UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Alterações cariotípicas dos cromossomos 7 e 8 em Síndromes
Mielodisplásicas *de novo* (SMD-p) e sua correlação com variáveis
biológicas de significado prognóstico

Cláudia Irene Emílio de Castro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Bernardo Garicochea

São Paulo
2002

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

C355a Castro, Cláudia Irene Emílio de
Alterações cariotípicas dos cromossomos 7 e 8 em Síndromes
Mielodisplásicas *de novo* (SMD-p) e sua correlação com
variáveis biológicas de significado prognóstico / Cláudia
Irene Emílio de Castro. -- São Paulo, 2002.
94p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Garicochea, Bernardo

I. Hematologia 2. Citogenética 3. Câncer : Medicina
I. T. II. Garicochea, Bernardo, orientador.

616.15 CDD

Cláudia Irene Emílio de Castro

Alterações cariotípicas dos cromossomos 7 e 8 em Síndromes
Mielodisplásicas *de novo* (SMD-p) e sua correlação com variáveis
biológicas de significado prognóstico

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Bernardo Garicochea
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, Junho de 2002.

Dedicatória

Dedico este trabalho a quatro grandes mulheres: Maria Helena Pereira de Andrade, minha amiga de sempre, à Neide Emílio de Castro Araújo, à Cleusa Emílio de Castro Campos, minhas irmãs, e à Ignez Munari de Castro, minha mãe, que sempre me causaram surpresa e admiração nas situações mais difíceis e tristes da vida, agindo com perseverança, serenidade e bondade inabaláveis.

“Existem pessoas que lutam um dia e são boas;

Existem pessoas que lutam um ano e são melhores;

Existem pessoas que lutam muitos anos e são muito boas;

Porém existem pessoas que lutam a vida toda, estas são imprescindíveis”.

Agradecimentos

- Ao Prof. Dr. Bernardo Garicochea, pela oportunidade de realizar este trabalho, mesmo sabendo da minha pouca disponibilidade de tempo;
- À Dra. Elvira D. R. P. Velloso, pela grande contribuição a este trabalho, orientando-me nos momentos de desespero, com toda a paciência e dedicação do mundo;
- À Profa. Dra Célia P. Koiffmann, que sempre soube entender minhas ausências no trabalho para dedicar-me à realização deste sonho;
- À Profa. Dra. Cristina Y. Miyaki, minha grande amiga, por toda a ajuda pessoal e profissional, desde a minha chegada à USP, a longos e bons anos atrás;
- À Dra. Mônica Conchon, por ter permitido que eu usasse o laboratório de Citogenética da Fundação Pró-sangue para terminar meu projeto, após a mudança do meu orientador para Porto Alegre;
- À Cristina Aiko Kumeda, por ter coloraborado com este trabalho, realizando a segunda leitura dos testes de “FISH” e também por todo apoio que me deu quando fui para a Fundação Pró-Sangue para realizar esta técnica;
- À Vivian Alves, secretária do depto de Biologia Tumoral, por todo apoio com relação ao preparo daquela quantidade absurda de papéis que temos que entregar durante ingresso e permanência na Pós-Graduação;

- As amigas de Laboratório, Tânia Aparecida S. Vieira e Luciana Zambeli Caputto, por todo o apoio técnico e pela amizade;
- À Dulci, Paty, Cláudia Muraro, Cora, Renata Pontes, Cristiani, Ilana, Carla, Érica Tavares, Andréa Ramirez e Lucilene, que colaboraram para o término deste trabalho, de forma direta ou indireta, ajudando com sugestões para elaboração de figuras, bibliografia ou mesmo uma palavra de conforto num momento de indecisão e descrença;
- Ao meu noivo, Cláudio Eduardo Fabris, que sempre compreendeu meus momentos de ausência e de estresse, sem deixar de amar-me;
- À querida D. Maria do Carmo, minha professora de colégio, que primeiro despertou em mim a paixão pela biologia e pela genética;
- E por último, porém não menos importante, a Deus, que colocou no meu caminho todas essas pessoas.

OBRIGADA A TODOS!!!

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO

1.	Síndromes Mielodisplásicas (SMD)	pg: 01
2.	Citogenética em SMD	pg: 03
2.1.	Histórico	pg: 03
2.2.	Importância	pg: 04
2.3.	A monossomia do cromossomo 7 e a trissomia do cromossomo 8 em SMD-p	pg: 06
3.	Fatores de prognóstico em SMD	pg: 10
3.1	Fatores de prognóstico em SMD-p	pg: 10
3.2.	Papel das alterações citogenéticas no prognóstico de SMD-p	pg: 11
3.3.	Papel da classificação FAB no prognóstico	pg: 11
3.3.1.	Classificação WHO	pg: 13
3.4.	Sistemas de escore com significado prognóstico em SMD	pg: 14

3.4.1. Sistemas de escores que utilizam parâmetros de sangue periférico e porcentagem de blastos na medula óssea, sem a variável citogenética	pg: 14
3.4.2. Escores utilizando Parâmetros citogenéticos (associados a outras variáveis)	pg: 15
4. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (“FISH”) em SMD	pg: 16
II. OBJETIVOS	pg: 20
III. CASUÍSTICA E MÉTODOS	pg: 21
1. Casuística	pg: 21
2. Métodos	pg: 22
2.1. Citogenética	pg: 22
2.2. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente	pg: 24
2.3. Análise estatística	pg: 33

IV. RESULTADOS	pg: 34
1. Características da amostra	pg: 34
2. Características da amostra quanto à análise citogenética	pg: 34
3. “FISH” nos controles	pg: 37
3.1. “FISH” no controle interno das hibridações	pg: 37
4. Características da amostra quanto à técnica de “FISH”	pg: 45
5. Comparação entre a classificação FAB, o sexo e os achados citogenéticos (banda G e “FISH”)	pg: 53
6. Análise estatística	pg: 53
6.1. Comparação entre os resultados obtidos com a técnica de “FISH” pelos dois observadores	pg: 53
6.2. Comparação entre as técnicas de Citogenética Convencional (banda G) e “FISH”	pg: 54
6.3. Comparação entre a técnica de “FISH” e o resultado do prognóstico	pg: 55
6.4. Análise de sobrevida	pg: 57
6.4.1. Tempo de diagnóstico e do exame citogenético até a evolução para LMA	pg: 57

6.4.2. Tempo de diagnóstico e do exame citogenético até o óbito	pg: 64
--	--------

V. Discussão	pg: 70
---------------------	--------

VI. Considerações finais	pg: 78
---------------------------------	--------

VI. Bibliografia	pg: 79
-------------------------	--------

Lista de Abreviaturas

AAS: Anemia Aplásica Severa

AR: Anemia Refratária

AREB: Anemia Refratária com excesso de blastos

AREBT: Anemia Refratária com excesso de blastos em transformação

ARSA: Anemia Refratária com Sideroblastos em anel

ATM: Ausência total de metáfases

CR: Citopenia Refratária

DAPI: 4,6 diamidina-2-phenylindole

DHL: Desidrogenase Láctica

FAB: Grupo Cooperativo de Leucemia Franco-Américo-Britânico

FISH: Hibridação *in situ* Fluorescente

FITC: Fluorescein-Labeled Anti-Digoxigenin

Hb: hemoglobina

HC-FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

IPSS: International Prognostic Scoring System

ISCN: Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana

LA: Leucemia Aguda

LMA: Leucemia Mielóide Aguda

LMA-M2: Leucemia Mielomonocítica Tipo-2

LMCJ: Leucemia Mielóide Crônica Juvenil

LMMC: Leucemia Mielomonocítica Crônica

MO: Medula óssea

NF-1: Neurofibromatose tipo 1

Ph: Cromossomo Philadelphia

PI: Iodeto de propídio

REAL: Revised European-American Lymphoma

RPM: Rotações por minuto

SMD-p: Síndrome mielodisplásica primária

SMD-t: Síndrome mielodisplásica relacionada à terapêutica

SMP: Síndrome Mieloproliferativa

SP: Sangue periférico

SSC: Solução saturada concentrada

RESUMO

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são doenças clonais, que se originam em células hemopoéticas totipotentes, com distúrbio na proliferação e perda da maturação celular gerando hiperplasia na medula óssea (MO) e citopenias no sangue periférico (SP). As SMD ocorrem predominantemente em pacientes mais velhos e estão associadas com um alto risco de progressão para leucemia mieloide aguda (LMA).

A etiologia das SMD é desconhecida na maioria dos casos (*de novo*), porém 10% das SMD estão associadas ao uso de agentes xenobióticos, como os agentes antineoplásicos e solventes orgânicos (SMD secundária). Os pacientes com SMD apresentam diferente evolução clínica, embora todos sejam incuráveis. Alguns pacientes podem viver por uma década com apenas uma anemia enquanto outros apresentam uma sobrevida curta devido à uma rápida evolução para LMA.

Diferentes aspectos biológicos da doença têm sido usados para dividir os pacientes em grupos e auxiliado nas decisões clínicas a serem tomadas em cada caso.

A maioria dessas classificações levam em conta os subtipos morfológicos (classificação FAB) e os dados citogenéticos do clone mielodisplásico. Anormalidades cromossômicas são importantes marcadores das SMD. A maioria dos pacientes com esta síndrome apresenta alterações citogenéticas que podem auxiliar no diagnóstico das SMD. Entretanto, algumas dessas alterações podem ser correlacionadas com um mau prognóstico, como a monossomia do 7 e a trissomia do 8. Essas aneuploidias têm sido investigadas por estudos citogenéticos convencionais (bandamento G) e moleculares ("FISH" – Hybridization *in situ* Fluorescente).

No intuito de se comparar a eficiência de ambas as técnicas e de se definir a frequência e o significado prognóstico da monossomia do 7 (-7) e trissomia do 8 (+8) em SMD, foram estudados 28 pacientes com SMD-p (17

homens e 11 mulheres) por citogenética convencional (banda G) e molecular ("FISH" em intérfase), previamente a tratamento quimioterápico.

Para compararmos o estudo cariotípico por bandamento G com o de "FISH", 19 pacientes foram estudados e a -7 foi detectada por "FISH" em seis pacientes e somente um deles o foi pela citogenética convencional. Os pacientes com -7 apresentaram uma menor sobrevida e um maior risco de transformação leucêmica. Cinco dos seis pacientes com -7 foram previamente classificados (FAB) como subtipos de mau prognóstico. Dois pacientes apresentaram +8, detectada por ambas as técnicas. Não houve diferença na sobrevida destes pacientes.

Nossos resultados demonstraram que o "FISH" é uma técnica mais eficiente para detectar anomalias cromossômicas numéricas (-7) com importância prognóstica, especialmente em amostras pobres em metáfases, uma vez que "FISH" pode ser realizado em núcleos interfásicos.

ABSTRACT

Myelodysplastic Syndromes (MDS) are clonal disorders of hematopoietic stem cells characterized by ineffective hematopoiesis leading to blood cytopenias. They predominate in elderly patients and are associated with a high risk of progression to acute myelogenous leukemia (AML).

The etiology of MDS is unknown in most cases (*de novo*) but about 10% of MDS are secondary to the use of xenobiotics, such as antineoplastic agents and organic solvents (secondary MDS). Though incurable, MDS patients have different clinical courses. Some patients can live for a decade with anemia being the only complaint whilst others present a very short term survival due to a rapid development of a treatment-refractory AML. Scales taking in account different biological aspects of the disease have been used in order to allocate patients in discrete risk levels. This risk stratification might help clinical decisions in a patient-by-patient basis. Most of these scales take in account the morphological subtype (FAB classification) and the cytogenetic status of the myelodysplastic clone.

Chromosome abnormalities are very important markers of MDS. Most patients with this syndrome present cytogenetic aberrations which can be helpful in the diagnosis of SMD. Moreover, some of these aberrations have been correlated to a poorer prognosis, such as monosomy 7 and trissomy 8. These aneuploidies have been investigated by conventional (G-Banding) and molecular cytogenetic studies (*In Situ* Hybridization - FISH).

In order to compare the efficiency of both techniques and to define the frequency and significance of monosomy 7 and trisomy 8 in MDS in a single institution population, chromosome studies of 28 patients were performed in metaphases by G-banding and in interphases by FISH (α satellite probes), before chemotherapy treatment.

Chromosome studies by both techniques were obtained for 19 patients; monosomy 7 was detected by FISH in 6 patients; only one of these has been detected by conventional cytogenetics. Clinical follow-up of this monosomy 7 group patients disclosed short survival and increased risk for developing AML. Five out of the six patients with monosomy 7 were previously classified as the FAB subtypes of poor prognostic. 2 patients presented trisomy 8 in this series and were detected by both techniques. No difference in survival could be seen in these patients.

Our results demonstrate that FISH is much more efficient to investigate chromosome numerical anomaly (at least monosomy 7) with prognostic relevance. This is specially true mainly when bone marrow samples lack metaphases since the studies can be performed in interphases cells.

INTRODUÇÃO

I- INTRODUÇÃO

1. SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS (SMD)

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são doenças clonais, que se originam em células hemopoéticas totipotentes, com distúrbio na proliferação e perda da maturação celular (Golde *et al.*, 1973; Beris, 1989; Jansen *et al.*, 1989), gerando hiperplasticidade na medula óssea (MO) e citopenias no sangue periférico (SP).

Dados epidemiológicos têm mostrado que a incidência das SMD é 2 vezes superior a das LMA (leucemia mielóide aguda) *de novo*, estimando-se que a doença atinja 10 a 20 mil indivíduos por ano nos EUA, o que a torna a doença neoplásica medular mais freqüente (Bennett, 1998). A doença atinge classicamente faixa etária elevada, havendo evidências de que agentes ambientais e ocupacionais (particularmente o benzeno), assim como o uso de agentes quimioterápicos possam aumentar o risco de seu aparecimento. Dessa forma, as SMD podem ser divididas em SMD *de novo* ou primárias (SMD-p) e SMD relacionadas à terapêutica (SMD-t), sendo que as SMD-t correspondem a 10% dos casos dessa síndrome (Fenaux *et al.*, 1996).

O primeiro caso de SMD foi provavelmente descrito em 1900 por Von Leube (apud Layton *et al.*, 1986). Inicialmente as SMD foram conhecidas por várias denominações que expressavam algumas das suas características clínicas ou laboratoriais, como curso com citopenias, refratariedade à terapêutica, medula óssea displástica e evolução para leucemias agudas (LA). Coube ao Grupo Cooperativo de Leucemia Franco-Américo-Britânico (FAB) realizar, em 1976, a distinção entre LMA e as SMD (Bennett *et al.*, 1976), e em 1982, a padronização dos seus subtipos (Bennett *et al.*, 1982).

A classificação FAB é aplicada somente para SMD-p, sendo baseada na porcentagem de blastos no sangue periférico e na medula óssea, no número de monócitos no sangue periférico e na presença ou ausência de sideroblastos em anel ou bastonetes de Auer (Noël *et al.*, 1993). De acordo com essa classificação, as SMD-p foram divididas em 5 subtipos: anemia

refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREBT) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Classificação FAB (Bennett *et al.*, 1982).

	% blastos no SP		% blastos na MO		Outros
AR	≤1		<5		
ARSA	≤1		<5		Sideroblastos anel >15%
AREB	≤5		5-20		
AREBT	>5	ou	>20 e <30	ou	Bastonete Auer
LMMC	<5		<20		Monócito >1.000/mm ³

SP: sangue periférico; **MO:** medula óssea; **AR:** anemia refratária; **ARSA:** anemia refratária com sideroblasto em anel; **AREB:** anemia refratária com excesso de blastos; **AREBT:** anemia refratária com excesso de blastos em transformação; **LMMC:** leucemia mielomonocítica crônica.

O diagnóstico das SMD baseia-se na avaliação clínica do paciente e na análise morfológica do aspirado de MO e do SP. O quadro clínico típico é a presença de citopenias, com medula óssea hipercelular em indivíduos de idade avançada, podendo haver evolução em cerca de 30% dos casos para leucemias agudas. A detecção de blastos e de alterações morfológicas (denominadas displasias) nos setores eritróide, granulocítico e megacariocítico são a base do diagnóstico correto destas síndromes. Tanto o estudo histológico da medula óssea, como a análise de alterações citogenéticas são de grande importância para a confirmação do diagnóstico (Velloso, 1996).

A definição de prognóstico das SMD leva em conta variáveis clínicas, cito-histológicas, bioquímicas, citogenéticas e moleculares. Estudos estatísticos de análise multivariável foram usados para criar sistemas de escore que determinam fatores de prognóstico. No entanto, enquanto não for possível definir-se com mais clareza como participam os elementos genéticos envolvidos na origem e progressão das SMD, o estudo de prognóstico ainda não estará completo.

2. CITOGENÉTICA EM SMD

2.1. HISTÓRICO

Em relação às alterações nas neoplasias, o primeiro estudo foi realizado por Von Hanseman (1890), que notou a presença de mitoses aberrantes em células neoplásicas.

Em 1914, Boveri postulou que as alterações das células tumorais poderiam ser devido à presença de anormalidades cromossômicas, sugerindo, pela primeira vez, que o câncer se originava de uma célula com alteração genética.

Vários estudos foram realizados demonstrando que as células malignas apresentavam alterações cromossômicas numéricas e estruturais (Levan, 1967; Sanberg, 1990), sendo um de grande importância o que descreveu o cromossomo Philadelphia (Ph) (Nowell e Hungerford, 1960).

Em 1970, as técnicas de bandas foram introduzidas à citogenética, permitindo novas descobertas (Capersson *et al.*, 1970).

Quanto à citogenética em intérfase, esta surgiu nos anos 60 (Gall e Purdene, 1969), facilitando o estudo das alterações genéticas, uma vez que, para utilizarmos as técnicas de bandamento, necessitamos de divisão celular para a obtenção de metáfases e, caso ocorra a escassez destas, não é possível a realização do estudo. À medida que podemos realizar nossos estudos em intérfase, sem a necessidade de metáfases, este problema está resolvido.

Em hematologia, com exceção dos tumores sólidos, a célula tumoral é facilmente coletada por punção da medula óssea ou pela coleta de sangue periférico, em alguns casos. As anormalidades observadas são numéricas ou estruturais, ocorrendo em porcentagem variável, dependendo da neoplasia estudada, sendo o estudo citogenético fundamental, não só para auxiliar no diagnóstico, mas também na determinação do tratamento, classificação e prognóstico de várias neoplasias (Luke *et al.*, 1997).

2.2. IMPORTÂNCIA

Após a análise morfológica de células do sangue periférico e medula óssea, o estudo citogenético é o exame mais importante para diagnóstico e para determinação de prognóstico de indivíduos com SMD (Koeffler, 1996).

Em relação ao diagnóstico, com a citogenética podemos determinar a origem clonal das alterações, e durante o acompanhamento, podemos monitorar a evolução do clone maligno e a resposta aos quimioterápicos ou TMO (Luke *et al*, 1997; Engel *et al*, 1999).

As SMD apresentam uma incidência relativa de diferentes anormalidades, como a predominância de perda cromossômica total (monossomia, representada por "-") ou parcial ("q-" ou "p-"), ganhos cromossômicos (trissomias, representadas por "+") e raras translocações (exceto em SMD-t). Numa revisão de mais de 3000 casos (Mufti, 1992), a frequência de anormalidades cromossômicas em SMD-p foram as seguintes: 5q- (deleção do braço longo do cromossomo 5, 27%), +8 (trissomia do cromossomo 8, 19%), -7 (monossomia do cromossomo 7, 15%), 11q- (deleção do braço longo do cromossomo 11, 7%), +7 (trissomia do cromossomo 7, 5%), 12q- (deleção do braço longo do cromossomo 12, 5%), 20q- (deleção do braço longo do cromossomo 20, 5%), 7q- (deleção do braço longo do cromossomo 7, 4%), 13q- (deleção do braço longo do cromossomo 13, 2%), entre outras. As perdas cromossômicas totais, principalmente do cromossomo 7, seguida pela perda do Y, são freqüentes, enquanto a perda de outros cromossomos é menos freqüente e geralmente está associada a outras anormalidades cromossômicas (especialmente no caso dos cromossomos 5, 17, 21, e X). Ganhos cromossômicos também são freqüentes, principalmente a trissomia do 8, seguida pela trissomia do 11, e trissomia adquirida do 21 (apesar desta última raramente ser encontrada isolada em SMD). Apesar de as translocações terem uma freqüência baixa em SMD, dentre elas há uma incidência relativamente alta de translocações não-equilibradas, geralmente envolvendo os cromossomos 1, 3, 5, 7, e 17 (Van den Berghe *et al.*, 1985; Thangaveleu *et al.*, 1989; Daly *et al.*, 1991; Lai *et al.*, 1995). As anormalidades citogenéticas complexas (isto é, envolvendo

no mínimo três cromossomos) ocorrem em 15% das SMD, e em 50% das SMD-t (Fenaux *et al.*, 1996).

O estudo citogenético tem se revelado de grande importância nas SMD, observando-se que a frequência das alterações citogenéticas difere entre as SMD-p e as SMD-t. Assim, nas SMD-p têm sido observadas anormalidades citogenéticas em cerca de 32 a 79% dos casos (Borgström, 1986; Yunis *et al.*, 1986), enquanto que nas SMD-t essa incidência atinge 86% (Bloomfield, 1986).

Porém, de forma geral, algumas entidades mielodisplásicas têm-se associado a achados citogenéticos como a síndrome do 5q-, deleções do 17p, rearranjo em 12p e em 3q e a monossomia do 7 em crianças.

A síndrome do 5q- tem sido descrita em mulheres com anemia macrocítica, plaquetas em nível normal ou elevado, presença de megacariócitos hipolobados, cursando com baixa taxa de evolução para LMA. Estas pacientes apresentam uma deleção do braço longo do cromossomo 5 envolvendo a região 5q31 (Fenaux *et al.*, 1996).

Já a deleção do 17p se associa a dados clínicos (mau prognóstico e má resposta à quimioterapia), morfológicos (presença de hipossegmentação e vacuolização de neutrófilos) e moleculares como a mutação de ponto no gene p53, localizado em 17p13, onde ambos os alelos podem estar inativados, um devido à deleção 17p e outro devido à mutação de ponto. Deleção de outro ou outros genes localizados na região 17p pode também estar associada à patologia desta doença. Em outros tumores onde a inativação do gene p53 está presente, também observamos pior resposta à quimioterapia e diminuição de sobrevida, como em SMD (Wattel *et al.*, 1994; Kaneko *et al.*, 1995; Fenaux *et al.*, 1996).

As translocações em 12p são restritas à LMMC e AREB e envolvem a perda de uma cópia do gene TEL, localizado na região 12p13 através da translocação desta região com outros cromossomos como o 5, o 21, etc, e conferem mau prognóstico a seus portadores (Golub *et al.*, 1994).

Os rearranjos envolvendo 3q26 ocorrem em pacientes que geralmente apresentam AREB, metade dos quais provocada pelo uso prévio

de agentes alquilantes; esta anomalia também confere mau prognóstico e associa-se a níveis normais de plaquetas com achado de micromegacariócitos displásicos na MO (Lai *et al.*, 1995).

A Síndrome da Monossomia do 7 em Crianças tem sido descrita predominantemente em meninos entre 4 e 5 anos de idade com esplenomegalia, leucocitose e monocitose freqüentes, trombocitopenia, anemia e um pior prognóstico (Luna-Fineman *et al.*, 1995).

2.3. A MONOSSOMIA DO CROMOSSOMO 7 E A TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 8 EM SMD-P.

Entre as anormalidades citogenéticas mais comumente associadas a prognóstico em SMD estão a monossomia do 7 e a trissomia do 8.

Parte ou todo o cromossomo 7 (figura 1a) está deletado durante o desenvolvimento de algumas doenças mielóides malignas secundárias a outras doenças, como anemia aplástica severa (AAS). Estas leucemias mielóides apresentam manifestações clínicas similares em adultos e crianças e a resposta à quimioterapia convencional é relativamente ruim (Brandwein *et al.*, 1990; Vila *et al.*, 1990; Morel *et al.*, 1993). Em outro grupo diferente de doenças mielóides, a deleção do cromossomo 7 ocorre preferencialmente em crianças, com displasia proeminente da medula óssea e hepatoesplenomegalia, condição que recebe o nome de leucemia mielóide crônica juvenil (LMCJ) (Castro-Malaspina *et al.*, 1984).

A monossomia do 7 é descrita na evolução de doenças genéticas que têm um alto risco de transformação leucêmica, incluindo a Anemia de Fanconi (Auerbach e Allen, 1991; Alter, 1992), Neutropenia Severa Congênita (Dale *et al.*, 1994; Young e Alter, 1994) e Síndrome de "Shwachman Diamond" (Woods *et al.*, 1981), e em algumas doenças constitucionais, como a Neurofibromatose Tipo 1 (NF-1) (Shannon *et al.*, 1992), Síndrome de Down e Monossomia do 7 Familiar (Gilchrist *et al.*, 1990).

A associação não-randômica da monossomia do 7 com leucemia mielóide consiste na perda de um ou mais genes que estão localizados

neste cromossomo e que regulam o crescimento e a diferenciação das células mielóides. Ainda não se sabe se é necessária a inativação de ambos os alelos deste gene/genes para alterar o fenótipo das células mielóides imaturas ou se a deleção de um único alelo contribui, por redução de alguma proteína crítica, para o crescimento e diferenciação anormal das células mielóides (Shannon *et al.*, 1989; Neuman *et al.*, 1992).

Embora a monossomia total do 7 ou 7q- ocorram durante o desenvolvimento de muitos casos de SMD e LMA, existem fortes evidências de que somente este evento não é suficiente para a transformação leucêmica. Alterações genéticas que afetam a sinalização das proteínas RAS (genes que codificam para proteínas que se ligam ao GTP) freqüentemente coexistem com a monossomia do 7 na MO de crianças com SMD e LMA. Além disso, a alta incidência de monossomia do 7 ou 7q- em crianças que estão predispostas à leucemia mielóide indica claramente que a perda total ou parcial deste cromossomo é um evento secundário na leucemogênese (progressão do processo leucêmico) (Luna-Finemam *et al.*, 1995).

Alguns estudos citogenéticos sugerem que as regiões críticas para o desenvolvimento da leucemia mielóide são as bandas 7q22 e 7q32-34 (Le Beau *et al.*, 1986; Neuman *et al.*, 1992). Esses dados coincidem com estudos moleculares que utilizam marcadores polimórficos ("Restriction Fragment Length Polymorphism") para essas regiões. A técnica de "FISH" (hibridação *in situ* fluorescente) também vem sendo um método poderoso para se mapear mais precisamente a extensão das deleções parciais e ajudando a delimitar qual a região crítica no cromossomo 7 envolvida com as SMD (Luna-Finemam *et al.*, 1995).

Em relação ao cromossomo 8 (figura 1b), a trissomia deste tem sido relatada como uma alteração numérica freqüente em doenças de origem mielóide (Sandberg, 1990), com uma incidência determinada pela citogenética convencional de 8% em LMA (Shackney *et al.*, 1995) e por volta de 10% em SMD (Brizard *et al.*, 1994; Haase *et al.*, 1995). Além disso, esta

alteração parece estar relacionada com uma alta probabilidade de evolução para leucemia aguda (Carbonel *et al.*, 1982).

A presença da trissomia do 8 está associada com um prognóstico ruim em várias doenças hematológicas, incluindo mieloma múltiplo (Taberenro *et al.*, 1996), leucemia linfóide aguda (Ankathil *et al.*, 1992) e LMA (Keating *et al.*, 1988; Yunis *et al.*, 1988; Schiffer *et al.* 1989).

Como a trissomia do 8 é a anormalidade mais comum nas neoplasias mielóides, permite-se supor que este cromossomo tenha importância na gênese destas neoplasias, mas apesar desta suposição, até o momento não foram identificados no cromossomo 8 os genes que possam ser responsáveis pela gênese destas doenças (Rowley, 1999).

Estudos citogenéticos seqüenciais também são importantes; observando-se o risco de transformação leucêmica em pacientes que desenvolvem anormalidades citogenéticas durante a evolução da doença este é muito maior (Tricot *et al.*, 1985; Suciú *et al.*, 1990). Segundo estudos realizados por Arif e colaboradores (1996), a freqüência da monossomia do 7 aumenta durante a transformação de SMD para LMA e durante a progressão da LMA. As alterações cariotípicas tornam-se mais complexas em 15% a 30% dos pacientes com SMD que têm cariótipos seqüenciais (Horiike *et al.*, 1988; Musilova *et al.*, 1988; Geddes *et al.*, 1990) e está associada com a baixa sobrevida e aumento na incidência de transformação leucêmica (Noël *et al.*, 1993).

Figura 1: Representação esquemática do cromossomo 7 (a) e do cromossomo 8 (b) (ISCN, 1905).

3. FATORES DE PROGNÓSTICO EM SMD

O prognóstico das SMD é extremamente variável. Enquanto alguns pacientes têm curso estável por muitos anos, outros, no entanto, evoluem rapidamente para leucemia aguda. Dentre os fatores de prognóstico que interferem no curso dessa doença temos a idade, a porcentagem e o tipo de blasto envolvido, a gravidade das citopenias, as alterações citogenéticas, a localização anômala de células imaturas na MO observada na biópsia, entre outros.

3.1. PROGNÓSTICO EM SMD-p

Em relação às características clínicas, a idade avançada do paciente confere pior prognóstico (Tricot *et al.*, 1985; kerkhofs *et al.*, 1987; Sanz *et al.*, 1989).

Quanto à morfologia, a porcentagem de blastos na MO ao diagnóstico parece ser o fator prognóstico isolado de maior importância na sobrevida global e transformação leucêmica desses pacientes (Coiffer *et al.*, 1983; Mufti *et al.*, 1985; Sanz *et al.*, 1989).

Definir fatores moleculares em SMD não tem sido muito fácil, especialmente porque sabe-se pouco sobre o envolvimento de oncogenes específicos ou genes supressores de tumor nesta patologia. Os parâmetros moleculares mostram que mutação em oncogenes da família RAS tem sido observada em 9 a 60% das SMD. Para Paquette e colaboradores (1993), os pacientes com SMD e que apresentavam *n-ras* mutado (10% dos casos) tinham significativa redução na sobrevida e maior taxa de evolução para leucemia aguda. Mutações no oncogene p53 foram observadas em 11 a 12% das SMD, geralmente associadas à perda do alelo normal. A mutação do p53 foi associada à sobrevida encurtada (Wattel *et al.*, 1994) e também à maior taxa de transformação leucêmica (Kaneko *et al.*, 1995).

A citogenética tem se mostrado uma variável importante, tanto na determinação da sobrevida, quanto na possível evolução para LMA.

3.2. PAPEL DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS NO PROGNÓSTICO DE SMD-p

Nas SMD, as alterações cromossômicas mais observadas associadas à sobrevida e ao potencial de transformação para LMA são: a síndrome do 5q-, que se correlaciona com baixo risco de transformação leucêmica e sobrevida mais longa (Van den Berghe *et al.*, 1974), monossomia do 7, 7q- e trissomia do 8, que se associam ao alto risco de progressão para LMA e curta sobrevida (Yunis *et al.*, 1986) e a deleção do braço longo do cromossomo 20 (20q-), que tem sido associada à sobrevida longa e baixo risco de transformação leucêmica em algumas casuísticas (Noel *et al.*, 1993; Wattel *et al.*, 1993). O pior fator de prognóstico citogenético nas SMD, no entanto, associa-se a alterações cariotípicas complexas (Suciu *et al.*, 1990; Toyama *et al.*, 1993), incluindo automaticamente os pacientes que as apresentam em um grupo de alto risco.

Alterações no conteúdo do cromossomo 7 (monossomia ou deleção do q) representam 15% das anormalidades cariotípicas em SMD-p (Mufti, 1992) e estão associadas com prognóstico adverso, com redução significativa da sobrevida total em vários estudos, com mediana variável (de 12 meses, Yunis *et al.*, 1988 e 8 meses, Nowell, 1992), enquanto que a trissomia do cromossomo 8 representa 19% das anormalidades cariotípicas em SMD e a duração média de sobrevida de pacientes com esta anormalidade cariotípica é de 18 meses (Yunis *et al.*, 1988) e 10 meses (Nowell, 1992). Esta trissomia também ocorre em pacientes após evolução de SMD ou SMP (Síndromes Miéloproliferativas) para LMA e é observada na fase crônica da doença (Carbonel *et al.*, 1982; Suciu *et al.*, 1990; Nguyen *et al.*, 1994).

3.3. PAPEL DA CLASSIFICAÇÃO FAB NO PROGNÓSTICO

A classificação FAB demonstrou grande valor na medida em que permitiu reconhecer pacientes com tempo de sobrevida e evolução leucêmica bastante diferentes.

Em 1988, um grupo de especialistas, (Third MIC Cooperative Study Group – MIC: Morphologic, Immunologic, and Cytogenetic) comparando características morfológicas, imunofenotípicas e citogenéticas de 11 trabalhos independentes englobando 1081 pacientes, observaram que portadores de AR e ARSA tinham sobrevida média de 50 meses, com baixa taxa de progressão leucêmica estimada entre 8 e 12%; já os portadores de AREB e AREBT sobreviviam 5 a 8 meses, com taxa de leucemização de 44 a 60%. Achados semelhantes também foram observados em outro estudo compreendendo 1914 pacientes (Sanz *et al.*, 1992).

Observa-se claramente que esta classificação separa pacientes de baixo risco (AR e ARSA) e de alto risco (AREB e AREBT). Em relação à LMMC, os resultados são mais heterogêneos, com sobrevida oscilando de 8 a mais de 60 meses e a taxa de transformação leucêmica de 3 a 55%.

A tabela 2 compara os dados dos trabalhos citados acima com dados de um trabalho realizado no Hospital das Clínicas de São Paulo, em 1996.

Tabela 2: Comparação do papel da classificação FAB no prognóstico de 3 diferentes grupos de estudo.

	MIC,1988	Sanz <i>et al</i>,1992	HC,1996
Nº Pacientes	1081	1914	96
Nº trabalhos	11	9	1
Sobrevida (meses)			
AR	50 (18-64)	37	52
ARSA	51 (14-76+)	49	89
AREB	11 (7-16)	9	16
AREBT	5 (2,5-11)	6	4
LMMC	11 (9-60)	22	16
% transformação leucêmica			
AR	12	11 (0 a 20)	15
ARSA	8	5 (0 a 15)	0
AREB	44	23 (11 a 50)	41
AREBT	60	48 (11 a 50)	100
LMMC	14	20 (3 a 55)	25

AR: anemia refratária; **ARSA:** anemia refratária com sideroblasto em anel; **AREB:** anemia refratária com excesso de blastos; **AREBT:** anemia refratária com excesso de blastos em transformação; **LMMC:** leucemia mielomonocítica crônica.

3.3.1. Classificação WHO

Novas classificações estão sendo publicadas, visando melhor adequação do nome da entidade a suas características biológicas e de prognóstico. Em 1994 foi criada a classificação REAL (Revised European-American Lymphoma), baseada na morfologia, imunofenotipagem e características genéticas e clínicas de doenças linfoproliferativas. Como a importância de cada uma dessas características varia e não há um consenso comum, em novembro de 1997, toda a Sociedade de Hematopatologia, e a Associação Européia de Hematologistas reuniram-se na tentativa de criar uma nova classificação das doenças onco-hematológicas para a Organização Mundial de Saúde (Harris *et al.*, 1999), a classificação Who.

As principais modificações na classificação das SMD quando comparamos a classificação FAB com a WHO são:

- suprimiu-se a AREBT: os pacientes com mais de 20% de blastos mielóides são classificados como LMA-M2 (leucemia mielomonocítica tipo-2), deixando de ter valor a presença de bastonetes de Auer na classificação.
- a AR (também denominada Citopenia Refratária - CR) foi dividida em 2 grupos: AR/CR com mínima displasia (de bom prognóstico) e a AR/CR com displasia de múltiplas linhagens (de mau prognóstico).
- a ARSA ficou sendo um termo utilizado somente para SMD com comprometimento apenas da série vermelha, caso contrário, segue-se o mesmo termo acima (com displasia de múltiplas linhagens).
- a LMMC entra no grupo das SMD/SMP, sendo modificado seu critério para a presença de mais de 5000 monócitos/mm³ no SP.

Segundo orientação do Comitê Internacional fica sugerido que a AREB seja subdividida em AREB I (5-10% de blastos na MO) e AREB II (10-20% de blastos na MO).

A classificação WHO é uma proposta de classificação e vem sendo adaptada por alguns centros, porém ainda é recomendável a manutenção da classificação FAB na prática clínica e em trabalhos de SMD-p, portanto, neste trabalho, utilizamos apenas a classificação FAB, mesmo porque na época em que nossos pacientes foram avaliados, a classificação WHO ainda não

estava disponível.

3.4. SISTEMAS DE ESCORE COM SIGNIFICADO PROGNÓSTICO EM SMD

3.4.1. Sistemas de escores que utilizam parâmetros de sangue periférico e porcentagem de blastos na medula óssea, sem a variável citogenética.

O primeiro sistema de escore com significado para prognóstico foi proposto por Mufti e colaboradores (1985), sendo conhecido como escore de Bournemouth. Com a utilização apenas de parâmetros de SP e MO, criou-se um sistema simplificado que permitiu reconhecer 3 subgrupos de pacientes diferentes, entre portadores de AR, ARSA e AREB.

Este escore foi modificado para a LMMC em 1988 por Wosley e colaboradores, utilizando os mesmos parâmetros anteriores e com a mesma pontuação, porém acrescentando para a contagem de neutrófilos um valor menor que $2,5 \times 10^9/L$.

A estratificação da porcentagem de blastos medulares em <5 , 5-10 e $>10\%$, e da contagem de plaquetas em $>100 \times 10^9$, $51-100 \times 10^9$ e inferior a $50 \times 10^9/L$, acrescido do fator idade, propiciaram a Sanz e colaboradores a criação de um sistema de escore também de valor preditivo para sobrevida de portadores de SM.

Em 1990 o escore de Bournemouth foi modificado: com exceção do valor de neutrófilos, confirmou-se que o valor de hemoglobina, de plaquetas e de blastos na medula óssea eram fatores importantes correlacionados com sobrevida e também com progressão leucêmica (Goasguen *et al.*, 1990).

Aul e colaboradores, em 1988, substituindo o valor de neutrófilos pelo de DHL (desidrogenase láctica), mostraram grande diferença de sobrevida e transformação leucêmica em pacientes pertencentes a 3 grupos: com escore de 0, escore 1 a 2 e escore de 3 a 4 (Aul *et al.*, 1988, 1992).

Vários outros sistemas de escore utilizando outras variáveis como quantificação da displasia medular (Varela *et al.*, 1985), histologia medular

(Cassano *et al.*, 1990) foram criados, porém não foram tão importantes para auxiliar no prognóstico dos pacientes com SMD.

3.4.2. Escores Utilizando Parâmetros Citogenéticos (associados a outras variáveis)

Morel e colaboradores (1993), analisando dados clínicos (sexo e idade), sangue periférico (hemoglobina - Hb, reticulócitos, leucócitos, neutrófilos, monócitos e blastos), porcentagem de blastos na medula óssea e alterações citogenéticas, criaram um sistema de escore com valor de prognóstico denominado escore de Lille, onde a presença de mais de 3 alterações citogenéticas conferiam um pior prognóstico.

Outro estudo utilizando critérios hematológicos e de citogenética criou um sistema de escore que separou os pacientes em três grupos, com diferentes probabilidades de sobrevida, onde a presença de três ou mais alterações citogenéticas conferiam um prognóstico ruim, enquanto que monossomia total ou parcial do 7, trissomia do 8 ou duas alterações citogenéticas conferiam um prognóstico de risco intermediário e outros achados eram de baixo risco (Toyama *et al.*, 1993).

Porém, somente em 1997, Greenberg e colaboradores, utilizando 816 pacientes com SMD-p, procedentes de grandes casuísticas européia, japonesa e americana, propôs um Sistema Internacional de Escore de Prognóstico, o IPSS (International Prognostic Scoring System), apresentado na tabela 3:

Tabela 3: Sistema Internacional de Escore de Prognóstico - IPSS.

Variável/ponto	0	0.5	1.0	1.5	2.0
Blastos MO (%)	<5	5 a 10		11 a 20	21 a 30
Cariótipo •	Bom	Intermediário	mau		
Nº citopenias ••	0, 1	2, 3			

• Em relação à taxa de sobrevida e de transformação leucêmica, o prognóstico foi dividido em: - **bom**: cariótipo normal, ou com anormalidades isoladas 5q-, 20q-, -Y;

- **intermediário**: demais alterações;

- **mau**: 3 ou mais anormalidades ou alteração do cromossomo 7.

••**citopenias**: Hb<10g/dl, neutrófilos<1.500/mm³, plaquetas<100.000/mm³.

Portanto, sob o nome SMD encontra-se um grupo de doenças bastante heterogêneas que têm em comum displasia de linhagens hematopoéticas acopladas a citopenias periféricas e potencial para transformação leucêmica. O achado de anormalidades cariotípicas tem sido um dos maiores aliados na definição de entidades homogêneas dentro desta síndrome, como por exemplo a síndrome 5q-e e a deleção 17p.

A citogenética tem fornecido novos conhecimentos sobre a biologia e a patogenia das SMD. Como uma ferramenta de prognóstico, tem sido uma variável fortemente associada à duração da sobrevida e transformação leucêmica. Porém a citogenética convencional (de bandas) apresenta algumas desvantagens como a necessidade da presença de metáfases para análise (o que em muitos casos não ocorre); não permite a quantificação real (pois permite somente a análise das células que entraram em metáfase); 20% dos pacientes com esta patogenia apresentam fibrose medular (Dansey, 2000), impossibilitando a análise cariotípica e a citogenética tradicional também exige pessoal com grande experiência para realização e, principalmente, interpretação do método. Porém, esta técnica permite uma avaliação de todos os cromossomos do indivíduo através do seu cariótipo, possibilitando um estudo cromossômico amplo, e não específico, de apenas alguns cromossomos ou regiões cromossômicas, como outros métodos.

Outras técnicas de citogenética molecular, como Hibridação *in situ* Fluorescente ("FISH"), usando sondas de DNA cromossomo-específicas, podem expandir a utilidade da citogenética.

4. HIBRIDAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE ("FISH") EM SMD

Em 1986, Pinkel e colaboradores descreveram o método de "FISH", utilizando imunofluorescência em vez de material radioativo, para marcar as sondas de DNA, facilitando a utilização desta metodologia.

A técnica de "FISH" consiste na aplicação de uma sonda de DNA (uma região genômica previamente conhecida marcada com um fluorocromo) a uma amostra de células cujo DNA foi previamente

desnaturado. A análise à microscopia de fluorescência identifica a presença da região em estudo, se a amostra apresentar a região complementar à sonda em análise (Lichter *et al.*, 1988).

Todos os cromossomos, bandas ou sub-regiões, ou seqüências de cópia única podem ser evidenciados dependendo do tipo de sonda usada (Trask, 1991).

Sondas de DNA derivadas de elementos de DNA α -satélite contêm informações sobre a região centromérica de um cromossomo específico. Estas sondas são utilizadas na análise de aberrações cromossômicas numéricas e estão disponíveis comercialmente para a maioria dos cromossomos (Noël *et al.*, 1993). As sondas de cromossomo total ("painting probes") são derivadas de bibliotecas cromossomo-específicas (Fuscoe *et al.*, 1986; Pinkel *et al.*, 1988). A combinação das sondas de cromossomo total e as sondas centroméricas permite a detecção de anormalidades estruturais e numéricas. Bandas e sub-regiões cromossômicas podem ser efetivamente analisadas usando sondas obtidas de microdissecção cromossômica (Bohlander *et al.*, 1992; Meltzer *et al.*, 1992).

Sondas para identificar cromossomos e regiões específicas estão sendo usadas na rotina de laboratórios de citogenética e patologia para identificar anormalidades cromossômicas associadas com doenças hematológicas malignas. Em muitos casos, a análise por "FISH" aumenta a sensibilidade naqueles pacientes onde as anormalidades citogenéticas não são identificadas pela análise citogenética convencional. A combinação da citogenética convencional, "FISH" e análise molecular auxilia no diagnóstico e classificação de doenças malignas em subgrupos relevantes, na seleção de terapia apropriada e no monitoramento eficaz da doença e do tratamento (Gozzetti e Le Beau, 2000).

As sondas utilizadas em análises citogenéticas de doenças hematológicas são as sondas centroméricas, sondas cromossômicas totais e sondas loco-específicas, sendo que as centroméricas são utilizadas por fornecerem um método rápido e simples para a contagem dos pares

cromossômicos, tanto em metáfase quanto intérfase, pois o número de sinais fluorescentes corresponde ao número de cópias presentes no cromossomo em estudo. Este tipo de análise é usado em muitos tipos de leucemia onde a morfologia dos cromossomos é de difícil análise. Entretanto, sondas centroméricas somente fornecem informações sobre o número dos centrômeros do cromossomo em questão, sem fornecer informações quanto a anormalidades estruturais, como translocações, deleções, entre outras. A utilização de sondas centroméricas em células em intérfase nos permite assegurar rapidamente anormalidades cromossômicas numéricas importantes como fatores de prognóstico e acompanhar doença residual mínima (Conchon, 1998).

Os problemas associados com a técnica de “FISH” incluem hibridação incompleta, variações na lâmina (lâminas mal lavadas ou engorduradas, riscadas, etc) e na qualidade da amostra (material com restos celulares, bactérias, material muito concentrado), auto-fluorescência e fragmentos de fluorescência, definição de um sinal fluorescente específico (sinais difusos), superposição de sinais e poliploidia (Noël *et al.*, 1993). As vantagens desta técnica são: rapidez para sua execução, simplicidade de interpretação, possibilidade de realizar o estudo em células em intérfase e de se quantificar a anomalia em estudo (já que a técnica permite uma análise célula-a-célula). Além disso, praticamente todos os reagentes do teste estão disponíveis comercialmente em forma de “Kits”, o que facilita a padronização do método. As desvantagens consistem em: custo elevado e a possibilidade de análise de um número limitado de regiões genômicas por teste, tornando-o um teste específico.

Entretanto, alguns resultados de Viguie e colaboradores (1995) confirmados por Fenaux e colaboradores (1996), mostraram que a técnica de “FISH” pode resultar em falso-negativo em alguns casos; sendo assim, esta técnica pode complementar, mas não substituir, a citogenética convencional.

“FISH” também pode ser combinado com outras técnicas, incluindo imunofenotipagem (que permite a identificação da linhagem das células em

lâminas de medula óssea) ou separação de células por citometria de fluxo.

A técnica de “FISH”, além de apoio diagnóstico tem sido utilizada também para acompanhar doença residual mínima após transplante de medula óssea (Conchon, 1998).

O valor da citogenética convencional e da “FISH” para a detecção de +8 e -7 tem sido analisado em várias grandes séries de pacientes com SMD (Jenkins *et al.*, 1992; Kibbelaar *et al.*, 1993; Flactif *et al.*, 1994).

Dentre as anormalidades numéricas em SMD, a monossomia do 7 e a trissomia do 8 são as mais comuns e podem ser prontamente identificadas por um teste como “FISH” em intérfase. Ambas as anomalias parecem ser fatores independentes de mau prognóstico e sua detecção é importante especialmente em casos em que a cariotipagem não pode ser realizada.

Uma vez que a expectativa de vida da população está aumentando e a SMD é uma doença correlacionada com uma maior sobrevida, e também está ocorrendo um aumento de sobreviventes de câncer após tratamento quimioterápico com agentes alquilantes, a tendência é a incidência desta doença também sofrer um aumento (Benett, 1998). Além disso, a SMD serve como modelo de estudo para as demais doenças mieloproliferativas. Como muitos trabalhos sugerem que genes contidos nos cromossomos 7 e 8 devem estar envolvidos na diferenciação mielóide e/ou controle de apoptose (Fischer *et al.*, 1997; Döhner *et al.*, 1998), a meta deste trabalho foi a observação da frequência e significado clínico das alterações numéricas nos cromossomos 7 e 8 na intérfase de pacientes com SMD utilizando-se uma técnica que não implica em cariotipagem e bandamento de cromossomos e, em seguida, avaliar o impacto destas anomalias na sobrevida e na taxa e tempo de transformação para LMA.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

- 1-** Comparar a frequência de monossomia do 7 e trissomia do 8 obtida pelos métodos de citogenética de bandas (GTG) e “FISH”;
- 2-** Verificar a associação da monossomia do 7 e trissomia do 8 com os subtipos da classificação FAB;
- 3-** Correlacionar a presença de -7 e $+8$ com a sobrevida em SMD e com o risco de transformação leucêmica.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

Constituiu-se de material citogenético congelado previamente de 28 pacientes portadores de SMD-p, previamente a tratamento quimioterápico. Este grupo de pacientes dividiu-se entre 17 pacientes do sexo masculino e 11 pacientes do sexo feminino; com mediana de idade de 61 (19-81) anos e média de 59 (DP=16). Quanto à classificação FAB, 11 pacientes tiveram diagnóstico de anemia refratária (AR), 3 pacientes de anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), 6 pacientes foram diagnosticados com anemia refratária com excesso de blastos (AREB), 6 pacientes com anemia refratária com excesso de blastos (AREBT), 2 pacientes com leucemia mielomonocítica crônica (LMMC).

Esses indivíduos foram atendidos no Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), no período de janeiro de 1995 a novembro de 1997. Essas amostras foram obtidas a partir da cultura de medula óssea.

O diagnóstico e a classificação das neoplasias foram realizados de acordo com as recomendações do grupo cooperativo FAB.

Infelizmente, não foi possível ter bons controles no presente trabalho, pois existe uma limitação muito grande em obter material de medula óssea (MO) de indivíduos saudáveis, que geralmente são doadores de MO para transplante. Além disso, é mais difícil ainda obter essas amostras de pessoas na faixa etária dos pacientes aqui estudados, uma vez que esta doença geralmente ocorre em pessoas de idade mais avançada e os doadores são, geralmente, indivíduos mais jovens. Por isso utilizamos o material de 5 indivíduos-controle, sendo que, inicialmente, utilizamos como controle interno das hibridações, material obtido a partir de aspirado de medula óssea de um doador masculino de 31 anos, sadio, do HC-FMUSP. Posteriormente, introduzimos ao estudo o material de mais 4 doadores de MO do HC-FMUSP. Estes indivíduos apresentavam as seguintes

características: um homem, sadio, com 31 anos e três mulheres, sadias, com 30, 22 e 26 anos.

2. MÉTODOS

2.1. CITOGENÉTICA

A citogenética convencional foi realizada com as culturas de medula óssea dos pacientes pelo Serviço de Citogenética da Fundação Pró-Sangue do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, entre 1995 e 1997. Essas análises não foram realizadas como parte do presente trabalho, mas seus dados são apresentados na tabela 4 e 5.

As técnicas usadas foram adaptadas do manual de citogenética do Center for Human Genetics, University of Leuven (1993) e da técnica descrita por Mori (1981).

Gostaríamos de salientar que foram realizadas culturas com diferentes tempos de incubação (24h, 48h e/ou 72h) por paciente.

O protocolo utilizado para este procedimento está descrito a seguir.

- **Coleta de material:** 2 a 4 ml de medula óssea procedente de cada paciente foi coletada em seringa estéril e heparinizada, através de punção medular em esterno ou crista ilíaca pósterio-superior utilizando-se agulha de mielograma, após anestesia cutânea e do periósteo.
- **Cultura celular:** 15 a 20 x 10⁶ células foram transferidas para meio de cultura composto por RPMI + 20% soro fetal bovino + penicilina-estreptomicina 200.000U/ml (concentração final de 1,5 a 2,0 x 10⁶ células/ml de meio) e incubadas, em frascos de cultura, por 24, 48 e/ou 72h (dependendo da quantidade de material adquirido) em estufa a 37°C com 5% CO₂ e umidade de 84%.
- **Preparação dos cromossomos:** Ao completar 24, 48 e/ou 72h de incubação, as culturas foram transferidas para tubos cônicos e submetidas

ao inibidor de fuso mitótico, no caso colchicina, durante 45' a 37°C, na concentração final de 4×10^{-5} M. Após os 45', o material foi centrifugado à 1500 RPM (rotações por minuto) por 10' a temperatura ambiente e o sedimento passou por um tratamento hipotônico através da adição lenta de 10 ml de 0,075M de cloreto de potássio e incubação em banho-maria, a 37°C por 20'. A seguir, o material foi centrifugado novamente a 1500 RPM por 10', o sobrenadante foi desprezado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e o sedimento foi ressuspensionado em fixador de Carnoy (3 metanol : 1 ácido acético glacial), sob agitação lenta e contínua. Após nova centrifugação de 1500 RPM por 10', novamente o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em fixador de Carnoy. Essa operação foi repetida por mais 2 vezes no mínimo, ou até o momento em que o material tornou-se límpido, em condições de ser aplicado sobre a lâmina.

- **Preparação das lâminas:** Uma gota da suspensão foi transferida para um lâmina limpa e os cromossomos foram checados em microscópio de fase. Foram montadas 3-6 lâminas/amostra. O restante do material foi congelado (-20°C) em "eppendorfs" (e foi utilizado no presente trabalho para o estudo, através da técnica de "FISH", de existência da monossomia do cromossomo 7 e trissomia do cromossomo 8).

- **Bandamento cromossômico (Banda G):** As lâminas contendo o material foram envelhecidas por 2-5 dias a temperatura ambiente. A renaturação foi feita em 2XSSC a 50°C por 20'. Posteriormente, as lâminas foram coradas por wright (1 wright : 2 Tampão Fosfato) por 1-2'. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente e colocadas para secar em temperatura ambiente.

- **Estudo das metáfases:** As metáfases com boa dispersão cromossômica foram selecionadas em estudo microscópico e análise computadorizada por captação de imagens através de câmera de vídeo. As anormalidades

cromossômicas foram descritas segundo a nomenclatura do ISCN (International System for Human Cytogenetic) (Mitelman *et al.*, 1995).

Todo o procedimento descrito também foi realizado para os 5 controles. No entanto, no caso dos 4 últimos controles, além das culturas de 24h, 48h e 72h, realizamos também uma cultura direta, ou seja, após a coleta do material, transferiu-se 1 ml deste para o meio de cultura preparado normalmente (como para os demais tempos de incubação), e acrescentou-se a colchicina, deixando a 37°C por 1h. Todo o processo de lavagem restante é igual ao das culturas incubadas por 24h, 48 ou 72h.

2.2. HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (“FISH”)

Ao iniciarmos a realização da “FISH” dispunhamos apenas do protocolo fornecido pelo fabricante (Oncor); como o laboratório não possuía experiência nesta técnica, passamos por um período de padronização.

No início utilizamos diretamente as amostras das culturas pré-congeladas. Algumas delas apresentaram-se “suja” (com restos celulares e bactérias) e quando foram submetidas ao “FISH”, este não funcionou. Passamos então a lavar todas as culturas pré-congeladas com fixador Carnoy (3 metanol:1 ácido acético) para limpá-las.

Após esta etapa, seguimos o protocolo do fabricante. A recomendação, tanto para a sonda alfaíde (hibrida com a região centromérica) do cromossomo 7 como para a sonda alfaíde do cromossomo 8 (pois o protocolo para ambas era o mesmo), era a de realizar uma hibridação de 0,5h a 16h. Porém após alguns testes observamos que para o presente estudo, reações com menos de 7h de hibridação não apresentaram resultados confiáveis (sinais fracos e com alta porcentagem de núcleos sem marcação, inclusive no controle, que tinha padrão citogenético normal). Resolvemos aumentar, então, o tempo de hibridação e passamos a deixar as lâminas hibridando durante a noite num total de 12 a 16h.

Neste período de padronização foi utilizado o material de alguns pacientes e estas amostras se esgotaram. Por isso, não foi possível realizar

a repetição do teste, após padronização para alguns destes pacientes (pacientes 2 e 13 para a sonda alfa de do cromossomo 7 e paciente 19 para o cromossomo 8).

- **Preparo das lâminas:** Estas foram montadas a partir de material obtido através de cultura de medula óssea previamente congelado. Este material foi submetido a, no mínimo, duas lavagens em fixador de Carnoy (3 metanol : 1 fixador). Logo após, uma gota em suspensão deste material foi transferida para uma lâmina limpa e o material foi visualizado em microscópio de fase, marcando-se a região da lâmina onde encontrou-se maior quantidade e melhor qualidade de material. As lâminas a serem utilizadas foram secas à temperatura ambiente por, no mínimo, 12 horas.

Foram montadas baterias que continham lâminas de três pacientes diferentes, sendo uma lâmina por paciente e mais uma lâmina do controle interno, resultando num total de quatro lâminas por bateria. Todas as quatro lâminas eram obtidas a partir de culturas com o mesmo tempo de incubação.

Após a secagem, as lâminas que formavam uma bateria (com o material já fixado) foram submetidas a um pré-tratamento por meio de um banho em 2XSSC, pH: 7,0 à 37°C por 30', seguido de desidratação em etanol (70%, 80% e 95%) à temperatura ambiente por 2' cada. A seguir, as lâminas foram transferidas para uma solução pré-aquecida de 70% de formamida em 2XSSC por 2' a 70°C e logo após desidratadas em uma nova série de etanol, idêntica a anterior, só que desta vez numa temperatura entre +2 a -8°C, também por 2' cada. Somente então foi realizada a hibridação com as sondas em questão.

Dessa forma, várias baterias foram montadas (doze baterias para o cromossomo 7 e treze baterias para o cromossomo 8) para realizar a hibridação com o material de todos os pacientes, tanto para o cromossomo 7 como para o cromossomo 8. Às vezes, uma das duas hibridações, ou até mesmo ambas, não funcionavam, devido à qualidade da cultura de cada paciente ser diferente, alterações não observadas nas soluções (por exemplo, alteração de pH), vencimento do prazo de validade de alguns lotes

de sondas, reduzindo assim sua eficiência, etc. Algumas vezes foi necessário repetir-se o processo.

Como já foi dito anteriormente, foram introduzidos, *a posteriori*, 4 doadores-controle neste estudo e realizou-se “FISH” para os cromossomos 7 e 8 nestes indivíduos. Montou-se quatro baterias com uma lâmina de cada um dos doadores, sendo que para cada bateria a cultura usada deveria ter o mesmo tempo de incubação, ou seja, a primeira bateria continha material obtido a partir da cultura direta, para a segunda bateria, o material foi obtido a partir da cultura de 24h e assim sucessivamente, tanto para a hibridação com a sonda alfoíde do cromossomo 7 (resultando em 4 baterias) como para a sonda alfoíde do cromossomo 8, (resultando também em 4 baterias).

Para a realização das hibridações, tanto com a sonda alfoíde do cromossomo 7 como para a sonda alfoíde do cromossomo 8, utilizamos o mesmo protocolo, descrito a seguir.

- **Preparo da sonda:** utilizou-se sondas alfoídes marcadas com digoxigenina, para os cromossomos 7 e 8. Todas as sondas utilizadas foram provenientes do laboratório Oncor (Gaithersburg, MA). As sondas foram pré-aquecidas a 37°C por 5' e combinadas com hibrisol VI (1,5 µl de cada sonda para 30 µl de hibrisol para cada lâmina utilizada). Logo após, cada sonda sofreu desnaturação a 70°C por 5' e foi colocada no gelo até a hora da hibridação.
- **Hibridação:** Após o preparo das lâminas e das sondas, para cada 22X50mm de lâmina foram colocados 30 µl da mistura (sonda+hibrisol). Em seguida, a lâmina foi coberta com lamínula de vidro, vedada com “rubber cement” e incubada “over-night” (aproximadamente 12h a 16h) à 37°C em câmara úmida.
- **Lavagem pós-hibridação:** A lamínula de vidro foi retirada e a lâmina foi colocada numa solução pré-aquecida de 0,25XSSC a 72°C por 5' e transferida para 1XPBD à temperatura ambiente por 1-2'. Em seguida foi

realizada a detecção.

- **Detecção:** Foram aplicados 50 µl de FITC (“Fluorescein-Labeled Anti-Digoxigenina”) marcada com anti-digoxigenina na lâmina, e esta foi coberta com lamínula de plástico, incubando por aproximadamente 15’ a 37°C. Após a incubação, a lamínula foi retirada e a lâmina lavada em 1XPBD, por três vezes, à temperatura ambiente, 2’ cada banho. Para finalizar o processo, a lâmina foi corada com iodeto de propídeo (PI) para detecção do FITC em microscópio com filtros adequados para a fluorescência em questão. Caso a marcação anterior não estivesse suficientemente visível, amplificou-se o sinal através do uso de outros dois anticorpos (“Rabbit Anti-Sheep” e “Fluorescein-Labeled Anti-Rabbit”).

A figura 2 esquematiza a técnica acima.

Figura 2: Esquema da técnica de "FISH"

• **Análise:** Foram analisados, por 2 observadores diferentes, 300 núcleos interfásicos por paciente e por controle, sendo que um dos observadores fazia inicialmente a leitura de uma bateria de lâminas e posteriormente, o outro observador fazia a leitura sem saber do resultado da primeira leitura.

Quando a hibridação não funcionava na lâmina controle devido ausência total de hibridação, hibridação cruzada ou valor de não hibridação acima de 5% (valor máximo aceitável segundo o fabricante), as lâminas dos pacientes não eram analisadas, pois o resultado não seria confiável.

Foram considerados 4 tipos de marcações diferentes: células sem nenhum sinal, células com um sinal (monossomia), células com dois sinais (normais) e células com três ou mais sinais.

Para esta análise, ambos os observadores seguiram alguns critérios, que estão descritos a seguir e esquematizados na figura 3:

- Não analisar células muito próximas umas às outras ou com sobreposição;
- Não considerar células com sinais difusos;
- Não considerar células com 2 sinais pequenos (em relação aos outros sinais) e muito próximos, pois podem corresponder a um único complemento cromossômico;
- Não analisar núcleos que não estejam intactos;
- Não considerar sinais de hibridação não específica, ou seja, aqueles que têm intensidade menor e forma diferente quando comparados aos sinais de outras células.

CRITÉRIOS* PARA A LEITURA DO TESTE DE "FISH"

Figura 3: Critérios de exclusão de núcleos interfásicos para leitura da técnica de "FISH" com uma única sonda.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

- Para comparação da repetibilidade da leitura de “FISH” por 2 observadores e nos controles internos da reação foi utilizado o coeficiente de relação intra-classes;
- Para comparação da incidência da monossomia do 7 e trissomia do 8 em relação ao grupo FAB de bom e mau prognóstico foi utilizado o teste exato de Fisher (Rosner, 1982);
- Para comparação de subtipos (de bom e mau prognóstico pela FAB; com ou sem monossomia do 7 e com ou sem trissomia do 8) foram empregadas as mesmas curvas acima, com comparação pelo teste “Log-rank” (Lee, 1980b);
- Para cálculo de sobrevida global e risco de transformação leucêmica foram utilizadas curvas atuariais livres dos eventos de LMA e óbito pelo método de Kaplan-Meier (Lee, 1980a).

RESULTADOS

IV- RESULTADOS

1. Características da amostra

A análise descritiva dos 28 pacientes submetidos a esse estudo foi a seguinte:

- Quanto ao sexo, tivemos 17 pacientes do sexo masculino e 11 pacientes do sexo feminino;
- Em relação à idade ao diagnóstico, a mediana foi de 61 (19-81) anos e a média foi de 59 (DP=16).
- A amostra foi composta por 11 pacientes com diagnóstico de anemia refratária (AR), 3 pacientes com anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), 6 pacientes com anemia refratária com excesso de blastos (AREB), 6 pacientes com anemia refratária com excesso de blastos (AREBT), 2 pacientes com leucemia monocítica crônica (LMMC).

A descrição acima está representada na tabela 17, juntamente com outros dados.

2. Características da amostra quanto à análise citogenética.

O padrão citogenético convencional (banda G) de nove pacientes não pôde ser determinado devido à ausência total de metáfases (ATM) observada em suas culturas celulares. Dos dezenove pacientes que tiveram resultado citogenético, onze apresentaram cariótipo normal, dois apresentaram deleção do braço longo do cromossomo 5, um apresentou uma translocação entre os cromossomos 6 e 9, quatro pacientes apresentaram mosaicismos, ou seja, dois ou mais conjuntos cromossômicos diferentes e o paciente 28 apresentou cariótipo complexo (Tabela 4).

Tabela 4: Dados referentes à análise citogenética convencional.

Pacientes	Dados Citogenéticos
1	46,XY[10]
2	ATM
3	46,XX,del(5)(q13q33)[5]
4	ATM
5	ATM
6	46,XY[3]
7	46,XY,t(6;9)(p23;q43)[18]
8	ATM
9	46,XY[8]/47,XY,+8[7]
10	ATM
11	ATM
12	ATM
13	ATM
14*	47,XY,+der(1;7)(q10;p10),-7,+8[4]/47,XY,+der(1;7)(q10;p10),+8,-15[1]
15	46,XY[10]
16	46,XX[12]
17	46,XX[7]
18	46,XX[2]/46,XX,del(5)(?q23?q34)[8]
19	46,XX[7]
20	46,XX[1]/46,XX,del(20)(q12)[10]
21	46,XY[9]
22	ATM
23	46,XY[13]
24	46,XY,del(5)(?q12q32)[7]
25	46,XY[12]
26	46,XY[10]
27	46,XY[6]
28	45,XY,-4,-6,-9,t(12;?)(p12;?),+mar1,+mar2,+mar3,+r[cp13]

ATM: ausência total de metáfases; **del:** deleção; **p:** braço curto do cromossomo; **q:** braço longo do cromossomo; **t:** translocação; **der:** derivado; *: o cariótipo da linhagem clonal com monossomia do cromossomo 7 do paciente 14 está representado na figura 4.

A citogenética convencional também foi realizada nos cinco doadores utilizados como controles. Para todos eles o padrão citogenético apresentou-se normal.

Figura 4: Cariótipo do paciente 14: 46,XY,+der(1;7)(q10;p10),-7,+8,-22.

3. “FISH” nos controles.

Os resultados obtidos com as sondas alféides dos cromossomos 7 e 8 foram analisados separadamente.

3.1. “FISH” no controle interno das hibridações

Para cada bateria de hibridação foi adicionada uma lâmina com material de um doador saudável, como controle da reação. Gostaríamos de ressaltar que o tempo de incubação das culturas somente era o mesmo dentro da mesma bateria, porém variou de uma bateria para outra.

A figura 5 mostra um núcleo intérfasico do controle 1 após hibridação com a sonda alféide do cromossomo 7.

Figura 5: Os sinais amarelos representam o cromossomo 7 após hibridação com a sonda alfa para este cromossomo.

A tabela 5 apresenta o número médio de núcleos nas diferentes categorias de marcação (núcleos sem sinal, com um sinal, com dois sinais e com três ou mais sinais), após hibridação com a sonda alfoíde do cromossomo 7.

Tabela 5: Número de núcleos após hibridação com a sonda alfoíde do cromossomo 7 observados no controle 1 (interno) sem ou com sinais em 12 baterias.

Bateria	Número de núcleos observados (total de 300 núcleos)							
	0 sinal		1 sinal		2 sinais		3 ou + sinais	
	Obs.	Obs.	Obs.	Obs.	Obs.	Obs.	Obs.	Obs.
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	4	2	13	12	283	282	3	4
2	2	0	8	6	286	292	4	2
3	0	5	10	13	288	279	2	3
4	0	7	14	10	286	289	0	1
5	0	4	12	7	285	288	3	3
6	3	1	10	6	284	292	3	1
7	0	1	6	1	294	298	0	0
8	0	0	9	5	290	295	1	0
9	0	2	8	4	290	293	2	1
10	1	2	4	2	295	294	0	2
11	1	0	6	8	292	291	1	1
12	1	2	11	12	287	278	1	8

Obs.: observador

Após a análise das 12 baterias, o número de núcleos (num total de 300 núcleos) observados sem nenhuma marcação (0 sinal) foi de 0 a 4 para o primeiro observador e 0 a 7 para o segundo observador. Em relação à monossomia do 7 (apenas um sinal observado) os números variaram de 4 a 14 núcleos observados com esta alteração para o primeiro observador e 1 e 13 núcleos para o segundo observador, não ultrapassando o índice de até 5%, indicado pelo fabricante para a validação do teste, para nenhum dos

dois observadores. Para os núcleos considerados sem monossomia ou trissomia do 7 (2 sinais), os números variaram entre 283 a 295 para o primeiro observador e 282 a 295 para o segundo observador. Quanto aos núcleos com trissomia ou tetrassomia do cromossomo 7 (3 ou mais sinais), o primeiro observador verificou de 0 a 4 núcleos com esta alteração enquanto que o segundo observador verificou de 0 a 8 núcleos tri ou tetrassômicos.

Foi realizado, também, "FISH" para o cromossomo 7 nos outros quatros controles com lâminas preparadas a partir de cultura de medula óssea. Foram realizadas culturas diretas, de 24h, 48h e 72h, separadamente. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Número de núcleos após hibridação com a sonda alféide do cromossomo 7 observados nos quatros controles, sem ou com sinais, em cultura direta.

	Número de núcleos observados (total de 300 núcleos)							
	0 sinal		1 sinal		2 sinais		3 ou + sinais	
	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2
1	3	4	7	5	288	290	2	1
2	3	5	5	5	290	287	2	3
3	1	2	4	3	295	295	0	0
4	2	4	6	4	289	291	3	1

Tabela 7: Número de núcleos após hibridação com a sonda alféide do cromossomo 7 observados nos quatros controles, sem ou com sinais, em cultura de 24h.

	Número de núcleos observados (total de 300 núcleos)							
	0 sinal		1 sinal		2 sinais		3 ou + sinais	
	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2
1	6	6	3	4	290	289	1	1
2	7	5	4	6	286	288	3	1
3	7	4	5	8	289	287	0	1
4	4	3	2	3	293	292	1	2

Tabela 8: Número de núcleos após hibridação com a sonda alfoíde do cromossomo 7 observados nos quatros controles, sem ou com sinais, em cultura de 48h.

Controles	Número de núcleos observados (total de 300 núcleos)							
	0 sinal		1 sinal		2 sinais		3 ou + sinais	
	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2
1	7	7	10	9	280	282	3	2
2	5	8	5	5	288	285	2	2
3	3	3	8	4	287	291	2	2
4	4	5	11	10	286	284	0	1

Tabela 9: Número de núcleos após hibridação com a sonda alfoíde do cromossomo 7 observados nos quatros controles, sem ou com sinais, em cultura de 72h.

Controles	Número de núcleos observados (total de 300 núcleos)							
	0 sinal		1 sinal		2 sinais		3 ou + sinais	
	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2
1	6	5	6	4	288	290	0	1
2	3	4	7	7	288	286	2	3
3	3	5	5	4	291	291	1	0
4	4	4	6	7	287	285	3	4

Ao compararmos a análise do “FISH” para a monossomia do 7 nos quatro pacientes controles, não observamos diferença significativa entre os vários tempos de cultura (direta, 24h, 48h e 72h), sendo o desvio padrão (DP) sempre menor que 1,0.

A figura 6 apresenta núcleo interfásico do controle 1 após hibridação com a sonda alfoíde do cromossomo 8.

Figura 6: Os sinais em amarelo representam o cromossomo 8 após hibridação com sonda alfaíde para este cromossomo.

O número de núcleos observados por categoria de marcação (sem sinal, 1 sinal, 2 sinais, 3 ou mais sinais) após a hibridação com a sonda alfaíde do cromossomo 8 é apresentado na tabela 10.

Tabela 10: Número de núcleos observados no controle (1) interno sem ou com sinais em 13 baterias com a sonda alfaíde do cromossomo 8.

Bateria	Número de núcleos observados (total de 300 núcleos)							
	0 sinal		1 sinal		2 sinais		3 ou + sinais	
	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2
1	1	2	7	8	289	288	3	2
2	1	0	3	0	294	299	3	1
3	0	0	8	0	289	298	3	3
4	0	0	11	1	288	291	1	8
5	2	2	5	7	292	291	1	0
6	0	0	4	1	293	299	3	0
7	1	0	5	0	294	300	1	0
8	0	0	5	4	295	296	0	0
9	0	0	2	1	297	298	1	1
10	0	0	6	0	294	298	0	2
11	2	0	5	2	292	294	1	4
12	0	0	5	1	294	299	1	0
13	1	1	8	4	290	294	0	1

Obs: observador

Após a análise das 13 baterias, o número de núcleos sem nenhuma marcação (0 sinal), num total de 300 núcleos analisados, tanto para o primeiro observador como para o segundo foi de 0 a 2 núcleos. Para a monossomia do 8 (1 sinal), os números dos núcleos observados variaram de 0 a 11 para o observador 1 e 0 a 8 para o observador 2. Quanto aos núcleos normais (2 sinais), o primeiro observador verificou de 288 a 297 núcleos enquanto que o segundo observador verificou de 288 a 300 núcleos. Em relação à trissomia ou tetrassomia do cromossomo 8 (3 ou mais sinais), os números observados foram de 0 a 3 núcleos para o observador 1 e 0 a 8 para o observador 2.

Também realizamos “FISH” com a sonda alfoíde do cromossomo 8 com lâminas preparadas a partir de culturas com diferentes tempos de incubação para os outros quatro controles, como foi realizado para o cromossomo 7, e os resultados estão apresentados nas próximas tabelas.

Tabela 11: Número de núcleos após hibridação com a sonda alfoíde do cromossomo 8 observados nos quatros controles, sem ou com sinais, em cultura direta.

Controles	Número de núcleos observados (total de 300 núcleos)							
	0 sinal		1 sinal		2 sinais		3 ou + sinais	
	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2
1	1	0	3	4	296	296	1	1
2	2	0	5	5	292	295	1	0
3	5	6	6	7	286	285	3	2
4	7	5	4	6	288	286	1	3

Tabela 12: Número de núcleos após hibridação com a sonda alfoíde do cromossomo 8 observados nos quatros controles, sem ou com sinais, em cultura de 24h.

Controles	Número de núcleos observados (total de 300 núcleos)							
	0 sinal		1 sinal		2 sinais		3 ou + sinais	
	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2
1	0	1	2	4	295	294	3	1
2	0	0	2	3	297	295	1	2
3	3	2	1	2	294	293	2	3
4	4	3	4	5	289	290	3	2

Tabela 13: Número de núcleos após hibridação com a sonda alfoíde do cromossomo 8 observados nos quatros controles, sem ou com sinais, em cultura de 48h.

	Número de núcleos observados (total de 300 núcleos)							
	0 sinal		1 sinal		2 sinais		3 ou + sinais	
	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2
Controle externo								
1	6	5	9	5	281	287	4	3
2	3	4	4	6	290	288	3	2
3	1	0	8	7	289	291	2	2
4	3	2	11	13	288	284	2	1

Tabela 14: Número de núcleos após hibridação com a sonda alfoíde do cromossomo 8 observados nos quatros controles, sem ou com sinais, em cultura de 72h.

	Número de núcleos observados (total de 300 núcleos)							
	0 sinal		1 sinal		2 sinais		3 ou + sinais	
	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2
Controles								
1	1	0	0	2	298	297	1	1
2	1	1	4	3	295	294	0	2
3	3	4	5	4	290	291	2	1
4	5	4	7	5	287	291	1	0

Após a comparação por “FISH” da trissomia do 8 nos controles (n=4), não observamos diferença significativa entre os tempos de cultura (direta, 24h, 48h e 72h), com um DP<1,0.

4. Características da amostra quanto à técnica de “FISH”

As figuras 5 e 6 representam núcleos interfásicos de controles e pacientes após a hibridação com a sonda alfoíde do cromossomo 7 do do cromossomo 8, respectivamente.

Como resultado da "FISH" tanto para o cromossomo 7 como para o cromossomo 8, consideramos sem alterações as amostras que apresentaram índice de monossomia do 7 ou trissomia do 8 inferior ou igual a 5%. As que apresentaram índices superiores a este valor foram considerados como apresentando uma destas alterações, ou ambas. A figura 7a apresenta núcleos do paciente 5 (normal) após hibridação, onde podemos observar 2 sinais em cada núcleo intacto e cada sinal representa um cromossomo 7 hibridado com a sonda e a figura 7b apresenta núcleos do paciente 14, tanto com um sinal, indicando a presença de apenas um cromossomo 7, como com dois sinais; portanto este paciente apresenta monossomia do 7 em 11,66% dos 300 núcleos analisados.

Figura 7: Os sinais em amarelo representam o cromossomo 7 após hibridação com sonda alfaíde para este cromossomo.

- a) Paciente 5 (normal) com duas marcações por núcleo inteiro;
- b) Paciente 14 (com monossomia) com núcleos com uma e com duas marcações.

Com a utilização da sonda alfoide do cromossomo 7, tanto o primeiro como o segundo observador verificaram a existência de 6 pacientes com monossomia deste cromossomo (pacientes 6, 9, 11, 14, 16, 28). Estes resultados podem ser observados na tabela 16.

Os pacientes 2 e 13 não foram avaliados pela citogenética convencional devido à ausência de metáfases e também não puderam ser avaliados pela técnica de “FISH” para o cromossomo 7 devido à falta de material (núcleo interfásico) necessário para a realização desta técnica, porém ambos puderam ser avaliados por “FISH” para o cromossomo 8, e não apresentaram alteração numérica para este cromossomo.

Tabela 15: Número de núcleos observados nas lâminas dos pacientes preparadas com a sonda alfoide do cromossomo 7.

Número de núcleos observados (total de 300 núcleos)								
Pacientes	0 sinal		1 sinal		2 sinais		3 ou + sinais	
	Obs. 1	Obs. 2	Obs.1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2
1	0	0	13	7	286	293	1	0
2	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
3	2	2	11	11	286	286	1	1
4	0	0	10	10	289	289	1	1
5*	1	0	11	7	288	292	3	3
6	5	5	175	168	119	127	1	0
7	0	0	8	0	291	300	1	0
8	0	0	4	0	293	299	1	1
9	4	7	66	61	227	230	3	2
10	0	0	4	3	295	296	1	1
11	0	0	154	160	146	136	0	4
12	1	0	7	9	289	285	3	6
13	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
14*	4	3	35	43	245	242	4	2
15	0	2	12	9	287	288	1	1
16	0	0	26	29	272	269	2	2
17	1	0	9	12	287	244	3	1
18	0	0	7	6	292	293	1	1
19	0	1	12	7	286	288	2	4
20	0	3	10	4	288	290	2	3
21	1	0	7	9	292	291	0	0
22	0	1	4	10	296	289	0	0
23	1	0	8	1	289	289	2	1
24	0	4	5	3	295	291	0	2
25	0	1	0	1	300	298	0	0
26	1	1	1	1	298	297	0	1
27	0	0	1	0	299	300	0	0
28	0	1	208	200	92	99	0	0

SR: sem resultado; Obs.: observador; *: as hibridações com a sonda do cromossomo 7 para os pacientes 5 e 14 estão representadas nas figuras 5-a e 5-b, respectivamente.

A figura 8a mostra os núcleos do paciente 1 (normal) após hibridação com a sonda alféide do cromossomo 8 com dois sinais, cada um deles representando um cromossomo 8. A figura 8b apresenta núcleos do paciente 9, sendo um com três sinais, representando três cromossomos 8, e um núcleo com dois sinais, representando um núcleo normal (com dois cromossomos 8); sendo assim, este paciente apresenta trissomia do cromossomo 8 em 14% dos 300 núcleos analisados para este paciente.

Para o cromossomo 8, observaram-se 2 pacientes (9 e 14) com trissomia, como mostra a tabela 16.

Figura 8: Os sinais em amarelo representam o cromossomo 8 após hibridação com sonda alfoide para este cromossomo.

- a) Paciente 1 (normal) com duas marcações por núcleo inteiro;
- b) Paciente 9 (com trissomia) com um núcleo com duas e um núcleo com três marcações .

Tabela 16: Número de núcleos observados nas lâminas dos pacientes preparadas com a sonda alfoíde do cromossomo 8.

Paciente	Número de núcleos observados (total de 300 núcleos)							
	0 sinal		1 sinal		2 sinal		3 ou + sinais	
	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 2
1*	0	0	10	2	288	295	2	3
2	4	0	10	3	284	295	2	2
3	0	0	4	4	295	296	1	0
4	0	0	10	7	290	293	0	0
5	0	0	6	1	293	293	1	6
6	2	2	15	12	281	281	2	5
7	0	2	7	1	292	294	1	1
8	1	0	4	1	294	299	1	0
9*	0	0	3	6	256	260	42	34
10	0	0	5	5	291	295	4	0
11	0	0	2	1	288	293	10	6
12	2	0	7	4	290	296	1	0
13	0	0	2	3	297	295	1	2
14	2	2	11	10	145	150	140	134
15	0	0	3	2	293	295	4	3
16	0	0	7	3	289	294	4	3
17	0	0	7	2	288	298	5	0
18	0	0	7	0	291	299	2	1
19	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
20	0	0	3	0	295	296	2	4
21	1	0	6	8	293	290	0	2
22	1	0	5	5	294	294	0	1
23	3	0	6	3	291	294	0	3
24	0	0	1	3	299	296	0	1
25	0	1	0	1	300	297	0	1
26	0	0	2	0	298	300	0	0
27	0	0	2	1	298	299	0	0
28	0	0	3	1	296	292	1	7

SR: sem resultado; **Obs.:** observador; *: as hibridações com a sonda do cromossomo 8 para os pacientes 1 e 9 estão representadas nas figuras 6-a e 6-b, respectivamente.

O paciente 19 não pôde ser avaliado por “FISH” para o cromossomo 8 devido à falta de material, porém foi analisado pela citogenética convencional (cariótipo normal em 7 metáfases observadas – 46,XX) e por “FISH” para o cromossomo 7, não apresentando alteração numérica para este cromossomo.

A tabela 17 apresenta um resumo dos dados relacionados à idade, sexo, classificação FAB, citogenética convencional, “FISH” e evolução para LMA e óbito dos pacientes estudados.

Tabela 17: Comparação entre as técnicas de Citogenética Convencional (bandamento) e Citogenética molecular ("FISH"), a classificação FAB, a evolução para LMA e tempo de sobrevida .

Paciente	Idade	Sexo	Sub-grupo	Citogenética	"FISH"		Evolução para LMA	Óbito
					$\alpha 7$	$\alpha 8$		
1	63	M	AR	Normal	N	N	N	N
2	74	M	AR	ATM	SR		N	N
3	81	F	AREB	Normal	N	N	S	S
4	54	F	AREBT	ATM	N	N	S	N
5	60	F	AREBT	ATM	N	N	N	S
6	49	M	AREBT	Normal	S	N	S	S
7	26	M	AREBT	Normal	N	N	N	S
8	48	M	ARSA	ATM	N	N	N	S
9	71	M	AREBT	+8	S	S	S	S
10	63	F	AREB	ATM	N	N	N	N
11	50	M	AREB	ATM	S	N	N	S
12	78	M	ARSA	ATM	N	N	N	S
13	76	F	AR	ATM	SR	N	N	S
14	47	M	AREBT	-7/+8	S	S	N	S
15	60	M	AR	Normal	N	N	N	S
16	24	F	AR	Normal	S	N	N	N
17	69	F	AR	Normal	N	N	N	N
18	47	F	AREB	Normal	N	N	N	N
19	81	F	AREB	NormalL	N	SR	N	S
20	56	F	AR	Normal	N	N	N	N
21	19	M	AR	Normal	N	N	N	N
22	65	F	LMMC	ATM	N	N	N	S
23	68	M	AR	Normal	N	N	N	N
24	70	M	AR	Normal	N	N	N	N
25	59	M	AR	Normal	N	N	N	S
26	72	M	ARSA	Normal	N	N	S	S
27	62	M	LMMC	Normal	N	N	N	N
28	59	M	AREB	Normal	S	N	N	N

M: masculino; **F:** feminino; **AR:** anemia refratária; **AREB:** anemia refratária com excesso de blastos; **AREBT:** anemia refratária com excesso de blastos em transformação; **ARSA:** anemia refratária com sideroblastos em anel; **LMMC:** leucemia mielomonocítica crônica; **Normal:** cariótipo normal somente em relação à -7 ou +8, podendo apresentar outras alterações citogenéticas; **ATM:** ausência total de metáfases; **N:** não; **S:** sim; **SR:** sem resultado.

5. Comparação entre a classificação FAB, o sexo e os achados citogenéticos (banda G e “FISH”)

A relação da classificação FAB, sexo e achados citogenéticos da nossa amostra pode ser observada na tabela 18.

Tabela 18: Comparação entre a classificação FAB, o sexo e os achados citogenéticos (banda G e “FISH”).

	M	F	ATM	Cariótipo N	Cariótipo A	Cariótipo com mosaicism	0	-7	+8
AR	7	4	2	7	1	1	1	1	0
ARSA	3	0	2	1	0	0	0	0	0
AREB	2	4	2	1	2	1	1	2	0
AREBT	4	2	2	2	1	1	1	3	2
LMMC	1	1	1	1	1	0	0	0	0

M: masculino; **F:** feminino; **ATM:** ausência total de metáfases; **N:** normal; **A:** anormal; monossomia do cromossomo 7; **+8:** trissomia do cromossomo 8; **AR:** anemia refratária; **ARSA:** anemia refratária com sideroblastos em anel; **AREB:** anemia refratária com excesso de blastos; **AREBT:** anemia refratária com excesso de blastos em transformação; **LMMC:** leucemia mielomonocítica crônica.

6. Análise Estatística

6.1. Comparação entre os resultados obtidos com a técnica de “FISH” pelos dois observadores

Inicialmente, estudamos a concordância dos dois observadores em relação à utilização da técnica de “FISH” para avaliar as alterações cariotípicas dos cromossomos 7 e 8.

A repetibilidade da técnica foi avaliada por meio do coeficiente de correlação intraclass e seu intervalo de confiança de 95% (I.C. 95%). De forma complementar, as médias dos observadores foram comparadas utilizando-se o teste “t” pareado.

O coeficiente de correlação intraclass estimado para monossomia do cromossomo 7 foi de 0,997 (I.C.95%: 0,995 ; 0,999), e para trissomia do

cromossomo 8 foi de 0,993 (I.C.95%: 0,988 ; 0,998). Estes resultados indicam alta concordância entre as contagens dos dois observadores.

Figura 7: Gráfico de dispersão dos valores obtidos por dois observadores.

6.2. Comparação entre as técnicas de Citogenética Convencional (banda G) e “FISH”.

Com o objetivo de comparar as técnicas de citogenética convencional e “FISH” foram criadas duas novas variáveis com base na média dos dois observadores, tanto para a monossomia do cromossomo 7 quanto para a trissomia do cromossomo 8. Em seguida, foram calculadas as porcentagens observadas em 300 cada núcleos, e então, essas variáveis foram classificadas em normal (para os valores de “FISH” $\leq 5\%$) ou anormal (para valores de “FISH” $> 5\%$).

Os pacientes com ausência total de metáfases (ATM) para citogenética convencional (n=9) foram desconsiderados dessa análise por não serem comparáveis com os resultados de “FISH”, pois estes não

apresentarem cariótipo. Dentre eles, dois pacientes não foram analisados para o cromossomo 7 por “FISH” e também não apresentaram análise cariotípica (ATM). Além disso, um paciente com padrão cariotípico normal não foi analisado para o cromossomo 8 por “FISH”.

A Tabela 19 apresenta a frequência observada entre citogenética convencional e “FISH”. No caso da monossomia do cromossomo 7, a proporção observada de resultados normais foi de 73,7% para a técnica de “FISH” e de 94,7% para a citogenética convencional. Essas porcentagens não são significativamente diferentes, com $p=0,125$. No caso da trissomia do cromossomo 8, os resultados foram idênticos para as duas técnicas, sendo a proporção de resultados normais igual a 88,9%.

Tabela 19: Comparação das frequências observadas entre alterações cromossômicas detectadas pela citogenética convencional (banda G) e pelo “FISH”.

	BANDA		
	FISH	normal	Anormal
Monossomia do 7 <i>*(p = 0,125)</i>			Total
	normal	14	0
	anormal	4	1
	Total	18 (94,7%)	1 (5,3%)
Trissomia do 8 <i>*(p > 0,99)</i>			Total
	normal	16	0
	anormal	0	2
	Total	16 (88,9%)	2 (11,1%)

* Valor de p para o teste McNemar.

6.3. Comparação entre a técnica de “FISH” e o resultado do prognóstico.

Pa avaliação do prognóstico, dividimos nossa amostra em 2 grupos: *bom prognóstico*, os pacientes com AR ou ARSA e *mau prognóstico* os demais da classificação FAB (AREB, AREBT e LMMC).

De acordo com a tabela 20, a porcentagem de indivíduos que possuíam prognóstico bom foi de 55,0% (11 em 20) para aqueles sem

monossomia do 7 e 16,7% (1 em 6) para aqueles com monossomia deste cromossomo. Em relação ao mau prognóstico, a porcentagem foi de 45% (9 em 20) para aqueles sem monossomia do 7 e de 83,3% para aqueles como monossomia.

No caso da trissomia do cromossomo 8, a porcentagem de indivíduos que possuíam prognóstico bom foi de 56,0% (14 em 25) para aqueles sem trissomia e 0,0% (0 em 2) para aqueles com trissomia deste cromossomo. Quanto a porcentagem de indivíduos sem a trissomia do 8 com mau prognóstico, esta foi de 40% (11 em 25) e para aqueles com a trissomia foi de 100%.

A análise não indicou associações significantes entre “FISH” e prognóstico, tanto para a alteração do cromossomo 7 ($p = 0,170$) quanto para a alteração do cromossomo 8 ($p = 0,222$). Porém, que a nota-se que a monossomia do 7 foi observada em 83,3% dos pacientes de mau prognóstico e 16,7% nos pacientes de bom prognóstico.

Tabela 20: Frequência observada entre “FISH” e Prognóstico.

	Prognóstico			
	FISH	bom	mau	Total
Monossomia do 7 ($p = 0,170$)	normal	11 (55,0%)	9 (45,0%)	20 (100,0%)
	anormal	1 (16,7%)	5 (83,3%)	6 (100,0%)
	Total	12 (46,2%)	14 (53,8%)	26 (100,0%)
	Prognóstico			
	FISH	bom	mau	Total
Trissomia do 8 ($p = 0,222$)	normal	14 (56,0%)	11 (44,0%)	25 (100,0%)
	anormal	0 (0,0%)	2 (100,0%)	2 (100,0%)
	Total	14 (51,9%)	13 (48,1%)	27 (100,0%)

Valor de p para o teste exato de Fisher.

6.4 Análise de sobrevida

A seguir são apresentados os resultados da análise de sobrevida considerando dois tempos de falha, isto é, *tempo até a evolução para LMA* e *tempo até o óbito* (no total, segundo prognóstico e segundo alteração dos cromossomos 7 e 8). Foram considerados também, dois momentos iniciais para o estudo, são eles: *exame* e *diagnóstico da doença*.

O método utilizado foi o de Kaplan-Meier. Este método é indicado para situações onde o período de observação é limitado, tendo uma data fixa para seu término, embora os pacientes entrem no estudo em diferentes momentos (Lee, 1980). Com este método, podemos utilizar informações pertencentes a indivíduos que morreram ou permaneceram vivos, sendo que para os indivíduos vivos ou que abandonaram o tratamento, o tempo exato de sobrevivência é desconhecido, e estes dados são considerados como informações censuradas. Em relação às estimativas de sobrevida, foram utilizados o tempo de seguimento dos pacientes até o momento do óbito, ou, no caso das informações censuradas, até a última data da consulta.

6.4.1. Tempo do diagnóstico e do exame citogenético até a evolução para LMA

A tabela 21 apresenta valores da média, mediana e respectivos intervalos de confiança de 95% (I.C.95%) para o tempo de sobrevida até a evolução para LMA (no total, segundo prognóstico e segundo alteração dos cromossomos 7 e 8). As curvas de KM construídas para cada caso são apresentadas nas Figuras de 8 até 15. As marcações feitas ao longo das curvas indicam a ocorrência de censuras. Observações censuradas são aquelas cujo tempo de falha não é conhecido, sabendo-se porém que ele excedeu um certo valor. De uma forma geral, o tempo médio do diagnóstico até a evolução para LMA foi de 1464 dias (48,8 meses) (I.C.95%: 1110 ; 1819).

A figura 14 mostra que após 500 dias do diagnóstico da doença 77,2% dos pacientes ainda não tinham evoluído para LMA, isto é, segundo o estimador KM, a probabilidade de um paciente evoluir para LMA após 500

dias do diagnóstico é de 77,2%. Tomando como exemplo o tempo do diagnóstico até a evolução para LMA segundo prognóstico (figura 10), conclui-se que o tempo médio de sobrevida dos pacientes foi de 1825 dias (60,8 meses) (I.C.95%: 1605 ; 2044) para aqueles com *bom* prognóstico e de 610 dias (20,3 meses) (I.C.95%: 246 ; 973) para aqueles com *mal* prognóstico. Entre os pacientes com *bom* prognóstico, menos de 50% evoluíram para LMA até a data do término do acompanhamento. Já no caso dos pacientes com *mau* prognóstico, 50% haviam evoluído após 427 dias (14,2 meses) do diagnóstico.

O teste log-rank indicou diferenças significantes entre as curvas de sobrevida estimadas para os pacientes com bom e mau prognóstico (ver Figuras 10 e 11). Este resultado foi observado considerando o tempo do diagnóstico até LMA ($p = 0,003$) e o tempo do exame citogenético até LMA ($p = 0,015$).

O teste log-rank não indicou diferenças significantes entre as curvas de sobrevida estimadas para os pacientes *com* ou *sem* alterações do cromossomo 7 (ver Figuras 12 e 13). Este resultado foi observado tanto no caso do tempo do diagnóstico até LMA ($p = 0,096$) quanto no caso do tempo do exame citogenético até LMA ($p = 0,116$). Entretanto, 50% dos pacientes com monossomia do 7 evoluíram para LMA em 216 dias (7,2 meses) e após término do seguimento, 65% dos pacientes sem monossomia do cromossomo 7 não haviam evoluído para LMA. Em relação à trissomia do cromossomo 8, a análise ficou prejudicada devido ao número pequeno de pacientes com esta alteração (2 indivíduos).

Tabela 21: Valores da média e mediana (em dias) obtidas da análise de sobrevida até a evolução para LMA.

Tempo (em dias) do diagnóstico até a evolução para LMA		n	c	Média (I.C. 95%)	Mediana (I.C.95%)
Total		28	23	1464 (1110 ; 1819)	-
Prognóstico	bom	14	13	1825 (1605 ; 2044)	-
	mal	14	10	610 (246 ; 973)	427 (0 ; 860)
<i>p = 0,003</i>					
Monossomia do Cromossomo 7 "FISH"	normal	20	17	1539 (1149 ; 1928)	-
	anormal	6	4	546 (0 ; 1158)	216 (54 ; 378)
<i>p = 0,096</i>					
Trissomia do Cromossomo 8 "FISH"	normal	25	21	1519 (1162 ; 1877)	-
	anormal	2	1	216 (-)	216 (-)
Tempo (em dias) do exame até a evolução para LMA		n	c	Média (I.C. 95%)	Mediana (I.C.95%)
Total		28	23	1011 (786 ; 1236)	-
Prognóstico	bom	14	13	1223 (1067 ; 1380)	-
	mal	14	10	590 (211 ; 968)	427 (0 ; 890)
<i>p = 0,015</i>					
Monossomia do Cromossomo 7	normal	20	17	1019 (825 ; 1213)	-
	anormal	6	4	543 (0 ; 1157)	207 (60 ; 354)
<i>p = 0,116</i>					
Trissomia do Cromossomo 8	normal	25	21	1051 (828 ; 1273)	-
	anormal	2	1	207 (-)	207 (-)

n: número total de observações; c: número de dados censurados; I.C.95%: intervalo de confiança de 95%; Valor de p para o teste log-rank.

Figura 8: Curva de Kaplan-Meier para o tempo do diagnóstico até a evolução para LMA.

Figura 9: Curva de Kaplan-Meier para o tempo do exame até a evolução para LMA.

Figura 10: Curvas de Kaplan-Meier para o tempo do diagnóstico até a evolução para LMA.

$p = 0,003$

Figura 11: Curvas de Kaplan-Meier para o tempo do exame até a evolução para LMA.

$p = 0,015$

Figura 12: Curvas de Kaplan-Meier para o tempo do diagnóstico até a evolução para LMA.

$p=0,096$

Figura 13: Curvas de Kaplan-Meier para o tempo do exame até a evolução para LMA.

$p=0,116$

Figura 14: Curvas de Kaplan-Meier para o tempo do diagnóstico até a evolução para LMA.

Figura 15: Curvas de Kaplan-Meier para o tempo do exame até a evolução para LMA.

6.4.2. Tempo do diagnóstico e do exame citogenético até o óbito

A Tabela 22 apresenta valores da média, mediana e respectivos I.C.95% para o tempo de sobrevida até o óbito (no total, segundo prognóstico e segundo alteração dos cromossomos 7 e 8). As curvas de KM construídas para cada caso são apresentadas nas Figuras de 16 até 22.

De uma forma geral, o tempo médio do diagnóstico até o óbito foi de 979 dias (32,6 meses) (I.C.95%: 668 ; 1289) e o tempo mediano foi de 957 (31,9 meses) dias (I.C.95%: 261 ; 1653), isto é, estima-se que 50% dos pacientes morrem após 957 dias (31,9 meses) do diagnóstico (ver Figura 16).

O teste log-rank indicou diferenças significantes entre as curvas de sobrevida estimadas para os pacientes com bom e mau prognóstico (ver Figuras 16 e 19). Este resultado foi observado considerando o tempo do diagnóstico até o óbito ($p = 0,015$) e o tempo do exame citogenético até o óbito ($p = 0,049$).

O teste log-rank não mostrou fortes evidências de diferenças entre as curvas de sobrevida estimadas para os pacientes com ou sem alterações do cromossomo 7 (ver Figuras 14 e 15). Este resultado foi observado tanto no caso do tempo do diagnóstico até óbito ($p = 0,078$) quanto no caso do tempo do exame citológico até óbito ($p = 0,117$). Porém, 50% dos pacientes com monossomia do cromossomo 7 foram a óbito em 122 dias enquanto que 65% dos pacientes com omonossomia do 7 não haviam ido a óbito até o final do seguimento.

Tabela 22: Valores da média e mediana (em dias) obtidas da análise de sobrevida até o óbito por LMA.

Tempo (em dias) do Diagnóstico até óbito		n	c	Média (I.C. 95%)	Mediana (I.C.95%)
Total		28	13	979 (668 ; 1289)	957 (261 ; 1653)
Prognóstico	bom	14	8	1328 (960 ; 1696)	1642 (905 ; 2379)
	mau	14	5	557 (207 ; 907)	270 (30 ; 510)
<i>p = 0,015</i>					
Monossomia do Cromossomo 7	normal	20	10	1087 (736 ; 1439)	1048 (426 ; 1670)
	anormal	6	2	329 (0 ; 761)	122 (0 ; 341)
<i>p = 0,078</i>					
Trissomia do Cromossomo 8	normal	25	13	1071 (738 ; 1404)	1048 (111 ; 1985)
	anormal	2	0	70 (0 ; 172)	18 (-)

Tempo (em dias) do Exame até óbito		n	c	Média (I.C. 95%)	Mediana (I.C.95%)
Total		28	13	783 (532 ; 1035)	634 (309 ; 959)
Prognóstico	bom	14	8	923 (686 ; 1160)	1048 (420 ; 1676)
	mau	14	5	517 (171 ; 863)	266 (135 ; 397)
<i>p = 0,049</i>					
Monossomia do Cromossomo 7	normal	20	10	884 (597 ; 1171)	901 (266 ; 1536)
	anormal	6	2	357 (0 ; 782)	175 (0 ; 508)
<i>p = 0,117</i>					
Trissomia do Cromossomo 8	normal	25	13	842 (568 ; 1117)	634 (332 ; 936)
	anormal	2	0	142 (0 ; 385)	18 (-)

n = número total de observações, c = número de dados censurados; I.C.95%: intervalo de confiança de 95%; Valor de p para o teste log-rank.

Figura 16: Curva de Kaplan-Meier para o tempo do diagnóstico até o óbito.

Figura 17: Curva de Kaplan-Meier para o tempo do exame até o óbito.

Figura 18: Curvas de Kaplan-Meier para o tempo do diagnóstico até o óbito.

$p=0,015$

Figura 19: Curvas de Kaplan-Meier para o tempo do exame até o óbito.

$p=0,049$

Figura 20: Curvas de Kaplan-Meier para o tempo do diagnóstico até o óbito.

Figura 21: Curvas de Kaplan-Meier para o tempo do exame até o óbito.

Figura 22: Curvas de Kaplan-Meier para o tempo do exame até o óbito.

Figura 23: Curvas de Kaplan-Meier para o tempo do diagnóstico até o óbito.

DISCUSSÃO

V- DISCUSSÃO

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são doenças clonais, que se originam em células hemopoéticas totipotentes, com distúrbio na proliferação e perda da maturação celular, podendo apresentar-se de formas variadas e com evolução clínica diversificada. O diagnóstico destas doenças nem sempre é fácil e baseia-se na avaliação clínica do paciente e na análise morfológica do aspirado de medula óssea e sangue periférico.

Seu prognóstico leva em conta variáveis clínicas, cito-histológicas, bioquímicas, citogenéticas e moleculares e muitos estudos vêm sendo realizados visando identificar melhor estas variáveis (Tricot *et al*, 1985; Bartran *et al*, 1996; Greenberg *et al*, 1997).

Uma vez que, após a análise morfológica de células do sangue periférico e medula óssea, o estudo citogenético é o exame mais importante para diagnóstico e para determinação do prognóstico de indivíduos com SMD (Koeffler, 1996), é muito importante a escolha do método para avaliar estas alterações cromossômicas e genéticas, e isto depende do tipo de alteração a ser pesquisada.

Atualmente, vários métodos estão disponíveis para o estudo destas alterações, como citogenética convencional (por bandamento), "FISH", hibridação genômica comparativa (CGH), cariotipagem espectral (SKY), dentre outras. Cada um deles apresenta suas vantagens e desvantagens (Nacheva *et al.*, 1995).

Em relação à utilidade da citogenética convencional (banda) e molecular ("FISH", entre outras), estas duas técnicas muito têm contribuído para os estudos da patogênese das doenças onco-hematológicas, sendo úteis ao diagnóstico, nas suspeitas das neoplasias, para a definição da clonalidade, no prognóstico e para a escolha da terapêutica mais adequada. Durante a evolução da doença, a realização de estudos citogenéticos permite acompanhar a expansão clonal e monitorar a resposta terapêutica, permitindo a detecção precoce de recidivas (Chen *et al.*, 1993; Kasprzyk *et al.*, 1995).

Um dos objetivos deste trabalho foi comparar, em SMD-p, a frequência de alterações citogenéticas, monossomia do cromossomo 7 (-7) e trissomia do cromossomo 8 (+8) pelos métodos de citogenética convencional (banda G) e “FISH” em intérfase, para verificar a eficiência de ambos. Após esta comparação, verificou-se a associação da -7 e +8 detectados pelo método de “FISH” com os subtipos da classificação FAB e, posteriormente, correlacionou-se estas alterações com o risco de transformação leucêmica e sobrevida em SMD.

Para todas as reações de “FISH”, tanto para o cromossomo 7 como para o cromossomo 8, acrescentamos um controle interno para validar a reação. Também realizamos “FISH” nas amostras de quatro controles, após diferentes tempos de cultura, e comparamos os resultados. Não observamos diferenças significantes entre os resultados obtidos para a -7 e a +8 nos diferentes tempos de cultura (direta, 24h, 48h e 72h), com um desvio padrão sempre menor do que 1, sugerindo que o tempo em que células normais ficam em divisão não influencia na detecção destas anormalidades (-7 e +8). Acreditamos que o mesmo ocorra com nossos pacientes uma vez que SMD é uma doença clonal de “stem cell” totipotente e, com exceção dos linfócitos T, todas as outras células da medula óssea e sangue periférico apresentam a mesma anormalidade citogenética.

Nossa amostra apresentou 17 pacientes do sexo masculino e 11 pacientes do sexo feminino, com predomínio do sexo masculino numa relação de (1,5/1), concordando com Jacobs e colaboradores (1986).

Quanto a idade ao prognóstico, a mediana foi de 61 anos (19-81 e a média foi de 59 (DP=16), semelhante aos dados obtidos por outros autores (Knapp *et al.*, 1985; Jacobs, 1986; Romeo, 2000).

Em relação ao grupo FAB, tivemos 11 pacientes com AR (39,5%), 3 pacientes com ARSA (10,5%), 6 pacientes com AREB (21,5%), 6 pacientes com AREBT (21,5%) e 2 pacientes com LMMC (7%), sendo estes valores semelhantes ao da literatura (Greenberg *et al.*, 1997; Romeo, 2000).

Ao dividirmos os subtipos FAB em subtipos de bom prognóstico (AR+ARSA) e mau prognóstico (AREB+AREBT+LMMC) e avaliarmos

estatisticamente através do teste de Log-rank, observamos diferenças significantes entre as curvas de sobrevida tanto do tempo do diagnóstico até a evolução para LMA ($p=0,003$) quanto o tempo do exame citogenético até a LMA ($p=0,015$), indicando que a probabilidade de um paciente com mau prognóstico segundo a classificação FAB evoluir para LMA é muito maior do que os pacientes com bom prognóstico, como está descrito na literatura. Do tempo do diagnóstico até a evolução para a LMA o tempo médio de sobrevida foi de 1825 dias (60 meses) para aqueles com bom prognóstico e de 610 dias (20 meses) para aqueles de mau prognóstico. Menos de 50% dos pacientes com bom prognóstico evoluíram para LMA até o término do acompanhamento, enquanto que 50% dos pacientes já tinham evoluído após 427 dias (14 meses) do diagnóstico.

Quanto à análise citogenética convencional, dos 28 pacientes iniciais, 9 tiveram ausência total de metáfases (ATM) em suas culturas celulares e não puderam ser avaliados por este método. Este índice alto (32%) de pacientes com ATM provavelmente ocorreu porque na época em que estas culturas foram realizadas, esta metodologia estava começando a ser implantada no Laboratório de Citogenética da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo. Outras causas que contribuíram para este fato foram a dificuldade de obtenção de material para as culturas, devido a presença de fibrose na medula óssea e dificuldade de proliferação celular “in vitro”. Outras desvantagens da citogenética convencional é a necessidade de pessoal bem treinado, de material fresco e o longo tempo necessário para a análise (Kibbelaar *et al.*, 1993; Luke *et al.*, 1997).

O índice mínimo de metáfases a serem analisadas, segundo Hook (1997), é de 20, pois exclui estatisticamente 11% de mosaicismo com intervalo de confiança de 90%; o exame fica mais sensível conforme um número maior de células forem analisadas. Em relação à nossa amostra, dezenove pacientes apresentaram estudo citogenético por banda G, porém todos apresentaram um número menor do que 20 metáfases analisadas devido à escassez das mesmas, podendo assim deixar de detectar algum tipo de mosaicismo. Destes 19 pacientes analisados pela citogenética

clássica, 11 apresentaram cariótipo normal (58%; pacientes 1, 6, 15, 16, 17, 19, 21, 23, 25, 26 e 27), sendo que 7 deles pertenciam ao subtipo AR, um ARSA, um AREB, um AREBT e um do subtipo LMMC. Dos nove casos sem análise citogenética, dois eram do subtipo AR, dois ARSA, dois AREB, dois AREBT e um LMMC, não ocorrendo, aparentemente, nenhuma correlação entre a dificuldade de proliferação celular *in vitro* e os subtipos de pior prognósticos (AREBT), como sugerem alguns autores (Geddes e cols, 1990; Romeo, 2000).

Segundo Romeo (2000) e outros autores, apenas 17% de pacientes não têm sucesso na análise de citogenética convencional, o que é semelhante ao índice de outros autores (Knapp *et al*, 1985; Geddes *et al*, 1990), sendo muito inferior ao nosso índice (32,14%). Porém talvez isto pode ser explicado pela prática da metodologia já existente nos laboratórios onde estes trabalhos tenham sido realizados e também pelo fato de que eles realizaram segunda coleta em 30% dos casos (12 pacientes em 40), no caso de Romeo (2000). Não foi possível realizar este mesmo procedimento em nossa amostra.

Como dos vinte e oito pacientes iniciais, somente dezenove puderam ser avaliados pela citogenética convencional, destes, nove apresentaram anormalidades cromossômicas (42,10%), sendo compatível com alguns estudos onde as anormalidades cariotípicas são encontradas em 30 a 50% das SMD-p (Knapp *et al.*, 1985; Fenaux *et al.*, 1996; Mauritsson *et al.*, 1999; Romeo, 2000). Dentre as anormalidades cariotípicas encontradas em nossos pacientes temos: 5q- (15,79%), t(6;9) (5,26%), +8 (5,26%), 20q- (5,26%) e dois cariótipos complexos (10,53%).

Anormalidades citogenéticas não-randômicas como 5q-, -7 e +8 são achados comuns em pacientes com SMD (Tricot *et al*, 1985). Quando anormalidades citogenéticas estão presentes, a técnica de "FISH" usando sondas específicas têm sido muito útil. Sendo assim, a utilização da técnica de "FISH" tem aumentado com o passar dos anos e sua sensibilidade, rapidez de detecção e outras vantagens fizeram com que esta técnica também tenha sido muito utilizada na prática clínica. Esta técnica pode ser

realizada em menos de 24h e pode ser usada para a detecção de aneuploidias cromossômicas, como no nosso estudo, onde estudamos a -7 e +8. Uma das vantagens desta técnica é que ela permite uma análise retrospectiva. Em no nosso trabalho realizamos uma análise retrospectiva de material previamente preparado e congelado desde 1995.

No presente estudo, optamos por realizar a análise do “FISH” por dois observadores diferentes, para que esta pudesse ser mais confiável.

Ao compararmos estatisticamente através do coeficiente de correlação intraclass os resultados dos dois observadores para os cromossomo 7 e 8 separadamente, estes indicaram alta concordância, com um coeficiente de 0,997 para o cromossomo 7 e 0,993 para o cromossomo 8, indicando não haver diferença de observação entre os dois observadores, tanto para o cromossomo 7 quanto para o 8. Quanto à confiabilidade da técnica, Wyandt e colaboradores (1998) realizaram um estudo onde compararam o resultado do uso de sondas centroméricas do cromossomo 7 e do cromossomo 8 de vários lotes diferentes, marcados tanto com biotina como digoxigenina, do mesmo fabricante das sondas utilizadas em nosso trabalho (Oncor) e não houve diferença significativa nos resultados, comprovando a confiabilidade da técnica e do fabricante.

O valor de corte para as anormalidades citogenéticas por nós estudadas (-7 e +8) foi de 5% para ambas (encontrando-se entre os valores de corte descritos na literatura, que variam de 1% a 20% para a -7 e 1% a 6% para a +8 (Kibbelaar *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 1993; Flactif *et al.*, 1994; Wyandt *et al.*, 1998; Romeo, 2000). Para a -7, dos 26 pacientes analisados por “FISH”, 23,07% apresentaram esta alteração, sendo este índice maior do que o descrito na literatura (Fenaux *et al.*, 1996; Romeo, 2000) . Para o cromossomo 8 a frequência foi de 7,41%, sendo semelhante à literatura (Greenberg *et al.*, 1997; Romeo, 2000).

Para a comparação entre as técnicas de citogenética convencional (banda G) e “FISH”, alguns pacientes tiveram de ser excluídos do estudo por problemas técnicos. Os pacientes 2, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 13 e 22 foram excluídos por apresentarem ausência total de metáfase (ATM) e não ser

possível a obtenção de seus cariótipos. Dentre esses pacientes, dois também não puderam ser avaliados por “FISH” para o cromossomo 7 (paciente 2 e paciente 13), porque durante a padronização deste teste o material pré-congelado de ambos esgotou-se, sem que o teste funcionasse, porém estes dois pacientes foram avaliados por este método para o cromossomo 8, apresentando-se normais; eles não puderam ser avaliados quanto à citogenética convencional devido à ATM. Tivemos o mesmo problema para o paciente 19 quanto a realização da “FISH” para o cromossomo 8, embora este paciente tenha sido avaliado pela citogenética convencional e para a análise de “FISH” para o cromossomo 7, apresentando-se normal para ambas as técnicas.

Sendo assim, dos vinte e oito pacientes iniciais, a comparação entre a citogenética convencional e o “FISH” para o cromossomo 7 só pôde ser realizada em dezenove, e a mesma comparação para o cromossomo 8 foi realizada em dezoito pacientes.

A frequência observada da -7 foi de 26,3% para a técnica de “FISH” e 5,3% para a citogenética convencional, sendo a frequência de 26,3% maior do que a encontrada na literatura (15%) (Fenaux *et al.*, 1996), porém estas frequências não são estatisticamente diferentes, com $p=0,125$ (teste McNemar). Talvez isso tenha ocorrido porque o número de pacientes incluídos nesta comparação seja pequeno.

O fato do “FISH” ter detectado esta anomalia em cinco dos dezenove pacientes comparados enquanto que a citogenética convencional só detectou em um sugere que a “FISH” seria um método melhor para a detecção desta anomalia, por ser um método mais sensível, principalmente nas amostras mais pobres em metáfases, como sugere Kibbelaar e colaboradores (1993). Segundo Tanaka e colaboradores (1999), a redução da detecção da -7 pela citogenética convencional pode ser influenciada por dois fatores: a dificuldade das células com esta monossomia em se dividirem e aquelas que entram em mitose apresentam morfologia inadequada e não são selecionadas para análise.

Quanto à +8, os resultados foram iguais para as duas técnicas (dois pacientes apresentaram +8 tanto em banda G quanto no "FISH"), apresentando apenas uma frequência de 11,1%, sendo semelhante aos achados de outros autores (Carbonel *et al.*, 1982; Greenberg *et al.*, 1997; Romeo, 2000).

Gostaríamos de ressaltar que, embora a comparação entre a técnica de "FISH" e a citogenética convencional por análise estatística não tenha apresentado diferença significativa, uma das vantagens do "FISH" é que esta técnica permite analisar casos onde não foi possível a realização da citogenética convencional devido à ATM, como no caso do paciente 11, que não pôde ser avaliado pela citogenética convencional devido à ATM e o "FISH" detectou a -7.

Uma vez que para a realização do "FISH" necessitamos apenas do núcleo interfásico e não da célula em divisão, os dados citogenéticos podem ser obtidos de células que não estão em divisão ou que terminaram a diferenciação, dados confirmados por outros autores como Gozzetti (2000). A outra vantagem é que o "FISH" nos permite a análise de um número muito maior de células do que a citogenética convencional, podendo detectar anormalidades em alguns casos onde a citogenética não as detectou, como nos nossos pacientes 6, 9, 16 e 28 em que a -7 foi observada por "FISH" e não pela citogenética convencional.

Todas as alterações encontradas pela citogenética convencional quando pesquisadas por "FISH" também foram detectadas; entretanto, várias aberrações encontradas na citogenética convencional não podem ser pesquisadas por "FISH" ou necessitariam de múltiplas sondas específicas. Este fato mostra a limitação da "FISH", ou seja, esta técnica fornece apenas dados sobre o cromossomo ou região cromossômica em questão, não sendo um bom método para "screening" (Zhao *et al.*, 1993; Gozzetti, 2000).

Neste estudo o tempo médio de sobrevida até a evolução para LMA foi de 1464 dias (48,8 meses) e o tempo médio de sobrevida até o óbito foi de 979 dias (32,6 meses), sendo este valor maior do que alguns descritos na literatura: 23 meses (Mufti *et al.*, 1985), 15 meses (Sanz *et al.*, 1989), 19

meses (Velloso, 1996), porém comparável ao obtido por Romeo (2000) que foi de 36,4 meses. Este dado talvez seja justificado pela alta porcentagem de pacientes de bom prognóstico (AR + ARSA) (43%) em nossa amostra.

Ao compararmos os resultados da técnica de "FISH" (-7 e +8) com o prognóstico, apesar de não haver associação estatisticamente significativa, observou-se que os pacientes com monossomia do cromossomo 7 tinham um risco maior de evolução para LMA, observado em 5/6 (83,3%) pacientes com -7, sendo estes do subtipo AREBT (3 pacientes) e do subtipo AREB (dois pacientes). Não foi observado valores de significância para a trissomia do cromossomo 8 pelo fato presença de apenas dois pacientes serem portadores desta anomalia. Mais uma vez, o número pequeno de nossa amostra pode ter mascarado esta análise.

CONSIDERAÇÕES **FINAIS**

VI- CONSIDERAÇÕES FINAIS

- “FISH” é uma técnica altamente reprodutível;
- “FISH” é um método mais sensível que a citogenética convencional quando sabemos o cromossomo ou a região cromossômica envolvida, pois pode ser realizado em casos onde a citogenética de bandas não pode ser realizada por ausência de metáfase;
- “FISH” é uma técnica rápida e fácil de ser utilizada, após padronização.
- Como desvantagens, “FISH” é uma técnica molecular de alto custo e necessita da utilização de microscópio de fluorescência; além disso, infere informação apenas sobre a sequência alvo da hibridação;
- Apesar de não atingir a significância, a monossomia do 7 parece ser mais freqüente nos pacientes portadores de subtipo FAB de mau prognóstico e parece também se associar a menor sobrevida e maior risco de evolução para LMA, indicando desta forma a importância da avaliação citogenética, tanto convencional como molecular, para a definição de prognóstico em SMD, corroborando com a literatura.

BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

ALTER, B.P. Leukemia and preleukemia in Fanconi's anemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v.58, p.206, 1992.

ANKATHIL, J.R., STEPHEN, D.M., VASUDEVAN, P., KUSUMAKUMARY, G., RAJASEKHARAM, P., KRISHNAN, N. Prognostic significance of karyotype analysis in children with acute lymphoblastic leukaemia. **Hematol Oncol**, v.10, p.339-344, 1992.

ARIF, M., TANAKA, K., DAMODARAN, C., ASOU, H., KYO, T., DOHY, H., KAMADA, N. Hidden monosomy 7 in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome detected by interphase fluorescence *in situ* hybridization. **Leukemia**, v.20, p.709-716, 1996.

AUERBACH, A., ALLEN, R. Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. **Cancer Genet Cytogenet**, v.51, p.1-9, 1991.

AUL, C., GATTERMANN, N., HEYLL, A., GERMING, G., DERIGS, G., SCHNEIDER, W. Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system. **Leukemia**, v.6, p.52-59, 1992.

AUL, C., SCHNEIDER, W. Myelodysplastic syndrome: A prognostic factor analysis in 221 untreated patients. **Blut**, v.57, p.234, 1988.

BARTRAM, C.R. Molecular aspects of myelodysplastic syndromes. **Sem Hematol**, v.33, n.2, p.139-149, 1996.

BENNETT, J.M., CATOVSKY, D., DANIEL, M.T., FLANDRIN, G., GALTON, D.A.G., GRALNICK, H.R., SULTAN, C. Proposals for the classification of

the acute leukemias. **Br J Haematol**, v.33, p.451-458, 1976.

BENNETT, J.M., CATOVSKY, D., DANIEL, M.T., FLANFRIN, G., GALTON, D.A.G., GRALNICK, H.R., SULTAN, C. (FAB Cooperative Group). Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **Br J Haematol**, v.51, p.189-199, 1982.

BENNET, J.M. Meeting highlights therapeutic strategies and supportive care in myelodysplastic syndromes: Yesterday, today and tomorrow. **Leuk Res**, v.22, p.51-52, 1998.

BERIS, P. Primary clonal myelodysplastic syndromes. **Sem Hematol**, v.3, p.216-233, 1989.

BLOOMFIELD, C.D. Chromosome abnormalities in secondary myelodysplastic syndromes. **Scand J Haematol**, v.36, p.82-90, 1986.

BOHLANDER, S.K., ESPINOSA, R.III, LE BEAU, M.M., ROWLEY, J.D., DIAZ M.O. A method for the rapid sequence-independent amplification of microdissected chromosome material. **Genomics**, v.13, p.1322-1324, 1992.

BORGSTRÖM, G.H. Cytogenetics of the myelodysplastic syndromes. **Scand J Haematol**, v.36, p.74-77, 1986.

BRANDWEIN, J.M., HORSMAN, D.E., EAVES, A.C., EAVES, C.J., MASSING, B.G., WADSWORTH, L.D., ROGERS, P.C.J., KALOUSEK, D. Childhood myelodysplasia: suggested classification as myelodysplastic syndromes. **Am J Pediatr Hematol Oncol**, v.12, p.63-70, 1990.

BRIZARD, F., BRIZARD, A., GUILHOT, F., TNZAR, J., BERGER, R. Detection of monosomy 7 and trisomy 8 and 11 in myelodysplastic

- disorders by interphase fluorescent *in situ* hybridization. Comparison with acute non-lymphotic leukaemias. **Leukemia**, v.8, p.1005-1011, 1994.
- CAPERSON, P., ZECH, L., JOHASSON, C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. **Exp. Cell Res.**, v.60, p.315-319, 1970.
- CARBONELL, F., BENITEZ, J., PRIETO, F., BADIA, L., SANCHEZ-FAYOS, J. Chromosome banding patterns in patients with chronic myelotic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v.5, p.287-297, 1982.
- CASSANO, E., GIORDANO, M., RICCARDI, A., COCI, A., CAZZOLA, M. Myelodysplastic syndormes: a multiparametric study of prognostic factors and a proposed scoring system. **Haematologica**, v.75, p.141-145, 1990.
- CASTRO-MALASPINA, H., SHAISON, G., PASSE, S., PASQUIER, A., BERGER, R., BAYLE-WEISGERBER, C., MILLER, D., SELIGMANN, M., BERNARD, J. Subacute and chronic myelomonocytic leukemia in children (juvenile CML). **Cancer**, v.54, p.675-686, 1984.
- CHEN, Z., MORGAN, R., STONE, J.F., SANDBERG, A.A. FISH: A useful technique in the verification of clonality of random chromosome abnormalites. **Cancer Genet Cytogenet**, v.66, p.73-74, 1993.
- COIFFIER, B., ADELEINE, P., VIALA, J.J., BRYON, P.A. FIERE, D., GENTILHOMME, O., VUVAN, H., Dysmyelopoietic syndromes: a search for prognostic factors in 193 patients. **Cancer**, v.52, p.83-90, 1983.
- CONCHON, M. Avaliação de quimerismo pós-transplante de medula óssea através das técnicas de hibridização *in situ* forfluorescência ("FISH") e citogenética convencional. São Paulo, 1998. 108p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

- DALE D., BONILHA M., BOXER L., FREEDMAN M., BROWN S., FIER C., WELTE K. Development of AML/MDS in a subset of patients with several chronic neutropenia. **Blood**, v.84, abstr, suppl.1, p.518, 1994.
- DALY, H.A., WILLIAMS, J., BOND, L.R. t (3;5) (q25;q33) in myelodysplastic syndrome. **Cancer Genet Cytogenet**, v.57, p.233-234, 1991.
- DANSEY, R. Myelodysplasia. **Curr Opin Oncol**, v.12, p.13-21, 2000.
- Döhner, K., Brown, J., Hemann, U., Hetzel, C., Stewart, J., Lowther, G., Scholl, C., Fröhling, S., Cuneo, A., Tsui, L.C., Litcher, P., Scherer, S., Döhner, H. Molecular cytogenetic characterization of a critical region in band 7q35-36 commonly deletes in malignant myeloid disorders. **Blood**, v.92, n.11, p.4031-4035, 1998.
- ENGEL, H., DRACH J., KEYANI, A., JIANG, S., VAN, N.T., KIMMEL, M. Quantitation of minimal residual disease in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome in complete remission by molecular cytogenetics of progenitor cells. **Leukemia**, v.13, p.568-577, 1999.
- FENAUX, P., MOREL, P., LAI, J.L. Cytogenetics of Myelodysplastic Syndrome. **Sem Hematol**, v.33, p.127-138, 1996.
- FLACTIF, M., LAI, J.L., PREUDHOMME, C., FENAUX, P. Fluorescence *in situ* hybridization improves the detection of monosomy 7 in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v.8, p.1012-1018, 1994.
- FUSCOE, J.C., CLARK L.M., VAN DILLA, M.A. Construction of fifteen human chromosome-specific DNA libraries from flow-purified chromosomes. **Cytogenet Cell Genet**, v.43, p.79-86, 1986.

- GALL, J.G., PURDENE, NC. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.63, p.378-383, 1969.
- GEDDES, A.D., BOWEN, D.T., JACOBS, A. Clonal karyotype abnormalities and clinical progress in the myelodysplastic syndrome. **Brit J Haematol**, v.76, p.149-161, 1990.
- GILCHRIST D.M., FRIEDMAN J.M., ROGERS P.C.; CREIGHTON S.P. Myelodysplasia and leukemia syndrome with monosomy 7: A genetic perspective. **Am J Med Genet**, v.35, p.437-441, 1990.
- GOASGUEN, J.E., GARAND, R., BIZET, M., BREMOND, J.L., GARDAIS, J., CALLAT, M.P., ACCARD, F., CHAPERON, J. Prognostic factors of myelodysplastic syndromes-a simplified 3-D scoring system. **Leuk Res**, v.14, p.255-262, 1990.
- GOLDE, D.W., CLINE, M.J. Human preleukemia, identification of a maturation defect *in vitro*. **N Engl J Med**, v.288, p.1083-1086, 1973.
- GOLUB T.R., BARKER G.F., LOVETT, M., GILLIAND, D.G. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. **Cell**, v.77, p.307-316, 1994.
- GOZZETTI, A., LE BEAUL, M.M. Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. **Sem Hematol**, v.37, n.04, p.320-333, 2000.
- GREENBERG, P., COX, C., LE BEAU, M.M., FENAUX, P., MOREL, P., SANZ, G., SANZ, M., VALLESPI, T., HAMBLIN, T., OSCIER, D., OHYASHIKI, K., TOYAMA, K., AUL, C., MUFTI, G., BENNET, J.

- International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v.89, p.2079-2088, 1997.
- HAASE, D., FONATSCH, C., FREUND, M. Cytogenetic findings in 179 patients with myelodysplastic syndromes. **Ann Hematol**, v.70, p.171-187, 1995.
- HARRIS, N.L., JAFFE, E.S., DIEBOLD, J., FLANDRIN, G., MULLER-HERMELINK, H.K., VARDIMAN, J., LISTER, T.A., BLOOMFIELD, C.D. World Health Organization Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting - Airlie House, Virginia, 1997. **J Clin Oncol**, v.17, p.3835-3849, 1999.
- HORIIKE, S., TANIWAKI, M., MISAWA, S., ABE, T. Chromosome abnormalities and karyotypic evolution in 83 patients with myelodysplastic syndrome and predictive value for prognosis. **Cancer**, v.62, p.1129-1138, 1988.
- HOOK, E.B. Exclusion of chromosomal mosaicism: Table of 90%, 95%, and 99% confidence limits and comments on use. **Am J Genet**, v.29, p.94-97, 1997.
- JACOBS, R.H., CORNBLEET, M.A., VARDIMAN, J.W., LARSON, R.A., LE BEAU, M.M., ROWLEY, J.D. Prognostic implication of morphology and karyotype in primary myelodysplastic syndrome. **Blood** v.6, p.1765-1772, 1986.
- JANSSEN, J.W.G., BUSCHLE, M., LAYTON, M., DREXLER, H.G., LYONS, J., VAN DER BERGHE, H., HEIMPEL, H., KUBANEK, B., KLEIHAUER, E., MUFTI, G.J., BARTRAM, C.R. Clonal analyses of myelodysplastic

- syndromes: evidence of multipotent stem cell origin. **Blood**, 73, v.248-254, 1989.
- JENKINS, R.B., LE BEAU, M.M., KRAKER, W.J., BORELL, T.J., STALBOERGER, P.G., DAVIS, E.M., PENLAND, L., FERNALD, A., ESPINOSA, R., SCHAID, D.J., NOEL, P., DEWALD, G.W. Fluorescence in situ hybridization: A sensitive method for trisomy 8 detection in bone marrow specimens. **Blood**, v.79, p.3307-3315, 1992.
- KANEKO, H., MISAWA, S., HORIIKE, S., NAKAI, H., KASHIMA, K.T. P53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. **Blood**, v.85, p.2189-2193, 1995.
- KASPRZYK, A., MEHTA, A.B., SECKER-WALKER, L.M. Single cell-trisomy in hematologic malignancy. Random change or tip of the iceberg? **Cancer Genet Cytogenet**, v.85, p.37-42, 1995.
- KEATING, M.J., SMITH, T.L., KANTARJIAN, H., CORK, A. Cytogenetic pattern in acute myelogenousleukaemia: a major reproducible determinant of outcome. **Leukemia**, v.2, p.403-412, 1988.
- KERKHOF, H., HERMANS, J., HAAK, H.L., LEEKSMA, C.H.W. Utility of the FAB classification of prognostic factors in 237 cases. **Br J Haematol**, v.65, p.73-81, 1987.
- KIBBELAAR, R.E., MULDER, J.W.R., DREEF, E.J., VAN KAMP, H., FIBBE, W. E., WESSELS, J. W., BEVERSTOCK, G. C., HAAK, H. L., KLUIN, P. M. Detection of monosomy 7 and trisomy 8 in myeloid neoplasia: A comparison of banding and fluorescence *in situ* hybridization. **Blood**, v.82, p.904-913, 1993.

- KNAPP, R.H., DEWALD, G.W., PIERRE, R.V. Cytogenetic studies in 174 consecutive patients with preleukemic or myelodysplastic syndrome. **Mayo Clin Proc**, v.60, p.507-516, 1985.
- KOEFFLER H.P. Introduction: Myelodysplastic Syndromes. **Sem Hematol**, v.33, p.87-94, 1996.
- LAI, J.L., PREUDHOMME, C., ZANDECKI, M., FLACTIF, M., VANRUMBEKE, M., LEPELLEY, P., WATTEL, E., FENAUX, P. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of p53 mutations. **Leukemia**, v.15, p.370-379, 1995.
- LEVAN A. Some current problems of cancer cytogenetics. **Hereditas**, v.57, p.343-355, 1967.
- LICHTER, P., CREMER, T., MANUELIDIS, L., WARD D. C. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* supression hybridization using recombinant DNA libraries. **Hum Genet**, v.80, p.224-234, 1988.
- LE BEAU, M., ALBAIN, K.S., LARSON, R.A., VARDIMAN, J., DAVIS, E., BLOUGH, R., GOLOMB, H., ROWLEY, J. Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: Further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes 5 and 7. **J Clin Oncol**, v.3, p.325-345, 1986.
- LEE, E.T. **Estatistical methods for survival data analysis**. Belmont: Lifetime Learning, 1980, p.75-118, p.122-154.

LUKE, S., VARKEY, J.A., BELOGOLOVKIN, V., LADOULIS, C.T. Current state of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in diagnostic pathology. **Cell Vision**, v.4, n.7, p.16-31, 1997.

LUNA-FINEMAN, S., SHANNON, K.M., LANGE, B.J. Childhood monosomy 7: epidemiology, biology, and mechanistic implications. **Blood**, v.85, p.1985-1999, 1995.

MAURITSZON, N., JOHANSSON, B., ALBIN, M., BILLSTRÖM, R., AHLGREN, T., MIKOCKY, Z., NILSON, P.G., HAGMAR, I., MITELMAN, F. A single-center population-based consecutive series of 1.500 cytogenetically investigated adult hematological malignancies: karyotypic features in relation to morphology, age and gender. **Eur J Haematol**, v.62, p.95-102, 1999.

MELTZER, P.S., GUAN, X-Y., BURGESS, A., TRENT, J.M. Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. **Nat Genet**, v.1, p.24-28, 1992.

MIC – Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of acute myeloid leukemias. Report of the workshop held in Leuven, Belgium, September 15-17, 1986. Second MIC cooperative study group. **Cancer Genet Cytogenet**, v.30, p.01-15, 1988.

MITELMAN, F. **(ISCN) An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**. Basel: Karger, 1995.

MOREL, P., HERBBAR, M., LAIL, J.L., DUHAMEL, A., PREUDOMME, C., WATTEL, E., BAUTERS, F., FEUNAUX, P. Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in *de novo* myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: A report on 408 cases. **Leukemia**, v.7, p.1315-1323, 1993.

- MORI, N.S. Contribuição ao estudo da citogenética da leucemia mielóide crônica e sua transformação blástica. São Paulo, 1981. 115p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- MUFTI, G.J. Chromosomal deletions in the myelodysplastic syndrome. **Leuk Res**, v.16, p.35-41, 1992.
- MUFTI, G.J., STEVENS, J.R., OSCIER, D.G., HAMBLIN, T.J., MACHIN, D. Myelodysplastic syndromes: a scoring system with prognostic significance. **Br J Haematol**, v.59, p.425-433, 1985.
- MUSILOVA, J, MICHALOVA, K.L. Chromosome study of 85 patients with myelodysplastic syndrome. **Cancer Genet Cytogenet**, v.33, p.39-50, 1988.
- NACHEVA, E., GRACE, C., HOLLOWAY, T.L., GREEN, A.R. Comparative genomic hybridization in acute myeloid leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v.82, p.6-16, 1995.
- NEWMAN, W., RUBIN, C., RIOS, R., LARSON, R., LE BEAU, M., ROWLEY, J., VARDIMAN, J., SCHWARTZ, J., FRABER, R. Chromosomal loss and deletion are the most common mechanisms for loss of heterozygosity from chromosomes 5 and 7 in malignant myeloid disorders. **Blood**, v.79, p.1501, 1992.
- NGUYEN, P.L., ARTHUR, D.C., LITZ, C.E., BRUNNING, R.D. Fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of trisomy 8 in myeloid cells of chronic myeloid leukaemia (CML): a study of archival blood and bone marrow smears. **Leukemia**, v.8, p.1654-1662, 1994.

NOEL, P., TEFFERI, A., PERRE, R.V., JENKINS, R.B., DEWALD, G.W. Karyotypic analysis in primary myelodysplastic syndromes. **Blood Ver**, v.7, p.10-18, 1993.

NOWELL, P.C. Chromosome Anormalities in myelodysplastic syndromes. **Semin Oncol**, v.19, p.25-33, 1992.

NOWELL, P.C., HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**, v.132, p.1497-1501, 1960.

PAQUETTE, R.L., LANDAW, E.M., PIERR, R.V., KAHAN, J., LUBBERT, M., LAZCANO, O., ISAAC, G., McCORMICK, F., KOEFFLER, H.P. N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. **Blood**, v.82, p.590-599, 1993.

PINKEL, D., LANDEGENT, J., COLLINS, C., FUSCOE, J., SEGRAVES, R., LUCAS, J., GRAY, J. Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trissomy 21 and translocations of chromosome 4. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.85, p.9138-9142, 1988.

PINKEL, D., STRAUME, T., GRAY, J. Cytogenetic analisis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, v.83, p.2934-2938, 1986.

ROMEU, A.S. Síndromes Mielodisplásicas: Pesquisa das alterações citogenético-moleculares (FISH – *Fluorescence in situ hybridization*) mais freqüentes e sua influência na sobrevida, São Paulo, 2000. 99p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

ROSNER, B. **Fundamentals of biostatistic**, 2. ed. Boston: PWS Publishers, 1992, 326-333.

ROWLEY, J.D. The role of chromosome translocation in leukemogenesis. **Sem Hematol**, v.36, suppl 7, p.59-72, 1999.

SANDBERG, A.A. **The chromosome in human cancer and leukaemia**, 2. ed. New York,: Elsevier, 1990.

SANZ, G.F., SANZ, M.A., VALLESPI, T., CANIZO, M.C., TORRABADELLA, M., GARCIA, S., IRRIGUIBLE, D., SAN MIGUEL, J.F. Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. **Blood**, v.74, p.395-408, 1989.

SANZ, G.F., SANZ, M.A. Prognostic factors in myelodysplastic syndormes. **Leuk Res**, v.16, p.77-86, 1992.

SCHIFFER, C., LEE, E.J., TOMIYASU, T., WIERNICK, P.H., TESTI, J.R. Prognostic impact of cytogenetic abnormalities in patients with de novo acute nonlymphocytic leukaemia. **Blood**, v.73, p.263-270, 1989.

SHACKNEY, S.E., SINGH, S.G., YAKULIS, R., SMITH, C.A., POLLICE, A.A., PETRUOLO, S., WAGGONER, A., HARTSOCK, R.J. Aneuploidy in breast cancer: a fluorescent *in situ* hybridization study. **Cytometry**, v.22, p.282-291, 1995.

SHANNON, K.M., TURHAN, A.G., CHANG, S.S., BOWCOCK, A.M., ROGERS, P.C., CARROLL, W.L., COWAN, M.J., GLADER, B.E., EAVES, A.C. Familial bone marrow monosomy 7. Evidence that the predisposing locus is not on the long arm of chromosome 7. **J Clin Invest**, v.84, p.984-989, 1989.

SHANNON, K.M., WATTERSON, J., JONHSON, P., O'CONNELL, P., LANGE, B., SHAH, N., STEINHERTZ, P., KAN, Y.W., PRIEST, J.R.

- Monosomy 7 myeloproliferative disease in children with neurofibromatosis, type 1: Epidemiology and molecular analysis. **Blood**, v.79, p.1311-1318, 1992.
- SUCIU, S., KUSE, R., WEH, H.J., HOSSFELD, D.K. Results of chromosome studies and their relation to morphology, course, and prognosis in 120 patients with *de novo* myelodysplastic syndrome. **Cancer Genet Cytogenet**, v.44, p.15-26, 1990.
- TABERNEIRO, M.D., SAN MIGUEL, J.F., GARCÍA-SANZ, R., NÁJERA, M.L., GARCÍA-ISIDORO, M., PÉREZ-SIMÓN, J.A., GONZÁLEZ, M., WIEGANT, J., RAAP, A.K., ORFAO, A. Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma. A FISH analysis using 15 chromosome-specific probes. **Am J Pathol**, v.149, p.153-161, 1996.
- TANAKA, K., ARIF, M., EGUCHI, M.M.S, KUMARAVEL, T.S., ASAOKU, H., KYO, T., DOHY, H., KAMADA, N. Interphase fluorescence in situ hybridization overcomes pitfalls of G-banding analysis with special references to underestimation of chromosomal aberration rates. **Cancer Genet Cytogenet**, v.115, p.32-38, 1999.
- THANGAVELEU, M., BITTER, M.A., LARSON, R.A., DAVIS, E.M., ROWLEY, J.D., LE BEAU, M.M. der (5) t(5;7) (q11.2;p11.2): A new recurring abnormality in malignant myeloid disorders. **Cancer Genet Cytogenet**, v.37, p.1-8, 1989.
- THIRD MIC COOPERATIVE STUDY GROUP. Recommendations for a morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of the primary and therapy related myelodysplastic disorders. **Cancer Genet Cytogenet**, v.32, p.1-10, 1988.

TOYAMA, K., OHYASHIKI, K., YOSHIDA, Y., ABE, T., ASANO, S., HIRAI, H., HIRASHIMA, K., HOTTA, T., KURAMOTO, A., KURIYA, S., MIYAZAKI, T., KAKISHITA, E., MIZOGUCHI, H., OKADA, M., SHIRAKAWA, S., TAKAKU, F., TOMONAGA, M., UCHINO, H., YASUNAGA, K., NOMURA, T. Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. **Leukemia**, v.7, p.499-508, 1993.

TRASK, B.J. Fluorescence *in situ* hybridization. **Genet Anal**, v.8, p.149-154, 1991.

TRICOT, G.J.K.. Treatment of acute nonlymphocytic leukemia. *In*: HOFFMAN, R.; BENZ, J.E.J.; SHATTIL, S.J.; FURIE, B.; COHEN, H.J. (Eds.) **Hematology basic principles and practice**. New York: Churchill Livingstone, 1992. p. 732-748.

TRICOT, G., BOOGAERTS, M.A., DE WOOFF-PEETERS, C., VAN DEN BERGHE, H., VERWHILGEN, R.L. The myelodysplastic syndromes: different evolution patterns based on sequential morphological and cytogenetic investigations. **Br J Haematol**, v.59, p.659-679, 1985.

TRICOT, G., VLIETNCK, R., BOOGAERTS, M.A., HENDRICKX, B., DE WOOFF-PEETERS, C., VAN DEN BERGHE, H., VERWHILGEN, R.L. Prognostic factors in the myelodysplastic syndromes: importance of initial data on peripheral blood counts, bone marrow cytology, trephine biopsy and chromosomal analysis. **Br J Haematol**, v.60, p.19-32, 1985.

VAN DER BERGHE, H., CASSIMAN, J.J., DAVID, G. Distinct haematological disorder with deletion of long arm of 5 chromosome. **Nature**, v.251, p.437-438, 1974.

- VAN DEN BERGHE, H., VERMAELEN, K., MECUCCI, C., BARBIERI, D., TRICOT, G. The 5q- anomaly. **Cancer Genet Cytogenet**, v.17, p.189-255, 1985.
- VARELA, B.J., CHUANG, C., WOLL, J.E., BENNETT, J.M. Modifications in the classification of primary myelodysplastic syndromes: the addition of a scoring system. **Hematol Oncol**, v.3, p.55-63, 1985.
- VELLOSO, E.D.R.P.: Síndromes Mielodisplásicas *de novo*: fatores preditivos para sobrevida e transformação leucêmica. São Paulo, 1996. 115p. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- VIGUE, F., PROGENT, Y., RAMOND, S., BAUMELOU, E., CADIOU, M., DREYFUS, F., ZITTOUN, R. Fluorescence *in situ* hybridization analyses of minute marker chromosomes in leukemia with monosomy 7. **Leukemia**, v.9, p.1154-1158, 1995.
- VILA L., CHARRIN C., ARCHIMBAUD E., TREILLE R. D., FRAISSE J., FELMAN P., FIERE D., GERMAIN D. Correlations between cytogenetics and morphology in myelodysplastic syndromes. **Blut** v.60, p.223-227, 1990.
- VON HANSELMANN D. Ueber asymmetrische zelltheilung in epitelkrebsen und derenbiologische bedeutung. **Virchows Arch A. Pathol**, v.119, p.299-326, 1890.
- WYANDT, H.E., CHINNAPPAN, D., IOANNIDOU, S., SLAMA, M., O'HARA, C. Fluorescence in situ hybridization to assess aneuploidy for chromosome 7 and 8 in hematologic disorders. **Cancer Genet Cytogen**, v. 102, p.114-124, 1998.
- WATTEL, E., LAI J. L., HEBBAR, M., PREUDHOMME, C., GRAHELD, D., MOREL, P., BAUTERS, F., FENAUX, P. *De novo* myelodysplastic

syndrome (MDS) with deletion of the long arm of chromosome 20: a subtype of MDS with distinct haematological and prognostic features? **Leuk Res**, v.17, p.921-926, 1993.

WATTEL, E., PREUDHOMME, C., HECQUET, B., VANRUMBEKE, M., QUESNEL, B., DERVITE, I., MOREL, P., FENAUX, P. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematological malignancies. **Blood**, v.84, p.3148-3157, 1994.

WOODS W.G., ROLOFF J.S., LUKENS J.N., KRIVIT, W. The occurrence of leukemia in patients with the Shwachman syndrome. **J Pediatr**, v.99, p.425-427, 1981.

WORSLEY, A., OSCIER, D.G., STEVENS, J., DARLOW, S., FIGES, A., MUFTI, G.J., HAMBLIN, T.J. Prognostic features of chronic myelomonocytic leukaemia: a modified Bournemouth score gives the best prediction of survival. **Br J Haematol**, v.68, p.17-21, 1988.

YUNIS, J.J., RYDELL, R.E., OKEN, M.M., ARNESEN, M.G., LOBELL, M. Refined chromosome analysis as an independent prognostic indicator in de novo myelodysplastic syndromes. **Blood**, v.67, p.1721-1730, 1986.

YUNIS, J.J., LOBELL, M., ARNESEN, M.A., OKEN, M.M., MAYER, M.G., RYDELL, R.E., BRUNNING, R.D. Refined chromosome study helps define prognostic subgroups in most patients with primary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia. **Br J Haematol**, v.68, p.189-194, 1988.

YOUNG N.; ALTER B. **Aplastic Anemia: Acquired and Inherited**. Philadelphia: Saunders, 1994.

ZHAO, L., OORT, J.V., CORK, A., LIANG, J.C. Comparison between

interphase and metaphase cytogenetics in detecting chromosome defects in hematological neoplasias. **Am J Hematol**, v.43, p.205-211, 1993.