mundial de saúde

SP – sangue periférico

MO – medula óssea

IPSS – *international prognostic scoring system*

IPSS-R – *revised international prognostic scoring system*

ISCN - i*nternational system for human cytogenetic nomenclature*

FISH - *fluorescente in situ hibridization*

CGH-A - *comparative genomic hybridization array*

SNP-A - *single nucleotide polymorphism array*

CN-LOH - *copy neutral loss of heterozigosity*

UPD - *uniparental dissomy*

CNV - *copy number variations*

PCR - *polymerase Chain Reaction*

ChAS - *chromosome analysis suite*

VCM – volume corpuscular médio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimentos realizados no método de SNP-A - Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD (Affymetrix, CA, USA). 38

Figura 2. Gel de agarose para avaliação do produto da reação em cadeia da polimerase (PCR). Resultado da corrida em gel de agarose a 2% do produto da PCR de amostras de pacientes com diagnóstico de síndrome mielodisplásica (SMD) e controles positivo (Ctrl+) e negativo (Ctrl-). Os produtos da PCR apresentaram padrão de bandas entre 150 a 2000 bp. Foi utilizado um marcador (ladder) de 1Kb.....41

Figura 3. Gel de agarose para avaliação do produto da fragmentação do DNA. Resultado da corrida em gel de agarose a 3,5% do produto da fragmentação de amostras de pacientes com diagnóstico de SMD e controle positivo (Ctrl+). O padrão de bandas do produto da etapa de fragmentação apresentou entre 25 a 125 pb. Foi utilizado um marcador de 25 pb e 1kb. 43

Figura 4. Definição diagnóstica para os 114 pacientes submetidos a exame de cariótipo com suspeita clínica de síndrome mielodisplásica no período do estudo. Abreviações: SMD, síndrome mielodisplásica; SMD/NMP, síndrome mielodisplásica/neoplasia mieloproliferativa; LMA/SMD, leucemia mieloide aguda com alterações mielodisplásicas; CISI, citopenia idiopática de significado indeterminado; AAG, anemia aplástica grave; n, número de pacientes na população. 48

Figura 5. Imagem representativa de um caso com citogenética convencional e SNP-A normais (caso #35). Citogenética convencional 46,XX. SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. O sinal localizado na extremidade do painel representa o valor do número de cópias (NC), (NC=1, número de cópias 1; NC=2, número de cópias 2; NC=3, número de cópias 3). O sinal localizado abaixo de cada painel representa os dados do genótipo ou frequência de alelos A e B.....57

Figura 6. Citogenética convencional evidencia cariótipo normal e presença de heterocromatina no cromossomo 1; SNP-A confirma cariótipo normal (caso #30). A citogenética convencional indicou 46,XX,1qh+. A seta indica a heterocromatina. SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. A primeira linha do cariograma indica regiões de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental, a segunda linha indica regiões de perda e a terceira linha indica regiões de ganho. SNP-A identificou cariograma normal. 58

Figura 7. Mapeamento da deleção do cromossomo 5 (caso #16). (A) Cariótipo convencional: 46,XX, del(5)(q13q33) A seta indica a deleção do cromossomo 5. (B) SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. O sinal localizado na extremidade do painel representa o valor do número de cópias (NC), (NC=1, número de cópias 1; NC=2, número de cópias 2; NC=3, número de cópias 3). O sinal localizado abaixo

do painel representa os dados do genótipo ou frequência de alelos A e B. SNP-A detectou uma deleção no braço longo do cromossomo 5, como ilustrado pela diminuição do número de cópias e frequência de alelos indicados pela marcação em vermelho. O SNP-A identificou o ponto de quebra 5q14.3q34. 59

Figura 8. Distribuição de lesões somáticas identificadas pelo SNPA em pacientes com SMD e doenças relacionadas. SNP-A detectou um total de 40 lesões, sendo 32 novas lesões comparadas com a citogenética convencional. Ganhos cromossômicas estão ilustrados em azul, regiões de perdas estão ilustradas em vermelho e regiões de perda neutra de heterozigose/dissomia uniparental em roxo. 60

Figura 9. Novas lesões detectadas pelo SNP-A. SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. O sinal localizado na extremidade do painel representa o valor do número de cópias (NC), (NC=1, número de cópias 1; NC=2, número de cópias 2; NC=3, número de cópias 3). O sinal localizado abaixo de cada painel representa os dados do genótipo ou frequência de alelos A e B. SNP-A detectou trechos de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental, observados pelo número de cópias normal e uma frequência alterada de alelos A e B destacada pelas marcações em roxo do cromossomo 17 (A caso #32), 4 e 6 (B caso #39), e 16 (D caso #20). SNP-A detectou uma região de ganho, ilustrado pelo aumento no número de cópias e frequência de alelos destacado pela marcação em azul (C #caso 2). 62

Figura 10. Cariótipo complexo definido pela citogenética convencional e SNP-A (caso #42). (A) A citogenética convencional apresentou 47,XY,del(2)(p13),-5,+8,add(9)(q34),-12,-13,-17,+4mar. As setas indicam as alterações. SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. O sinal localizado na extremidade do painel representa o valor do número de cópias (NC), (NC=1, número de cópias 1; NC=2, número de cópias 2; NC=3, número de cópias 3). O sinal localizado abaixo de cada painel representa os dados do genótipo ou frequência de alelos A e B. Deleções foram observadas nos cromossomos 2 (B), 5 (D), 9 (G), 12 (H), 13 (I), 17 (J) como ilustrado pela diminuição no número de cópias e frequência de alelos marcados em vermelho. Regiões de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental foram observadas nos cromossomos 4 (C), 6 (E), 13 (I) e 18 (K) ilustrado pela frequência de alelos A e B marcados em roxo. Um ganho foi observado no cromossomo 8 (F), como ilustrado pelo aumento no número de cópias (CN=3) e pela frequência de alelos marcados em azul. 64

Figura 11. Morfologia, avaliação citgenética e molecular de um caso com LMA com alterações mielodisplásicas (caso #41). (A) Fragmento de medula óssea hipercelular; (B) mieloblastos; (C) diseritropoiese; (D) diseritropoese com precursor eritróide binucleado/maturação assincronica; (E) precursor mieloide com hipogranulação no citoplasma; (F) megacariócitos displásicos com núcleo monolobulado. A citogenética convencional apresentou (G) 46,XY,t(9;22)(q34;q11.2),del(20)(q11), (H) 46,XY,t(9;22)(q34;q11.2),del(20)(q11),inv(7)(q22q36), (I) 46,XY,t(9;22)(q34;q11.2),del(20)(q11),inv(7)(q22q36),+19. As setas indicam as alterações. (J) Reação da cadeia da polimerase para os transcritos b2a2/b3a2 e ela2 BCR-ABL-1. 1:

ladder 50 pb; 2: Caso #16; 3: controle positivo para o transcrito b2a2/b3a2 *BCR-ABL1* (p210); 4: controle positivo para o transcrito e1a2 *BCR-ABL1* (p190); 5: controle negativo para os transcritos b2a2/ b3a2 e e1a2 *BCR-ABL1*. (K) SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. O sinal localizado na extremidade de cada painel representa o valor do número de cópias (NC), (NC=1, número de cópias 1; NC=2, número de cópias 2; NC=3, número de cópias 3). O sinal localizado abaixo de cada painel representa os dados do genótipo ou frequência de alelos A e B. Deleções foram observadas nos cromossomos 2, 7, 20, como ilustrado pela diminuição no número de cópias e frequência de alelos marcados em vermelho. Os cromossomos 9, 19 e 22 apresentaram com número de cópias e frequência de alelos normais. 65

Figura 12. Translocação balanceada identificada pela citogenética convencional (caso #18). Citogenética convencional identificou 46,XX,t(3;11)(p25;q15). SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. O sinal localizado na parte superior da imagem do SNP-A representa o valor do número de cópias (NC), (NC=1, número de cópias 1; NC=2, número de cópias 2; NC=3, número de cópias 3). O sinal localizado na parte inferior da imagem do SNP-A representa os dados do genótipo ou frequência de alelos A e B. Número de cópias normal e três genótipos foram observados nos cromossomos 3 e 11 pelo SNP-A. 67

Figura 13. Imagem ilustrativa de limitações da metodologia de SNP-A (caso #19). A citogenética convencional indicou 46,XY, del20(q11),+mar. As alterações apresentam indicadas pelas setas. SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. A primeira linha do cariograma indica regiões de UPD, a segunda linha indica regiões de perda e a terceira regiões de ganho. O cariograma indicou uma perda no braço longo do cromossomo 20q destacado em vermelho na segunda linha. O cromossomo marcador não foi identificado pelo SNP-A (sensibilidade do teste). 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de Síndrome Mielodiplásica (SMD) de acordo com a Organização Mundial de Saúde 2008 22

Tabela 2. Anormalidades cromossômicas recorrentes presuntivas de SMD em casos com citopenia persistente com origem indeterminada com ausência de características morfológicas de SMD 23

Tabela 3. Anormalidades citogenéticas relacionadas a LMA com alterações mielodisplásicas. 24

Tabela 4. Estratificação de risco citogenético em SMD utilizada na estratificação de risco pelo IPSS-R. 25

Tabela 5. Master mix digestão. 39

Tabela 6. Master mix ligação. 40

Tabela 7. Master mix PCR. 40

Tabela 8. Master mix fragmentação. 42

Tabela 9. Master mix marcação. 43

Tabela 10. Master mix hibridização. 44

Tabela 11. Reagentes requeridos para o procedimento de lavagem e coloração 45

Tabela 12. Características demográficas e hematimétricas dos pacientes do estudo. 49

Tabela 13. Caracterização do grupo de pacientes com SMD. 50

Tabela 14. Sumário do resultado da avaliação citogenética dos pacientes do estudo. 51

Tabela 15. Alterações citogenéticas observadas nos pacientes com diagnóstico de SMD*. ... 52

Tabela 16. Características dos 17 pacientes selecionados para o SNP-A. 53

Tabela 17. Comparação de anormalidades cromossômicas detectadas pela citogenética convencional e SNP-A em pacientes com SMD*. 55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
1.1 Síndromes Mielodisplásicas 21
1.2 Citogenética convencional e molecular 26
2 OBJETIVOS 31
2.1 Objetivo geral 31
2.2 Objetivos Específicos 31
3 MATERIAL E MÉTODOS 33
3.1 Casuística 33
3.2 Padronização da metodologia de citogenética convencional 33
3.3 Tempo de cultura 34
3.4 Bloqueador mitótico 34
3.5 Hipotonização e fixação 35
3.6 Bandeamento G 35
3.7 Protocolo padronizado para citogenética convencional 36
3.8 Padronização da metodologia de SNP-A 37
3.9 Etapa 1: DNA genômico, digestão e ligação 38
3.9.1 Preparação do DNA genômico 38
3.9.2 Digestão 39
3.9.3 Ligação 39
3.10 Etapa 2: Reação em cadeia da polimerase, purificação e quantificação 40
3.10.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) 40
3.10.2 Purificação das amostras 41
3.11 Etapa 3: Fragmentação, marcação, hibridização 42
3.11.1 Fragmentação 42
3.11.2 Marcação 43
3.11.3 Hibridização 44

3.12 Etapa 4: Lavagem e escaneamento 44

3.13 Interpretação dos dados 45

3.14 Análise estatística 45

4 RESULTADOS 47

4.1 Caracterização clínica e citogenética de pacientes com hipótese diagnóstica de SMD 47

4.2 Análise integrada dos resultados da citogenética convencional e SNP-A 52

4.2.1 Seleção das amostras para o SNP-A 52

4.2.2 SNP-A confirmou a ausência de anormalidades cromossômicas observadas pela citogenética convencional 53

4.2.3 SNP-A define regiões de perda intersticial em SMD 59

4.2.4 SNP-A permite a detecção de novas lesões, incluindo regiões de perda neutra de heterozigose 60

4.2.5 SNP-A esclareceu anormalidades cromossômicas complexas identificadas pela citogenética convencional 62

4.2.6 SNP-A apresenta limitações metodológicas 66

5 DISCUSSÃO 70

6 CONCLUSÃO 77

REFERÊNCIAS 79

ANEXOS 83

Anexo I. Comprovação do Comitê de Ética do HC FMRP USP. 83

Anexo II. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #29: 46,XY,t(2;11)(p21;q23). 87

Anexo III. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #16: 46XX,del(5)(q13q33). 88

Anexo IV. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #20: 46,XY-7,del(20)(q11)x2. 89

Anexo V. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #17: 46,XX,del(5)(q21q34). 90

Anexo VI. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #15: 45,X,-Y 91

Anexo VII. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #19: 47,XY,del(20)(q11),+mar. 92

Anexo VIII. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #38: 47,XY,+der(1)t(1;19)(p13;p13.1). 93

Anexo IV. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso 18 #: 46,XX,t(3;11)(p25;q15). 94

Anexo X. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #43: 46,XX,add(1)(p36),t(2;10)(q?;q?),-7,+18. 95

Anexo XI. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #41: 46,XY,inv(7)(q22q36),t(9;22)(q34;q11.2),+19, del(20)(q11). 96

Anexo XII. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #42: 47,XY,del(2)(p13),-5,+8,add(9)(q34),-12,-13,-17,+4mar.....97

Anexo XIII. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #30: 46,XX,1qh+ 98

Anexo XIV- Casuística de pacientes com diagnóstico de SMD e doenças relacionadas.....99

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndromes Mielodisplásicas

As síndromes mielodisplásicas (SMD) constituem um grupo de doença clonal caracterizada por hematopoese ineficaz, citopenia e risco de progressão para leucemia mieloide aguda (LMA) [1]. A SMD é mais comum em pacientes com idade superior a 60 anos e as taxas de incidência são mais elevadas nos homens. Outros fatores de risco incluem a quimioterapia ou tratamento com radiação, o uso de tabaco e a exposição a solventes ou produtos químicos [2]. O fenótipo clínico é diverso em relação ao número e gravidade de citopenias, celularidade e contagem de blastos na medula óssea, índice de progressão para LMA, sobrevida global e resposta ao tratamento. Esta heterogeneidade clinica provavelmente é devido à variedade de alterações genéticas que contribuem para a fisiopatologia da doença [1, 3].

Devido à heterogeneidade clinica característica da SMD, é importante a identificação de grupos de pacientes com características semelhantes, na tentativa de melhor definir a terapia adequada e predizer a sobrevida dos pacientes. Desta forma, a primeira tentativa de classificação das SMD foi realizada em 1982 pelo grupo Franco Américo Britânico (FAB), a qual dividiu os pacientes com SMD em 5 grupos, de acordo com a porcentagem de blastos no sangue periférico e medula óssea, porcentagem de sideroblastos em anel na medula óssea e número absoluto de monócitos no sangue periférico. Esta classificação definiu anemia refratária [AR] e anemia refratária com sideroblastos em anel [ARSA], anemia refratária com excesso de blastos [AREB] e anemia refratária com excesso de blastos em transformação [AREBt] e leucemia mielomonocítica crônica [4]. Fisiopatologicamente, as SMD com <5% de blastos na medula óssea são caracterizadas por altas taxas de apoptose das células hematopoéticas, hipercelularidade na medula óssea e citopenias no sangue periférico. As SMD com ≥5% blastos na medula óssea são caracterizadas por aumento da proliferação, baixa apoptose, falha na diferenciação celular com consequente acumulo de blastos e maior risco de evolução para LMA [5].

Posteriormente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) redefiniu as neoplasias mieloides e a última revisão foi publicada em 2008 [1]. As mudanças mais importantes nesta nova classificação foram: (1) a mudança na porcentagem de blastos que define SMD e LMA, sendo que pacientes com ≥20% de blastos na medula óssea foram definidos como LMA; (2) a incorporação das alterações citogenéticas na classificação, definindo o grupo SMD del(5q); (3) a consideração do número de linhagens com atipias na classificação, diferenciando o grupo de pacientes com displasia de uma única linhagem do grupo de pacientes com displasia de múltiplas linhagens. A classificação da OMS foi capaz de melhor identificar e distinguir grupos de pacientes com diferentes fenótipos clínicos e sobrevida [6]. A classificação morfológica de acordo com a OMS é baseada principalmente na porcentagem de blastos na medula óssea (MO) e sangue periférico (SP), presença ou ausência de displasia nas linhagens eritroide, mieloide e megacariocítica e pela presença de sideroblastos em anel [1], e define os subtipos descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação de Síndrome Mielodiplásica (SMD) de acordo com a Organização Mundial de Saúde 2008

Definições	Sangue periférico	Medula óssea
Citopenia refratária com displasia de única linhagem (CRDU): (anemia refratária [AR]; neutropenia refratária [NR]; trombocitopenia refratária [TR]).	Citopenia de uma ou duas séries	Displasia de única linhagem: 10% de células em uma linhagem mielóide. < 5% blastos < 15% de precursores eritroides são sideroblastos em anel.
Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA)	Anemia Ausência de blastos	≥ 15% dos precursores eritróides são sideroblastos em anel. Displasia apenas na série eritróide < 5% blastos
Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens (CRDM)	Citopenia (s) Ausência de bastonetes de Auer < 1 x 10^9/L monócitos	Displasia em ≥ 10% de células em ≥ 2 linhagens mieloides (neutrófilo e/ou precursor eritróide e/ou megacariócito) <5% de blastos Ausência de bastonetes de Auer ± 15% de sideroblastos em anel
Anemia refratária com excesso de blasto 1 (AREB-1)	Citopenia(s) <5% de blastos Ausência de bastonetes de Auer < 1 x 10^9/L monócitos	Displasia em uma ou mais linhagens 5-9% de blastos Ausência de bastonete de Auer
Anemia refratária com excesso de blasto 2 (AREB-2)	Citopenia(s) 5-19% de blastos ± Bastonete de Auer < 1 x 10^9/L monócitos	Displasia em uma ou mais linhagens 10-19% de blastos ± Bastonete de Auer
SMD não classificada	Citopenia(s)	Displasia de uma linhagem e < 5% de blasto ou sem displasia mas com alteração citogenética característica
SMD associada com del(5q)	Anemia Plaqueta normal ou aumentada <5% de blastos	Displasia série eritróide <5% de blastos Ausência de bastonete de Auer Anormalidade citogenética isolada: del(5q)

De acordo com a OMS 2008, em casos com características clínicas e laboratoriais consistentes com SMD com características morfológicas inconclusivas, o diagnóstico presuntivo de SMD pode ser feito através de uma anormalidade cromossômica clonal específica (Tabela 2). Anormalidades citogenéticas recorrentes observadas em SMD, particularmente del(20q), +8 e –Y não estão incluídas na classificação da OMS [7]. Essas anormalidades têm sido reportadas em pacientes com anemia aplástica ou outras citopenias que apresentam boa resposta a terapia imunossupressora e/ou pacientes que não apresentam evidências morfológicas de SMD com acompanhamento prolongado. A perda do cromossomo Y em células hematopoéticas tem sido reportada como um fenômeno associado com a idade [7].

Tabela 2. Anormalidades cromossômicas recorrentes presuntivas de SMD em casos com citopenia persistente com origem indeterminada com ausência de características morfológicas de SMD

Anormalidades não balanceadas	**Anormalidades balanceadas**
_7 ou del(7q)	t(11;16)(q23;p13.3)
_5 ou del(5q)	t(3;21)(q26.2;q22.1)
i(17q) ou t(17p)	t(1;3)(p36.3;q21.1)
_13 ou del(13q)	t(2;11)(p21;q23)
del(11q)	inv(3)(q21q26.2)
del(12p) ou t(12p)	t(6;9)(p23;q34)
del(9q)	
idic(X)(q13)	
Cariótipo complexo (3 ou mais anormalidades cromossômicas) envolvendo uma ou mais das alterações listadas acima	

A categoria síndrome mielodisplásica/neoplasia mieloproliferativa (SMD/NMP), foi incorporada na classificação da OMS 2008 para incluir neoplasias mieloides com características clínicas, laboratoriais e morfológicas de SMD e NMP. Este subgrupo inclui leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), leucemia mieloide crônica atípica (LMCa), leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), SMD/NMP não classificada e anemia refratária com sideroblastos em anel e trombocitose (ARSA-T) [1, 7].

LMA com displasia de múltiplas linhagens foi introduzido inicialmente na classificação da OMS 2001 [8] para abranger os casos de LMA com características mielodisplásicas, incluindo anormalidades citogenéticas e resposta à terapia desfavoráveis. Apesar do significado prognóstico de LMA com displasia de múltiplas linhagens ter sido demonstrado em alguns estudos, outros mostraram que a displasia de múltiplas linhagens não apresentava significado prognóstico independente quando as anormalidades citogenéticas foram incorporadas na análise. Este subtipo foi renomeado como LMA com alterações mielodisplásicas e o critério para esta categoria inclui

pacientes com 20% ou mais de blastos no sangue periférico ou medula óssea e que apresentem (1) história prévia de SMD ou SMD/NMP, (2) anormalidades citogenéticas relacionadas a mielodisplasia (Tabela 3), (3) displasia em 50% ou mais das células em duas ou mais linhagens mieloides [1, 7].

Tabela 3. Anormalidades citogenéticas relacionadas a LMA com alterações mielodisplásicas.

Anormalidades não balanceadas	Anormalidades balanceadas
-7 ou del(7q)	t(11;16)(q23;p13.3)
-5 ou del(5q)	t(3;21)(q26.2;q22.1)
i(17q) ou t(17p)	t(1;3)(p36.3;q21.1)
-13 ou del(13q)	t(2;11)(p21;q23)
del(11q)	t(5;12)(q33;p12)
del(12p) ou t(12p)	t(5;7)(q33;q11.2)
del(9q)	t(5;17)(q33;p13)
idic(X)(q13)	t(5;10)(q33;q21)
	t(5;10)(q33;q21)
	t(3;5)(q25;q34)

Apesar de todos os critérios diagnósticos para SMD, há um número de pacientes com citopenia(s) persistente com ausência de critérios morfológicos e citogenéticos para a definição do diagnóstico de SMD. Alguns autores têm sugerido o termo citopenia idiopática de significado indeterminado (CISI) para esses casos. Esse termo não é considerado como uma entidade de classificação da OMS 2008 para SMD, mas como uma descrição para pacientes sem critérios mínimos para o diagnóstico de SMD. Esse grupo de pacientes deve ser criteriosamente monitorado para evidências morfológicas ou citogenéticas de SMD [9].

Anormalidades citogenéticas adquiridas são marcadores prognósticos bem estabelecidos em SMD. As alterações citogenéticas foram incorporadas na estratificação de risco pelo Sistema Internacional de Escore Prognóstico - IPSS. O IPSS originou-se de um estudo de 816 casos para determinação da classificação prognóstica de SMD, e considera as anormalidades citogenéticas, o número de citopenias e a porcentagem de blastos na estratificação de risco, definindo quatro subgrupos de pacientes com diferentes sobrevida e risco de evolução para LMA. As alterações citogenéticas foram classificadas como sendo de prognóstico bom, intermediário e ruim. Alterações citogenéticas consideradas de bom prognóstico foram cariótipo normal, del(5q), del(20q) e –Y; anormalidades cromossômicas complexas (≥ 3 anormalidades) ou alterações no cromossomo 7 definiram um grupo de pacientes com prognóstico

desfavorável. As demais alterações citogenéticas foram consideradas como sendo de risco intermediário [10].

Schanz e colaboradores [11] propuseram um novo sistema de estratificação de risco citogenético baseado em coleta de dados de 2.902 pacientes que contribuíram para a atualização do IPSS e para um refinamento de categorias de risco citogenético. O IPSS foi revisado em 2012 em um estudo que incluiu 7012 pacientes e houve modificações nos parâmetros prognósticos. As alterações mais importantes foram a incorporação da gravidade de citopenias e a nova definição de risco baseada nas alterações citogenéticas, incluindo novas anomalias citogenéticas que definiram cinco categorias de prognóstico: muito bom, bom, intermediário, ruim, e muito ruim. Alterações citogenéticas com > 3 anormalidades foram consideradas de prognóstico muito ruim, enquanto que a presença de 3 anormalidades foi definida como prognóstico ruim. A del(7q) ou monossomia do 7 foram definidas como prognóstico intermediário, enquanto que as alterações no cromossomo 7 associadas a outra alteração citogenética foram consideradas como prognóstico ruim [12] (Tabela 4).

Tabela 4. Estratificação de risco citogenético em SMD utilizada na estratificação de risco pelo IPSS-R.

Subgrupos	**Anormalidades citogenéticas**
Muito bom	-Y, del(11q)
Bom	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), duas alterações incluindo a del(5q);
Intermediário	del(7q), -8, -19, i(17q), qualquer outra alteração ou duas alterações envolvendo clones independentes;
Ruim	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), duas alterações envolvendo -7/del(7q), Complexo: 3 anormalidades
Muito ruim	Complexo: > 3 anormalidades

A patogênese de SMD é complexa e envolve (1) aumento da auto-renovação de células tronco hematopoéticas ou aquisição de auto-renovação em uma célula progenitora, (2) aumento na capacidade de proliferação no clone que sustenta a doença, (3) bloqueio da diferenciação celular, (4) instabilidade genética e epigenética, (5) mecanismos anti-apoptóticos, (6) evasão do sistema imunológico, (7) supressão da hematopoese normal [3].

A hematopoese ineficaz em pacientes com SMD pode ser atribuída a uma susceptibilidade anormal à apoptose em células progenitoras e respostas limitadas dessas células a fatores de crescimento. Acredita-se que sinais pró-apoptóticos em pacientes com SMD provenham de uma sinalização anormal, um excesso de citocinas pró-inflamatórias e uma alterada resposta imune [13]. As alterações epigenéticas de

metilação do DNA e acetilação de histonas podem alterar a transcrição de genes. Em pacientes com SMD pode ocorrer uma metilação anormal da transcrição em regiões promotoras e o número de *loci* envolvido é aumentado em pacientes com alto risco e durante a progressão da doença [14].

1.2 Citogenética convencional e molecular

A citogenética metafásica ou citogenética convencional é uma importante ferramenta para o diagnóstico e seguimento de pacientes com neoplasias hematológicas, podendo detectar alterações cromossômicas balanceadas, incluindo translocações ou inversões, e alterações cromossômicas não balanceadas, incluindo trissomias, duplicações e deleções [3]. Lesões cromossômicas identificadas pela citogenética convencional podem afetar o comportamento do clone maligno, a progressão da doença, resposta a terapia e sobrevida de pacientes com SMD [11]. Anormalidades cromossômicas balanceadas são comuns em leucemias mieloides, como LMA ou leucemia mieloide crônica (LMC), no entanto, em SMD, anormalidades cromossômicas não balanceadas que refletem ganho ou perda de material cromossômico são prevalentes [15]. Haase e colaboradores [16] analisaram anormalidades citogenéticas numéricas e estruturais em 2072 pacientes com SMD e observaram que anormalidades envolvendo deleções no cromossomo 5q foram as mais frequentes, ocorrendo em 30% de 1080 pacientes com anormalidades citogenéticas clonais. Outras anormalidades frequentemente observadas foram -7/del (7q) em 21% dos pacientes com anormalidades cromossômicas, seguido por +8 (16%), del(20q) (7%) e –Y (5%).

A citogenética convencional exige um tempo prolongado para a preparação da amostra e análise dos cromossomos, depende da proporção de células clonais na amostra examinada e do tamanho do clone. A sensibilidade é relativamente baixa. De acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana 2013 (ISCN 2013) [17], anormalidades estruturais devem estar presentes em pelo menos 2 células e anormalidades numéricas devem estar presentes em pelo menos 3 células para serem consideradas como clone. A resolução depende da localização da alteração cromossômica e do padrão de bandas obtido. A necessidade de se obter células em

metáfase que permita a cariotipagem é uma limitação da técnica. A citogenética convencional determina a proporção de células anormais dentro de um grupo de células em divisão e pode não se correlacionar com a porcentagem de células malignas, um fato que pode ser o responsável por diferenças quantitativas entre vários métodos citogenéticos. Devido a essas limitações, provavelmente quando a citogenética convencional é utilizada em neoplasias hematológicas, muitos defeitos cromossômicos permanecem não detectados [18, 19].

Alternativa para a detecção de alterações cromossômicas para os casos com ausência de metáfase é a metodologia de hibridização *in situ* por fluorescência (*fluorescente in situ hibridization*; FISH). Sondas específicas de FISH podem ser utilizadas na detecção de deleções, amplificações, translocações e na identificação de rearranjos em genes. Os painéis de FISH mais comumente aplicados em SMD incluem sondas para a detecção de -5/del(5q), - 7/del(7q), del(20q) e trissomia do cromossomo 8. A principal vantagem do FISH é que não há necessidade de obter células em metáfase para análise e a sua sensibilidade é relativamente elevada em relação ao número de células analisadas em comparação com a análise de apenas 20 células pela citogenética convencional. Porém, o método de FISH pode ser utilizado apenas na detecção de alterações cromossômicas específicas, e não é útil na identificação de novas alterações cromossômicas [20, 21].

Várias tecnologias baseadas em microarranjo (*array*) de DNA têm sido introduzidas na tentativa de se examinar o genoma normal e neoplásico. Hibridização genômica comparativa (CGH-A) baseia-se na detecção de alteração no número de cópias entre a amostra de DNA teste e uma amostra de DNA de referência. Diferenças no número de cópias resultam em uma mudança no sinal de fluorescência. A capacidade de comparar os sinais de hibridização entre o DNA teste e o DNA controle permite um elevado nível de precisão e de exclusão de artefatos [18]. Usando uma tecnologia similar, arranjos de polimorfismos de nucleotídeos únicos (*Single nucleotide polimorphism array* [SNP-A]) foi desenvolvido para o estudo de todo o genoma e também para o estudo de citogenética, sem necessidade de uma amostra de DNA de referência. O conceito básico do SNP-A envolve a análise de *loci* genômicos para obtenção do número de cópias e genótipo. São usadas sondas não polimórficas para determinar o valor do número de cópias e sondas polimórficas para a determinação da genotipagem. Para isso, o DNA genômico a ser testado é hibridizado contra um "*chip*"

que contém sondas de oligonucleotídeos imobilizadas e precisamente definidas. Em geral, um sinal de fluorescência é obtido para cada alelo hibridizado com a sonda, chamado aleatoriamente de A ou B, para um determinado SNP. Em uma abordagem simples, este sinal é convertido em dois tipos de informações: o genótipo de cada SNP (A, B, AB) e no valor do número de cópias (intensidade de fluorescência) para o *locus* específico. Ao contrário da citogenética convencional, CGH-A e SNP-A podem ser realizadas em células na interfase, ambas as tecnologias são capazes de detectar defeitos não balanceados, têm resolução superior quando comparados à citogenética convencional e permitem a detecção de lesões cromossômicas intersticiais, não visualizadas através da citogenética convencional [22].

O SNP-A contém sondas específicas que fornecem dados de genotipagem permitindo a detecção da perda neutra de heterozigose (*copy neutral loss of heterozigosity* [CN-LOH]), também denominada de dissomia uniparental (*uniparental dissomy* [UPD]). Dissomia uniparental representa um estado alélico anormal em que pode ocorrer deleção de um alelo e subsequente substituição do alelo deletado por uma cópia do alelo remanescente ou recombinação mitótica [23]. A dissomia uniparental é uma alteração cromossômica comum em neoplasias hematológicas não detectada pela citogenética convencional e não detectada pelo CGH-A. Regiões de dissomia uniparental têm sido frequentemente observadas em 20% dos casos de LMA, 30% dos casos de SMD e doenças relacionadas e em mais que 80% de linfomas malignos [24]. Como esperado, as regiões de dissomia uniparental estão associadas a mutações de genes supressores de tumor, incluindo *TET2* no 4q, *CDKN2A/B* no 9p, *TP53* no 17p, *NF1* no 17q, *Rb* no 13q, *CEBPA* no 19q, e *RUNX1* no 21q [22]. Recentes estudos sugerem que a dissomia uniparental pode ocasionar a perda de função de alelos de genes supressores de tumor ou um ganho de função de oncogenes [25].

SNP-A tem sido aplicado em diversas neoplasias hematológicas, incluindo mieloma múltiplo (MM) [26], leucemia linfoide crônica (LLC) [27], leucemia linfoide aguda (LLA) [28], LMA [29], SMD [30] e NMP [31]. Em geral, os resultados obtidos através da aplicação do SNP-A demonstraram uma ampla complexidade de anormalidades cromossômicas[32].

Variações no número de cópias (*Copy number variations* [CNVs]) representam perdas ou ganhos de material genômico indentificados em controles saudáveis e são considerados como uma variação genômica normal. CNVs são alvos do SNP-A,

podendo dificultar a discriminação entre eventos somáticos e germinativos em pacientes com neoplasias. Com isso, a comparação da amostra teste com uma amostra de DNA contendo uma configuração da linhagem germinativa pode ser importante na exclusão de CNVs e na distinção entre lesões somáticas e germinativas. No entanto, não há uma boa definição da melhor amostra para exclusão de lesões germinativas, e a análise adicional de células não clonais apresenta um alto custo na prática clínica. Em casos de neoplasias mieloides, linfócitos não clonais podem ser usados como fonte de DNA germinativo. Células de mucosa bucal são frequentemente usadas como referência da linhagem germinativa, mas pode ocorrer contaminação com leucócitos, principalmente quando a contagem de células brancas apresenta-se alta [18, 33]. A confirmação de novas lesões cromossômicas somáticas pode ser importante, mas essa exigência pode depender do tamanho da lesão observada. Estudos têm proposto que se a análise de citogenética convencional e SNP-A apresentarem concordância nos resultados, a análise de DNA germinativo não é necessária. Em casos com deleções e ganhos não detectados pela citogenética convencional, pode-se realizar uma comparação dos resultados com um banco de dados de CNVs, e as lesões podem ser excluídas sem a necessidade de um DNA germinativo [18, 34].

A sensibilidade do SNP-A está relacionada com a presença de um número suficiente de células que compartilham uma anormalidade clonal. Para detecção de lesões não balanceadas pelo SNP-A é necessário a presença de aproximadamente 30% de células clonais na amostra testada. A citogenética convencional permite a detecção da presença de clones. O SNP-A não permite a distinção entre clones [22].

O objetivo do presente estudo foi a caracterização da coorte de pacientes com suspeita clínica de SMD atendidos em nossa instituição, assim como a padronização e o uso integrado das técnicas de citogenética convencional e SNP-A na investigação de anormalidades cromossômicas em pacientes com SMD e doenças relacionadas. SMD é uma doença particularmente indicada para demonstrar o uso de SNP-A na avaliação de anormalidades não balanceadas adquiridas.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a presença de alterações citogenéticas em pacientes com SMD e doenças relacionadas através do uso integrado de citogenética convencional e SNP-A.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a coorte de pacientes com suspeita clínica de SMD e doenças relacionadas avaliados em nossa instituição.
- Investigar as alterações citogenéticas através da citogenética convencional em amostras de medula óssea de pacientes com SMD e doenças relacionadas.
- Investigar a presença de perda de heterozigose (deleção e dissomia uniparental adquirida) e ganhos cromossômicos em pacientes com SMD e doenças relacionadas através da técnica de SNP-A.
- Comparar as alterações citogenéticas encontradas através da técnica de citogenética convencional e SNP-A.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram recebidos um total de 114 amostras de pacientes com suspeita clínica de SMD no Laboratório de Citogenética do Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC FMRP-USP) entre 08/01/2014 a 11/11/2015. Todos os pacientes foram atendidos no HC FMRP USP e foram submetidos à avaliação clínica para a exclusão de outras causas de citopenia. Todos os pacientes foram submetidos à coleta de mielograma, biópsia de medula óssea e cariótipo como parte da investigação da suspeita clínica de SMD. As informações clínicas foram coletadas do prontuário médico pela Profa. Dra. Fabiola Traina. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética de pesquisa do HC FMRP-USP (Anexo I) e o termo de consentimento foi obtido dos participantes.

3.2 Padronização da metodologia de citogenética convencional

Foi realizado a padronização da metodologia de citogenética convencional e definição do protocolo no laboratório de hematologia do HC FMRP-USP. Apesar da metodologia já ser bem estabelecida em diversos laboratórios, é necessário que seja adaptada e padronizada para cada laboratório, a depender das condições de temperatura, umidade e material utilizado. A técnica de citogenética convencional envolve a obtenção de um material adequado, a definição do tempo ideal da cultura, tempo de incubação com bloqueador mitótico, hipotonização, fixação, e bandeamento G. Segue a descrição dos procedimentos e etapas que foram testadas para a padronização.

3.3 Tempo de cultura

Foram coletadas amostras de medula óssea em seringa de 20 mL contendo de 1 a 2 mL de heparina, com volume final total de 3 a 5 mL. Inicialmente, a amostra de medula óssea foi submetida a uma contagem de células e estipulamos semear $1x10^7$ células em 10 mL de meio RPMI (Vitrocell, SP, BR) 20% soro fetal bovino (SFB; GIBCO, SP, BR). O tempo da cultura foi definido a partir de diferentes testes. Na tentativa de manter o tempo de cultura recomendado de 24 horas, as amostras recebidas foram armazenadas e mantidas ao longo do dia a $4^{\circ}C$ até o dia seguinte, todas as culturas foram iniciadas no mesmo momento, e retiradas após um período de exatamente 24 horas de cultura em estufa com CO_2 a $37^{\circ}C$. Simultaneamente a cultura de 24 horas, amostras foram submetidas a cultura imediatamente após a coleta e retiradas na manhã do dia seguinte, sem respeitar as 24 horas. Foi observado um maior índice de crescimento celular quando as amostras frescas foram semeadas em cultura e retiradas no dia seguinte. A seguir, foram testados três diferentes tempos de cultura: 1, 2 ou 3 dias de cultura, e foi observado que houve maior índice de metáfases em culturas em que as amostras foram semeadas imediatamente após a coleta e processadas 1 (~24 horas) ou 2 (~48horas) dias depois.

3.4 Bloqueador mitótico

O bloqueador mitótico colchicina (Colcemid™ 10µg/mL KaryoMAX® [Gibco®, NY, EUA) é usado no método de citogenética para o bloqueio de proteínas do fuso mitótico e consequente obtenção de células em divisão celular na fase de metáfase. A concentração e o tempo de exposição ao bloqueador mitótico influenciam diretamente no número de metáfases e o padrão dos cromossomos. Foram avaliados diferentes tempos e doses de colchicina. Foram testadas as doses de 80 e 100 µL, nos tempos de 30, 40 e 50 minutos em estufa de CO_2 a $37^{\circ}C$. Como esperado, as metáfases expostas a um tempo maior de colchicina apresentaram um encurtamento nos cromossomos, o que dificulta sua identificação na análise. Foi observado um menor índice mitótico quando o

volume da colchicina foi de 80 µL. Portanto, foi padronizado o uso de 100 µL de colchicina em um período de 30 minutos para inibição das proteínas do fuso mitótico e obtenção de metáfases adequadas para análise.

3.5 Hipotonização e fixação

A hipotonização das amostras foi avaliada em tempos e maneiras diferentes. Primeiramente, as amostras foram incubadas por 20 minutos a 37°C com 10 mL de solução hipotônica, e o processo de homogeneização foi feito manualmente. Entretanto, este método resultou em uma frequente perda aleatória dos cromossomos. Foi padronizado a hipotonização em um tempo de 16 minutos e a homogeneização foi realizada em agitador *vortex*.

Foram testadas diferentes concentrações de solução de Carnoy (ácido acético e metanol) para fixação do material, sendo testadas as proporções de metanol:ácido acético de 3:1, 2:1 e 1:1. Foi observado que o uso do fixador na proporção 2:1 e 1:1 resultou em espalhamento inapropriado e perda aleatória de cromossomos na metáfase. Foi padronizado 3 lavagens com solução de Carnoy na proporção 3:1 para melhor fixar as células e obter metáfases adequadas para análise. Foi definido que em casos específicos em que os cromossomos se apresentaram sobrepostos e pouco dispersos, o material deveria ser submetido a uma nova lavagem utilizando Carnoy nas proporções 2:1 ou 1:1.

3.6 Bandeamento G

O preparo das lâminas para a cariotipagem e o procedimento de bandeamento G devem ser adaptados para as condições de temperatura e umidade de cada laboratório. Diferentes métodos de preparo e envelhecimento das lâminas foram testados. (a) o material fixado foi pingado em lâminas secas e submetidas ao calor de uma chama para envelhecimento; (b) o material fixado foi pingado em lâminas secas e submetido a

incubação em uma placa de aquecimento a 88°C durante 10 minutos para envelhecimento; (c) o material fixado foi pingado em lâminas embebidas em água a 4°C e mantidas a temperatura ambiente para envelhecimento. Este último teste resultou na obtenção do melhor padrão de bandas e foi estabelecido como padrão. Para envelhecimento das lâminas, as mesmas foram pingadas e armazenadas em temperatura ambiente em período mínimo de 5 horas e máximo de 15 dias para o processo de bandeamento, sendo possível obter bandas adequadas para análise dentro deste intervalo de tempo testado. Definimos como protocolo um tempo de 24 horas para envelhecimento das lâminas e bandeamento G.

Dois métodos de bandeamento G foram testados. As lâminas foram submetidas a (a) solução de 2×SSC e solução de tampão fosfato, ou (b) tripsina (GIBCO, NY, EUA) e tampão fostato. O uso da tripsina resultou na obtenção de um melhor padrão de bandas. O protocolo definido como padrão consiste em submersão das lâminas envelhecidas em tripsina e tampão fostato e coloração. Dois corantes foram testados para o bandeamento G, Giemsa e Wright's eosine methylene blue (Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo que este último conferiu um melhor padrão de bandas cromossômicas.

3.7 Protocolo padronizado para citogenética convencional

As amostras foram obtidas através da coleta de medula óssea em seringa de 20 mL contendo anticoagulante heparina. Foram realizadas duas culturas, sendo uma de 24 horas e outra de 48 horas em 10 mL de meio RPMI (Vitrocell, SP, BR), com 20% de soro bovino fetal (GIBCO, SP, BR) e 1% Streptomicina/Penicilina e mantidas em estufa de CO_2 a 37ºC. Completado o tempo estipulado de cultura foram acrescentados 100 µL de bloqueador de fuso mitótico, Colcemid®, e as amostras foram incubadas em estufa de CO2 a 37ºC por 30 minutos adicionais. Posteriormente, o material foi centrifugado, desprezando-se o sobrenadante e exposto a solução hipotônica (KCL 0,075 mol/L) por 16 minutos a 37ºC. O material foi fixado em solução de Carnoy (metanol e ácido acético 3:1) e gotejado em lâminas de vidro. As bandas foram feitas pela técnica de bandeamento G com o uso de tripsina, tampão fosfato e corante Wright's eosine

methylene blue. As metáfases foram analisadas ao microscópio óptico Zeiss AXIO Imager acoplado ao sistema de captura de imagem *Applied Spectral Imaging 6.0* para cariotipagem. Alternativamente, as imagens foram analisadas ao microscópio óptico Zeiss acoplado ao sistema de captura de imagem *Applied Spectral Imaging GenASIs*. Sempre que possível, pelo menos 20 metáfases foram analisadas. As anormalidades cromossômicas foram descritas de acordo com o ISCN 2013 [17]. Todas as metáfases foram analisadas pela autora e revisadas pela orientadora deste trabalho.

3.8 Padronização da metodologia de SNP-A

Para padronização do SNP-A, foi realizado um treinamento técnico de duas semanas segundo instruções do fabricante Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD (Affymetrix, CA, USA). Todas as etapas realizadas passaram por controles. SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD (Affymetrix). O protocolo do SNP-A consiste em 4 etapas principais (Figura 1). As amostras foram obtidas através da coleta de medula óssea em tubo contendo anticoagulante EDTA. Foi realizada a extração do DNA de acordo com instruções do fabricante (Qiagen DNA Kit; Qiagen, CA, USA). O DNA genômico foi diluído em 50 ng/uL utilizando tampão EDTA TE para a realização do SNP-A. Foi utilizado um controle positivo (DNA genômico-CytoScan) e um controle negativo (Low EDTA TE buffer-CytoScan) recomendados pelo fabricante. Foi pipetado 5uL das amostras de DNA diluído e controles em uma placa de 96 poços. Todas as etapas foram realizadas em uma caixa com gelo e todos os reagentes foram homogeneizados através de agitação em *vortex* antes do uso. A reação foi padronizada para 8 amostras, incluindo os controles. Os procedimentos executados em cada etapa são detalhados a seguir.

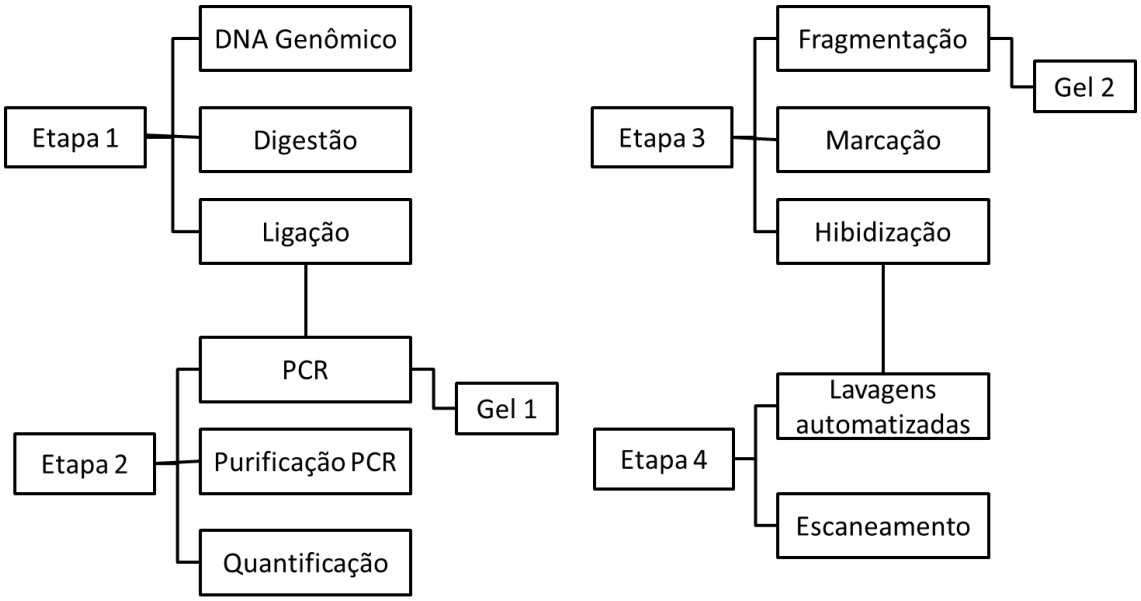


Figura 1. Procedimentos realizados no método de SNP-A - Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD (Affymetrix, CA, USA).

3.9 Etapa 1: DNA genômico, digestão e ligação

3.9.1 Preparação do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido através de amostra de medula óssea total coletada em EDTA. A coleta de medula óssea para SNP-A foi realizada simultaneamente à coleta de medula óssea para a citogenética convencional. A extração de DNA das amostras foi realizada de acordo com as orientações do fabricante (Qiagen DNA Kit). Foi utilizado solução de lise de hemácias, solução de lise de glóbulos brancos e solução de precipitação de proteína para retirada dos restos celulares. Posteriormente, foi usado isopropanol para precipitação do DNA e solução de hidratação de DNA para reconstituição do precipitado. As amostras foram tratadas com RNAse para digestão de moléculas de RNA remanescentes do processo de extração. Foram analisadas a quantidade e qualidade das amostras para o SNP-A através da leitura do DNA usando absorbância UV (Nano Vue GE) e corrida em gel de agarose a 1%. As amostras apresentaram razões da absorbância A260/A280 e A260/A230 entre 1.8 e 2.0, concentrações acima de 100 ng/uL, e bandas de aproximadamente 10-20 kb em gel de

agarose a 1%, o que confere boa quantidade e qualidade para realização da técnica. As amostras de DNA foram diluídas em uma concentração de 50 ng/uL para os procedimentos do SNP-A.

3.9.2 Digestão

Para a preparação do master mix do procedimento de digestão, foi pipetado em tubo cônico os reagentes descritos na Tabela 5. Foi transferido um volume de 19,75 uL do master mix em cada poço contendo as amostras de DNA e controles. A placa foi selada com filme adesivo, agitada em *vortex* em alta velocidade, centrifugada a 1200×g durante 1 minuto e colocada no termociclador na seguinte programação: 2 horas (37°C), 20 minutos (65°C), manutenção (4°C).

Tabela 5. Master mix digestão.

Reagentes	Volume
Nuclease-Free Water	110,9 µL
10× Nsp I Buffer	19,2 µL
100× BSA	1,9 µL
Nsp I	9,6 µL
Volume total	151,2 µL

3.9.3 Ligação

Após o procedimento da digestão, foi realizada a etapa de ligação. Foram pipetados em tubo cônico os reagentes descritos na Tabela 6. Um volume de 5,25 uL do master mix da ligação foi pipetado em cada poço contendo o produto da digestão. A placa foi selada com filme adesivo, agitada em *vortex* em alta velocidade, centrifugada a 1200×g durante 1 minuto e colocada no termociclador na programação: 3 horas (16°C), 20 minutos (70°C), manutenção (4°C).

Tabela 6. Master mix ligação.

Reagentes	Volume
10× T4 DNA Ligase Buffer	25,0 µL
50 µM Adaptor, Nsp I	7,5 µL
T4 DNA Ligase	20,0 µL
Volume total	52,5 µL

3.10 Etapa 2: Reação em cadeia da polimerase, purificação e quantificação

3.10.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a etapa de PCR, os produtos provenientes da etapa anterior foram diluídos com Chilled Affymetrix® Nuclease-Free Water (25 µL do produto da ligação + 75 µL de água). Após a diluição, 10 µL de cada poço foram transferidos para uma nova placa em quadruplicata para cada amostra. O master mix do PCR foi preparado de acordo com a Tabela 7. Um volume de 90 µL foi adicionado em cada poço contendo os 10 µL referente ao produto da ligação diluída de cada amostra. A placa foi selada com filme adesivo, agitada em *vortex* em alta velocidade por duas vezes, centrifugada a 1200×g durante 1 minuto. A placa foi colocada no termociclador na programação de 3 minutos (94°C), 30 segundos (94°C), 45 segundos (60°C), 15 segundos (68°C), 7 minutos (68°C), manutenção (4°C). A partir desta etapa, o produto da PCR foi manipulado na área pós PCR. Produtos originados das reações de PCR foram visualizados em gel de agarose para confirmar a distribuição de tamanho adequado das bandas (150 a 2000 pb) (Figura 2).

Tabela 7. Master mix PCR.

Reagentes	Volume
Chilled Affymetrix® Nuclease-Free Water	1453,6 µL
10× TITANIUM ™ Taq PCR Buffer	368,0 µL
GC-Melt Reagent	736,0 µL
dNTP Mixture	515,2 µL
PCR Primer	165,6 µL
50× TITANIUM	73,6 µL
Total	3312,0 µL

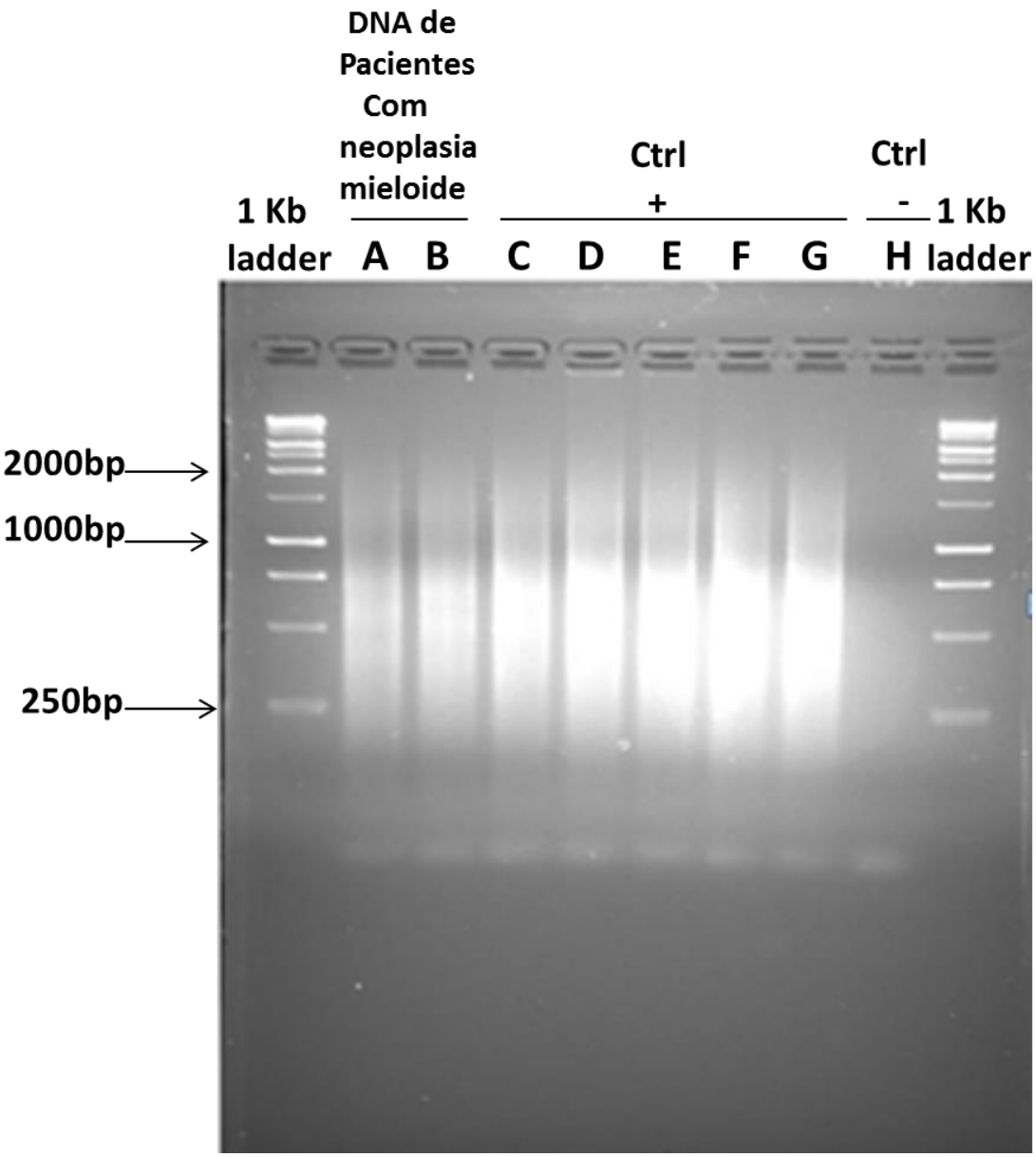


Figura 2. Gel de agarose para avaliação do produto da reação em cadeia da polimerase (PCR). Resultado da corrida em gel de agarose a 2% do produto da PCR de amostras de pacientes com diagnóstico de síndrome mielodisplásica (SMD) e controles positivo (Ctrl+) e negativo (Ctrl-). Os produtos da PCR apresentaram padrão de bandas entre 150 a 2000 bp. Foi utilizado um marcador (ladder) de 1Kb.

3.10.2 Purificação das amostras

As amostras amplificadas foram purificadas utilizando *beads* de purificação e estante magnética. A análise da pureza do DNA foi feita usando absorbância UV (Nano Vue GE). O produto purificado apresentou concentração ≥ 3.0 ug/uL, a razão da absorbância A260/280 entre 1.8 e 2.0, e o OD 320 ≤ 0.1. Foram purificadas as amostras de DNA e controle positivo, o controle negativo foi descartado nessa etapa.

3.11 Etapa 3: Fragmentação, marcação, hibridização

3.11.1 Fragmentação

Os reagentes descritos na Tabela 8 foram pipetados em tubo cônico. Um volume de 10 µL do master mix da fragmentação foi pipetado em cada poço contendo o produto da purificação da PCR. A placa foi selada com filme adesivo, agitada em *vortex* em alta velocidade por uma vez, centrifugada em centrífuga refrigerada a 1200×g durante 1 minuto e colocada no termociclador na programação de 35 minutos (37°C), 15 minutos (95°), manutenção (4°C). Produtos originados das reações de fragmentação foram visualizados em gel de agarose para confirmar a distribuição de tamanho adequado das bandas (25 a 125 pb) e estão ilustrados na Figura 3.

Tabela 8. Master mix fragmentação.

Reagentes	Volume
Chilled Affymetrix® Nuclease-Free Water	271,2 µL
10× Fragmentation Buffer	343,8 µL
Fragmentation Reagent	10 µL
Total	630 µL

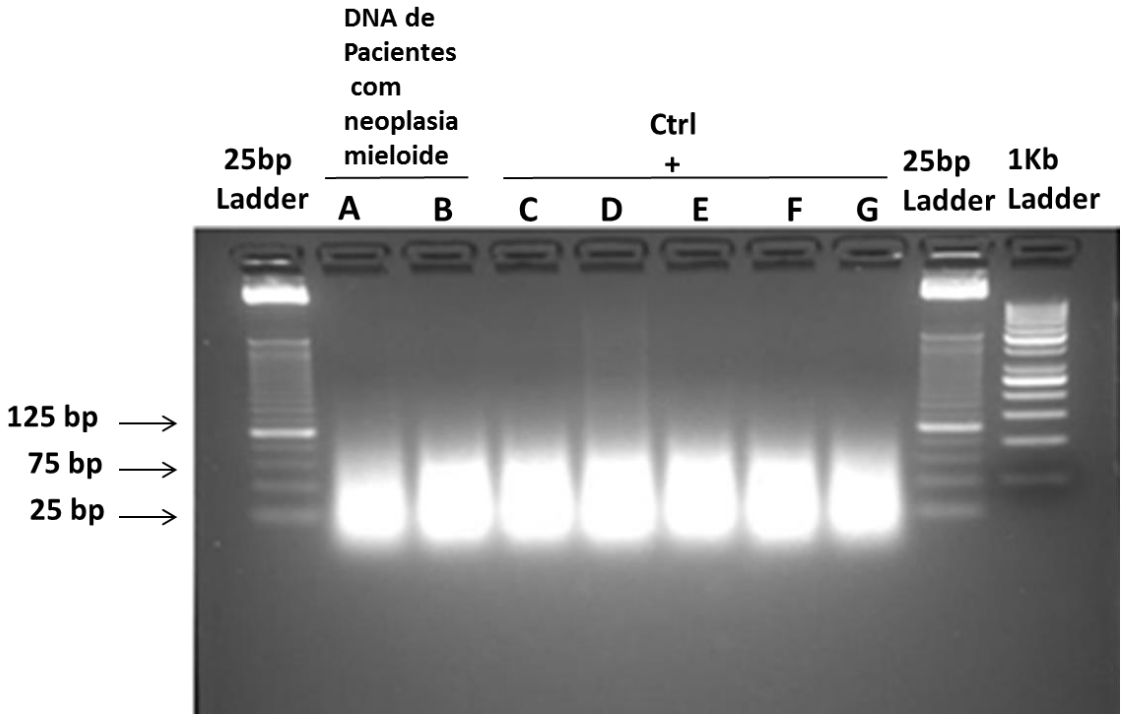


Figura 3. Gel de agarose para avaliação do produto da fragmentação do DNA. Resultado da corrida em gel de agarose a 3,5% do produto da fragmentação de amostras de pacientes com diagnóstico de SMD e controle positivo (Ctrl+). O padrão de bandas do produto da etapa de fragmentação apresentou entre 25 a 125 pb. Foi utilizado um marcador de 25 pb e 1kb.

3.11.2 Marcação

Os reagentes descritos na Tabela 9 foram pipetados em tubo cônico. Um volume de 19,5 µL do master mix da marcação foi pipetado em cada poço contendo o produto da fragmentação. A placa foi selada com filme adesivo, agitada em *vortex* em alta velocidade por uma vez, centrifugada em centrífuga refrigerada a 1200×g durante 1 minuto e colocada no termociclador na programação de 4 horas (37°C), 15 minutos (95°C), manutenção (4°C).

Tabela 9. Master mix marcação.

Reagentes	Volume
5X TdT Buffer	134,4 µL
30 mM DNA labeling Reagent	19,2 µL
TdT	33,6 µL
Total	187,2 µL

3.11.3 Hibridização

Os reagentes descritos na Tabela 10 foram pipetados em tubo cônico. Um volume de 190 uL do master mix da hibridização foi pipetado em cada poço contendo o produto da marcação. A placa foi selada com filme adesivo, agitada em *vortex* em alta velocidade por uma vez, centrifugada em centrífuga refrigerada a 1200×g durante 1 minuto e colocada no termociclador na programação de 10 minutos (95°C), manutenção (49°C).

Tabela 10. Master mix hibridização.

Reagentes	Volume
Hyb Buffer Part 1	1584,0 µL
Hyb Buffer Part 2	144,0 µL
Hyb Buffer Part 3	67,2 µL
Hyb Buffer Part 4	9,6 µL
Oligo Control Reagent 0100	19,2 µL
Total	1824 µL

Após o término da hibridização, 200 µL de cada amostra foram transferidos para um *chip*® da Affymetrix contendo as sondas de oligonucleotídes para todo o genoma. Os *chips* foram incubados em um forno em um período de 16 a 18 horas a 50°C, 60 rpm.

3.12 Etapa 4: Lavagem e escaneamento

Os *chips* foram introduzidos em uma estação fluídica (Affymetrix®) de lavagens e coloração automática. Os reagentes requeridos para o procedimento de lavagem e coloração estão descritos na Tabela 11. Em seguida, os *chips* foram inseridos e escaneados no equipamento GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix®). Após o escaneamento, foram gerados arquivos no formato CEL (arquivo de dados de intensidade de sinal). Os arquivos CEL foram convertidos para arquivos CYCHP (dados

de visualização) e analisados por meio do programa ChAS® (Chromosome Analysis Suite) previamente instalado em um computador.

Tabela 11. Reagentes requeridos para o procedimento de lavagem e coloração

Stain Buffer 1
Stain Buffer 2
Affymetrix Gene Chip Array Holding Buffer
Affymetrix Gene Chip Wash A
Affymetrix Gene Chip Wash B

3.13 Interpretação dos dados

Regiões com alteração no número de cópias maiores do que 1 Mb e dissomia uniparental maior do que 10 Mb indicadas pelo programa ChAS® foram definidas como alterações verdadeiras. Para a distinção de lesões somáticas de CNVs, as lesões identificadas pelo ChAS foram comparadas a um banco de dados (DGV,http://projects.tcag.ca/variation). Alterações identificadas pelo SNP-A foram descritas de acordo com o ISCN 2013 [17]. Todas as imagens foram analisadas pela autora e revisadas pela orientadora deste trabalho.

3.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA). Para as comparações, foi utilizado o teste de X^2 para variáveis categóricas e o teste de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Dunns* para fatores mensuráveis. Um valor de $P<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização clínica e citogenética de pacientes com hipótese diagnóstica de SMD

De um total de 114 pacientes com suspeita de SMD, 43 apresentaram um diagnóstico conclusivo de SMD ou doenças relacionadas (SMD [n=34], SMD/NMP [n=5], LMA com alterações mielodisplásicas [n=4]). Vinte e um pacientes foram classificados como citopenia idiopática de significado indeterminado (CISI) e 50 indivíduos apresentaram outros diagnósticos. Dentre os pacientes que foram definidos como outros diagnósticos, 2 apresentaram anemia aplástica grave (AAG), 6 apresentaram outras neoplasias hematológicas (hipereosinofilia [n=1], mielofibrose [n=1], MM [n=2], LMC ao diagnóstico [n=1] e linfoma não Hodgkin [n=1]), 20 pacientes apresentaram hepatopatia, 5 apresentaram doença renal e 8 apresentaram doença autoimune. Indivíduos que apresentaram citopenia resolvida em um período menor que 6 meses foram incluídos no grupo outras doenças/diversos (n=9) (Figura 4).

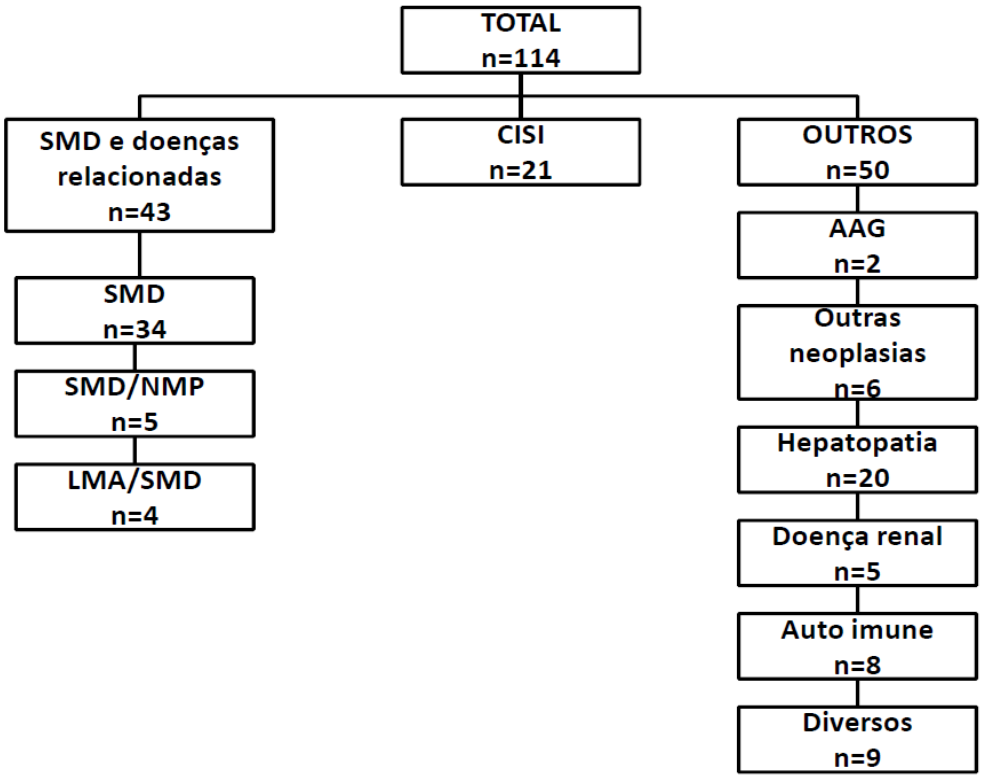


Figura 4. Definição diagnóstica para os 114 pacientes submetidos a exame de cariótipo com suspeita clínica de síndrome mielodisplásica no período do estudo. Abreviações: SMD, síndrome mielodisplásica; SMD/NMP, síndrome mielodisplásica/neoplasia mieloproliferativa; LMA/SMD, leucemia mieloide aguda com alterações mielodisplásicas; CISI, citopenia idiopática de significado indeterminado; AAG, anemia aplástica grave; n, número de pacientes na população.

As características demográficas e hematimétricas dos pacientes agrupados nos 3 grupos (SMD e doenças relacionadas, CISI e outros diagnósticos) estão apresentadas na Tabela 12. Os valores de hemoglobina foram significativamente menores nos pacientes com SMD comparados com CISI (P<0,01) e comparado com outros diagnósticos (P<0,01). Não houve diferença entre os valores de hemoglobina entre os grupos CISI versus (*vs*) outros. Os pacientes com SMD apresentaram valores de neutrófilos significativamente menores que os pacientes com outros diagnósticos (P<0,05). Não houve diferença significativa entre os valores de neutrófilos entre os grupos SMD *vs* CISI (P>0,05) e entre os grupos CISI *vs* outros diagnósticos (P>0,05). A percentagem de blastos na medula óssea foi significativamente maior nos pacientes com SMD comparado com outros diagnósticos (P< 0,01) e entre os grupos de SMD *vs* CISI (P<0,05). Não houve diferença significativa na porcentagem de blastos na medula óssea entre os e entre os grupos de CISI *vs* outros diagnósticos (P>0,05). Não houve diferença

significativa na idade e na distribuição do sexo entre os grupos de pacientes com SMD, CRSI e outros diagnósticos. Não houve diferença significativa entre os valores de volume corpuscular média (VCM), leucócitos, monócitos, plaquetas e número de citopenias entre os 3 grupos (Tabela 12).

Tabela 12. Características demográficas e hematimétricas dos pacientes do estudo.

	SMD* (n=43)	CRSI (n=21)	Outros (n=50)	$P^{\#}$
Sexo, M/F	20/23	05/16	21/29	0.18
Idade (anos)	69 (17-85)	70 (28 - 84)	62 (26-89)	>0,05
Hb (g/dL)$^{\neq}$	8,8 (3,7-14,8)	12,6 (8,9 - 14,7)	11,3 (6,6-16,3)	<0,01$^{\$}$
VCM$^{\neq}$	95(79-114)	93 (80-105)	92 (29-118)	>0,05
Leuco (x10$^{9/}$L)$^{\neq}$	3,3 (0,7-15,6)	4,4 (1,3 - 9,4)	4,2 (0,8-46)	>0,05
Neutro (x10^{9}/L)$^{\neq}$	1,2(0,2-7,6)	2,3 (0,5 - 6,3)	2,4 (0,2-25,7)	0,03$^{\&}$
Mono (x10^{9}/L)v	0,2 (0-9,5)	0,3 (0 - 0,9)	0,3 (0-2,2)	>0,05
Plt (x10^{9}/L)$^{\neq}$	85 (8-626)	110 (39 - 341)	74 (7-466)	>0,05
% blastos MO$^{\neq}$	2 (1-66)	1 (1 - 6)	1 (1-4)	<0,01$^{"}$
0 citopenia	0	0	2	0,12
1 citopenia	12	13	21	
2 citopenias	19	4	20	
3 citopenias	11	4	8	

Abreviações: SMD, síndrome mielodisplásica; CRSI, citopenia refratária de significado indeterminado; N, número de pacientes na população; (%), porcentagem; Hb, hemoglobina; VCM, volume corpuscular médio; Leuco, leucócitos; Mono, monócitos; Plt, plaquetas; MO, medula óssea.
*SMD e doenças relacionadas.
$^{\neq}$ mediana (mínimo – máximo).
$^{\#}$Variáveis categóricas foram analisas pelo teste X^2 e variáveis continuas pelo teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunns*.
$^{\$}$SMD *versus* (*vs.*) CISI: $P<0.01$; SMD *vs.* Outras: $P<0.01$; CISI *vs.* Outras: $P>0.05$
$^{\&}$SMD *vs.* CISI: $P>0,05$; SMD *vs.* Outras: $P<0.05$; CISI *vs.* Outras: $P>0.05$
$^{"}$SMD *vs.* CISI: $P<0,05$; SMD *vs.* Outras: $P<0.01$; CISI *vs.* Outras: $P>0.05$

A classificação dos pacientes de acordo com a OMS 2008, o risco citogenético e o IPSS-R estão indicados na Tabela 13. De acordo com a OMS 2008 os pacientes foram classificados em SMD, SMD/NMP e LMA com alterações mielodisplásicas. O grupo de SMD foi classificado nas seguintes categorias: citopenia refratária com displasia de única linhagem - anemia refratária (CRDU-AR), citopenia refratária com displasia de única linhagem - trombocitopenia refratária (CRDU-TR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens (CRDM), citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens com sideroblastos em anel (CRDM-SA), anemia refratária com excesso de blastos 1 e 2 (AREB1 e AREB2), e síndrome mielodisplásica não-classificável. O grupo de SMD/NMP foi classificado em leucemia mielomonocítica crônica 1 e 2 (LMMC 1 e 2) e em anemia

refratária com sideroblastos em anel associada a trombocitose (ARSA-T) e SMD/NMP não classificada. Os pacientes classificados como SMD, SMD/NMP com < 12 x10^9/L leucócitos e LMA com alterações mielodisplásicas com < 30% de blastos foram estratificados em 5 grupos de risco de acordo com o risco citogenético [11] e de acordo com o Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R) [12]. Os pacientes cujo exame de citogenética foram inconclusivos devido à ausência de metáfase não puderam ser estratificados em grupos de risco.

Tabela 13. Caracterização do grupo de pacientes com SMD.

Classificação OMS (2008)		**Número de pacientes**
SMD	CRDM/ARSA/CRDU-AR/	21/5/1
	CRDU-TR/AREB-/AREB2	1/3/1
	CRDM-SA/Não classificada	1/1
SMD/NMP	ARSAT/LMMC1/LMMC2	2/1/1
	Não classificada	1
LMA com alterações mielodisplásicas		4
Estratificação de Risco Citogenético		
Muito Bom/bom		1/28
Intermediário		3
Ruim/Muito ruim		1/2
Não avaliável*		8
Estratificação de risco IPSS-R		
Muito baixo/baixo		5/20
Intermediário		4
Alto/Muito alto		4/2
Não avaliável*		8

Abreviações: SMD, síndrome mielodisplásica; SMD/NMP, síndrome mielodisplásica/neoplasia mieloproliferativa; LMA, leucemia mieloide aguda; OMS, Organização Mundial da Saúde; ARSA, anemia refratária com sideroblastos em anel; CRDM, citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens; CRDM-SA citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens com sideroblastos em anel; CRDU-AR, citopenia refratária com displasia de única linhagem-anemia refratária; CRDU-TR , citopenia refratária com displasia de única linhagem –trombocitopenia refratária; AREB1, anemia refratária com excesso de blastos 1; AREB2, anemia refratária com excesso de blastos 2; LMMC, leucemia mielomonocítica crônica, IPSS-R, Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado. O risco citogenético foi definido de acordo com Schanz e colaboradores [11] o IPSS-R foram definidos de acordo com Greenberg [12].

*8 pacientes não foram avaliados de acordo com o risco citogenético e de acordo com o IPSS-R; 2 pacientes apresentaram % de blastos na medula óssea ≥30% e 6 pacientes apresentaram cariótipo inconclusivo por ausência de metáfase.

A avaliação citogenética foi realizada para 114 pacientes. Ausência de metáfases ocorreu em 16/114 (14%) dos casos. Alteração citogenética foi observada em 13/114 casos (11%), e cariótipo normal foi observado em 85/114 (75%) casos.

Dentre os pacientes definidos como outros diagnósticos, um paciente com diagnóstico de MM apresentou cariótipo complexo (46,XX,+6,add(15)(q26)-17,-22,+mar[5]/47,idem,+9[5]/46,XX[15]) e um paciente com LMC apresentou a

translocação entre os cromossomos 9 e 22 (46XY,t(9;22)(q34;q11)[20]). O resultado do cariótipo foi normal para todos os demais pacientes que foram definidos como CISI e outros diagnósticos (Tabela 14).

Dentre os 43 pacientes com diagnóstico de SMD, 26 (60%) pacientes apresentaram cariótipo normal, 11 (26%) apresentaram alteração citogenética e 6 (14%) não foram avaliados devido a ausência de metáfases (Tabela 14).

Tabela 14. Sumário do resultado da avaliação citogenética dos pacientes do estudo.

	SMD* (n=43)	CISI (n=21)	Outros (n=50)
Cariótipo normal, n (%)	26 (60)	15 (71)	44 (88)
Cariótipo alterado, n (%)	11 (26)	0	2 (4)
Cariótipo inadequado, n (%)	6 (14)	6 (29)	4 (8)

*SMD e doenças relacionadas.
Abreviações: SMD, síndrome mielodisplásica; CISI, citopenia idiopática de significado indeterminado; N, número de pacientes na população; (%), porcentagem.

Alterações estruturais não balanceadas frequentemente observadas nos pacientes com SMD foram deleções no braço longo do cromossomo 5 (n=2) e deleções no braço longo do cromossomo 20 (n=3). Deleções no braço longo do cromossomo 5 foram observadas em CRDM. Deleções observadas no braço longo do cromossomo 20 foram observadas em CRDM e LMA com alterações mielodisplásicas. Outras alterações numéricas ou deleções foram observadas nos cromossomos 2, 7, 8, 9, 12, 13, 17, 18, 19, 21 e Y.

Translocações balanceadas foram observadas em 5 casos de SMD classificados como ARSA (n=1), CRDM (n=1), LMMC2 (n=1), LMA com alterações mielodisplásicas (n=2). As translocações observadas envolveram os cromossomos 2;11, 3;11, 1;19, 2;10, 9;22. Além das translocações balanceadas, 2 pacientes com LMA com alterações mielodisplásicas apresentaram cariótipo complexo. Cromossomos marcadores não identificados pela citogenética convencional foram observados em 2 casos e foram incluídos em outras alterações. As alterações citogenéticas observadas nos pacientes com SMD estão descritas na Tabela 15. Uma metáfase e o cariograma correspondente ilustrativos de cada caso de SMD e doenças relacionadas com alteração citogenética estão ilustrados nos Anexos II-XII. Um dos casos com SMD ARSA e cariótipo normal apresentou heterocromatina no cromossomo 1 (Anexo XIII). Informações demográficas e clínicas dos 43 pacientes com SMD estão detalhadas no Anexo XIV.

Tabela 15. Alterações citogenéticas observadas nos pacientes com diagnóstico de SMD*.

Caso	OMS 2008	Citogenética
#29	ARSA	46,XY,t(2;11)(p21;q23)[17]/46,XY[3]
#16	CRDM	46,XX,del(5)(q13q33)[13]/46,XX[7]
#20	CRDM	46,XY-7,del(20)(q11)x2[19]/46,XY[1]
#18	CRDM	46,XXt(3;11)(p25;p15)[10]/46,XX[10]
#19	CRDM	46,XY,del(20)(q11)[23]/47,idem,+mar[2]
#17	CRDM	46,XX,del(5)(q21q34)[18]/46,XX[2]
#15	CRDM	45,X,-Y[20]
#38	LMMC2	47,XY,+der(1)t(1;19)(p13;p13.1)
#43	LMA/SMD	46,XX,t(2;10)(q?;q?),-7,+18[12]/46,idem,add(1)(p36)[12]
#42	LMA/SMD	47,XY,del(2)(p13),-5,+8,add(9)(q34),-12,-13,-17,+4mar[20]
#41	LMA/SMD	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2),del(20)(q11)[2]/46,idem,inv(7)(q22q36)[6]/47,idem, inv(7)(q22q36),+19[12]

*SMD e doenças relacionadas.
Abreviações: OMS, Organização Mundial da Saúde; ARSA, anemia refratária com sideroblastos em anel; CRDM, citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens; LMMC2, leucemia mielomonocítica crônica 2; LMA/SMD, leucemia mieloide aguda com alterações mielodisplásicas.

4.2 Análise integrada dos resultados da citogenética convencional e SNP-A

4.2.1 Seleção das amostras para o SNP-A

Dezessete casos confirmados de SMD ou doenças relacionadas foram arbitrariamente selecionados para a realização do SNP-A. A seleção dos casos foi baseada na disponibilidade e qualidade das amostras, apresentação clínica e resultado da citogenética convencional. Selecionamos pacientes com citogenética normal (n=11), incluindo o caso com heterocromatina no cromossomo 1, na tentativa de identificarmos lesões cromossômicas adicionais. Um dos casos selecionados (caso #35) apresentou diagnóstico de ARSA-T, anemia, macrocitose e plaquetose (Hb=4,5 g/dL; VCM=110 fL; leucócitos=2,5x10^9/L; neutrófilos=0,9x10^9/L; plaquetas=534x10^9/L; % blastos na medula óssea=1; % sideroblastos em anel na medula óssea=34) e suspeita clínica de deleção no cromossomo 5. Selecionamos um caso que apresentou um cromossomo marcador (caso #19) na tentativa de identificarmos o cromossomo marcador e lesões adicionais. Dois casos com deleção intersticial (casos #16 e #20) foram selecionados na tentativa de definirmos com exatidão o ponto de quebra cromossômico e lesões adicionais. Um caso com translocação balanceada (caso #18) foi selecionado para a

investigação de lesões adicionais, incluindo perda de material cromossômico no ponto de quebra da translocação. Dois casos que apresentaram cariótipo complexo (casos #41 e #42) foram selecionados para o SNP-A na tentativa de melhor definirmos as alterações cromossômicas identificadas pela citogenética convencional e de observarmos lesões adicionais. Características clínicas dos pacientes selecionados estão descritas na Tabela 16.

Tabela 16. Características dos 17 pacientes selecionados para o SNP-A.

Pacientes	**Número**
Idade (anos), mediana (intervalo)	68 (49-83)
Gênero, Masculino/Feminino	8/9
Classificação OMS (2008), n	
SMD	13
CRDU-AR	1
CRDM	8
CRDM-SA	1
ARSA	2
AREB1	1
SMD/NMP	2
ARSA-T	1
SMD/NMP não classificada	1
LMA-SMD	2
Estratificação de risco IPSS-R, n	
Muito baixo/Baixo	1/8
Intermediário	3
Alto/muito alto	3/2

Abreviações: SMD, síndrome mielodisplásica; OMS, Organização mundial da saúde; CRDU-AR, citopenia refratária com displasia de única linhagem- anemia refratária; CRDM, citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens; CRDM-SA, citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens com sideroblastos em anel; ARSA, anemia refratária com sideroblastos em anel; AREB1,anemia refratária com excesso de blastos 1; ARSA-T, anemia refratária com sideroblastos em anel associado a trombocitose ; SMD/NMP não classificada; LMA-SMD, LMA com alterações mielodisplásicas; IPSS-R, Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado; n, número.

4.2.2 SNP-A confirmou a ausência de anormalidades cromossômicas observadas pela citogenética convencional

Anormalidades cromossômicas foram observadas em 6/17 casos (35%) pelo cariótipo convencional e em 8/17 casos (47%) pela técnica de SNP-A. Através da técnica de citogenética convencional, 11 pacientes apresentaram um cariótipo normal, incluindo um caso com presença de heterocromatina no cromossomo 1. SNP-A

confirmou 8 casos normais previamente realizados pela citogenética convencional e detectou anormalidades cromossômicas não observadas pela citogenética convencional em 3 casos. Os resultados da citogenética convencional e SNP-A estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17. Comparação de anormalidades cromossômicas detectadas pela citogenética convencional e SNP-A em pacientes com SMD*.

Caso	Resultados citogenética convencional	Lesões detectadas pelo SNP-A	OMS (2008)
#11	46,XY[20]	Normal	CRDM
#35	46,XX[20]	Normal	ARSA-T
#5	46,XX[20]	Normal	CRDM
#28	46,XX[20]	Normal	ARSA
#24	46,XX[20]	Normal	CRDM-SA
#10	46,XY[20]	Normal	CRDM
#3	46,XX[20]	Normal	CRDM
#16	46XX,del(5)(q13q33)[13]46XX[7]	arr[hg19]5q14.3q34(87,293,324-161,083,278)x1-2	CRDM
#32	46,XY[20]	arr[hg19] 17q11.2q25.3(28,538,474-81,041,938) hmz	AREB1
#39	46,XX[20]	arr[hg19] 4q12q13.1(55,077,335-65,219,047) hmz	SMD/NMP-U
		arr[hg19] 4q22.1q24(89,143,567-104,611,010) hmz	
		arr[hg19] 6q11.1q13(61,968,745-74,352,365) hmz	
		arr[hg19] 6q21q23.3(106,205,296-138,195,723) hmz	
#2	46,XY[20]	arr[hg19] 8p23.3p23.2(1,668,896-3,464,542)x3	CRDU-AR
#20	46,XY,-7,del(20)(q11)x2[19]/46,XY[1]	arr[hg19] 7p22.3q36.3(43,360-159,119,707)x1-2	CRDM
		arr[hg19] 16p13.3p11.2(89,560-31,397,642) hmz	
		arr[hg19] 20p13q11.21(61,568-30,877,821)x2-3	
		arr[hg19] 20q11.21q13.13(30,975,801-49,764,509)x1-2	
		arr[hg19] 20q13.2q13.33(49,913,446-62,915,555)x2-3	
#18	46,XX,t(3;11)(p25;q15)[10]/46,XX[10]	Normal	CRDM
#19	46,XY,del(20)(q11)[23]/47,idem,+mar[2]	arr[hg19] 20q11.21q13.13(31,166,664-47,423,768)x1-2	CRDM
#42	47,XY,del(2)(p13),-5,+8,add(9)(q34),-12,-13,-17,+4mar[20]	arr[hg19] 2p13.3p11.2(70,394,513-87,344,725)x1	LMA-SMD
		arr[hg19] 2q36.1q36.3(224,723,031-226,221,091)x1	
		arr[hg19] 2q36.3q37.1(230,004,348-231,273,290)x1	
		arr[hg19] 4q13.3q24(71,449,612-105,582,452) hmz	
		arr[hg19] 5p15.31p15.2(7,717,024-10,512,625)x1	
		arr[hg19] 5p15.2(11,526,914-13,288,977)x1	
		arr[hg19] 5q14.1q34(79,701,699-166,538,905)x1	
		arr[hg19] 5q34(166,838,438-168,047,047)x1	
		arr[hg19] 5q35.1(170,135,452-170,859,758)x1	
		arr[hg19] 6p25.1p22.3(4,480,509-21,343,097) hmz	
		arr[hg19] 6p21.1p11.1(43,806,469-58,741,497) hmz	
		arr[hg19] 6q14.3q16.2(87,599,075-100,429,917) hmz	
		arr[hg19] 8p23.3q24.3(158,048-146,295,771)x3	

		arr[hg19] 9q22.31q31.1(94,454,675-104,234,487)x1 arr[hg19] 12p13.31p12.3(9,209,635-17,199,761)x1 arr[hg19] 12p12.1p11.22(22,116,240-30,175,901)x1 arr[hg19] 12q21.1q21.2(75,132,400-78,117,505)x1 arr[hg19] 12q21.31q23.1(84,818,958-96,455,871)x1 arr[hg19] 12q23.2q23.3(103,103,471-106,774,223)x1 arr[hg19] 13q12.12q12.13(23,619,956-26,365,365)x1 arr[hg19] 13q12.3q21.1(31,210,882-56,492,960)x1 arr[hg19] 13q31.3q33.3(92,980,925-109,829,371) hmz arr[hg19] 17q11.2q12(27,528,421-35,222,532)x1 arr[hg19] 17q12q21.33(35,885,136-50,013,434)x1 arr[hg19] 18q11.2q12.2(23,257,185-34,953,537) hmz	
#41	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2),del(20)(q11)[2]/46,idem,inv(7)(q22q36)[6]/ 47,idem,inv(7)(q22q36),+19[12]	arr[hg19] 2q36.3q37.3(229,385,664-239,698,667)x1-2 arr[hg19] 7q36.3(155,607,058-156,777,458)x1-2 arr[hg19] 20q11.21q13.13(30,975,861-49,210,224)x1-2	LMA-SMD
#30	46,XX,1qh+[20]#	Normal	ARSA

*SMD e doenças relacionadas.

#Paciente apresentou cariótipo normal e presença de heterocromatina no cromossomo 1.

Abreviações: SMD, síndrome mielodisplásica; OMS, Organização mundial da saúde; CRDU-AR, citopenia refratária com displasia de única linhagem- anemia refratária; CRDM, citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens; CRDM-SA, citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens com sideroblastos em anel; ARSA, anemia refratária com sideroblastos em anel; AREB1,anemia refratária com excesso de blastos 1; ARSA-T, anemia refratária com sideroblastos em anel associado a trombocitose ; SMD/NMP não classificada; LMA-SMD, LMA com alterações mielodisplásicas;

O resultado normal de citogenética convencional e do SNP-A de um caso com diagnóstico de SMD-CRDM (Caso #35) está ilustrado na Figura 5.

Figura 5. Imagem representativa de um caso com citogenética convencional e SNP-A normais (caso #35). Citogenética convencional 46,XX. SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. O sinal localizado na extremidade do painel representa o valor do número de cópias (NC), (NC=1, número de cópias 1; NC=2, número de cópias 2; NC=3, número de cópias 3). O sinal localizado abaixo de cada painel representa os dados do genótipo ou frequência de alelos A e B.

O resultado normal de citogenética convencional e do SNP-A de um caso com diagnóstico de SMD-ARSA (Caso #30) e presença de heterocromatina no cromossomo 1 está ilustrado na Figura 6.

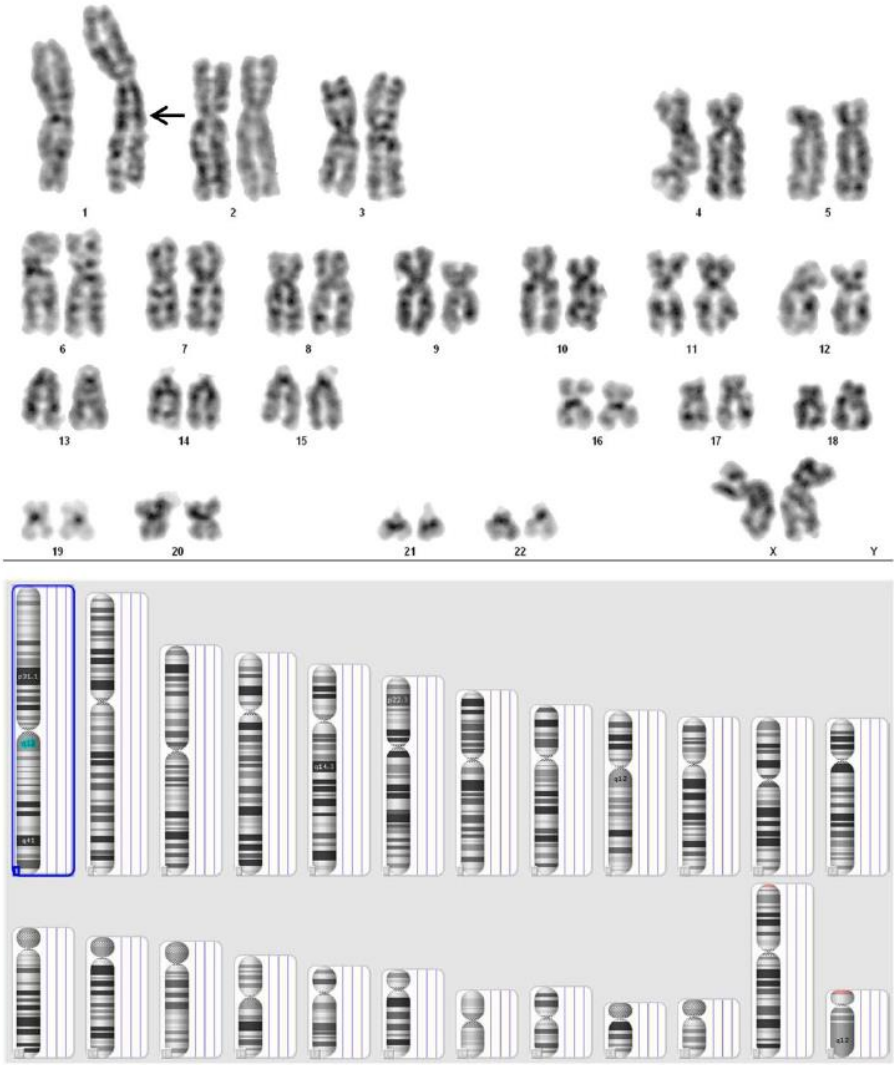


Figura 6. Citogenética convencional evidencia cariótipo normal e presença de heterocromatina no cromossomo 1; SNP-A confirma cariótipo normal (caso #30). A citogenética convencional indicou 46,XX,1qh+. A seta indica a heterocromatina. SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. A primeira linha do cariograma indica regiões de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental, a segunda linha indica regiões de perda e a terceira linha indica regiões de ganho. SNP-A identificou cariograma normal.

4.2.3 SNP-A define regiões de perda intersticial em SMD

O alto nível de resolução do SNP-A permite a definição precisa do mapeamento de lesões genômicas. SNP-A permitiu a definição precisa do ponto de quebra do braço longo do cromossomo 5 de uma paciente com diagnóstico de SMD CRDM (caso #16). A deleção detectada pelo SNP-A apresentou tamanho de 73.7 Mb, localizada entre as regiões 5q14.3 e 5q34 (Figura 7). A deleção foi identificada em 50% das células através da metodologia de SNP-A.

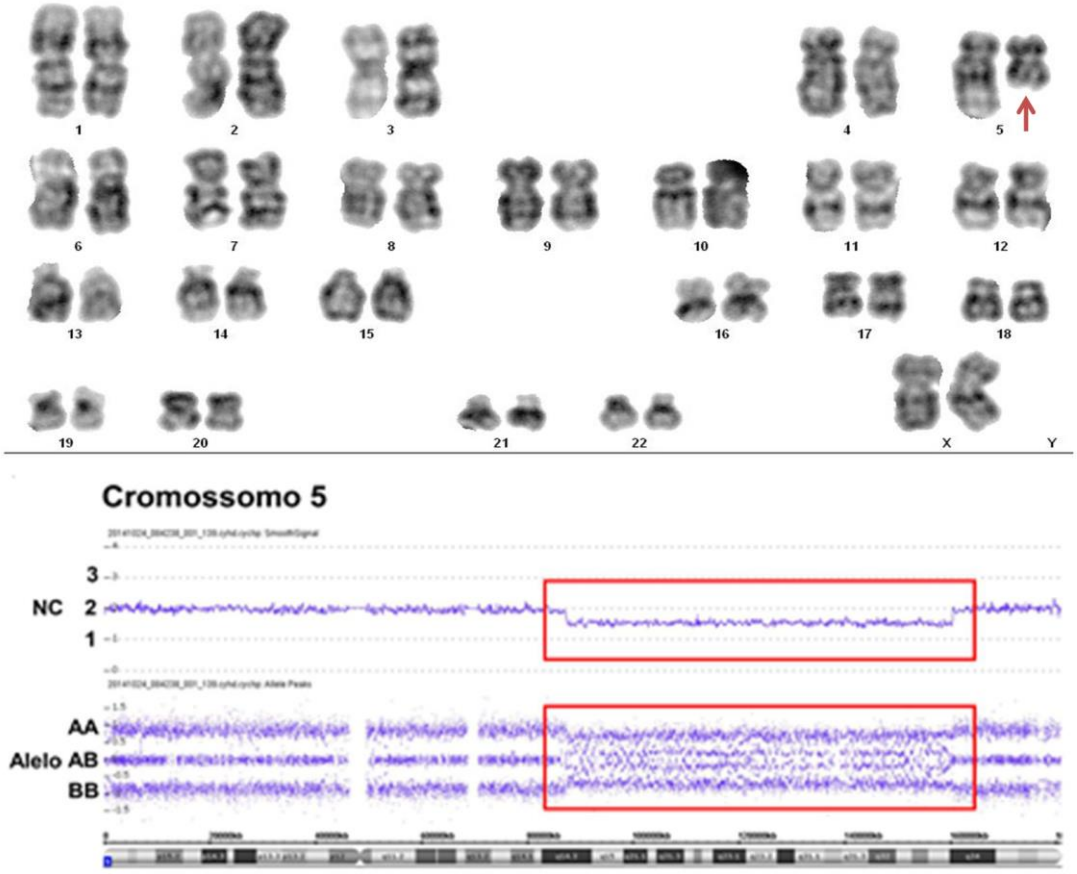


Figura 7. Mapeamento da deleção do cromossomo 5 (caso #16). (A) Cariótipo convencional: 46,XX, del(5)(q13q33) A seta indica a deleção do cromossomo 5. (B) SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. O sinal localizado na extremidade do painel representa o valor do número de cópias (NC), (NC=1, número de cópias 1; NC=2, número de cópias 2; NC=3, número de cópias 3). O sinal localizado abaixo do painel representa os dados do genótipo ou frequência de alelos A e B. SNP-A detectou uma deleção no braço longo do cromossomo 5, como ilustrado pela diminuição do número de cópias e frequência de alelos indicados pela marcação em vermelho. O SNP-A identificou o ponto de quebra 5q14.3q34.

4.2.4 SNP-A permite a detecção de novas lesões, incluindo regiões de perda neutra de heterozigose

O SNP-A identificou novas lesões não identificadas pela citogenética convencional em 6 casos. SNP-A detectou um total de 32 novas lesões (1 ganho, 19 perdas e 12 perdas neutras de heterozigose ou dissomia uniparental). As novas lesões detectadas pelo SNP-A ocorreram em pacientes com um resultado prévio de citogenética normal (n=3) e alterado (n=3). Todas as lesões cromossômicas detectadas pelo SNP-A estão representadas na Figura 8.

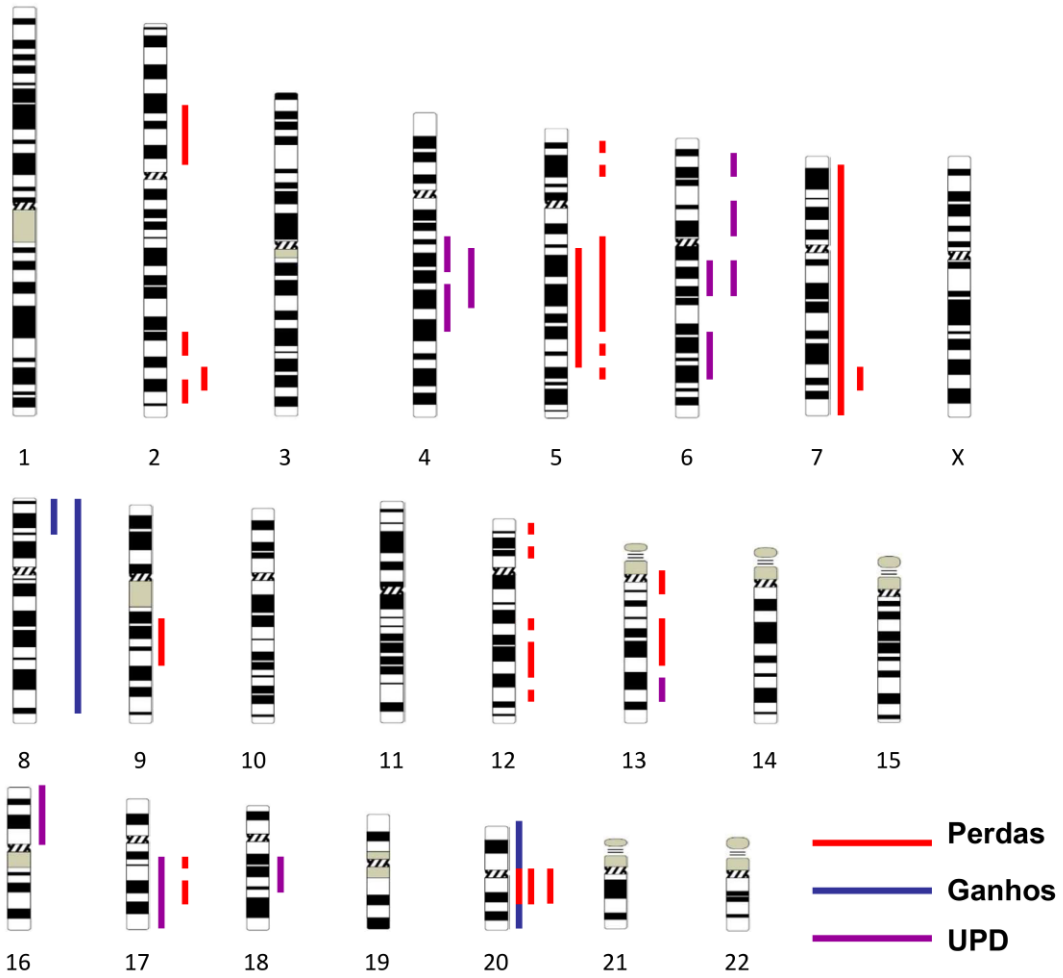


Figura 8. Distribuição de lesões somáticas identificadas pelo SNPA em pacientes com SMD e doenças relacionadas. SNP-A detectou um total de 40 lesões, sendo 32 novas lesões comparadas com a citogenética convencional. Ganhos cromossômicas estão ilustrados em azul, regiões de perdas estão ilustradas em vermelho e regiões de perda neutra de heterozigose/dissomia uniparental em roxo.

Novas lesões detectadas pelo SNP-A em pacientes com resultados prévios de citogenética convencional normal incluem regiões de UPD envolvendo o cromossomo 17q (caso#32; AREB-1), e UPD no cromossomo 4q e 6q (caso #39; SMD/NMP-U) e uma microtriplicação no braço curto do cromossomo 8 (caso # 2; CRDU-AR), (Figura 9A-C). SNP-A confirmou a monossomia do cromossomo 7 e deleção do cromossomo 20q previamente observados em um caso pela citogenética convencional e identificou uma nova lesão, UPD 16p (caso #20, CRDM) (Figura 9D). Em dois casos com LMA com alterações mielodisplásicas (casos #41 e #42) que apresentaram um cariótipo complexo pela citogenética convencional, o SNP-A permitiu a detecção de novas lesões e auxiliou na identificação de lesões não determinadas pela citogenética convencional.

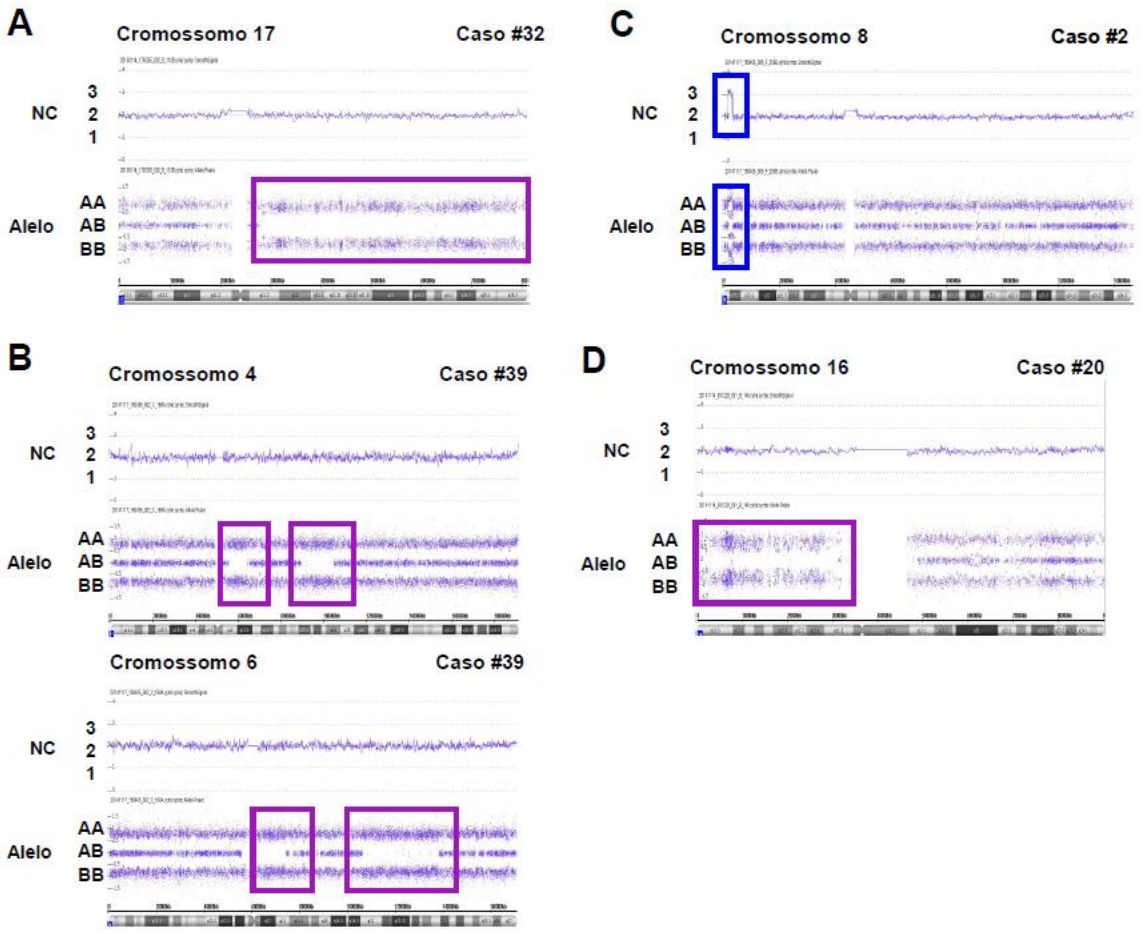


Figura 9. Novas lesões detectadas pelo SNP-A. SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. O sinal localizado na extremidade do painel representa o valor do número de cópias (NC), (NC=1, número de cópias 1; NC=2, número de cópias 2; NC=3, número de cópias 3). O sinal localizado abaixo de cada painel representa os dados do genótipo ou frequência de alelos A e B. SNP-A detectou trechos de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental, observados pelo número de cópias normal e uma frequência alterada de alelos A e B destacada pelas marcações em roxo do cromossomo 17 (A caso #32), 4 e 6 (B caso #39), e 16 (D caso #20). SNP-A detectou uma região de ganho, ilustrado pelo aumento no número de cópias e frequência de alelos destacado pela marcação em azul (C #caso 2).

4.2.5 SNP-A esclareceu anormalidades cromossômicas complexas identificadas pela citogenética convencional

A resolução do método de citogenética convencional é dependente da localização da lesão e padrão de bandas, lesões cromossômicas podem não ser identificadas, incluindo microdeleções e lesões intersticiais. Em nosso estudo, o caso #42, paciente com diagnóstico de LMA com alterações mielodisplásicas, apresentou um cariótipo complexo com 4

cromossomos marcadores não identificados através da citogenética convencional. O SNP-A confirmou a trissomia do cromossomo 8 e esclareceu as alterações cromossômicas não definidas pela citogenética convencional. A metodologia do SNP-A identificou 17 lesões intersticiais não detectadas pela citogenética convencional, envolvendo os cromossomos 2, 5, 9, 12, 13 e 17. SNP-A também identificou regiões de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental envolvendo os cromossomos 4, 6, 13 e 18 (Figura 10).

No caso #41, paciente com LMA com alterações mielodisplásicas, a citogenética convencional também identificou um cariótipo complexo: 46,XY,t(9;22)(q34;q11.2),del(20)(q11)[2]/46,idem,inv(7)(q22q36)[6]/47,idem,inv(7)(q22q36),+19[12]. A presença do BCR-ABL1 foi confirmada pelo método de PCR que revelou a isoforma p190 (e1a2 BCR-ABL1). SNP-A identificou uma perda no cromossomo 2q36 não identificada pela citogenética convencional, confirmou a deleção no cromossomo 20q e como esperado, não detectou a translocação balanceada t(9;22) e a inversão do cromossomo 7q. Interessantemente, SNP-A detectou uma microdeleção no cromossomo 7q36 não identificada pela citogenética convencional. No entanto, SNP-A não identificou a trissomia do cromossomo 19. A morfologia do aspirado de medula óssea, o resultado da citogenética convencional, o resultado da PCR e do SNP-A estão ilustrados na Figura 11.

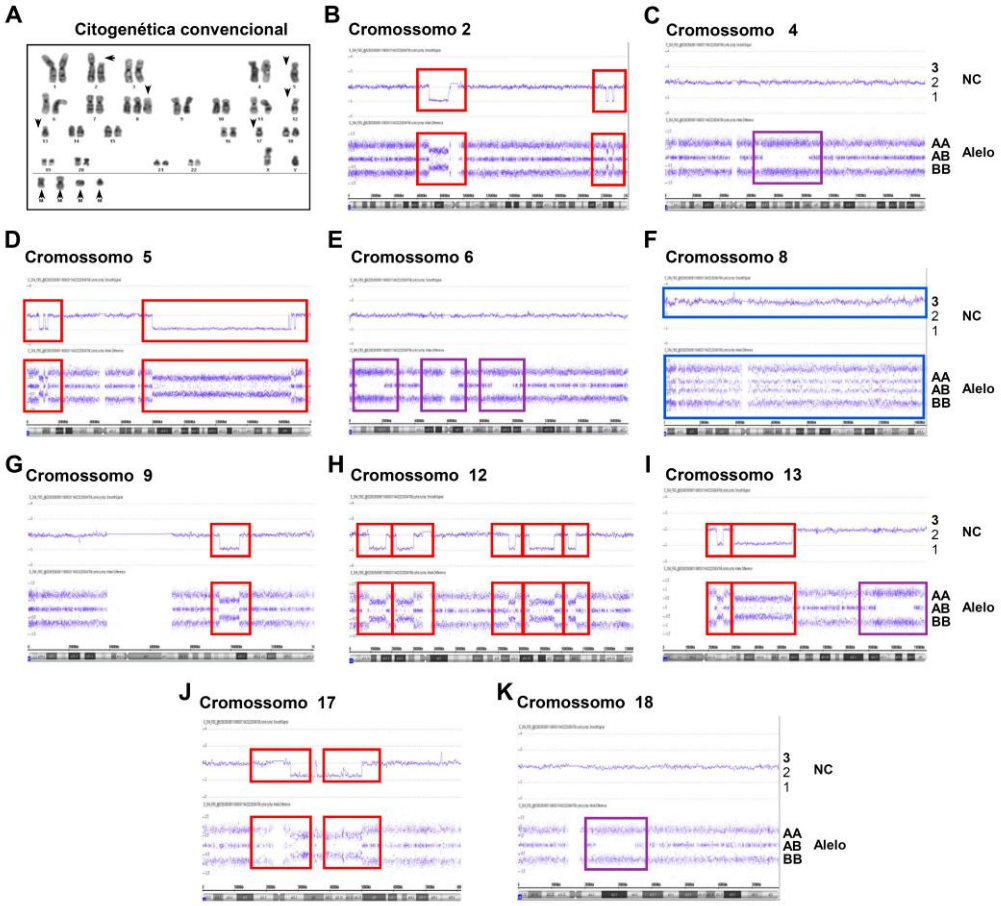


Figura 10. Cariótipo complexo definido pela citogenética convencional e SNP-A (caso #42). (A) A citogenética convencional apresentou 47,XY,del(2)(p13),-5,+8,add(9)(q34),-12,-13,-17,+4mar. As setas indicam as alterações. SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. O sinal localizado na extremidade do painel representa o valor do número de cópias (NC), (NC=1, número de cópias 1; NC=2, número de cópias 2; NC=3, número de cópias 3). O sinal localizado abaixo de cada painel representa os dados do genótipo ou frequência de alelos A e B. Deleções foram observadas nos cromossomos 2 (B), 5 (D), 9 (G), 12 (H), 13 (I), 17 (J) como ilustrado pela diminuição no número de cópias e frequência de alelos marcados em vermelho. Regiões de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental foram observadas nos cromossomos 4 (C), 6 (E), 13 (I) e 18 (K) ilustrado pela frequência de alelos A e B marcados em roxo. Um ganho foi observado no cromossomo 8 (F), como ilustrado pelo aumento no número de cópias (CN=3) e pela frequência de alelos marcados em azul.

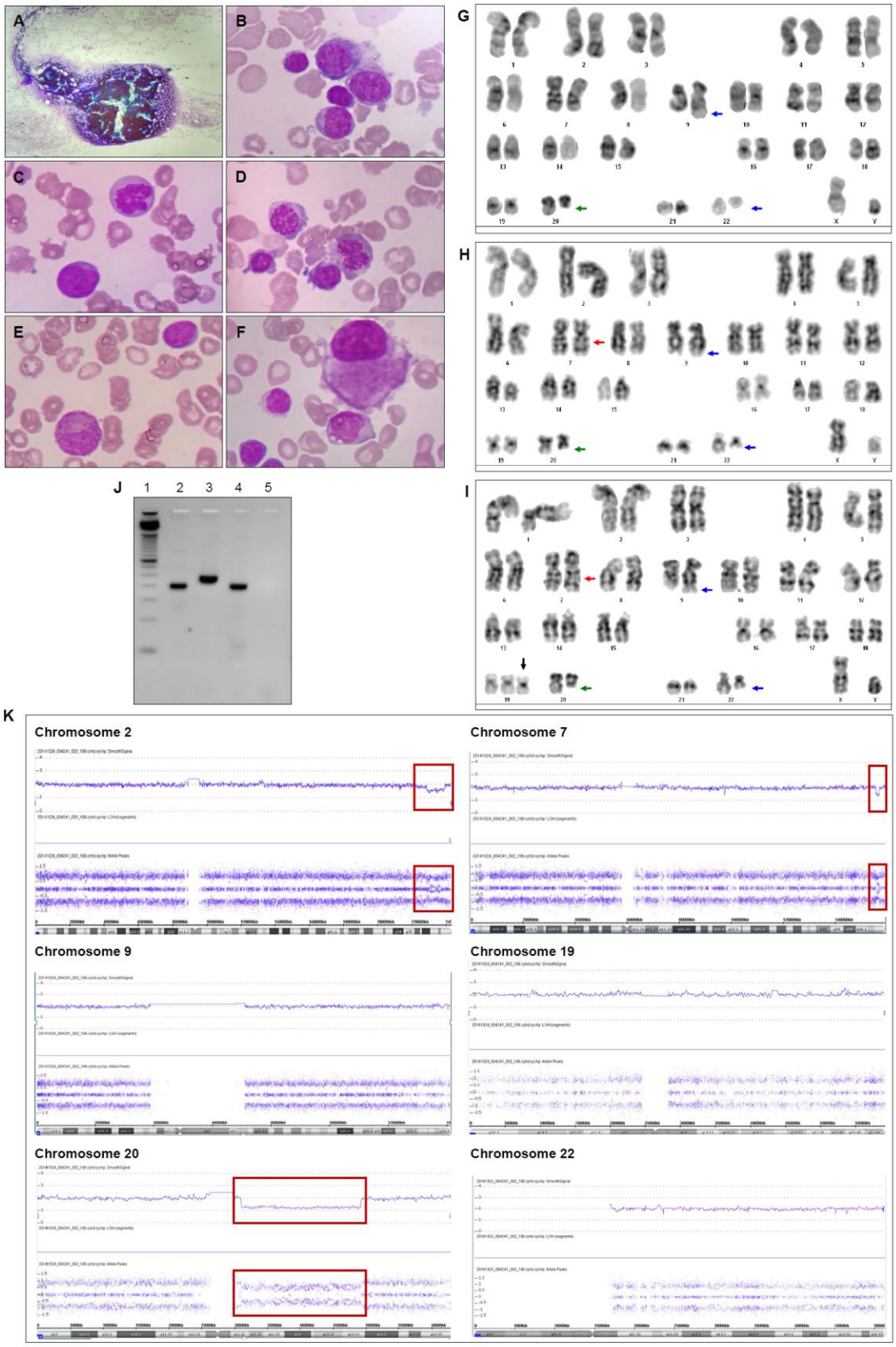


Figura 11. Morfologia, avaliação citgenética e molecular de um caso com LMA com alterações mielodisplásicas (caso #41). (A) Fragmento de medula óssea hipercelular; (B) mieloblastos; (C) diseritropoiese; (D) diseritropoese com precursor eritróide binucleado/maturação assincronica; (E) precursor mieloide com hipogranulação no citoplasma; (F) megacariócitos displásicos com núcleo monolobulado. A citogenética convencional apresentou (G) 46,XY,t(9;22)(q34;q11.2),del(20)(q11), (H)

46,XY,t(9;22)(q34;q11.2),del(20)(q11),inv(7)(q22q36), (I) 46,XY,t(9;22)(q34;q11.2),del(20)(q11),inv(7)(q22q36),+19. As setas indicam as alterações. (J) Reação da cadeia da polimerase para os transcritos b2a2/b3a2 e ela2 BCR-ABL-1. 1: *ladder* 50 pb; 2: Caso #16; 3: controle positivo para o transcrito b2a2/b3a2 *BCR-ABL1* (p210); 4: controle positivo para o transcrito e1a2 *BCR-ABL1* (p190); 5: controle negativo para os transcritos b2a2/ b3a2 e e1a2 *BCR-ABL1*. (K) SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. O sinal localizado na extremidade de cada painel representa o valor do número de cópias (NC), (NC=1, número de cópias 1; NC=2, número de cópias 2; NC=3, número de cópias 3). O sinal localizado abaixo de cada painel representa os dados do genótipo ou frequência de alelos A e B. Deleções foram observadas nos cromossomos 2, 7, 20, como ilustrado pela diminuição no número de cópias e frequência de alelos marcados em vermelho. Os cromossomos 9, 19 e 22 apresentaram com número de cópias e frequência de alelos normais.

4.2.6 SNP-A apresenta limitações metodológicas

É bem estabelecido que o método de SNP-A não detecta translocações balanceadas. Em nossa coorte, um paciente com SMD com t(3;11)(p25;q15) detectada pela citogenética convencional ilustrou essa limitação do SNP-A (caso #18; CRDM); Os resultados do SNP-A indicaram número de cópias e padrão de genotipagem normais para os cromossomos 3 e 11 e não foram identificadas novas lesões neste caso (Figura 12).

Foi observado um caso (caso #19; CRDM) em que a citogenética convencional identificou uma deleção no 20q em 16/20 metáfases e um cromossomo marcador em 2/20 (10%) metáfases analisadas. SNP-A confirmou a deleção no braço longo do cromossomo 20, no entanto, não detectou o cromossomo marcador (Figura 13).

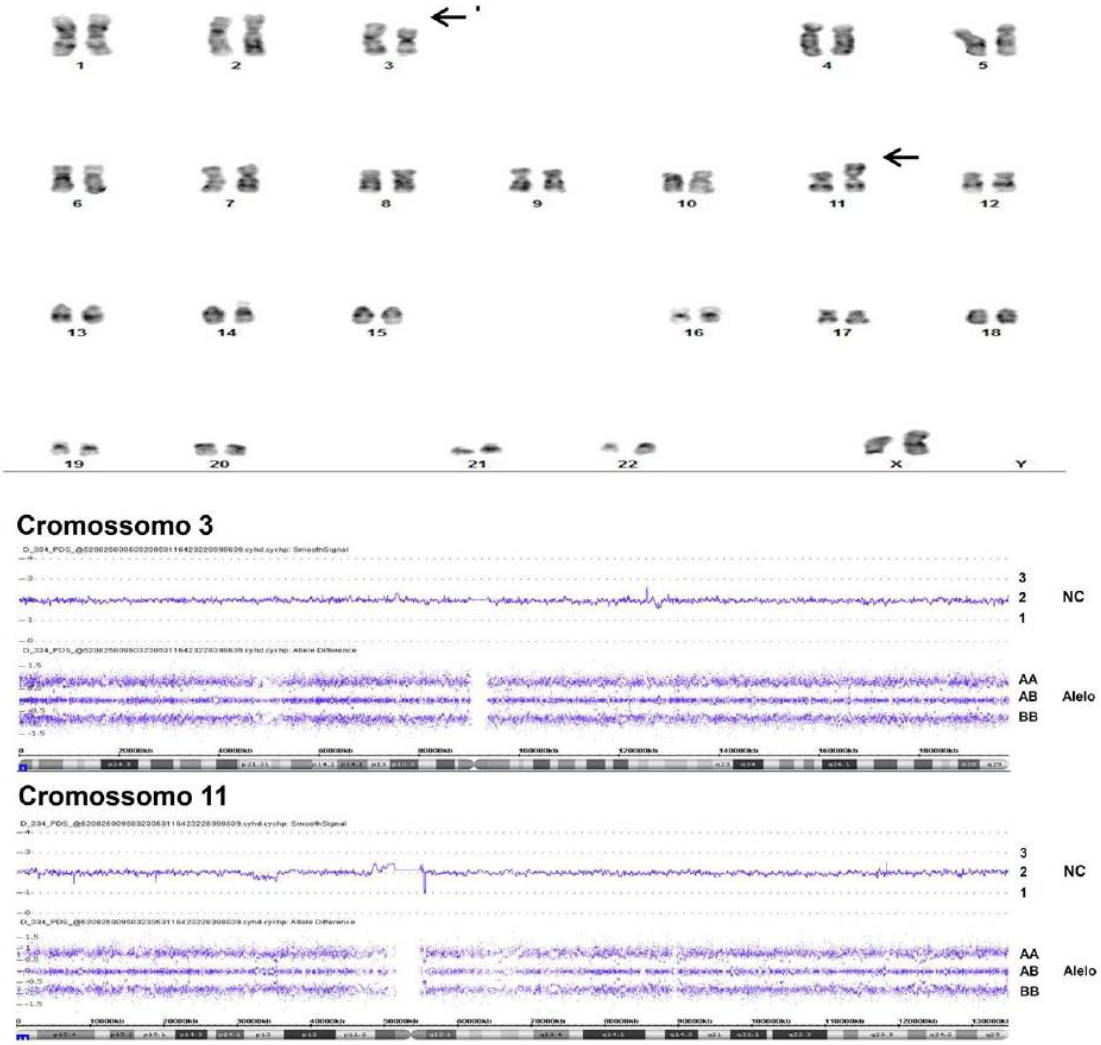


Figura 12. Translocação balanceada identificada pela citogenética convencional (caso #18). Citogenética convencional identificou 46,XX,t(3;11)(p25;q15). SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. O sinal localizado na parte superior da imagem do SNP-A representa o valor do número de cópias (NC), (NC=1, número de cópias 1; NC=2, número de cópias 2; NC=3, número de cópias 3). O sinal localizado na parte inferior da imagem do SNP-A representa os dados do genótipo ou frequência de alelos A e B. Número de cópias normal e três genótipos foram observados nos cromossomos 3 e 11 pelo SNP-A.

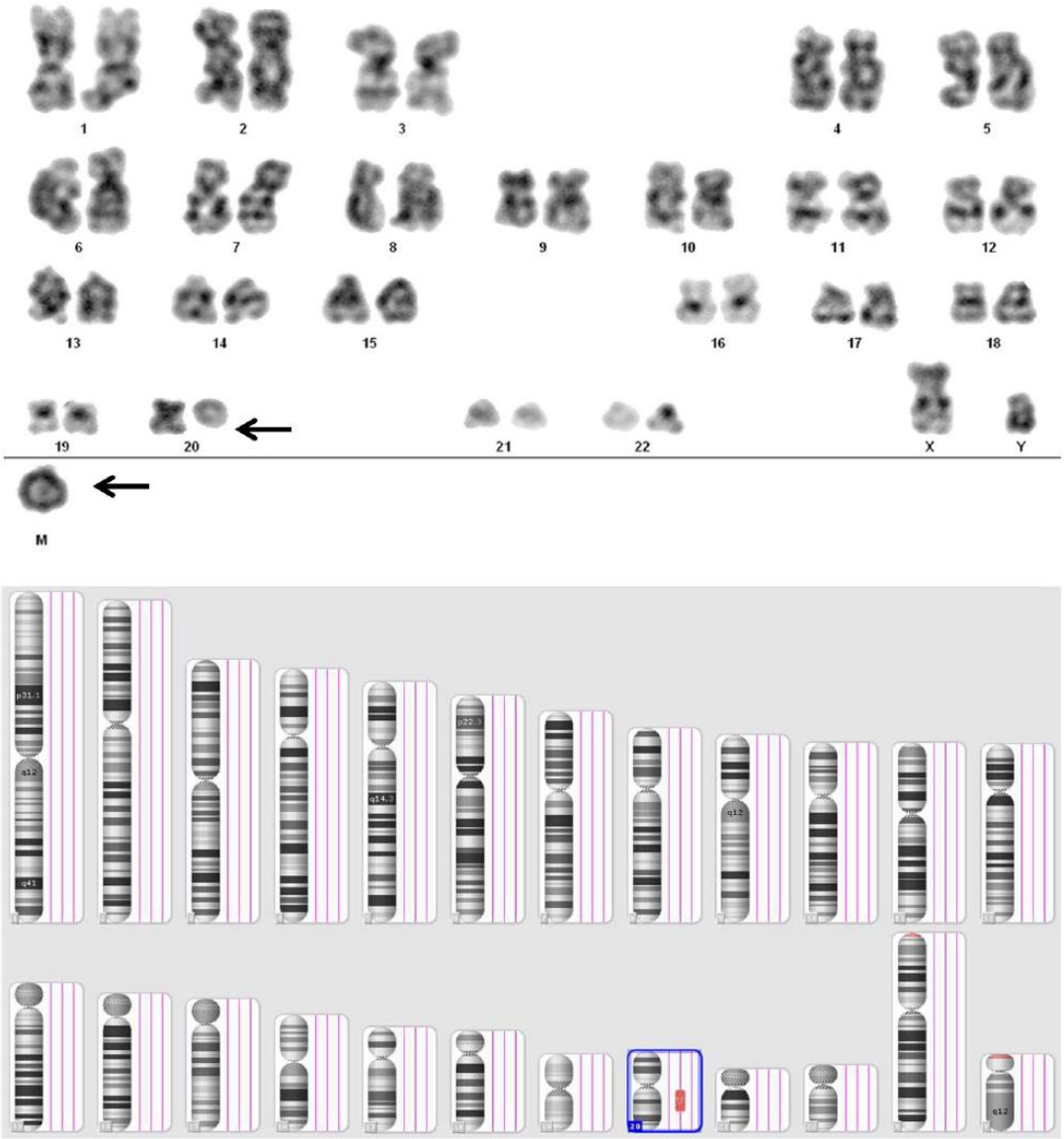


Figura 13. Imagem ilustrativa de limitações da metodologia de SNP-A (caso #19). A citogenética convencional indicou 46,XY, del20(q11),+mar. As alterações apresentam indicadas pelas setas. SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CYTOSCAN HD. A primeira linha do cariograma indica regiões de UPD, a segunda linha indica regiões de perda e a terceira regiões de ganho. O cariograma indicou uma perda no braço longo do cromossomo 20q destacado em vermelho na segunda linha. O cromossomo marcador não foi identificado pelo SNP-A (sensibilidade do teste).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A abordagem diagnóstica atual para SMD inclui citologia para a avaliação de anormalidades morfológicas de células hematopoéticas, biópsia de medula óssea para a avaliação de celularidade, fibrose e topografia e citogenética para a identificação de anormalidades cromossômicas. Na ausência de outras causas de citopenias, a combinação de displasia de medula óssea (presença de alterações displásicas em pelo menos 10% de células da linhagem) e anormalidade citogenética clonal permite um diagnóstico conclusivo de SMD, no entanto essas alterações são observadas em apenas uma parte dos pacientes. Em muitos casos, o resultado de citogenética não é informativo e o diagnóstico de SMD é baseado nos critérios morfológicos. Os critérios mínimos da OMS para definir displasia de medula óssea como anormalidade morfológica também estão presentes em citopenia não clonal e em indivíduos saudáveis. O diagnóstico de SMD pode ser particularmente difícil em pacientes em estágio inicial da doença, especialmente naqueles que não apresentam marcadores morfológicos consistentes, como sideroblastos em anel. Além disso, o diagnóstico pode ser questionado em um quinto dos pacientes com SMD com hipoplasia ou fibrose de medula óssea que também é observado em pacientes com anemia aplástica e mielofibrose primária, respectivamente [35]. Della Porta e colaboradores [35] realizaram uma revisão sistemática de dados citológicos e histológicos de pacientes com citopenia no sangue periférico que foram submetidos ao exame de medula óssea para suspeita clínica de SMD e observaram que de um total de 1076 pacientes, 576 (53%) apresentaram um diagnóstico conclusivo de SMD. Em nossa coorte, 114 pacientes apresentaram suspeita clínica de SMD e 43 (38%) apresentaram diagnóstico conclusivo de SMD e doenças relacionadas.

Belli e colaboradores [36] realizaram uma análise retrospectiva de 1080 pacientes com SMD *de novo* de países da América do Sul (Argentina [n=635], Brasil [n=345] e Chile [n=100]) para descrição das características demográficas, clínicas e evolução de pacientes com SMD. Os resultados de citogenética estavam disponíveis para 632 pacientes da Argentina, 309 pacientes do Brasil e em 99 pacientes do Chile. A frequência de anormalidades cromossômicas foi similar entre os 3 grupos. O cariótipo normal foi observado em 619 (59,5%) dos pacientes e anormalidades cromossômicas foram observadas em 421 (40,5%) desse grupo de pacientes. Anormalidades citogenéticas mais frequentes foram:

cariótipo complexo (≥ 3 anormalidades) em 82 (19,5%) pacientes; del(5q) em 60 (14,3%) pacientes; +8 em 48 (11,4%) pacientes; del(7q)/-7 em 28 (6,7%); del (20q) em 22 (5,2%); -Y em 21 (5%) pacientes. Em nossa coorte, de um total de 43 pacientes com diagnóstico de SMD e doenças relacionadas, 26 (60%) apresentaram um cariótipo normal, 11 (26%) apresentaram anormalidades cromossômicas e 6 (14%) não foram avaliados devido a ausência de metáfases. Dentre os 11 pacientes com alterações citogenéticas, 5 apresentaram uma alteração citogenética isolada e 6 pacientes apresentaram mais do que uma alteração cromossômica. Anormalidades cromossômicas mais frequentemente observadas foram del(5q) em 2 pacientes e del(20q) em 3 pacientes. Alterações no cromossomo 7, incluindo monossomia (n=2) e inversão (n=1) foram observadas em 3 pacientes. Translocações balanceadas foram observadas em 5 pacientes. O cariótipo complexo foi observado em 3 pacientes.

O termo CISI foi criado para descrever casos com citopenia persistente sem critérios mínimos de diagnóstico de SMD. O diagnóstico de CISI só pode ser estabelecido quando a investigação de medula óssea for realizada e outras causas de citopenias forem excluídas. Citopenia idiopática de significado indeterminado pode envolver 1, 2 ou 3 linhagens hematopoéticas, no entanto, a maioria dos pacientes apresenta citopenia de única linhagem e são definidos como (1) anemia idiopática de significado indeterminado, (2) neutropenia idiopática de significado indeterminado ou (3) trombocitopenia idiopática de significado indeterminado. Similarmente a SMD, a citopenia deve ser registrada por um período mínimo de 6 meses para ser considerado como CISI e outras investigações devem ser realizadas, incluindo avaliação citogenética, histológica e imuno-histoquímica [37]. Em nosso estudo, um total de 21 pacientes com citopenia (s) foram classificados como CISI por não apresentarem critério mínimo para o diagnóstico de SMD. De um total de 21 pacientes com CISI, 13 (62%) apresentaram citopenia de única linhagem, 4 (19%) pacientes apresentaram citopenias envolvendo 2 linhagens, 4 (19%) pacientes apresentaram citopenias envolvendo 3 linhagens.

O termo hematopoese clonal de potencial indeterminado (*clonal hematopoiesis of undetermined significance* [CHIP]) tem sido descrito para indivíduos que apresentam uma mutação somática associada à neoplasia hematológica, na ausência de citopenias e critérios diagnósticos para neoplasia hematológica [38]. Evidências do acúmulo de mutações em células hematopoéticas e o aumento do risco de neoplasias mieloides com a idade levaram a uma avaliação de indivíduos saudáveis para genes recorrentemente mutados em neoplasias mieloides usando metodologias de sequenciamento de segunda geração. Indivíduos com hematopoese clonal de potencial indeterminado têm um aumento no risco de progressão para

neoplasia hematológica comparado a indivíduos sem mutações, e o risco pode ser proporcional ao tamanho do clone. Avanços na identificação de biomarcadores associados a neoplasias mieloides procedentes da análise de expressão gênica e sequenciamento de segunda geração podem refinar os critérios diagnósticos, sugerirem novas entidades diagnósticas e definir prognóstico. Genes mais comumente mutados em neoplasias mieloides são *SF3B1, TET2, SRSF2, ASXL1, DNMT3A, RUNX1, U2AF1, TP53* e *EZH2* [39]. Embora alguns indivíduos com hematopoese clonal de potencial indeterminado possam desenvolver SMD, esta condição ainda não está totalmente esclarecida [40]. Citopenia clonal de significado indeterminado é uma entidade recentemente reconhecida para definir os indivíduos com CISI que apresentem uma mutação em genes frequentemente mutados em neoplasias mieloides. O termo CISI permanece para os indivíduos com citopenia idiopática sem critérios clínicos, morfológicos e citogenéticos de SMD para os quais a presença de mutação não foi investigada ou é ausente [9, 38, 40]. Destaca-se que os novos conceitos indicam que a identificação de uma mutação define clonalidade, mas não define diagnóstico de SMD [40]. A nova proposta de classificação de SMD da OMS revisada em 2016 estabelece que a presença de mutação SF3B1 em indivíduo com critérios clínicos e morfológicos de SMD e com ≥5% de sideroblastos em anel define o subgrupo de ARSA, e a presença de mutação TP53 define pior prognóstico em pacientes com del(5q), mas a presença isolada de mutações não é considerada como critério diagnóstico de SMD na ausência de critérios clínicos, morfológicos e citogenéticos [41].

Apesar das novas metodologias de sequenciamento de segunda geração ainda não serem obrigatórias e definidores de diagnóstico de SMD, a citogenética convencional continua sendo uma metodologia essencial para o diagnóstico de SMD, estratificação de risco, seleção do tratamento e monitoramento da resposta à terapia [11]. Na ausência de anormalidades citogenéticas clonais, o diagnóstico de SMD depende da presença de anormalidades morfológicas definido pela classificação da OMS [1].

SNP-A é uma metodologia que pode complementar a citogenética convencional na detecção de anormalidades cromossômicas [42]. SMD, SMD/NMP e LMA com alterações mielodisplásicas são as patologias mais indicadas para o uso do SNP-A, onde alterações não balanceadas são mais comuns e são incorporadas na estratificação de risco. Estudos demonstraram que o SNP-A apresentou um melhor resultado na detecção de alterações cromossômicas quando comparado com a citogenética convencional em neoplasias mieloides [31].

Papaemmanuil e colaboradores [39] realizaram o sequenciamento de 111 genes em 738 pacientes com SMD e neoplasias relacionadas. Mutações oncogênicas foram observadas em 43 genes. *SF3B1* foi o gene mais frequentemente mutado na coorte (24%), seguido por *TET2* (22%) e *SRSF2* (14%). Apenas 4 genes foram mutados em mais que 10% dos pacientes. No total, 549 de 738 (74%) pacientes apresentaram pelo menos 1 mutação de ponto ou mudança no número de cópia relacionada a SMD detectada pelo sequenciamento de segunda geração, enquanto que a citogenética convencional identificou anormalidades em 33% dos pacientes. Quando foi realizado o uso combinado de sequenciamento de segunda geração e citogenética, pacientes com lesões oncogênicas relacionadas a SMD aumentaram para 78%. Nazha e colaboradores [43] validaram um novo modelo para o IPSS-R que incorporou dados de mutações em 508 pacientes com SMD em tratamento e fatores prognósticos significantes para sobrevida incluíram a idade, IPSS-R, *EZH2*, *SF3B1* e *TP53*.

Em nosso estudo, SNP-A detectou todas as lesões identificadas pela citogenética convencional, com exceção de anormalidades balanceadas e alterações cromossômicas que provavelmente estavam presentes em menos que 30% das células não cultivadas. SNP-A é estritamente limitado a lesões genéticas que causam alterações no número de cópias, tais como anormalidades numéricas e perdas e ganhos de segmentos cromossômicos. Translocações balanceadas, que são comumente observadas em neoplasias hematológicas e que são identificadas pela citogenética convencional não são detectadas pelo SNP-A [22]. A sensibilidade do SNP-A depende da contribuição do clone neoplásico (mínimo de 30% de células neoplásicas) [18].

Nossos resultados ilustraram que o SNP-A permite o mapeamento preciso do ponto de quebra cromossômico, como foi ilustrado em um caso com SMD com del(5q). SNP-A detectou uma lesão com tamanho de 73.7 Mb, localizada entre as regiões 5q14.3 e 5q34 em 50% das células. A deleção do cromossomo 5q é uma deleção frequentemente reportada em SMD e é observada em 10 -15% desses pacientes. Jerez e colaboradores [44] realizaram um estudo com uso do SNP-A em uma coorte de 1155 pacientes com neoplasias mieloides para a definição precisa das características topográficas em pacientes com del(5q) e observaram que deleções envolvendo extremidades centroméricas e teloméricas estão relacionadas com um fenótipo mais agressivo da doença e lesões cromossômicas adicionais. Huh e colaboradores [45] utilizaram o SNP-A em uma coorte de 532 pacientes com SMD, SMD/NMP e LMA para o mapeamento do cromossomo 20q e definição precisa do ponto de quebra e tamanho da lesão

cromossômica e definiram 2 regiões comumente deletadas no cromossomo 20q. Em nosso estudo, foi observado a del(20q) no caso #19 e #20 localizada entre q11.21 e q13.q13.

O uso do SNP-A para o estudo de regiões comumente deletadas em pacientes com SMD permitiu a identificação de alterações em genes relacionados com a patogênese de SMD. Novas lesões cromossômicas detectadas pelo SNP-A, incluindo perda neutra de heterozigo ou dissomia uniparental e microdeleções tem sido fundamental na detecção de mutações em genes, incluindo o *TET2* em SMD/NMP [46], *MPL* em anemia refratária com sideroblastos em anel e trombocitose [47], e EZH2 em SMD, LMMC e LMA [48].

Oncogenes específicos têm sido implicados no mecanismo de instabilidade genômica e são considerados como potenciais candidatos envolvidos no mecanismo de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental. O *BRCA1/2* tem sido relacionado a perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental em neoplasia de ovário [49]; a ciclina D1 apresenta expressão elevada na maioria dos casos de linfoma de células do manto e está associada com frequentes regiões de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental [50]. A mutação JAK2V617F é frequentemente observada em NMP e a progressão da doença está associada com aquisição bialélica da mutação através do mecanismo de recombinação mitótica e perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental [51]. A associação entre perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental e mutações oncogênicas foi confirmada em uma variedade de neoplasias hematológicas, exemplos comuns incluem mutações no *c-MPL, NRAS, c-CBL,* e *FLT3* [18].

Tiu e colaboradores [32] reportaram que novas lesões detectadas pelo SNP-A contribuíram para um pior prognóstico em pacientes com SMD e neoplasias mieloides relacionadas estratificados pela OMS 2008 e IPSS, e que a presença e o número de novas lesões detectadas pelo SNP-A foram fatores preditivos independentes de sobrevida global e sobrevida livre de evento. Deleções e ganhos recorrentes detectados pela citogenética convencional apresentam um valor diagnóstico e prognóstico bem estabelecido e foram incorporados em esquemas de estratificação prognóstica, incluindo o IPSS em SMD, no entanto o impacto clínico de regiões recorrentes de perda neutra de heterozigoze ou dissomia uniparental ainda não é bem estabelecido [52]. Em um estudo com 174 pacientes com SMD, SMD/NMP e SMD com alterações mielodisplásicas, Gondek e colaboradores [31] demonstraram que anormalidades detectadas pelo SNP-A apresentaram impacto na sobrevida global dos pacientes e que regiões de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental envolvendo cromossomos frequentemente deletados podem apresentar implicações

prognósticas similares a deleções observadas pela citogenética convencional. Estudos prévios destacaram a presença de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental em até 20% dos casos com LMA com citogenética normal utilizando SNP-A [53]. Mori e colaboradores [54] investigaram a presença de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental na transformação de SMD para LMA, e observaram a presença desta lesão em mais que 20% dos casos envolvendo os cromossomos 6q, 7p, 10p, 11q, 14q e 20q . Em nosso estudo, foi observado 12 regiões de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental em 4/17 casos, sendo que 6 regiões de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental foram identificadas em um caso com LMA com alterações mielodisplásicas e envolveram os cromossomos 4q, 6p, 6q, 13q e 18q.

Em nosso estudo, SNP-A identificou 32 novas lesões, sendo 1 ganho, 19 perdas e 12 regiões de UPDs, e permitiu o esclarecimento de lesões cromossômicas não definidas pela citogenética convencional. Nosso trabalho não permite identificar genes causadores da SMD e não permite avaliar o impacto prognóstico das lesões detectadas pelo SNP-A, pois o número de casos incluídos é pequeno e o tempo de seguimento clínico é limitado.

O presente trabalho permitiu a padronização de técnicas de citogenética convencional e molecular importantes para a definição de alterações cromossômicas em pacientes com neoplasias hematológicas e a caracterização da coorte de pacientes com suspeita de SMD e doenças relacionadas em nossa instituição. Ilustramos que o SNP-A pode complementar a citogenética convencional na identificação de anormalidades citogenéticas e na detecção de regiões de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental em pacientes com SMD. No entanto, SNP-A não substitui a citogenética convencional, pois não detecta alterações balanceadas e não permite a distinção de diferentes clones.

A experiência adquirida na realização deste trabalho permitiu a autoria de um comentário científico publicado na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.01.007). Os resultados da análise comparativa da metodologia de citogenética convencional e SNP-A foram compilados na forma de um manuscrito original aceito para publicação na *Journal of Clinical Pathology* (doi:10.1136/jclinpath-2016-204023).

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados apresentados neste trabalho permite as seguintes conclusões:

1. A caracterização de pacientes com suspeita clínica de SMD em nossa instituição evidenciou:
   a. A definição de 3 grupos na população de estudo: SMD e doenças relacionadas (SMD, SMD/NMP e LMA/SMD), CISI e outras doenças.

2. A investigação de alterações citogenéticas através da citogenética convencional em pacientes com diagnóstico de SMD e doenças relacionadas evidenciou:
   a. Foram observados 11/43 (26%) pacientes com diagnóstico de SMD que apresentaram alteração citogenética. Anormalidades cromossômicas mais comumente observadas envolveram os cromossomos 5q, 7 e 20q.

   A Investigação da presença de perda de heterozigose (deleção e dissomia uniparental adquirida) e ganhos cromossômicos em pacientes com SMD e doenças relacionadas através da técnica de SNP-A evidenciou:
   a. SNP-A detectou um total de 40 lesões, sendo 25 perdas, 12 regiões de UPD e 3 ganhos.

3. O estudo comparativo entre os métodos de citogenética convencional e SNP-A evidenciou:
   a. SNP-A detectou um total de 32 novas lesões (1 ganho, 19 perdas e 12 regiões de UPDs) quando comparado à citogenética convencional.
   b. SNP-A permitiu a detecção de novas lesões e o esclarecimento de lesões intersticiais não definidas pela citogenética convencional.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Swerdlow SH, C.E., Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* Fourth ed, ed. L. IARC. 2008.
2. Rollison, D.E., et al., *Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs.* Blood, 2008. **112**(1): p. 45-52.
3. Bejar, R., R. Levine, and B.L. Ebert, *Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes.* J Clin Oncol, 2011. **29**(5): p. 504-15.
4. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes.* Br J Haematol, 1982. **51**(2): p. 189-99.
5. Nolte, F. and W.K. Hofmann, *Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes.* Ann Hematol, 2008. **87**(10): p. 777-95.
6. Cazzola, M., *Risk assessment in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms.* Haematologica, 2011. **96**(3): p. 349-52.
7. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.* Blood, 2009. **114**(5): p. 937-51.
8. Vardiman, J.W., N.L. Harris, and R.D. Brunning, *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms.* Blood, 2002. **100**(7): p. 2292-302.
9. Valent, P., et al., *Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS.* Leuk Res, 2012. **36**(1): p. 1-5.
10. Greenberg, P., et al., *International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes.* Blood, 1997. **89**(6): p. 2079-88.
11. Schanz, J., et al., *New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge.* J Clin Oncol, 2012. **30**(8): p. 820-9.
12. Greenberg, P.L., et al., *Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes.* Blood, 2012. **120**(12): p. 2454-65.
13. Parker, J.E., et al., *The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS.* Blood, 2000. **96**(12): p. 3932-8.
14. Jiang, Y., et al., *Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML.* Blood, 2009. **113**(6): p. 1315-25.
15. Haase, D., et al., *Cytogenetic findings in 179 patients with myelodysplastic syndromes.* Ann Hematol, 1995. **70**(4): p. 171-87.
16. Haase, D., et al., *New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients.* Blood, 2007. **110**(13): p. 4385-95.
17. Shaffer LG, M.-J.J.a.S.M., *ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, ed. B.S. Karger. 2013.
18. Maciejewski, J.P., R.V. Tiu, and C. O'Keefe, *Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies.* Br J Haematol, 2009. **146**(5): p. 479-88.
19. Peterson, J.F., et al., *Integration of microarray analysis into the clinical diagnosis of hematological malignancies: How much can we improve cytogenetic testing?* Oncotarget, 2015. **6**(22): p. 18845-62.

20. Makishima, H., et al., *FISH and SNP-A karyotyping in myelodysplastic syndromes: improving cytogenetic detection of del(5q), monosomy 7, del(7q), trisomy 8 and del(20q).* Leuk Res, 2010. **34**(4): p. 447-53.
21. Morrissette, J.J. and A. Bagg, *Acute myeloid leukemia: conventional cytogenetics, FISH, and moleculocentric methodologies.* Clin Lab Med, 2011. **31**(4): p. 659-86, x.
22. Maciejewski, J.P. and G.J. Mufti, *Whole genome scanning as a cytogenetic tool in hematologic malignancies.* Blood, 2008. **112**(4): p. 965-74.
23. Svobodova, K., et al., *Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of TP53 are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes.* Leuk Res, 2016. **42**: p. 7-12.
24. Kato, M., et al., *Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas.* Nature, 2009. **459**(7247): p. 712-6.
25. Kralovics, R., et al., *A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders.* N Engl J Med, 2005. **352**(17): p. 1779-90.
26. Gutierrez, N.C., et al., *Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma.* Blood, 2004. **104**(9): p. 2661-6.
27. Tyybakinoja, A., J. Vilpo, and S. Knuutila, *High-resolution oligonucleotide array-CGH pinpoints genes involved in cryptic losses in chronic lymphocytic leukemia.* Cytogenet Genome Res, 2007. **118**(1): p. 8-12.
28. Mullighan, C.G., et al., *Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia.* Nature, 2007. **446**(7137): p. 758-64.
29. Fitzgibbon, J., et al., *Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias.* Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9152-4.
30. Gondek, L.P., et al., *SNP array karyotyping allows for the detection of uniparental disomy and cryptic chromosomal abnormalities in MDS/MPD-U and MPD.* PLoS One, 2007. **2**(11): p. e1225.
31. Gondek, L.P., et al., *Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML.* Blood, 2008. **111**(3): p. 1534-42.
32. Tiu, R.V., et al., *Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies.* Blood, 2011. **117**(17): p. 4552-60.
33. Noronha, T.R., S.S. Rohr, and L. Chauffaille Mde, *Identifying the similarities and differences between single nucleotide polymorphism array (SNPa) analysis and karyotyping in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes.* Rev Bras Hematol Hemoter, 2015. **37**(1): p. 48-54.
34. Carter, N.P., *Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays.* Nat Genet, 2007. **39**(7 Suppl): p. S16-21.
35. Della Porta, M.G., et al., *Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes.* Leukemia, 2015. **29**(1): p. 66-75.
36. Belli, C.B., et al., *Myelodysplastic syndromes in South America: a multinational study of 1080 patients.* Am J Hematol, 2015. **90**(10): p. 851-8.
37. Valent, P., *Low blood counts: immune mediated, idiopathic, or myelodysplasia.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2012. **2012**: p. 485-91.
38. Malcovati, L. and M. Cazzola, *The shadowlands of MDS: idiopathic cytopenias of undetermined significance (ICUS) and clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP).* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2015. **2015**: p. 299-307.
39. Papaemmanuil, E., et al., *Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes.* Blood, 2013. **122**(22): p. 3616-27; quiz 3699.
40. Steensma, D.P., et al., *Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes.* Blood, 2015. **126**(1): p. 9-16.

41. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.* Blood, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
42. Mohamedali, A., et al., *Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes.* Blood, 2007. **110**(9): p. 3365-73.
43. Nazha, A., et al., *Incorporation of molecular data into the Revised International Prognostic Scoring System in treated patients with myelodysplastic syndromes.* Leukemia, 2016.
44. Jerez, A., et al., *Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited.* J Clin Oncol, 2012. **30**(12): p. 1343-9.
45. Huh, J., et al., *Characterization of chromosome arm 20q abnormalities in myeloid malignancies using genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis.* Genes Chromosomes Cancer, 2010. **49**(4): p. 390-9.
46. Jankowska, A.M., et al., *Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms.* Blood, 2009. **113**(25): p. 6403-10.
47. Szpurka, H., et al., *UPD1p indicates the presence of MPL W515L mutation in RARS-T, a mechanism analogous to UPD9p and JAK2 V617F mutation.* Leukemia, 2009. **23**(3): p. 610-4.
48. Makishima, H., et al., *Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies.* Leukemia, 2010. **24**(10): p. 1799-804.
49. Walsh, C.S., et al., *Genome-wide loss of heterozygosity and uniparental disomy in BRCA1/2-associated ovarian carcinomas.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(23): p. 7645-51.
50. Bea, S., et al., *Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling.* Blood, 2009. **113**(13): p. 3059-69.
51. Plo, I., et al., *JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders.* Blood, 2008. **112**(4): p. 1402-12.
52. O'Keefe, C., M.A. McDevitt, and J.P. Maciejewski, *Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies.* Blood, 2010. **115**(14): p. 2731-9.
53. Gorletta, T.A., et al., *Frequent loss of heterozygosity without loss of genetic material in acute myeloid leukemia with a normal karyotype.* Genes Chromosomes Cancer, 2005. **44**(3): p. 334-7.
54. Mori, N., et al., *Allelic loss in the progression of myelodysplastic syndrome.* Cancer Res, 2000. **60**(11): p. 3039-42.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo I. Comprovação do Comitê de Ética do HC FMRP USP.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Uso do Single Nucleotide Polymorphism Array (SNP-A) na investigação de alterações citogenéticas em pacientes com síndromes mielodisplásicas.

Pesquisador: Fernanda Borges da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 26885314.0.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 866.044

Data da Relatoria: 28/10/2014

Apresentação do Projeto:

As síndromes mielodisplásicas (SMD) constituem um grupo heterogêneo de doenças hematológicas de origem clonal, caracterizado por hematopoese ineficaz, citopenia e
risco de evolução para leucemia mieloide aguda (LMA). As anormalidades citogenéticas adquiridas são marcadores prognósticos bem estabelecidos em SMD. As alterações cromossômicas não balanceadas observadas pelo cariótipo metafásico estão presentes em aproximadamente metade dos pacientes com esta doença. No entanto, a técnica de citogenética metafásica apresenta limitações, incluindo baixa resolução e necessidade de divisão celular, sendo que defeitos cromossômicos podem não ser
detectados. Tecnologias baseadas em array de DNA, como o Single Nucleotide Polymorphism Array (SNP-A), são importantes para avaliação do genoma normal e neoplásico. O SNP-A foi desenvolvido para o estudo de todo o genoma, apresenta uma resolução superior a citogenética metafásica convencional, pode ser realizado em células na interfase, e detecta alterações cromossômicas não visualizadas pela
citogenética metafásica. Além disso, o SNP-A fornece dados de genotipagem para detecção de perda neutra de heterozigose (copy neutral loss of heterozigosity [CNLOH]), também denominada de dissomia uniparental somática (uniparental dissomy [UPD]). Regiões cromossômicas com

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

deleção, UPD ou ganho são comuns em pacientes com neoplasias hematológicas e sugeriu genes candidatos a supressores de tumor e oncogenes. O objetivo do presente estudo é a implantação e o uso da tecnologia de SNP-A no serviço de hematologia do HCFMRP-USP na investigação de alterações citogenéticas em pacientes com SMD. Pacientes com diagnóstico de SMD atendidos no HCFMRP-USP serão incluídos no estudo, e resultados da citogenética metafásica convencional e do SNP-A serão comparados. Espera-se que o SNP-A auxilie na confirmação diagnóstica e estratificação de risco dos pacientes com SMD.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo é investigar as alterações citogenéticas através do uso da tecnologia de Single Nucleotide Polymorphism Array (SNP-A) em pacientes com hipótese diagnóstica de síndrome mielodisplásica. As síndromes mielodisplásicas são doenças clonais hematopoéticas caracterizadas por hematopoese ineficaz e anemia, neutropenia ou plaquetopenia no sangue periférico. Nas síndromes mielodisplásicas, podem ocorrer alterações cromossômicas que são normalmente detectadas através do exame de citogenética ou cariótipo convencional. A realização do exame de cariótipo está prevista como procedimento de rotina para pacientes com hipótese diagnóstica de síndrome mielodisplásica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco é mínimo e está relacionado à coleta do sangue de medula óssea. Todas as informações obtidas serão mantidas em sigilo e apenas os pesquisadores responsáveis terão acesso à sua amostra guardada no freezer, às informações obtidas e à identificação da sua amostra de sangue. As amostras guardadas no freezer serão numeradas e não conterão nenhuma informação que possa identificar o doador.

O desconforto que você pode sentir é apenas da picada da agulha durante a coleta e um potencial hematoma que possa se formar no local da picada da agulha. Infecção no local da coleta de medula óssea pode acontecer muito raramente.

Não, não há nenhum benefício imediato para o paciente. Entretanto os dados obtidos podem ser úteis para o tratamento dos paciente futuramente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Um total de 40 pacientes com diagnóstico de SMD deve ser incluído no estudo. As características clínicas serão avaliadas pela equipe de médicos hematologistas do HC FMRP USP, incluindo a

orientadora do projeto. Citogenética Convencional. As amostras serão obtidas através da coleta de sangue de medula óssea em tubo contendo anticoagulante heparina. Serão realizadas duas culturas, sendo uma de 24 horas e outra de 48 horas em 10 mL de meio RPMI, com 20% de soro bovino fetal e 1% Streptomicina/Penicilina e mantidas em estufa de CO2 a 37ºC. Completado o tempo estipulado de cultura serão acrescentados 100 L de bloqueador de fuso mitótico, Colcemid®, e as amostras serão incubadas em estufa de CO2 a 37ºC por 30 minutos adicionais. Posteriormente, o material será centrifugado, desprezando -se o sobrenadante e exposto a solução hipotônica (KCL 0,075 mol/L) por 20 minutos a 37º C. Por fim, o material será fixado em solução de Carnoy (metanol e ácido acético 3:1) e gotejado em lâminas de vidro. As bandas serão feitas pela técnica de bandeamento G com tripsina e corante Wright's eosine methylene blue. As metáfases serão analisadas ao microscópio óptico Zeiss AXIO Imager 2 acoplado ao sistema de captura de imagem Applied Spectral Imaging para cariotipagem, e sempre que possível, pelo menos 20 metáfases serão analisadas. As anormalidades cromossômicas serão descritas de acordo com o ISCN 2013. Extração de DNA genômico: O DNA será obtido de sangue de medula óssea total coletada em EDTA.SNP array (SNP -A): Para investigação de novas alterações cromossômicas não balanceadas utilizaremos a técnica de SNP-A.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos de apresentação obrigatória estão de acordo com as recomendações.

Recomendações:

Nenhuma recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão 2 (22/10/2014), assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 (22/10/2014) e o TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios

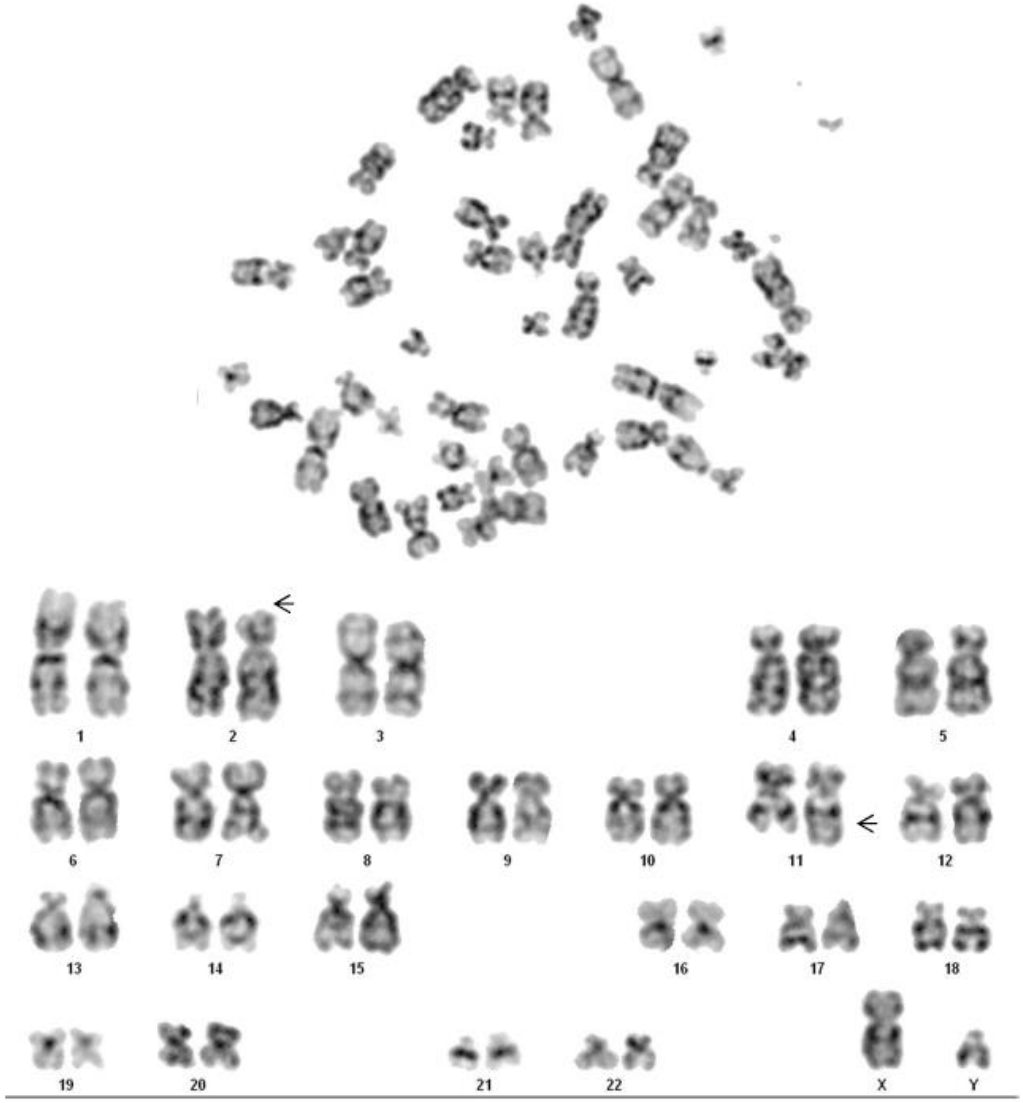
parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRAO PRETO, 11 de Novembro de 2014

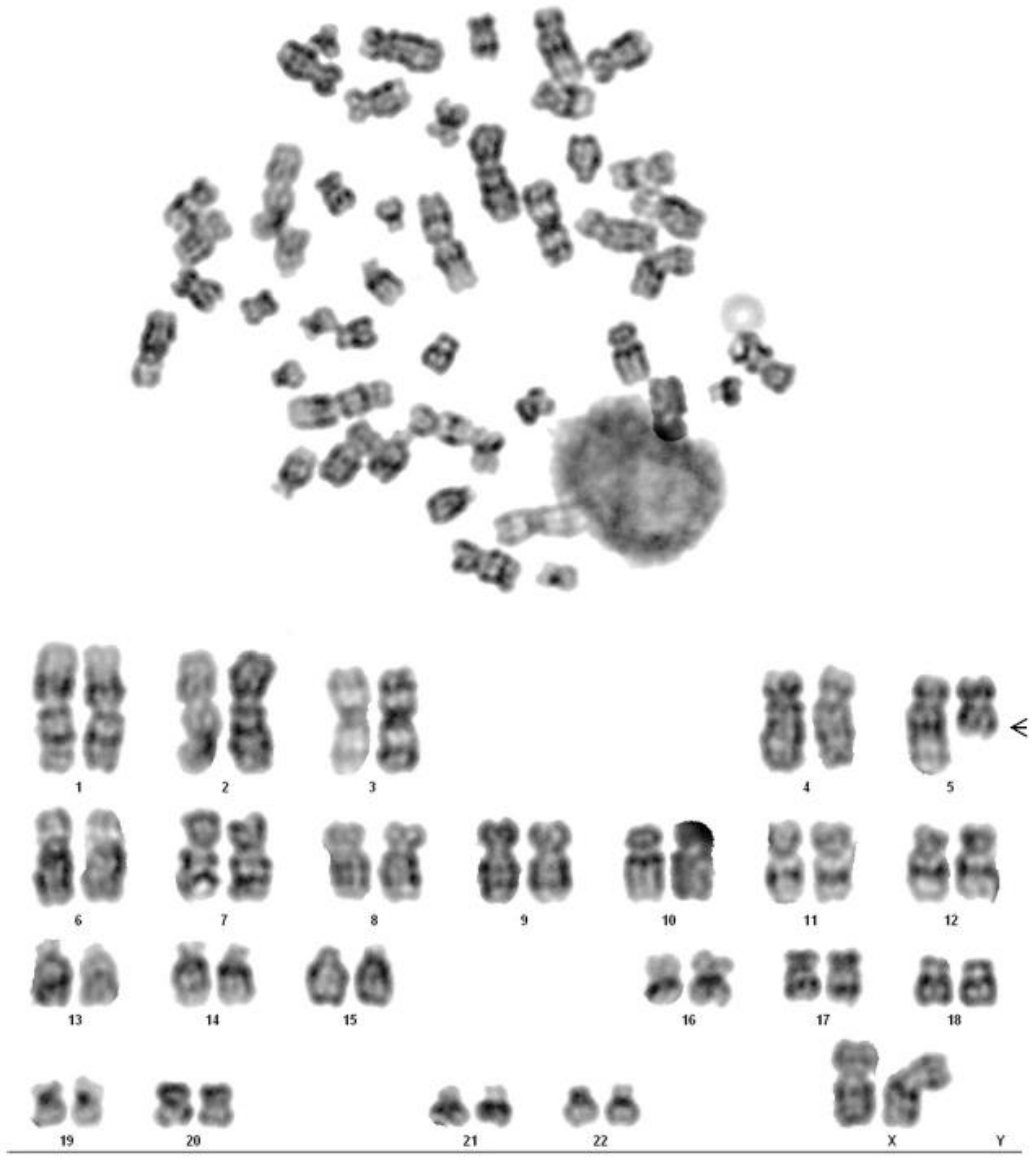
Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

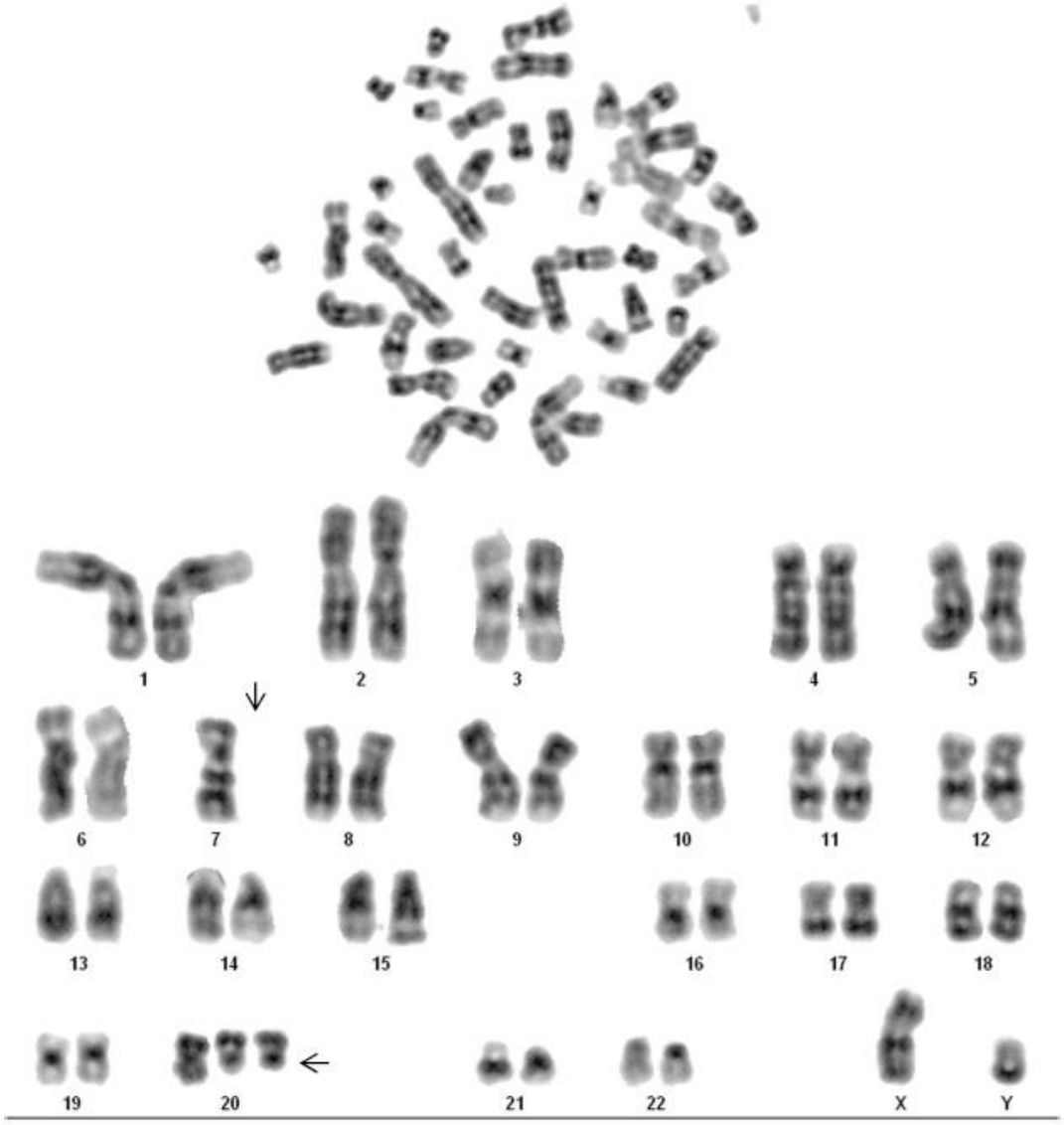
Anexo II. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #29: 46,XY,t(2;11)(p21;q23).



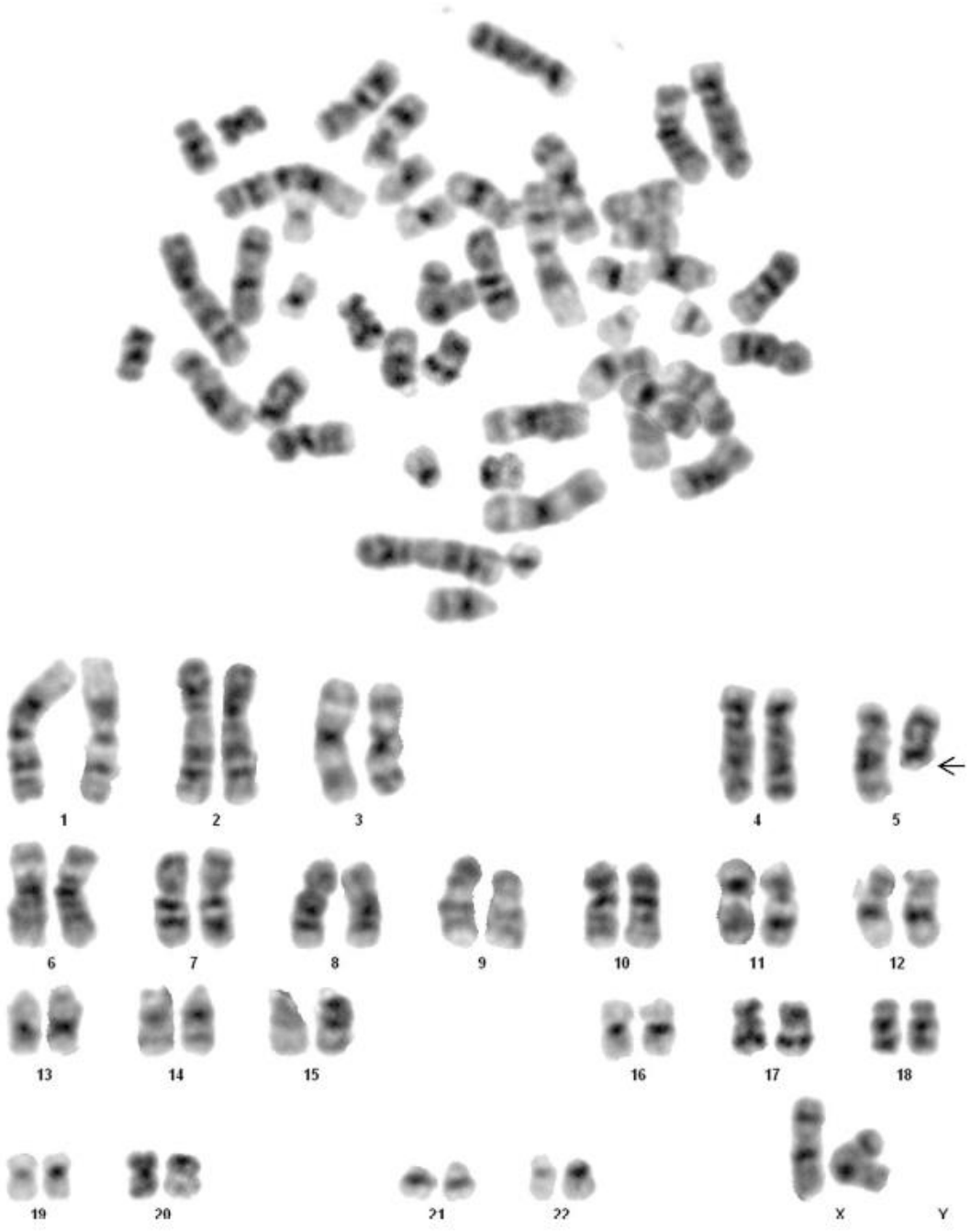
Anexo III. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #16: 46XX,del(5)(q13q33).



Anexo IV. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #20: 46,XY-7,del(20)(q11)x2.



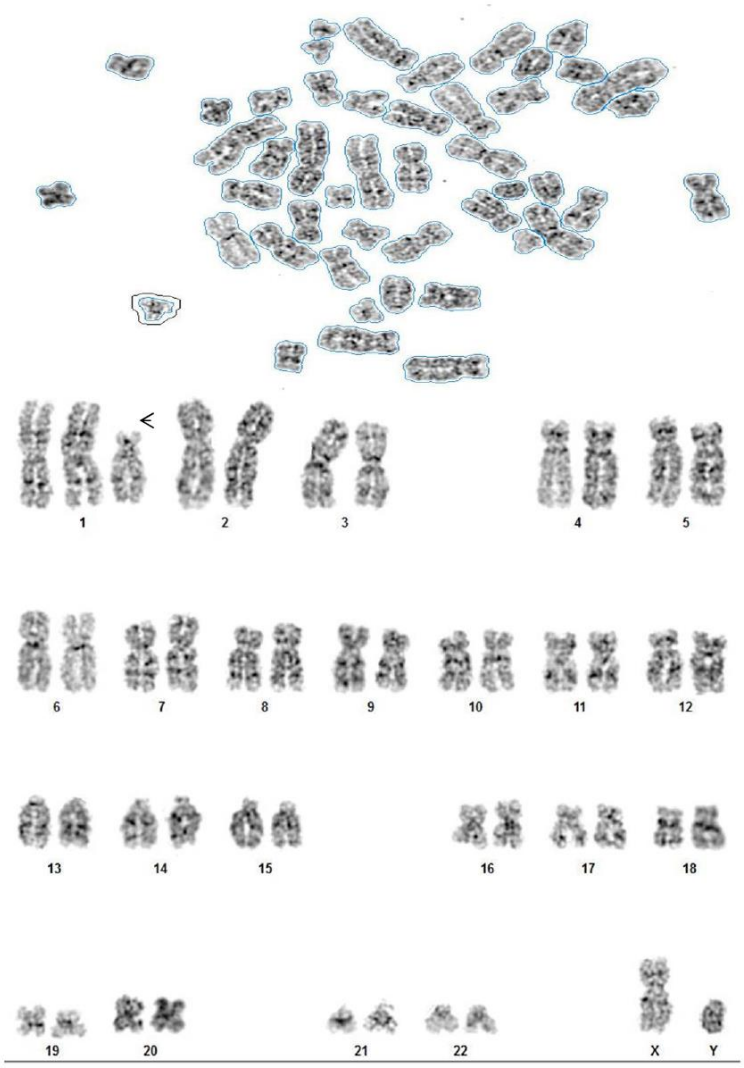
Anexo V. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #17: 46,XX,del(5)(q21q34).



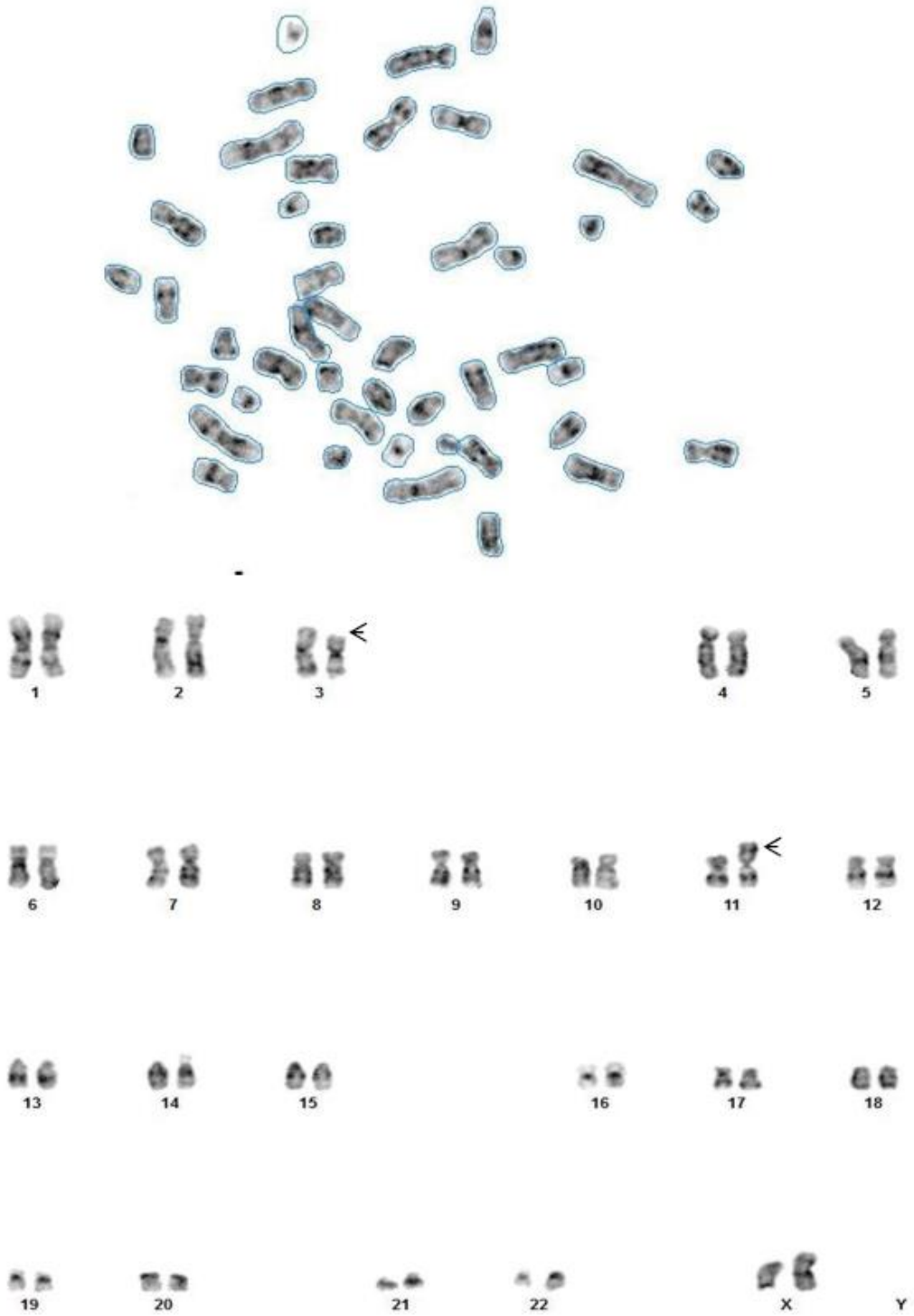
Anexo VI. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #15: 45,X,-Y

Anexo VII. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #19: 47,XY,del(20)(q11),+mar.

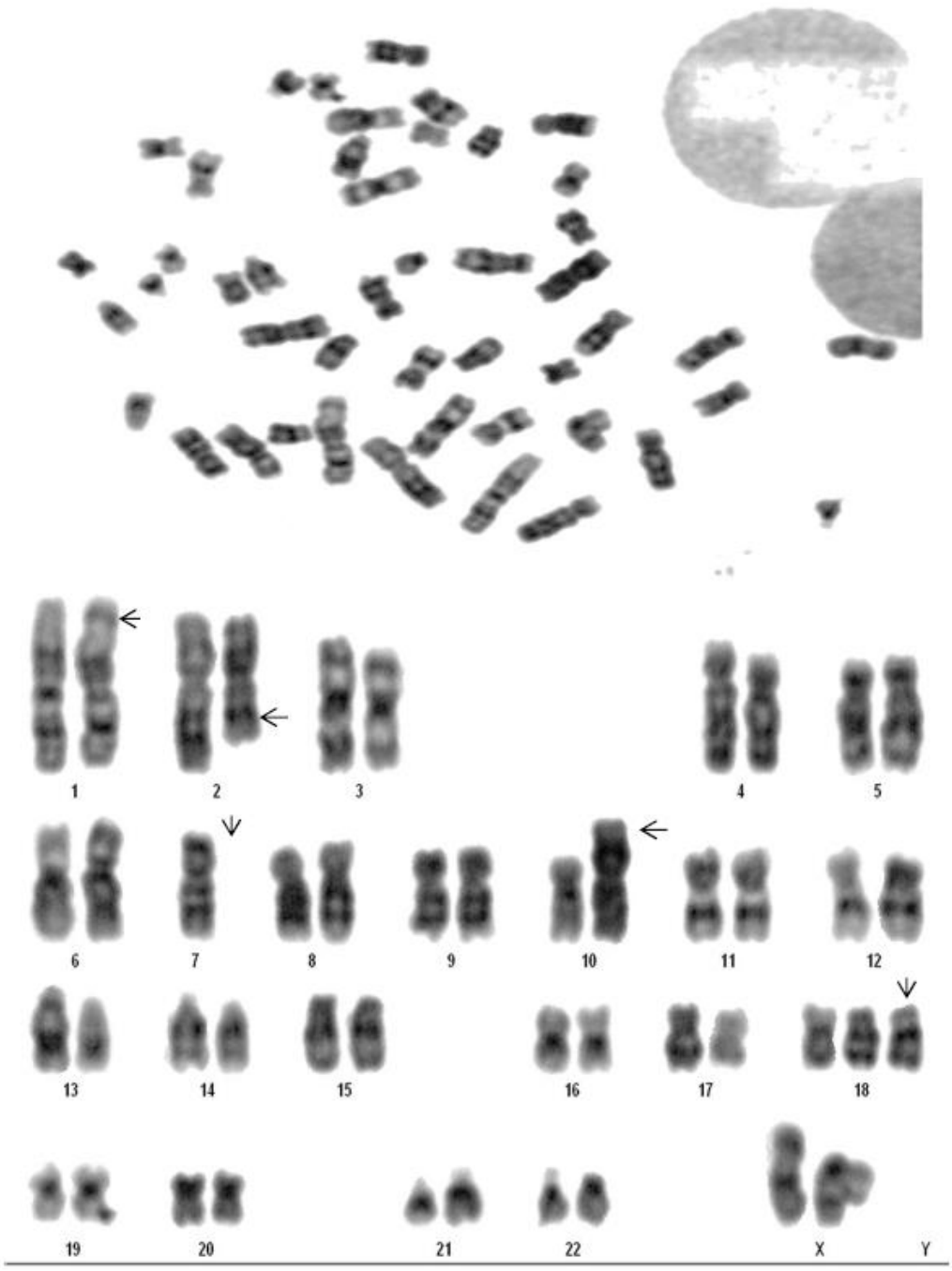
Anexo VIII. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #38: 47,XY,+der(1)t(1;19)(p13;p13.1).



Anexo IV. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso 18 #: 46,XX,t(3;11)(p25;q15).

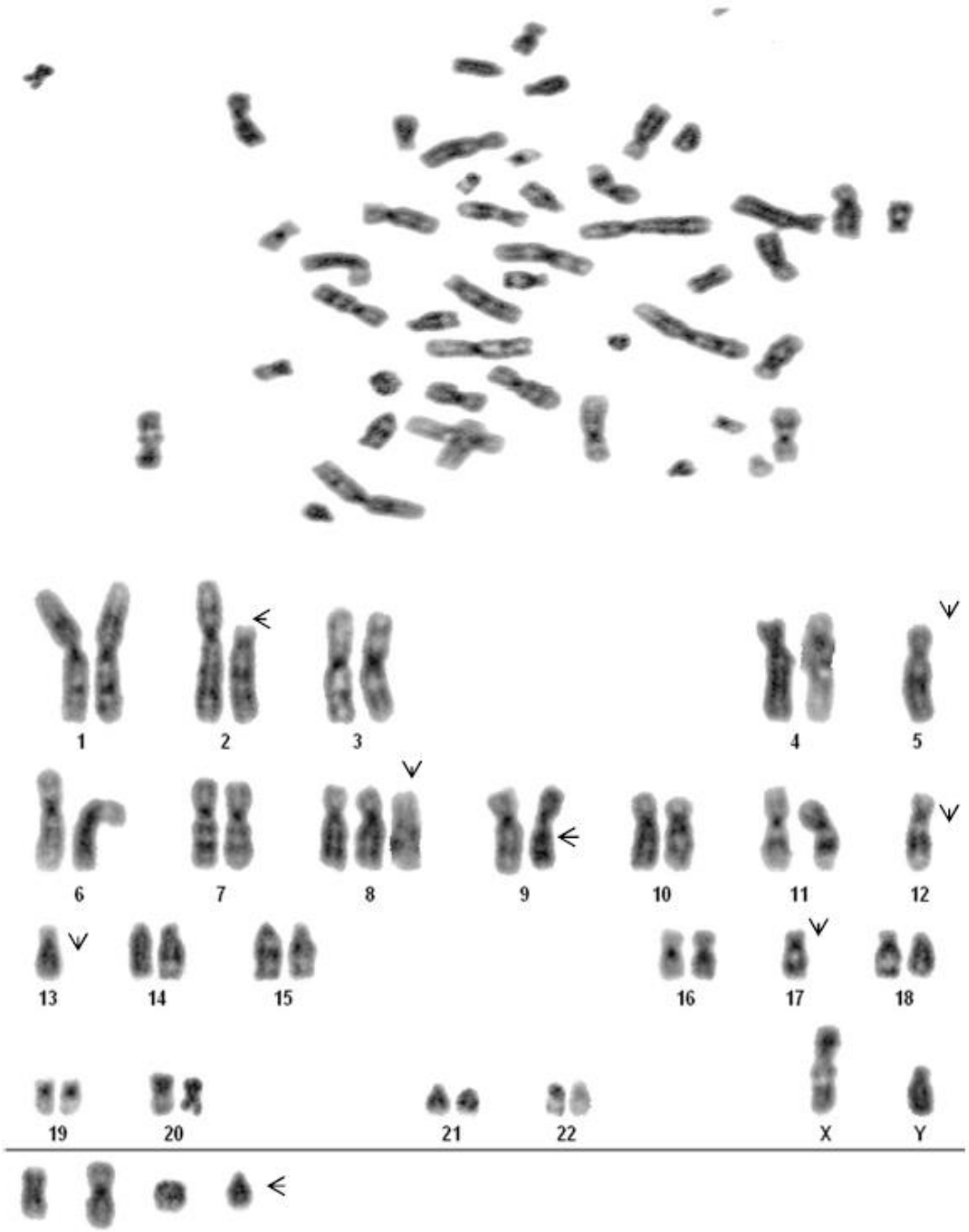


Anexo X. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #43: 46,XX,add(1)(p36),t(2;10)(q?;q?),-7,+18.



Anexo XI. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #41: 46,XY,inv(7)(q22q36),t(9;22)(q34;q11.2),+19, del(20)(q11).

Anexo XII. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #42: 47,XY,del(2)(p13),-5,+8,add(9)(q34),-12,-13,-17,+4mar.



Anexo XIII. Metáfase e cariograma ilustrativo. Caso #30: 46,XX,1qh+**.**

Anexo XIV- Casuística de pacientes com diagnóstico de SMD e doenças relacionadas.

#	Sexo	Data Coleta	Idade	Grupo Diagnóstico WHO 2008	Classificação OMS 2008	Hb (g/dL)	VCM (fL)	Leuc ($x10^9$/L)	Seg ($x10^9$/L)	Mono ($x10^9$/L)	Plt ($x10^9$/L)	% Blastos MO	Cariótipo	Risco Citogenético
1	M	17/12/14	58	SMD	CRDU-TR	13,2	88	5,6	3	0,4	32	2%	normal	bom
2	M	29/08/14	64	SMD	CRDU-AR	8,4	85	9,3	5,9	0,8	327	3%	normal	bom
3	F	04/02/15	76	SMD	CRDM	6,9	114	1,1	0,3	0	42	3%	normal	bom
4	F	27/08/14	73	SMD	CRDM	11,3	89	4,6	1,7	0,2	74	1%	normal	bom
5	F	13/08/14	64	SMD	CRDM	10,2	81	3	1,8	0,2	52	3%	normal	bom
6	F	26/11/14	37	SMD	CRDM	10,8	84	2,1	0,5	0,1	169	2%	normal	bom
7	F	16/09/15	65	SMD	CRDM	10,8	79	3,4	2,3	0,2	78	2%	normal	bom
8	F	22/10/14	57	SMD	CRDM	9,8	96	2,9	1,4	0,2	85	1%	normal	bom
9	F	10/06/15	46	SMD	CRDM	12,3	111	3,3	1,6	0,2	11	3%	normal	bom
10	M	16/07/14	58	SMD	CRDM	3,7	92	1,7	0,6	0,2	161	1	normal	bom
11	M	09/05/14	72	SMD	CRDM	9,6	79	2,7	0,2	0,3	363	1%	normal	bom
12	M	22/10/14	33	SMD	CRDM	7,2	98	2,1	0,5	0,1	254	2%	normal	bom
13	M	17/06/15	29	SMD	CRDM	7,5	99	2,7	1	0,2	205	1%	normal	bom
14	M	25/06/14	71	SMD	CRDM	14,8	96	3,3	1	0,8	43	4%	normal	bom
15	M	04/06/14	70	SMD	CRDM	8,9	110	4,8	2,3	0,5	333	1%	alterado	muito bom
16	F	14/05/14	75	SMD	CRDM	7,5	103	3,7	1,8	0,1	411	2	alterado	bom
17	F	25/02/15	81	SMD	CRDM	9,2	92	3,1	1	0,4	245	1%	alterado	bom
18	F	24/02/15	58	SMD	CRDM	10,3	91	2,7	1	0,4	29	1%	alterado	intermediário
19	M	06/08/14	64	SMD	CRDM	10,1	106	2,3	1,1	0,1	47	1	alterado	intermediário
20	M	20/05/14	67	SMD	CRDM	11,8	108	1,4	0,2	0,1	12	3%	alterado	ruim
21	M	29/01/14	76	SMD	CRDM	8,2	98	1,8	0,5	0,1	44	4	inconclusivo	NA
22	F	23/07/14	62	SMD	CRDM	12,6	92	2,6	1,2	0,1	78	1	inconclusivo	NA
23	F	03/12/14	77	SMD	CRDM	10	105	4,6	2,8	0,2	10	2%	inconclusivo	NA
24	F	27/08/14	56	SMD	CRDM-SA	9,8	9,1	6,6	0,4	0,4	415	2%	normal	bom
25	M	02/07/14	84	SMD	SMD-NC	6,9	84	2	0,8	0	82	2%	inconclusivo	NA
26	F	12/03/14	69	SMD	ARSA	8,8	95	7,2	4,2	0,5	152	2%	normal	bom
27	F	01/04/14	80	SMD	ARSA	8,8	94	5,5	2,9	0,6	349	2	normal	bom
28	F	19/02/14	81	SMD	ARSA	9,6	92	4,2	2,5	0,3	170	1%	normal	bom
29	M	14/07/14	59	SMD	ARSA	8,2	103	7	4,8	0,4	138	3	alterado	intermediário
30	F	20/10/14	83	SMD	ARSA	7,7	114	6	3,7	0,5	247	4%	normal	bom
31	F	17/06/15	69	SMD	AREB1	10,5	99	1,3	0,6	0,1	63	5%	normal	bom
32	M	02/04/14	60	SMD	AREB1	8,7	92	2,1	1,2	9,5	16	7%	normal	bom
33	M	15/10/14	81	SMD	AREB1	11,6	85	5	1,7	1,3	85	6%	inconclusivo	NA
34	F	16/09/15	75	SMD	AREB2	8,1	86	13,8	7,6	2,1	29	10%	inconclusivo	NA
35	F	23/07/14	67	SMD/NMP	ARSA-T	4,5	110	2,5	0,9	0,2	534	1	normal	bom
36	F	23/09/15	73	SMD/NMP	ARSA-T	7,5	96	8,8	5,9	0,4	510	1%	normal	bom
37	M	13/08/14	85	SMD/NMP	LMMC1	7,6	104	4	1,1	1,1	185	4	normal	bom
38	M	15/04/15	73	SMD/NMP	LMMC2	8,3	86	15,6	6,2	3,4	138	13%	alterado	bom
39	F	11/06/14	50	SMD/NMP	SMD/NMP-NC	10,3	104	6,7	3,8	0,4	626	3%	normal	bom
40	M	29/10/14	72	LMA/SMD	LMA/SMD	8,1	101	0,7	0,4	0,1	185	36%	normal	NA
41	M	08/07/14	82	LMA/SMD	LMA/SMD	7,2	102	2,5	0,3	0	8	20%	alterado	muito ruim
42	M	09/02/15	79	LMA/SMD	LMA/SMD	8,5	94	6	0,7	0,2	15	27%	alterado	muito ruim
43	F	12/03/15	17	LMA/SMD	LMA/SMD	7,4	88	1,2	0,2	0,2	24	66%	alterado	NA

Abreviações: F, feminino; M, masculino; SMD, síndrome mielodisplásica; SMD/NMP, síndrome mielodisplásica/neoplasia mieloproliferativa; LMA/SMD Leucemia mieloide aguda com alterações mielodisplásicas; subtipos ARSA, anemia refratária com sideroblastos em anel; CRDM, citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens; CRDM-AS citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens com sideroblastos em anel; CRDU-AR, citopenia refratária com displasia de única linhagem-anemia refratária; CRDU-TR , citopenia refratária com displasia de única linhagem –trombocitopenia refratária;AREB-1, anemia refratária com excesso de blastos-1; AREB-2, anemia refratária com excesso de blastos-2; LMMC, leucemia mielomonocítica crônica, IPSS-R, Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado; Hb, hemoglobina; VCM, volume corpuscular médio; Leuco, leucócitos; Mono, monócitos; Plt, plaquetas; MO, medula óssea; NA, não avaliado.