



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

INVESTIGAÇÃO CITOGENÉTICA NA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA INFANTIL

Cássia Gisele Terrassani Silveira

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvia Regina Rogatto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Botucatu-SP

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Silveira, Cássia Geisele Terrassani.

Investigação citogenética na síndrome mielodisplásia infantil / Cássia Gisele Terrassani Silveira. – 2006.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, [133] 2006.

Orientadora: Dr^a Silvia Regina Rogatto

Assunto CAPES: 20205007

1. Câncer - Aspectos genéticos 2. Citogenética humana

CDD 575.21

CDD 616.994042

Palavras-chave: Citogenética clássica; Hibridação *in situ* fluorescente;
Síndrome mielodisplásica infantil

Sumário

Índice de Figuras	i
Índice de Tabelas	iii
Resumo	v
Abstract	vii
I- Introdução	01
1. Síndrome Mielodisplásica.....	01
2. Etiologia e Patogênese da Síndrome Mielodisplásica.....	09
3. Síndrome Mielodisplásica Infantil.....	13
4. Citogenética da Síndrome Mielodisplásica.....	17
II- Objetivos	35
III- Material e Métodos	36
1. Amostras.....	36
2. Métodos.....	41
2.1. Cultura de Células.....	41
2.2. Caracterização das amostras por bandamento GTG.....	42
2.3. Metodologia de hibridação <i>in situ</i> fluorescente.....	42
IV- Resultados	55
1. Citogenética Clássica.....	55
2. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente.....	58
2.1. Cromossomo 3.....	59
2.2. Cromossomo 7.....	62
2.3. Cromossomo 17.....	65
2.3.1. Gene <i>TP53</i>	65
2.3.2. Gene <i>ERBB2</i>	68
2.4. Análise Comparativa.....	71
V- Discussão	72
VI- Conclusões	106
VII- Referências Bibliográficas	108

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da patogênese da SMD.....	10
Figura 2. Ativação de PPAR γ	27
Figura 3. Mecanismos de repressão transcricional mediados por PPAR γ	28
Figura 4. Modelo da via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) dependente de TP53 e XPC.....	30
Figura 5. Representação esquemática da via de sinalização induzida pela ativação da oncoproteína HER2 envolvida na tumorigênese	46
Figura 6. Localização dos clones e os respectivos controles centroméricos utilizados neste estudo.....	44
Figura 7. Localização da sonda RP11-275J11 no cromossomo 3p25.1 clonada em BAC.....	45
Figura 8. Localização da sonda RP11-46J20 no cromossomo 7q22.3-q31.1 clonada em BAC.....	45
Figura 9. Localização da sonda RP11-89D11 no cromossomo 17p13 clonada em BAC.....	46
Figura 10. Localização da sonda RP11-62N23 no cromossomo 17q12 clonada em BAC.....	46
Figura 11. Sondas marcadas pela reação de <i>nick translation</i>	49

Figura 12. Alterações cromossômicas identificadas após a análise por bandamento GTG.....	57
Figura 13. Análise citogenética para sonda RP11-275J11.....	61
Figura 14. Análise da FISH para sonda do cromossomo 7 (RP11-46J20).....	64
Figura 15. Análise da FISH para sonda do gene <i>TP53</i>	67
Figura 16. Análise citogenética para sonda RP11-62N23/ <i>ERBB2</i>	70
Figura 17. Análise comparativa das perdas hemizigotas e homozigotas para as regiões avaliadas pela FISH.....	71
Figura 18. Mapa físico apresentando as regiões do cromossomo 3.....	77
Figura 19. Mapa físico apresentando as regiões do cromossomo 7.....	89

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais características morfológicas da SMD.....	03
Tabela 2. Sistemas de classificação da SMD.....	07
Tabela 3. Incidência da SMD nas diferentes localizações geográficas em subgrupos distintos de pacientes conforme a classificação da FAB e OMS.....	08
Tabela 4. Classificação segundo o sistema Categoria Citologia Citogenética (CCC).....	16
Tabela 5. Categorias diagnósticas de mielodisplasias e doenças mieloproliferativas em crianças.....	16
Tabela 6. Frequência das principais anormalidades cromossômicas na SMD....	20
Tabela 7. Anormalidades citogenéticas mais freqüentes em SMD <i>de novo</i> e SMD-t	22
Tabela 8. Caracterização clínica da amostra avaliada neste estudo.....	38
Tabela 9. Resultados da análise após bandamento GTG nos casos de SMD infantil.....	56
Tabela 10. Proporção do número de sinais fluorescentes da sonda RP11-275J11 detectados em células dos controles (linfócitos normais do sangue periférico) e das amostras analisadas.....	60
Tabela 11. Proporção do número de sinais fluorescentes da sonda RP11-46J20 detectados em células dos controles (linfócitos normais do sangue periférico) e das amostras analisadas.....	63

Tabela 12. Proporção do número de sinais fluorescentes das sondas <i>D17Z1</i> e RP11-89D11 detectados em células dos controles (linfócitos normais do sangue periférico) e das amostras analisadas.....	66
---	----

Tabela 13. Proporção do número de sinais fluorescentes das sondas RP-62N23 detectados em células dos controles (linfócitos normais do sangue periférico) e das amostras analisadas.....	69
--	----

I- RESUMO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) consiste em um grupo heterogêneo de doenças hematológicas de origem monoclonal e potencialmente maligna. É caracterizada por uma hematopoese ineficaz das células-tronco pluripotentes e morfologia displásica nas três linhagens celulares não-linfóides, evoluindo freqüentemente para leucemia mieloide aguda. A SMD é rara em crianças e adolescentes e apresentam características clínicas e laboratoriais distintas. Este estudo teve como principal objetivo a pesquisa de anormalidades cromossômicas em 23 pacientes pediátricos (0 a 18 anos) com SMD utilizando as metodologias de citogenética clássica (banda GTG) e molecular (Hibridação *in situ* Fluorescente - FISH). A análise após bandamento GTG revelou a presença de alterações cromossômicas envolvendo, principalmente, deleções nos cromossomos 12 e 17 e monossomia 20. Pela FISH, uma média 150 núcleos interfásicos foi analisada com as sondas RP11-275J11 (3p25) (19 casos), RP11-46J20 (7q22.3) (17 casos), *D17Z1* e RP11-89D11 (17p13.1 - *TP53*) (5 e 19 casos, respectivamente) e RP11-62N23 (17q21) (16 casos). As perdas homozigotas e heterozigotas significativas em 3p25.1 foram observadas em 17/19 casos (acima de 30% das células). Os genes *MKRN2*, *TSEN2*, e *PPARG* estão mapeados em 3p25.1 e são compatíveis de função. Quinze em dezessete casos apresentaram perdas homozigotas e heterozigotas no cromossomo 7. Em 7q22.3 estão mapeados os genes candidatos a perdas *DUS4L*, *BCAP29*, *SLC26A3*, *SLC26A4*, *LAMB1* e *HBP1*. Em 18/19 casos foram confirmadas a perda significativa do gene supressor tumoral *TP53*. Apenas um caso de SMD relacionada à terapia não apresentou perda deste gene. Este gene codifica uma fosfoproteína nuclear responsável pela regulação da duplicação do DNA, proliferação celular e apoptose. Assim, mutações ou deleções neste gene podem promover sua inativação gerando instabilidade genômica e contribuindo para progressão tumoral. Este estudo revelou que o gene *TP53* pode ser considerado um marcador molecular na SMD primária infantil. A análise para seqüência do *ERBB2/HER-2* mostrou padrão normal em todos os casos. A análise comparativa das alterações observadas para todas as seqüências avaliadas pela FISH demonstrou perda significativa para as sondas dos cromossomos 3 e 7 e do gene *TP53* em 13 casos. Alguns destes casos apresentaram quadro clínico agressivo e risco elevado de progressão da doença. Cinco casos de SMD apresentaram padrão cromossômico normal por bandamento GTG e após FISH foi detectada a deleção em 3p25.1, 7q22.3 e do *TP53*. Estudos recentes indicam a presença de anormalidades cromossômicas ocultas em 15 a

30% dos pacientes que apresentavam cariotípicos normais pela citogenética convencional. Abordagens em citogenética molecular podem validar alterações cromossômicas supostas e contribuir efetivamente no diagnóstico e na conduta terapêutica das SMD.

II- ABSTRACT

Myelodysplastic Syndrome (MDS) is a heterogeneous and potentially malign group of hematological diseases with monoclonal origin. Inefficient hematopoiesis of pluripotent stem cells, dysplastic morphology in the three non-lymphoid lineages, and progression to acute myeloid leukemia are features of the disease. MDS is rare in children and adolescents showing distinct clinical and laboratorial features. In this study we investigated chromosomal abnormalities in 23 MDS patients (age ranging from 0 to 18 years) using GTG banding and FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization). The most common chromosomal alterations detected by G-banding were deletions at 12p and 17p and monosomy 20. Using FISH, a mean of 150 interphasic nuclei were evaluated with the probes RP11-275J11 (3p25) (19 cases), RP11-46J20 (7q22.3) (17 cases), *D17Z1* and RP11-89D11 (17p13.1 - *TP53*) (5 and 19 cases, respectively), and RP11-62N23 (17q21) (16 cases). Homozygous and hemizygous losses at 3p25 were observed in 17/19 cases (over 30% of the cells). The potential candidate genes to losses *MKRN2*, *TSEN2*, and *PPARG* are mapped at 3p25.1. Fifteen out of 17 cases showed homozygous and hemizygous losses at chromosome 7. In 7q22.3 are mapped the putative candidates to losses: *DUS4L*, *BCAP29*, *SLC26A3*, *SLC26A4*, *LAMB1*, *HBP1*. In 18 out of 19 cases it was detected significant losses of the tumor suppressor gene *TP53*. Only one case of MDS therapy-related presented absence of *TP53* losses. The *TP53* gene codes a nuclear phosphoprotein responsible for DNA replication regulation, cell proliferation and apoptosis. Mutations or deletions on *TP53* may promote its inactivation leading to genomic instability and contributing to tumor progression. According to our study, the *TP53* gene may be considered a molecular marker in pediatric primary MDS. The *ERBB2/HER-2* sequence analysis revealed a normal pattern in all the cases. The general comparison using all sequences analyzed by FISH showed significant losses in 13 cases for chromosomes 3 and 7 and *TP53*. Some of these cases showed aggressive clinical features and high risk for disease progression. Five cases showed normal karyotype for GTG banding, however, they presented deletions by FISH at 3p25.1, 7q22.3 and *TP53*. Recent studies indicated the presence of occult chromosomal abnormalities in 15 to 30% of the patients with normal karyotypes by conventional cytogenetics. Molecular cytogenetics approaches may validate suggestive chromosomal alterations and effectively contribute for the diagnosis and therapeutic approaches in Myelodysplastic Syndrome.

I- INTRODUÇÃO

1. SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é conhecida há mais de 50 anos e foi, por várias décadas, considerada uma “pré-leucemia” pelo fato de muitos pacientes com SMD (cerca de 30-40%) evoluírem para leucemias, principalmente do tipo mielóide aguda (LMA) (Mhawech e Saleem, 2001).

O termo “pré-leucemia” foi introduzido por Block et al. (1953) para definir um grupo de pacientes com alterações hematológicas crônicas, variáveis, e pouco definidas, acompanhadas de evolução para leucemias agudas. Esta terminologia continuou sendo utilizada até o início dos anos 70's para denominar portadores de anemia (sem deficiência nutricional e refratários ao tratamento com hematínicos), com menos de 5% de blastos na medula óssea (MO) e linhagens celulares mielóides com alterações displásicas (Linman, 1970).

Somente na década de 80 surgiu o termo “síndrome mielodisplásica” para definir um grupo heterogêneo de doenças hematológicas mieloproliferativas de potencial maligno, origem monoclonal e progressão variável, em geral lenta. A SMD é caracterizada pela ocorrência de hematopoese ativa, mas ineficaz e inadequada, resultando na proliferação e diferenciação anormais das células-tronco pluripotentes, displasias morfológicas, deficiências nas funções celulares e instabilidade genética (Cilloni et al, 2004; Breccia et al, 2005; Jekic et al, 2006). As inúmeras alterações genéticas, presentes nos clones neoplásicos, levam à ativação de vias metabólicas intrínsecas, mediadoras da morte celular programada, bem como à estimulação do sistema imunológico. As citocinas produzidas como resultado da proliferação de

linfócitos intensificam o processo apoptótico e promovem a eliminação de clones aberrantes e células hematopoéticas normais (Komrokji e Bennett, 2005).

As consequências da hematopoese ineficaz são citopenias que, freqüentemente, envolvem as três linhagens celulares hematopoéticas (eritróide, granulocítica e megacariocítica). A MO de portadores de SMD apresenta anormalidades quantitativas e qualitativas das linhagens não-linfóides, sendo substituída, parcial ou totalmente, pela progênie clonal derivada de uma célula primordial multipotente mutante (Polychronopoulou et al, 2004). Embora um pequeno subgrupo de pacientes apresente hipoplasia da medula óssea, a maioria exibe aumento da celularidade medular, denotando o caráter paradoxal da doença de citopenia do sangue periférico e normo/hipercelularidade da MO (Catenacci e Schiller, 2005).

Em virtude das alterações morfológicas, as manifestações clínicas marcantes em portadores de SMD envolvem anemias refratárias e sintomas associados, bem como complicações extra-medulares (hepatoesplenomegalia). As causas de óbito de pacientes com esta doença hematológica estão comumente associadas à ausência de resposta aos tratamentos contra citopenias periféricas, infecções recorrentes, hemorragias e alterações funcionais da circulação de células sangüíneas (Hofmann et al, 2004; Mufti, 2004; Cabello et al, 2005).

Além dos sinais clínicos característicos, o diagnóstico laboratorial da SMD baseia-se na detecção de alterações morfológicas peculiares e displasia no sangue periférico (SP) e MO (Tabela 1) (Vallespi et al, 1998). Entretanto, não há nenhum marcador clínico ou morfológico, único, associado especificamente a esta doença, capaz de individualizá-la de outras doenças hematológicas, incluindo formas moderadas de anemia aplásica, as quais são dificilmente diferenciadas da SMD

(Yoshida, 1996). Segundo Komrokji e Bennett (2005), a combinação de fatores morfológicos, tais como a porcentagem de blastos e a displasia medular, e o padrão citogenético permitem uma avaliação diagnóstica diferencial e mais fidedigna para este tipo de neoplasia. Desta forma, a detecção de sinais morfológicos acompanhada de avaliação citogenética é essencial para a triagem clínica de pacientes com suspeita de SMD.

Tabela 1. Principais características morfológicas da SMD (Modificado de Vallespi et al, 1998)

	Sangue Periférico	Medula Óssea
Diseritropoese	Anisocitose Poiquilocitose Macrocitose Eritroblastos anormais	Multinuclearidade Morfologia nuclear e citoplasmática anormal Anormalidades megaloblastóides Sideroblastos em anel
Disgranulopoese	Anormalidade de pseudo-Pelger-Huet Hipogranulação Hipersegmentação Alterações nucleares	Cromatina anormal Grânulos volumosos Núcleos com sideroblastos em anel
Distrombopoese	Aumento do número de plaquetas Hipogranulação Hipergranulação	Micromegacariócitos Formas mononucleares Múltiplos núcleos pequenos e fragmentados

A história natural da SMD é bastante heterogênea o que torna complexa a triagem clínica e o planejamento terapêutico dos pacientes (Navarro et al, 2006). Baseando-se em características displásicas, porcentagem de blastos no SP e MO, contagem absoluta de monócitos no sangue e presença de bastonetes de Auer e sideroblastos em anel, foi estabelecido um sistema de classificação Franco-Americano-Britânico (FAB) o qual dividiu o curso clínico da SMD em cinco fases distintas (Bennett et al, 1982) (Tabela 2). No início, em um estágio indolente, os indivíduos afetados manifestam apenas citopenia e não necessitam de tratamento

específico. Esta fase é referida como anemia refratária com ausência (RA) ou presença de sideroblastos em anel (RARS) na medula óssea. Após a permanência de fase indolente por vários anos (ou mesmo décadas), uma proporção de pacientes pode sofrer transformação leucêmica. À medida que ocorre um aumento da porcentagem de blastos leucêmicos na MO, o diagnóstico do paciente se altera. Inicialmente com uma RA com excesso de blastos (5-20% de blastos medulares), em transformação (RAEB-t) ou não (RAEB), com leucemia mielomonocítica crônica (CMML) em uma fase intermediária e, finalmente, com leucemia mielóide aguda associada à SMD (>20% de blastos na MO). Neste estágio, os pacientes podem ser refratários à quimioterapia e o tempo médio de sobrevida é, em geral, inferior a um ano (Ueda et al, 2003; Catenacci e Schiller, 2005).

A classificação FAB foi amplamente utilizada na prática clínica e auxiliou a realização de inúmeros estudos morfológicos, e, conseqüentemente, o entendimento da evolução da SMD. Entretanto, a avaliação do prognóstico por este sistema mostrou-se bastante limitada, uma vez que permite definir apenas dois subgrupos distintos em termos de sobrevida e risco de evolução para leucemia aguda: prognóstico favorável (RA e RARS) e desfavorável (RAEB e RAEB-t) (Navarro et al, 2006).

O esquema de classificação FAB tem sido comumente combinado com o esquema do *International Prognostic Score System* (IPSS) (Greenberg, 1998) (Tabela 2). Este sistema baseou-se em dados citogenéticos, morfológicos e clínicos de 816 portadores de SMD primária, os quais foram reavaliados no sentido de estabelecer uma classificação mais refinada dos fatores de risco para porcentagens de blastos medulares, grupos citogenéticos e presença de citopenias. Os subgrupos foram classificados pelo IPSS como: baixo risco [pacientes com del(20q), del(5q),

perda do cromossomo Y ou cariótipos normais]; alto risco (pacientes com cariótipos complexos ou com aberrações no cromossomo 7) e intermediário (pacientes portadores de outras anormalidades cromossômicas) (Greenberg, 1998). Segundo esta classificação, a sobrevida média de pacientes portadores de SMD situa-se no intervalo de 6 anos (grupo de baixo risco) a 6 meses (grupo de alto risco) (Hofmann et al, 2004).

A associação da SMD de alto risco com a presença de cariótipos desfavoráveis e anormalidades complexas aponta a relevância prognóstica da citogenética em predizer o curso clínico nos pacientes com mielodisplasias, além de auxiliar no diagnóstico e individualização das estratégias terapêuticas conforme o padrão cariotípico, quando positivo (Hiddemann, 1998; Cabello et al, 2005; Steensma e List, 2005).

Embora aceito e utilizado no âmbito clínico, o esquema proposto pela FAB foi alvo de críticas e controvérsias na prática diagnóstica. A heterogeneidade das anemias refratárias, a inclusão da leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) como entidade distinta, o fato de pacientes com porcentagem de blastos medulares maiores que 20% geralmente apresentarem prognósticos similares a portadores de LMA e a ausência de alguns parâmetros histológicos e morfológicos que influenciam o quadro clínico de pacientes SMD motivaram a reavaliação e a reestruturação da classificação da FAB pela Organização Mundial de Saúde (OMS) resultando em uma nova distribuição dos estágios clínicos.

Neste sistema, foram definidas entidades mais homogêneas e novas subcategorias específicas conforme a presença de anormalidades citogenéticas peculiares, limiões mais estreitos de porcentagem de blastos e envolvimento de uma ou mais linhagens hematopoéticas. Dessa forma, a LMMC foi re-classificada

como parte do grupo SMD/Síndrome Mieloproliferativa e a RAEB-t foi considerada como uma leucemia, uma vez que o tratamento e prognóstico são similares aos da LMA. Foram adicionados como novos subtipos de SMD tais como a citopenia refratária em múltiplas linhagens celulares, a SMD não-categorizada e a síndrome de 5q- (Malcovati et al, 2005; Sakuma et al, 2006) (Tabela 2). Conseqüentemente, informações citogenéticas tornaram-se indispensáveis e a não disponibilidade destes dados representam um obstáculo para esta classificação (Hofmann et al, 2004; Pinto et al, 2005).

Não obstante, este novo esquema de classificação não é universalmente aceito e a utilidade clínica desta proposta bem como o valor prognóstico tem sido alvo de inúmeras investigações (Germing et al, 2000; Greenberg et al, 2000; Nosslinger et al, 2001; Bennett et al, 2002; Dunkley et al, 2002; Strupp et al, 2003; Howe et al, 2004; Giagounidis et al, 2004; Muller-Berndorff et al, 2006; Navarro et al, 2006). Muitos esforços estão sendo empreendidos no intuito de refinar os critérios clínicos e morfológicos da estratificação da SMD proposta pela OMS (Malcovati et al, 2005).

A verdadeira prevalência da SMD não é conhecida, uma vez que esta neoplasia não está rotineiramente contida nos registros de câncer. Entretanto, estudos epidemiológicos restritos demonstram que a SMD é pelo menos três vezes mais comum que a LMA e que a frequência desta doença aumenta progressivamente com a idade, sendo mais rara entre indivíduos mais jovens (Van Etten e Shannon, 2004).

Tabela 2. Sistemas de classificação da SMD (Modificado de Catenacci e Schiller, 2005).

FAB	IPSS		OMS
	(1) % de blastos na MO:		
	<u>% Blastos</u>	<u>Score do IPSS</u>	<u>SMD</u>
(1) RA: citopenia de uma linhagem celular do SP; medula normo- ou hipocelular com displasia; <1% de blastos no SP e <5% de blastos na MO	<5	0	(1) RA
	5-10	0.5	(2) RCMD
	11-20	1.5	
	21-30	2.0	
	(2) Características citogenéticas ¹ :		
	<u>Cariótipo</u>	<u>Score do IPSS</u>	(3) RARS
(2) RARS: citopenia, displasia e mesma % de blastos de RA; >15% de sideroblastos em anel na MO	Bom prognóstico (-Y,5q-, 20q-, normal)	0	(4) RCMD RS
	Prognóstico intermediário (trissomia do 8)	0.5	
	Pior prognóstico (alterações 7, complexo)	1.0	
	(3) Citopenias ² :		
	<u>Citopenia</u>	<u>Score do IPSS</u>	
(3) RAEB: citopenia de 2 ou + linhagens celulares de SP; displasia envolvendo 3 linhagens celulares; <5% de blastos no SP e 5-20% de blastos na MO	Ausência ou 1 linhagem celular	0	(5) RAEB 1: 5-10% blastos
	2 ou 3 linhagens celulares	0.5	(6) RAEB 2: 10-20% blastos
			(7) SMD com 5q- isolado (Síndrome 5q-)
			(8) SMD não categorizada
	(4) Score do IPSS e sobrevida:		
	<u>Score do IPSS</u>	<u>Sobrevida</u>	<u>Leucemias Mielogênicas Agudas:</u>
(4) RAEB-t: características hematológicas idênticas a RAEB, >5% de blastos no SP ou 21-30% de blasto na MO ou presença de bastonetes de Auer nos blastos	Baixo (0)	5.7 anos	(1) LMA com alterações genéticas recorrentes
	Intermediário		(2) LMA com displasia em múltiplas linhagens
	1 (0.5 ou 1.0)	3.5 anos	(3) LMA-t e SMD-t
	2 (1.5 ou 2.0)	1.2 anos	(4) LMA não categorizada
	Alto (2.5 ou mais)	0.4 anos	
			<u>SMD/MPD:</u>
(5) CMML: monocitoses no SP; <5% de blastos no SP e mais de 20% de blastos na MO			(1) CMML
			(2) aCML
			(3) JMML

Abreviações: SP, sangue periférico; MO, medula óssea; RA, anemia refratária; RARS, anemia refratária com sideroblastos em anel; RAEB, anemia refratária com excesso de blastos; RAEB-t, anemia refratária com excesso de blastos em transformação; CMML, leucemia mielomonocítica crônica; RCMD, citopenia refratária com multilinhagens displásicas; SMD, síndrome mielodisplásica; LMA, leucemia mielóide aguda; MPD, doenças mieloproliferativas; aCML, leucemia mielomonocítica crônica atípica; JMML, leucemia mielomonocítica juvenil; ¹Complexo, 3 ou mais anormalidades; ² Citopenia por IPSS, hemoglobina <10, neutrófilos <1500/mm³, plaquetas <100.000/mm³.

De um modo geral, a freqüência da SMD tem aumentado significativamente e apresenta-se discrepante em localizações geográficas distintas (Aul et al, 1994; Germing et al, 2000; Lee et al, 2003; Lorand-Metze et al, 2004) (Tabela 3). Estima-se que cerca de 15.000 a 20.000 novos casos de SMD são diagnosticados anualmente nos Estados Unidos e que a incidência desta neoplasia varia de 2,1 a 12,6 casos/100.000 ao ano em indivíduos acima de 70 anos no continente europeu (Komrokji e Bennett, 2005). Este recente aumento da incidência da SMD pode ser resultado do aumento da expectativa de vida, como conseqüência dos avanços na medicina e precocidade dos diagnósticos. A variabilidade geográfica, por sua vez, pode ser reflexo não apenas do local de origem dos pacientes, como também das diferenças na interpretação e aplicação dos critérios morfológicos ao diagnóstico (Navarro et al, 2006).

Tabela 3. Incidência da SMD nas diferentes localizações geográficas em subgrupos distintos de pacientes conforme a classificação da FAB e OMS (Modificado de Navarro et al, 2006).

	BRASIL (%)	CORÉIA (%)	ÁUSTRIA (%)	ALEMANHA (%)	ESPANHA (%)	ITÁLIA (%)
FAB	No. 150	No. 227	No. 431	No. 1600	No. 311	-
RA	60	36	33	26	37	-
RARS	12	8	11	20	24	-
RAEB	23	40	21	22	21	-
RAEB-t	2	12	12	17	6	-
CMML	3	4	23	15	12	-
OMS	No. 141	No. 176	No. 281	No. 1243	No. 256	No. 374
RA	34	12 ^a	15	8,5	18	21
RARS	8,5	-	2	11	22	9
RCMD	18 ^b	37 ^b	32 ^b	24	20,5	22
RCMD-RS	-	-	-	15	7	3
RAEB-1	24 ^c	29	18	21	11	16
RAEB-2	-	21	15	18,5	14	19
5q-	1	0	0,5	2	0,8	8
NC-SMD	16	1	18	0	7	3

NC-SMD: SMD não-categorizada segundo OMS; ^a RA + RARS; ^b RCMD + RCMD-RS; ^c RAEB 1 + 2

2. ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

A etiologia da SMD não está completamente elucidada e convencionalmente é definida baseando-se na história prévia dos pacientes (Mecucci, 1998). Estudos em grandes séries sugerem que, em aproximadamente 20 – 30% dos casos, o desenvolvimento da SMD está relacionado a fatores de risco incluindo idade, sexo masculino (Ido et al, 1996), etilismo (Datta et al, 1990), tabagismo (Bjork et al, 2000), infecções virais (Pekmezovic et al, 2006), exposição ambiental e/ou ocupacional à radiação ionizante, benzeno e outros agentes genotóxicos (Levine e Bloomfield, 1992).

Conforme a etiologia, a SMD pode ser primária ou secundária. As mielodisplasias primárias, também definidas como idiopáticas ou SMD *de novo*, apresentam etiologia indeterminada e representam 30 a 50% dos casos diagnosticados afetando, na maioria, indivíduos de meia idade (55-70 anos de idade), bem como pessoas mais jovens (Pisani e Rainaldi, 2000). Condições autoimunes e a presença de doenças genéticas tais como Síndrome de Down, anemia de Fanconi e Síndrome de Bloom, também estão associadas ao desenvolvimento deste tipo de mielodisplasia (Strom et al, 2005).

As SMD secundárias são decorrentes de eventos mutacionais induzidos por agentes genotóxicos. O tipo de mielodisplasia secundária mais comum está associado ao uso de regimes quimioterápicos e radioterápicos prévios (SMD relacionada à terapia ou SMD-t) e está correlacionado a pior prognóstico e elevado risco de progressão para LMA (Mufti, 2004). A maioria dos casos de SMD-t envolve o tratamento de doenças primárias com agentes alquilantes e inibidores de topoisomerase II (Andersen et al, 2005). Os agentes alquilantes abrangem um amplo

grupo de drogas capazes de inibir a transcrição e a proliferação celular transferindo grupos alquil à estrutura do DNA (Allan e Travis, 2005). Os quimioterápicos inibidores de topoisomerases, por sua vez, induzem quebras de dupla fita no DNA e rearranjos de diversas seqüências gênicas (Richardson e Jasin, 2000).

Embora a patogênese da SMD não esteja completamente elucidada, observa-se que o desenvolvimento desta neoplasia está intimamente associado à presença de anormalidades cromossômicas constitucionais (Bernasconi et al, 2005). O processo tumorigênico das mielodisplasias envolve basicamente uma sucessão de três estágios: iniciação, promoção tumoral e transformação maligna (Figura 1) (Fenaux, 2004). Este processo de múltiplas etapas envolve o acúmulo de alterações genéticas críticas que podem afetar múltiplas vias metabólicas e determinar o surgimento de clones distintos no mesmo paciente (Panani e Roussos, 2006).

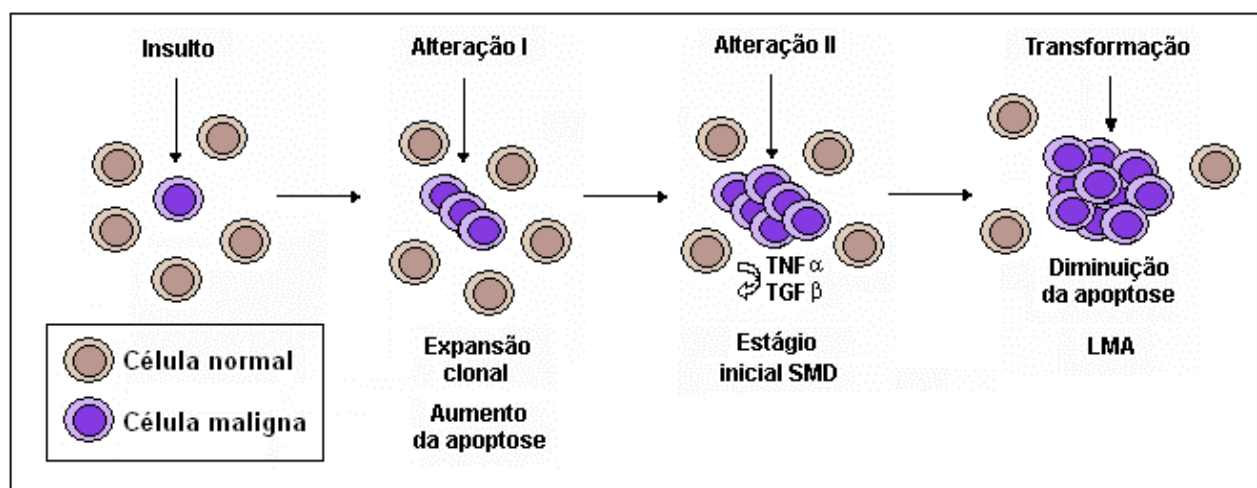


Figura 1. Representação esquemática da patogênese da SMD, em que uma alteração inicial é seguida pelo acúmulo de mutações, progressão tumoral e, por fim, diminuição da apoptose celular (modificado de Fenaux, 2004)

Fatores hereditários e/ou ambientais, incluindo agentes químicos e radioativos, drogas citotóxicas (mielossupressoras) e, até mesmo mutações

endógenas ocasionais, representam as alterações genômicas iniciais nas células hematopoéticas primordiais, determinando o surgimento do clone neoplásico (Fenaux, 2004).

Após os eventos iniciais, as células progenitoras medulares proliferam-se descontroladamente e adquirem uma variedade de anormalidades citogenéticas, mutações e silenciamento gênico que afetam a expressão de genes relacionados ao controle do ciclo celular, incluindo fatores de transcrição e ou supressores tumorais (Cermak et al, 2005).

Este perfil genético anormal é considerado propriedade intrínseca do clone neoplásico e pode estar relacionado a interações autócrinas e/ou parácrinas de citocinas (Catenacci e Schiller, 2005). A ocorrência destas anormalidades citogenéticas clonais, nas células da MO no microambiente medular anormal, pode facilitar a predominância e determinar o caráter proliferativo do clone displásico, sendo acompanhado, inicialmente, por elevada taxa apoptótica intramedular e instabilidade genômica, eventos que caracterizam a ineficiência da hematopoese (Liesveld et al, 2004).

A evidência de que o processo apoptótico participa do desenvolvimento tumoral nas SMDs representa um dos principais avanços no entendimento da patogênese desta mielodisplasia. A ocorrência de morte celular programada explica o caráter morfológico paradoxal de citopenia periférica e normo ou hiper celularidade medular na maioria dos portadores de SMD (Raza et al, 1995; Yoshida et al, 1995).

Yoshida (2002) relatou que a presença de alterações em genes específicos torna os clones neoplásicos suscetíveis à morte celular. Alguns mecanismos relacionados à ativação da apoptose podem envolver deficiências no ciclo celular e alterações mitocondriais. Mutações do DNA mitocondrial de células hematopoéticas

afetam o metabolismo do ferro e contribuem para o desenvolvimento de anemia refratária com sideroblastos em anel (Hou et al, 2005). Entretanto, até o presente, não há correlações evidentes entre as anormalidades citogenéticas presentes nestas células e a apoptose, sugerindo que este fenômeno não está restrito somente aos clones anormais (Komrokji e Bennett, 2005).

Os processos apoptóticos que controlam a eritropoese sob condições fisiologicamente normais estão restritos às células CD34+ e parecem atuar predominantemente em estágios precoces da SMD, declinando conforme a progressão tumoral (Hofmann et al, 2002; Panani e Roussos, 2006). Inúmeros mecanismos estão associados à ocorrência excessiva de apoptose e envolvem a participação de alguns fatores solúveis incluindo a eritropoetina (Epo), secreção de proteínas e ativação de receptores das vias de sinalização apoptótica [fator de necrose tumoral (TNF/TNF-R) e Fas-FasL], expressão de BCL-2, ativação de células T e deficiência de fatores de crescimento hemotopoético. Com a progressão da neoplasia, ocorre um decréscimo dos sinais apoptóticos mediados por estes fatores enquanto aumentam os sinais anti-apoptóticos (Fenaux, 2004).

A progressão clínica da SMD, o aumento significativo de blastos medulares e a evolução para leucemia mielóide aguda são eventos intimamente associados à presença de instabilidade genômica. Os eventos que promovem o aumento desta instabilidade incluem encurtamento telomérico, metilação anormal, silenciamento de genes envolvidos nas vias de reparo de mau pareamento do DNA, perda ou mutação em genes supressores tumorais (Kearns et al, 2004). Estes, somados ao decréscimo apoptótico, caracterizam o estágio de transformação maligna (Hofmann et al, 2004).

Os múltiplos eventos envolvidos na etiologia da SMD, bem como o caráter variável dos fatores clínicos e morfológicos refletem a complexidade e heterogeneidade desta neoplasia (Strom et al, 2005). Atualmente, o avanço no conhecimento das neoplasias hematológicas revela a importância da combinação de informações clínicas, prognósticas e citogenéticas na definição das mielodisplasias (Steensma e List, 2005).

3. SÍNDROME MIELODISPLÁSICA INFANTIL

As mielodisplasias abrangem um grupo de doenças hematológicas raras em crianças e adolescentes, com características clínicas e laboratoriais distintas (Hasle et al, 2003; Rytting, 2004). Entre o período de 1984 a 1992, um pequeno número de casos de SMD pediátrica foi publicado em literatura. Em 17 manuscritos, somente seis estudos relataram mais de dez casos, após amplo período de análise, sugerindo a raridade das SMD na infância. Até o presente, aproximadamente 325 casos pediátricos de SMD (0 a 18 anos de idade) foram cariotipados e estão armazenados no banco de dados de Mitelman et al. (2006) (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/CytList>).

A frequência real das SMD infantis não foi determinada pois as características morfológicas presentes em pacientes pediátricos afetados não correspondem às estabelecidas pelos critérios da FAB (Bader-Meunier et al, 1996). Até o momento, foram realizados somente dois estudos epidemiológicos regionais de mielodisplasia infantil. Passmore et al. (1995) relataram que a incidência de SMD pediátrica no Reino Unido é de aproximadamente $1,7 \times 10^6$ /ano. Quatro anos depois,

Hasle et al. (1999) relataram uma casuística de 77 casos estudados na Dinamarca e Canadá com uma incidência anual de $3,6 \times 10^6$.

De um modo geral, o número de casos de mielodisplasia pediátrica tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e estima-se que esta síndrome abrange aproximadamente 10% de todas as doenças hematológicas infanto-juvenis, podendo ser uma neoplasia primária, decorrente de terapias citotóxicas prévias ou surgir na forma familiar (Jekic et al, 2006).

Em contraste com a sintomatologia mais insidiosa presente nos pacientes adultos, a maioria das crianças com SMD é sintomática. Os sinais mais freqüentemente observados são febre, palidez, hemorragias, petéquias e infecções recorrentes. Ocasionalmente, as plaquetas são hipogranulares, a medula óssea geralmente apresenta-se hiper celular e a eritropoiese ineficaz resulta no aparecimento de precursores eritróides megablastóides multinucleados (Blank e Lange, 1981).

Devido a menor prevalência desta neoplasia em crianças e jovens, os mecanismos patogênicos envolvidos na promoção anormal e na hematopoese maligna ainda são pouco elucidados (Polychronopoulou et al, 2004). No entanto, sabe-se que a SMD pediátrica difere das demais mielodisplasias quanto aos fatores clínicos como também pelo tipo de anormalidades citogenéticas presentes. A maioria dos casos pediátricos de SMD é portador de alterações associadas ao cromossomo 7, apresenta baixa sobrevida (5.5 a 9.9 meses) e elevado risco de progressão para leucemia (Nair et al, 1992). Essas características peculiares podem definir entidades biológicas especiais de SMD infantil importantes na determinação do prognóstico e na conduta terapêutica (Hasle et al, 2004).

Apesar de sua importância no âmbito das neoplasias hematológicas e das discrepâncias existentes entre as mielodisplasias pediátricas e adultas, ainda não se estabeleceram critérios adequados de classificação e diagnóstico para SMD no grupo de neoplasias infantis (Morerio et al, 2001; Hasle et al, 2004). Por esta razão, há um número significativo de casos com diagnósticos não-conclusivos (Occhipinti et al, 2005).

A classificação da SMD pediátrica nos modelos da FAB e OMS é complexa, e, por vezes, não abrangente, visto que esses sistemas foram baseados em revisão de casos adultos (Babicz et al, 2005; Barnard et al, 2006). Entretanto, a utilização do esquema FAB para classificação das mielodisplasias infantis ainda é bastante comum e reflete uma elevada frequência de casos RAEB e RAEB-t entre jovens e crianças (Tuncer et al, 1992).

Em vista das significativas diferenças clínicas e citogenéticas envolvidas nas neoplasias hematológicas adulta e infantil, Mandel et al. (2002) propuseram uma nova classificação denominada Categoria Citologia Citogenética (CCC) (Tabela 4) em que a identificação de anormalidades citogenéticas poderia ser utilizada como único critério para o diagnóstico de SMD infantil na ausência de dados morfológicos. O sistema CCC é incitante, mas não permite, em alguns casos, estabelecer diagnósticos confiáveis. Ao mesmo tempo, baseados em dados clínicos, morfológicos e citogenéticos, Hasle et al. (2003) reestruturaram o sistema da OMS e estabeleceram critérios diagnósticos mínimos para doenças mielóides pediátricas, definindo três categorias diagnósticas distintas: um grupo de mielodisplasias e doenças mieloproliferativas, leucemia associada à Síndrome de Down e as SMD envolvendo citopenia refratária (RC), RAEB e RAEB-t (Hasle et al, 2003) (Tabela 5).

Tabela 4. Classificação segundo o sistema Categoria Citologia Citogenética (CCC) (Modificado de Mandel et al, 2002).

I. Categoria – etiologia da SMD
▪ Doença idiopática ▪ Doença associada ao tratamento ▪ Doença associada à síndrome
II. Citologia – características morfológicas da medula óssea e sangue periférico
▪ Citopenia refratária com sideroblastos em anel ▪ Citopenia refratária ▪ Citopenia refratária com displasia ▪ Citopenia refratária com excesso de blastos (5 – 29% blastos) ▪ Citopenia refratária com displasia e excesso de blastos
III. Citogenética
▪ Perfil citogenético normal ▪ Perfil citogenético anormal ▪ Perfil citogenético desconhecido

Tabela 5. Categorias diagnósticas de mielodisplasias e doenças mieloproliferativas em crianças (Modificado de Hasle et al, 2003).

I. Mielodisplasia/Doença mieloproliferativa
▪ Leucemia mielomonocítica juvenil (JMML) ▪ Leucemia mielomonocítica crônica (CMML) (apenas secundária) ▪ Leucemia mielóide crônica <i>BCR-ABL</i>-negativo (Ph⁻ CML)
II. Associação com síndrome de Down (DS)
▪ Mielopoiese anormal transicional (TAM) ▪ Leucemia mielóide de DS
III. Síndrome Mielodisplásica (SMD)
▪ Citopenia refratária (RC) (Blastos periféricos <2% e blastos medulares <5%) ▪ Anemia refratária com excesso de blastos (RAEB) (Blastos periféricos 2-9% e blastos medulares 5-19%) ▪ RAEB em transformação (RAEB-t) (Blastos periféricos e medulares 20-29%)

A definição de entidades distintas, relacionadas a fatores prognósticos que predizem a progressão da doença e a sobrevida, é extremamente importante na escolha da conduta terapêutica (Hasle et al, 2004). É necessário o direcionamento de pesquisas na busca de informações clínicas, morfológicas e citogenéticas para desvendar as peculiaridades envolvidas na SMD infantil e, assim, estabelecer critérios diagnósticos e prognósticos adequados e condutas terapêuticas específicas e eficazes (Rytting, 2004; Babicz et al, 2005).

4. CITOGENÉTICA DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Diferentes bandas, regiões e cromossomos estão preferencialmente envolvidos em rearranjos nas diferentes neoplasias e um número crescente de anormalidades específicas tem sido relacionado com doenças particulares ou a subgrupos de doenças (Mitelman et al, 2005).

Os tumores hematológicos são significativamente influenciados por alterações cromossômicas numéricas e estruturais, incluindo deleções, translocações, isocromossomos e marcadores cromossômicos. Alterações numéricas e estruturais únicas ou complexas (envolvendo três ou mais cromossomos distintos) são descritas em mais de 50% dos pacientes com SMD (Hofmann et al, 2004).

Alterações cromossômicas específicas caracterizam entidades clínico-hematológicas distintas na SMD, definindo importantes marcadores diagnósticos e predizendo a evolução da doença (Mecucci, 1998).

A introdução da análise citogenética foi fundamental para a caracterização de entidades clínico-hematológicas distintas na SMD e permitiu a definição de

importantes marcadores diagnósticos e fatores prognósticos relevantes e independentes, predizendo a evolução da doença e auxiliando na escolha da terapia adequada. Inúmeros protocolos de tratamento foram descritos em função dos achados citogenéticos resultando em um aumento significativo da sobrevida nestes pacientes (Ribeiro et al, 2003).

Os testes genéticos comumente utilizados para determinação do diagnóstico das SMD envolvem análises citogenéticas convencionais de cariótipos, principalmente bandamento GTG. As técnicas de bandamento são amplamente aplicadas desde o início dos anos 70 e permitem a detecção de cariótipos anormais em células individualizadas, a identificação de alterações cromossômicas clonais e o grau de heterogeneidade genética do tumor (Salman et al, 2004).

Entretanto, as análises cariotípicas convencionais apresentam limitações na detecção de alterações cromossômicas sutis e cariótipos complexos, particularmente em preparações celulares contendo pequeno número de metáfases, sobreposições cromossômicas e baixa qualidade do bandamento, freqüentemente observado em tumores hematológicos. Somando-se a esses fatores, o crescimento de células progenitoras *in vitro* dificulta a análise em alguns tipos de tumores (Steensma e List, 2005).

Outra limitação relevante da análise citogenética clássica está relacionada à impossibilidade de identificar cromossomos ou bandas cromossômicas envolvidos em alterações numéricas ou estruturais complexas, as quais são freqüentemente observadas em aproximadamente 30% dos portadores de SMD *de novo* e em 50% dos casos de SMD-t (Van Limbergen et al, 2002). Os cariótipos complexos definem entidades citogenéticas em SMD associadas a prognósticos agressivos e elevado risco de evolução para LMA (Bernasconi et al, 2005).

Com o advento das técnicas de citogenética molecular foram desenvolvidas metodologias mais eficientes para a triagem de rearranjos genéticos utilizando ferramentas da biologia molecular aplicadas à citogenética (Kearney e Horsley, 2005).

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), descrita por Pinkel et al. e Cremer et al. em 1986, proporcionou avanços significativos na pesquisa e diagnóstico de leucemias e linfomas. As vantagens da FISH incluem a análise rápida de um grande número de células e a detecção de anormalidades cromossômicas específicas em núcleos interfásicos e metafásicos com elevada sensibilidade e especificidade, o que demonstra a importância de sua utilização como adjuvante no diagnóstico e na caracterização citogenética de doenças hematopoéticas (Catenacci e Schiller, 2005).

A aplicação da citogenética molecular, muitas vezes combinada às metodologias convencionais, tornou-se bastante freqüente no estudo de neoplasias hematológicas, incluindo as SMD, e possibilitou a identificação de ganhos e perdas no genoma tumoral e a caracterização de novas alterações (Steensma e List, 2005). Até o presente, mais de 3983 casos de SMD foram cariotipados e armazenados no banco de dados de Mitelman et al. (2006) (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/CytList>).

Investigações citogenéticas na SMD revelam a presença de cariótipos caracterizados por uma variedade de aberrações cromossômicas incluindo deleções cromossômicas parciais, monossomias e rearranjos complexos (Tabela 6). Particularmente, em pacientes pediátricos, deleções completas ou parciais do cromossomo 7, monossomia do 17, trissomia do 8 e perdas no braço curto do

cromossomo 12 são freqüentemente observadas (Mitelman et al, 2006). A presença de translocações é rara, acometendo principalmente os casos de leucemias *de novo* (Mecucci, 1998; Mhawech e Saleem, 2001; Cherry et al, 2003; Hirai, 2003; Hofmann et al, 2004; Cilloni et al, 2004; Komrokji e Bennett, 2005; Catenacci e Schiller, 2005; Pinto et al, 2005).

Cariótipos complexos são freqüentemente observados em 15 – 30% dos portadores de SMD. Pacientes com este padrão citogenético geralmente apresentam prognósticos agressivos e tendem a evoluir para LMA (Bernasconi et al, 2005). O aprimoramento da caracterização e descrição de rearranjos cromossômicos complexos é fundamental (Cermak et al, 2005) pois pode levar a identificação de marcadores prognósticos e ou tratamento.

Tabela 6. Freqüência das principais anormalidades cromossômicas na SMD (Hofmann et al, 2004).

Numérica	Deleções	Translocações
+8 (19%)	inv 3 (7%)	del 5q (27%)
-7 (15%)	t(1;7) (2%)	del 11q (7%)
+21 (7%)	t(1;3) (1%)	del 12q (5%)
-5 (7%)	t(3;3) (1%)	del 20q (5%)
	t(6;9) (<1%)	del 7q (4%)
	t(5;12) (<1%)	del 13q (2%)

Freqüência da aberração cromossômica é dada entre parênteses.

Cariótipos normais também são freqüentes na SMD e acometem 30-60% dos casos diagnosticados. A detecção deste perfil citogenético pode estar relacionada à existência de populações celulares normais, mais comuns em pacientes em estágios iniciais pré-malignos da SMD, e/ou a limitações das técnicas de citogenética clássica, as quais não permitem identificar rearranjos cromossômicos sutis, como

pequenas ampliações e microdeleções. Independentemente da causa, os cariótipos normais estão associados a prognósticos mais favoráveis (Catenacci e Schiller, 2005).

Anormalidades cariotípicas clonais são identificadas em aproximadamente 40 – 70% dos casos de SMD primária, enquanto que nas SMD-t a proporção de pacientes com alterações cromossômicas excede 95% (Tabela 7). As alterações recorrentes em SMD *de novo* envolvem deleções completas ou parciais do cromossomo 5 (30%), trissomia do cromossomo 8 (20%) e monossomia 7 (15%). A distribuição de anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais em SMD-t envolve predominantemente os cromossomos 5 e 7 , e juntas acometem 75% dos casos com cariótipos anormais. Estas alterações estão relacionadas com prognósticos desfavoráveis tanto nas SMD primárias como nas tipo relacionadas à terapêutica (Pellagatti et al, 2005; Steensma e List, 2005).

Anormalidades numéricas e estruturais do cromossomo 3 são freqüentemente observadas em doenças hematológicas e em outros tipos de neoplasias humanas, ocorrendo isoladamente ou em associação com outras alterações cromossômicas, geralmente monossomia 7 e deleções 7q (Mhawech e Saleem, 2001). No grupo das SMD, a presença de alterações envolvendo este cromossomo é mais comum entre os casos de SMD-t e está associada a prognósticos agressivos e resistência a tratamentos quimioterápicos convencionais (Lahortiga et al, 2004).

As deleções no braço curto do cromossomo 3 são comuns em tumores sólidos. Johansson et al. (1997) relataram que, em neoplasias hematológicas incluindo a SMD, os pontos de quebra no cromossomo 3 localizam-se mais distalmente quando comparados com os tumores sólidos, sugerindo que diferentes genes supressores tumorais estão envolvidos na patogênese das mielodisplasias.

Tabela 7. Anormalidades citogenéticas mais frequentes em SMD *de novo* e SMD-t (modificado de Catenacci e Schiller, 2005)

ANORMALIDADE CITOGENÉTICA	% SMD de novo/ SMD-t	RISCO DE PROGRESSÃO PARA LMA / PROGNÓSTICO	REGIÃO CROMOSSÔMICA ENVOLVIDA ou GENE(S) CONHECIDO(S)
del(20q)	5% / 7%	Baixo / Favorável	del(20)(q11.2-q12)
Perda de Y	-	Baixo se anormalidade isolada / Favorável	-
Monossomia 5/ del(5q) Síndrome de 5q-	10-20% / 40%	Alto / Desfavorável Baixo / Favorável	del(5)(q31e q33)
Monossomia 7/ del(7q)	5% / 55%	Alto / Desfavorável	7q22 e 7q32-33
Síndrome 17p-	7% SMD	Alto / Desfavorável	Gene <i>TP53</i>
11q23	5-6% / 2-3%	Intermediário / Médio	Gene <i>MLL</i>
Trissomia 8	10% SMD	Intermediário / Médio	-
Cariótipos complexos	10-20% / 90%	Alto / Desfavorável	Múltiplos

A deleção completa ou parcial do braço longo do cromossomo 7 está associada a uma série de doenças mielóides. Nas SMD, a monossomia 7 e deleções em 7q são freqüentes em pacientes com cariótipos complexos e prognósticos desfavoráveis caracterizados por baixa sobrevida e evolução para leucemia (Le Beau, 1996; Arif et al, 1996; Pedersen et al, 1997; Wyandt et al, 1998; Estey et al, 2000; Shen et al, 2001; Maserati et al, 2004).

Há dois principais picos de idade em que esta aberração citogenética apresenta maior freqüência: no primeiro ano de vida e por volta da sexta década. A deleção 7q pode ser observada em três grupos: em SMD *de novo* (10% dos casos) e, mais freqüentemente, pós-terapia citotóxica e após exposição ocasional ou constante a agentes potencialmente mutagênicos (Chen et al, 2004).

A perda completa ou parcial do cromossomo 7 também é freqüentemente observada em grupos de SMD/LMA familiares associados com doenças Mendelianas sendo comumente designadas como casos familiares de monossomia 7 (Maserati et al, 2004).

A associação desta alteração com outras anormalidades citogenéticas é freqüentemente observada e estudos por metodologias de citogenética molecular demonstram o envolvimento dos cromossomos 5 e 7 em translocações caracterizadas por monossomias parciais devido a perda do braço de cada cromossomo: $t(5;7)(q3?;q?)$, $t(5;7)(q?;q11)$, $t(4;5;7;13)$, $t(5;7)(q11;q11)$ (Mhawech e Saleem, 2001). Inserções críticas de pequenos segmentos cromossômicos também são identificadas como, por exemplo, a $ins(9;7)$, sendo esta comumente presente em SMD-t (Lessard et al, 1998).

Alterações cromossômicas clonais envolvendo deleções em 17p são observadas em 3 a 4% dos casos de SMD, mais freqüentemente em SMD-t (Hirai, 2003). As anormalidades que resultam em perdas neste segmento cromossômico incluem deleções, $i(17q)$ ou translocações não-balanceadas.

As $del(17p)$ estão freqüentemente associadas com alterações adicionais envolvendo principalmente os cromossomos 5 e 7 e estão relacionadas preferencialmente a SMD clinicamente agressivas, com resistência a tratamentos e baixa sobrevida (Panani e Roussos, 2006).

Embora extremamente raros, ganhos e ampliações de segmentos do braço longo do cromossomo 17 foram relatados em neoplasias hematológicas. Martin-Subero et al. (2001) identificaram amplificação em 17q em um paciente adulto inicialmente com SMD e que evoluiu para LMA. No mesmo ano, Morerio et al. (2001) descreveram um caso pediátrico de SMD com $t(9;11)(p12;q23)$ ao diagnóstico, que

progrediu para LMA extremamente agressiva como conseqüência da evolução clonal da doença decorrente do surgimento de células mutantes quimioresistentes contendo a trissomia de 17q21-qter.

A associação das várias anormalidades citogenéticas clonais recorrentes na SMD tem direcionado os estudos moleculares que permitem a identificação e a caracterização dos genes responsáveis pela origem destes tumores, bem como as vias metabólicas em que atuam (Hirai, 2003).

Uma variedade de estudos sugere que mutações em múltiplos genes medeiam a patogênese e progressão da SMD. Alterações em oncogenes e genes supressores tumorais são achados freqüentes em pacientes com SMD e indicativas de pior prognóstico. Entretanto, estas alterações estão associadas com a idade e estadio clínico, sendo mais comum nas fases iniciais e de progressão da doença (Cilloni et al, 2004).

A elevada freqüência de deleções de *loci* cromossômicos nas SMD sugere que a inativação de genes supressores tumorais e genes envolvidos no reparo a danos no DNA estão intimamente relacionados a este grupo de mielodisplasias. Sendo assim, o fenótipo anormal dos clones hematopoéticos resultante destes tipos de alterações envolvem dois eventos de perda de função, ocorrendo primeiramente deleção de uma cópia do gene alvo e subsequente perda do segundo alelo por microdeleções, mutações em ponto, perda de expressão por eventos epigenéticos ou recombinações aberrantes (Hirai, 2003; Hofmann et al, 2004). Contudo, a haploinsuficiência de genes supressores, ou seja, a perda de um único alelo do gene resulta na redução significativa dos produtos gênicos e na predisposição ao desenvolvimento desta neoplasia (Komrokji e Bennett, 2005).

Nas SMD com deleção de 3p, os pontos de quebra no cromossomo 3 localizam-se mais distalmente quando comparados com os tumores sólidos, sugerindo que diferentes genes supressores tumorais estão envolvidos na patogênese das mielodisplasias (Johansson et al, 1997).

Alguns genes importantes relatados em processos neoplásicos mapeados em 3p são *XPC* e *PPARG* (3p25.1), *Ghelin/MYLPR*, *VHL* e *FANCD2* (3p25-p26), *TCTA*, *AF3q21*, *Catenina* e *MST1R*, porém nenhum estudo demonstrou a associação destes com o desenvolvimento da SMD (<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/>).

O gene supressor tumoral multifuncional *VHL* (*von Hippel-Lindau*) está mapeado em 3p25-26 e seu produto protéico participa das vias do *checkpoint* do ciclo celular promovendo a senescência celular mediante danos no DNA, na regulação da expressão de genes (processo de ubiquinação) e está envolvido com a organização do citoesqueleto, adesão e motilidade celulares (Richard et al, 2002). O gene da anemia de Fanconi, *FANCD2*, situado em 3p25-26, próximo ao gene *XPC*, codifica uma proteína nuclear do complemento D2 que atua no ciclo celular e no reparo a danos no DNA (Huret et al, 2000).

O gene *PPAR γ* (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ* ou *PPARG*) mapeado em 3p25.1 codifica uma proteína pertencente a família de receptores nucleares envolvidos no controle do metabolismo energético e efeitos inflamatórios, regulação da diferenciação e proliferação celulares, e na indução da apoptose em vários tipos de células (Shearer e Hoekstra, 2003; Francis et al, 2003). Os eventos que resultam na ativação dos receptores *PPAR γ* envolvem principalmente a interação com ligantes de origem fisiológica e/ou farmacológica, incluindo hormônios

tireoideanos, ácido retinóico e colecalciferol (vitamina D3). Após a ativação, os receptores PPAR γ formam heterodímeros com receptores retinóicos X (RXR), também presentes no compartimento nuclear (Wang et al, 2006). O complexo PPAR γ /RXR interage com coativadores transcrpcionais e se liga a sítios específicos denominados PPRES (*peroxime proliferator response elements*) de genes específicos. Os PPRES consistem em motivos hexaméricos com repetição em *tandem* (TGACCT) presentes na região promotora dos genes alvos (Figura 2). Esta interação afeta a transcrição destas seqüências pelo remodelamento da estrutura da cromatina e/ou agindo como moléculas adaptadoras, que se ligam a receptores nucleares envolvidos na maquinaria transcrricional (Kodera et al, 2000; Lee et al, 2001). Além das propriedades metabólicas, o PPAR γ tem sido caracterizado tanto como um supressor e/ou promotor tumoral dependendo do tipo celular (Lehrke e Lazar, 2005). Embora este gene não apresente uma função direta de repressor transcrricional, agonistas de PPAR γ demonstram esta atividade repressora em alguns tipos de tecidos como observado, por exemplo, em monócitos e macrófagos (Ricote et al, 1998). Os mecanismos envolvidos na repressão transcrricional dependente de agonistas de PPAR γ ainda não foram completamente elucidados, mas acredita-se que podem estar associados à inibição de vias celulares relacionadas à ativação de fatores de transcrição. Este evento, também conhecido como silenciamento, estaria relacionado à interação física dos heterodímeros PPAR γ /RXR com outros fatores de transcrição ativos, inibindo a transcrição de genes alvos (Grommes et al, 2004). Estudos utilizando linhagens celulares tumorais têm demonstrado o envolvimento de PPAR γ na via do *checkpoint* do ciclo celular. Agonistas de PPAR γ promovem a ativação de inibidores de ciclinas quinase-dependente (CDK). Os inibidores de CDKs

promovem o bloqueio da progressão do ciclo celular impedindo a formação dos complexos ciclina/CDK, e, conseqüentemente, a fosforilação da proteína Rb (retinoblastoma) ligada ao E2F, proteína que regula negativamente a transcrição de *Rb* (Wang et al, 2006).

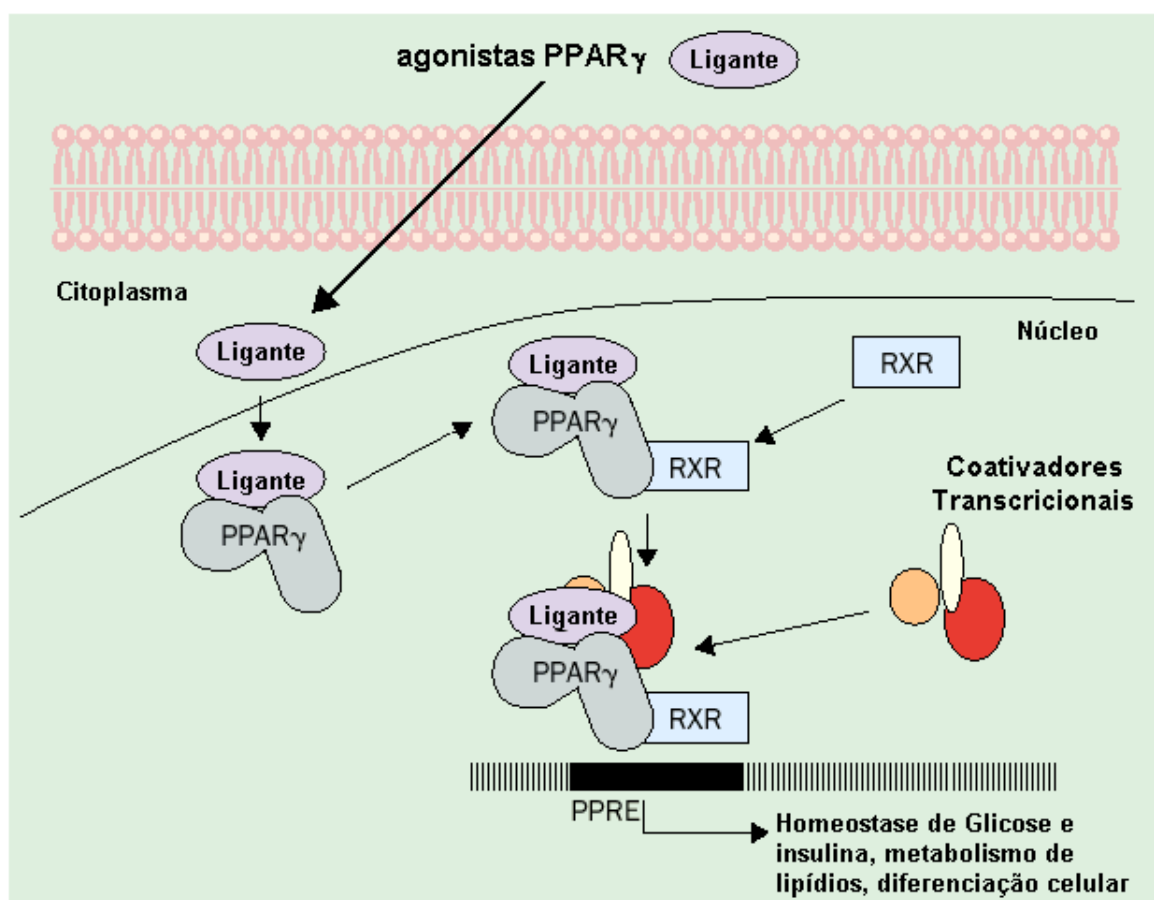


Figura 2. Ativação de PPAR γ . Após a interação com o ligante, PPAR γ forma heterodímeros com o receptor retinóico (RXR) no núcleo. Os heterodímeros PPAR γ /RXR se associam com coativadores transcricionais e se ligam a seqüências denominadas elementos de resposta a PPAR (PPRE) localizadas em genes alvos envolvidos na homeostasia da glicose e insulina, metabolismo de lipídios e diferenciação celular (Modificado de Grommes et al, 2004).

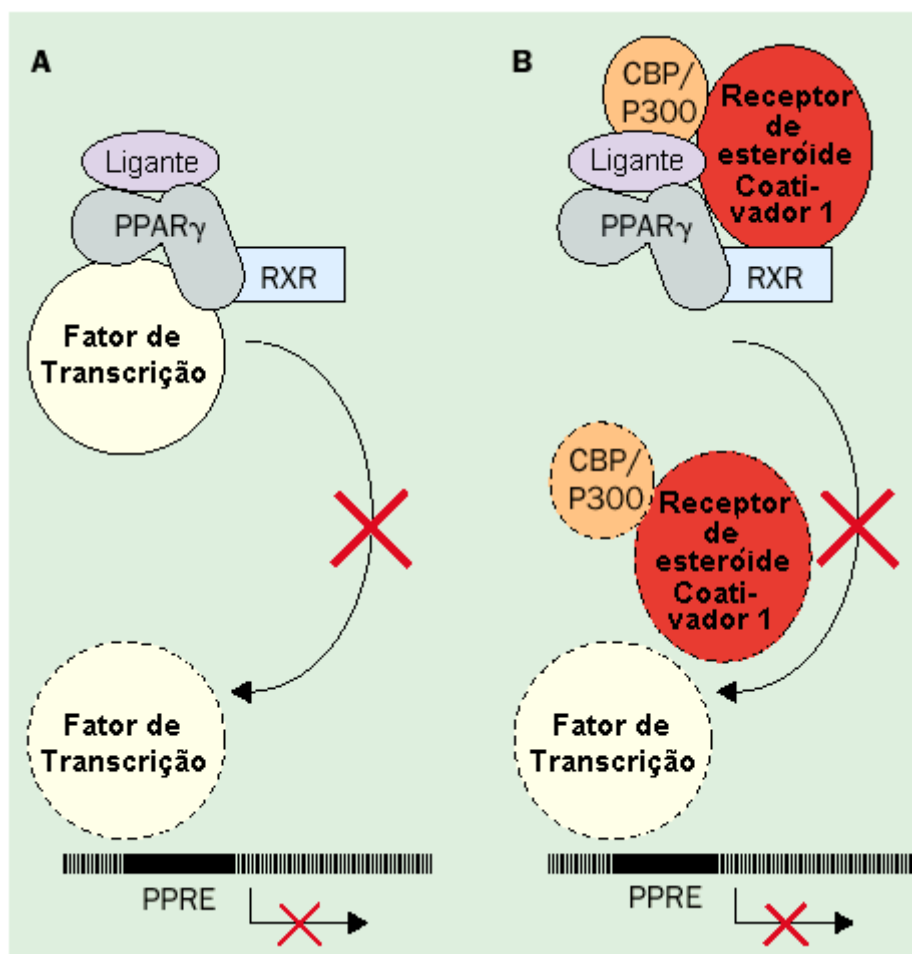


Figura 3. Mecanismos de repressão transcricional mediados por *PPARγ*. (A) A inibição da via de tradução de sinal é mediada pela associação física de *PPARγ*/RXR com outros fatores transcripcionais levando a inibição da expressão de genes específicos (p.ex., *STATs*, *AP1* e fator nuclear κB). (B) A competição de coativadores transcripcionais estimulam a atividade repressora dos agonistas de *PPARγ*. O seqüestro de coativadores (p.ex., cAMP, CBP/P300 e coativador 1 do receptor de esteróide) pelo complexo *PPARγ*/RXR previne a ativação transcricional (Modificado de Grommes et al, 2004).

O gene *XPC* (*Xeroderma pigmentosum*) está localizado em 3p25.1 e codifica uma fosfoproteína nuclear envolvida no reconhecimento prematuro de danos no DNA, especificamente na via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), a qual encontra-se não funcional em portadores de *Xeroderma pigmentosum* (Spatz et al,

2001). Recentes estudos relacionaram este gene com a SMD (Pinto et al, 2005) e com o gene *TP53* (Wang et al, 2003).

A NER é uma via celular altamente conservada entre as espécies e apresenta a capacidade de remover e reparar lesões potencialmente mutagênicas ao DNA, induzidas por agentes genotóxicos endógenos ou ambientais (Figura 4) (Adimoolam e Ford, 2003). Nesta via de reparo, em resposta a estímulos genotóxicos, a proteína TP53 é ativada e, com o auxílio de um complexo de coativadores, liga-se às regiões promotoras específicas, acionando a transcrição de genes importantes como o *XPC*. A proteína XPC é responsável pelo reconhecimento dos erros no DNA e se liga diretamente no local do dano ou, conforme o tipo de erro, interage preliminarmente com outros co-ativadores protéicos específicos no sítio da lesão (Figura 2) (Sengupta e Harris, 2005).

A fosfoproteína nuclear p53 é codificada por um dos mais importantes genes supressores tumorais, freqüentemente mutado em cânceres humanos, o *TP53*. Este gene está mapeado em 17p13.1 e exerce um papel crucial na regulação do ciclo celular, manutenção da integridade do DNA e controle dos processos apoptóticos. Embora multifuncional, a função primária do *TP53* é a supressão tumoral, atribuída pelas suas propriedades de fator transcricional e regulador de expressão de diferentes genes celulares (Adimoolam e Ford, 2003).

A inativação do gene *TP53* resultante de deleções em 17p é detectada em aproximadamente 15% dos casos de SMD primária, apresentando maior incidência entre portadores de SMD-t, e está relacionada preferencialmente a pacientes com estadio clínico avançado e instabilidade cariotípica (Hirai, 2003; Steensma e List, 2005). A existência de pontos de quebra próximos ao gene *TP53* situado em

17p13.1 sugere o envolvimento deste gene no processo patogênico das mielodisplasias (Watanabe et al, 2004).

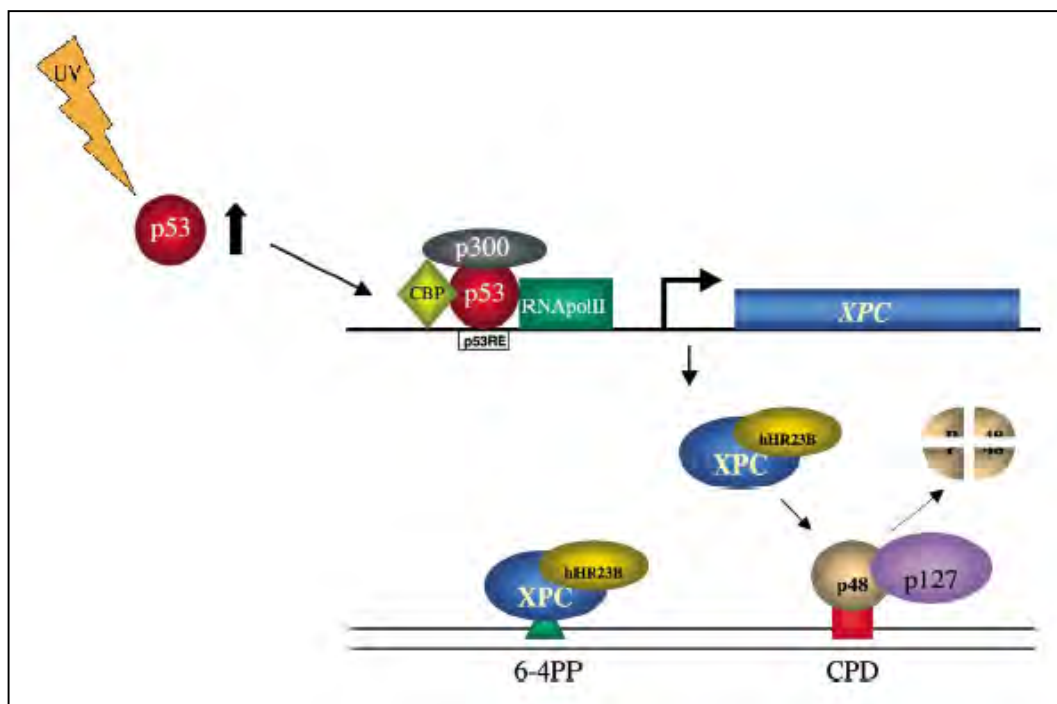


Figura 4. Modelo da via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) dependente de TP53 e XPC. Após insulto ao DNA, a TP53 é ativada e, com o auxílio do complexo coativador p300/CBP, liga-se a elementos promotores específicos e inicia a transcrição de XPC. A proteína XPC liga-se direta ou indiretamente no sítio da lesão, conforme o tipo do dano ocorrido. A ligação indireta é mediada pela interação preliminar com a proteína p48, a qual sofre degradação proteossômica após ser liberada de XPC. Modificado de Adimoolam e Ford (2003).

A freqüente associação entre as perdas no cromossomo 7 e leucemias mielóides sugere que essas alterações podem liderar a perda de genes que regulam o crescimento e a diferenciação de células mielóides (Neuman et al., 1992).

A maioria dos casos com deleções em 7q apresenta dois principais pontos de quebra, sendo um proximal (7q11-22) e um distal (7q31-36). Alguns possíveis genes candidatos, mapeados no braço longo do cromossomo 7 e associados às mielodisplasias, incluem a eritropoetina (*EPO*) em 7q22, inibidor do ativador da

plasmina (*PLANH1*) (7q21.3-22), os genes da asparagina sintetase (*ASNS*) e fosfoinositidil-3-quinase (*PIK3CG*) em 7q22.1, e o receptor de célula-T β (*TCRB*) em 7q35. Os seus produtos estão envolvidos nas vias de regulação do crescimento e diferenciação de células mielóides (Neuman et al, 1992; Mhawech e Saleem, 2001).

Em SMD, a perda de segmento genômico em 7q22.1 parece ser crítica (Johnson et al, 1996; Mecucci, 1998; Hirai, 2003). Um potencial gene mapeado nesta região é o *EPO*. Este gene é altamente conservado e codifica uma citocina glicosilada denominada eritropoetina, a qual é responsável pela regulação da produção de células vermelhas, promovendo a diferenciação e maturação da linhagem hematopoética eritróide, e iniciando a síntese de hemoglobina (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/OMIN>). Esta proteína é expressa em uma variedade de tecidos, principalmente em situações de hipóxia, na qual atua como fator anti-apoptótico (Siren et al, 2001). A diminuição da sensibilidade de precursores eritróides a EPO contribui para o desenvolvimento de anemia em portadores de SMD e outras neoplasias mielóides (Hoefsloot et al, 1997). Estes resultados levaram ao desenvolvimento de terapias com EPO em pacientes com mielodisplasias sensíveis a ela (Bunworasate et al, 2001).

O gene supressor tumoral mielóide, o *PIK3CG* (fosfoinositidil-3-quinase) também foi identificado neste *locus* e codifica uma enzima a qual modula a sinalização extracelular nos processos de adesão célula-célula mediados pela E-caderina, importante para manutenção da integridade estrutural e funcional do epitélio (Sasaki et al, 2000). Entretanto, não foi estabelecida nenhuma correlação significativa do envolvimento deste gene em neoplasias mielóides associadas com monossomia 7 e del(7q) (Kratz et al, 2002). Outro gene candidato mapeado em

7q22-q31 é o *COG5*. O produto deste gene é constituinte do complexo multiprotéico localizado na membrana do complexo de Golgi (*conserved oligomeric Golgi* – COG), o qual é responsável pelo transporte intracelular e metabolização de glicoproteínas. Contudo, para o nosso conhecimento, nenhum estudo tem relacionado alterações neste gene e o desenvolvimento de neoplasias.

A associação entre a monossomia do cromossomo 7 e a SMD primária é especialmente observada em crianças com leucemia mielomonocítica juvenil (JMML) e esta condição foi designada de “síndrome da monossomia 7” uma vez que emerge de alterações clonais relacionadas a neurofibromatose do tipo 1 (NF1) (Savage et al, 1994). O gene *NF1* é um supressor tumoral responsável pela expressão da neurofibromina, uma proteína ativadora da GTPase (GAP) que regula negativamente a ativação transcricional do gene *RAS* (Side et al, 1997). Pacientes pediátricos com neurofibromatose apresentam perda ou mutação dos alelos normais de *NF1* e predisposição elevada a JMML. Mutações no gene *NF1* são detectadas em aproximadamente 30% dos casos de JMML e promovem a ativação descontrolada da proliferação celular (Hirai, 2003).

A ativação de oncogenes é um evento raro em mielodisplasias e pode ser identificado em nível cariotípico na forma de *double-minutes* ou como regiões homogeneamente coradas. Este fenômeno resulta de rearranjos estruturais, ganhos ou amplificações de segmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, e está associado a prognósticos mais agressivos com baixa sobrevida e resistência a terapias (Mecucci, 1998; Papenhausen et al, 2005).

Relatos do envolvimento do *ERBB2* em SMD e LMA agressivas demonstram que alterações neste gene ou em segmentos próximos podem ser importantes na patogênese de neoplasias hematológicas do tipo mielóide. Fukushige et al. (1986) e

Kaneko et al. (1987) identificaram a existência de um ponto de quebra na região 17q12 envolvendo o gene *ERBB2* em casos de leucemia promielocítica aguda. Posteriormente, Potti et al. (2002) avaliaram por imunohistoquímica 69 pacientes diagnosticados com mieloma múltiplo e identificaram níveis aumentados de expressão do gene *ERBB2* em 13% dos pacientes. Mais recentemente, Martínez-Ramírez et al. (2005) detectaram pela CGH (Hibridação Genômica Comparativa) e confirmaram, pela FISH, ampliações do gene *ERBB2* em 35% dos 37 pacientes com SMD, os quais apresentaram cariótipos complexos por citogenética convencional. Os autores sugeriram que alterações neste gene podem determinar o desenvolvimento de neoplasias hematológicas.

A proteína codificada pelo oncogene *ERBB2* (*HER2*) é membro da família de receptores transmembrânicos do tipo tirosina quinase (*HER-1*, *HER-2*, *HER-3*, *HER-4*) e apresenta elevada afinidade a importantes substratos estimuladores de crescimento (Ross et al, 2003). A família *HER* participa das vias de transdução de sinais de proliferação, diferenciação, motilidade e adesão em uma variedade de linhagens celulares (Baselga e Albanell, 2001). A interação destes receptores tirosina-quinase com fatores de crescimento promove a formação de dímeros entre as diferentes proteínas *HER2* e, conseqüentemente, a ativação da divisão celular. A expressão elevada de *ERBB2* resulta na formação de homodímeros permanentes os quais se mantêm constitutivamente ativos promovendo vantagens proliferativas (Figura 5) (Pupa et al, 2005).

Níveis aumentados de expressão do gene *ERBB2* são descritos em vários tipos de tumores sólidos e, particularmente, no câncer de mama quando mostra associação a prognósticos agressivos (Wang e Hung, 2001).

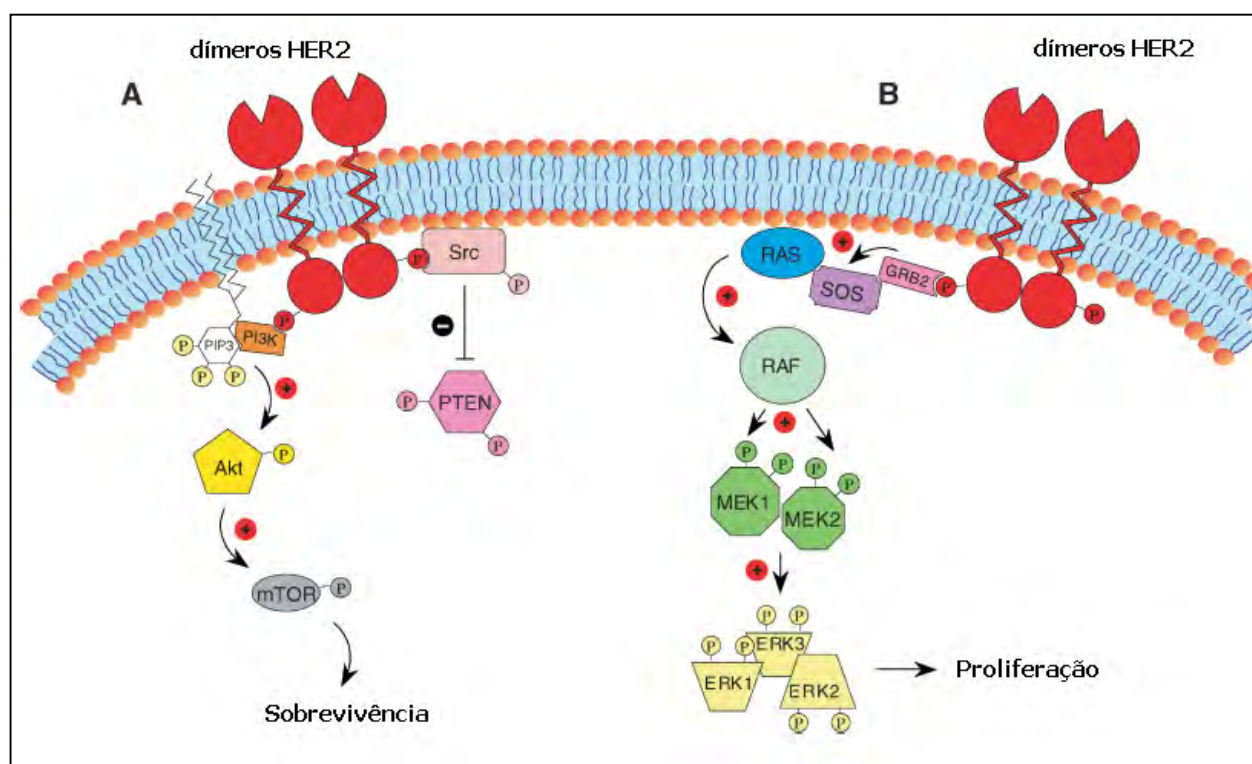


Figura 5. Representação esquemática da via de sinalização induzida pela ativação da oncoproteína HER2 envolvida na tumorigênese (A) e proliferação normal (B). As duas vias são precedidas pelo aumento de expressão e ativação de HER2, resultante da autofosforilação (P). Em (A), a ativação de HER2 induz o recrutamento de quinases Src e fosfatidilinositol 3' (PI3K) ao receptor e ativação de ambas as enzimas. Src ativa, fosforila e inibe a função de PTEN, impedindo seu deslocamento à superfície celular. Dessa forma, o PTEN não é capaz de inibir PI3K, determinando a viabilidade da célula. A ativação do PI3K promove o aumento dos níveis de fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3), o qual ativa as proteínas Akt e mTOR, induzindo a tumorigênese. Na via (B), o HER2 ativado induz a ativação de RAS com o auxílio de moléculas GRB2 e SOS, resultando na estimulação de quinases da família MEK, responsáveis pela ativação quinases extracelulares (ERK), as quais conduzem a proliferação celular. Modificado de Pupa et al. (2005).

A freqüente associação entre alterações citogenéticas e os diferentes estadios da SMD demonstra a importância da realização de testes genéticos na prática clínica. A identificação de anormalidades cromossômicas pode contribuir para a elucidação dos mecanismos patogênicos da doença e auxiliar na definição do diagnóstico e prognóstico, bem como na escolha da conduta terapêutica adequada (Steensma e List, 2005).

II- OBJETIVOS

Considerando-se que a técnica da FISH torna possível a análise rápida de um grande número de células e a detecção de anormalidades cromossômicas específicas em núcleos interfásicos, e que aliado a sua elevada sensibilidade, especificidade e rapidez, permite sua utilização como adjuvante na identificação de anormalidades cromossômicas em doenças hematopoéticas, foi proposto este estudo com o objetivo de:

- avaliar as alterações cromossômicas em amostras de medula óssea de pacientes pediátricos com SMD utilizando a metodologia de FISH de modo a permitir um refinamento da participação de genes particulares na patogenia e evolução da doença;
- comparar os dados encontrados por FISH com os de bandamento GTG;
- correlacionar as alterações encontradas com os dados histopatológicos, estadiamento clínico e prognóstico da doença.

III- MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

Um total de 23 pacientes pediátricos portadores de síndrome mielodisplásica foi avaliado neste estudo. Entre este grupo de pacientes estão incluídos 14 do sexo masculino e nove do sexo feminino, com idade variando de 45 dias a 18 anos.

As amostras de medula óssea (sedimentos contendo preparações cromossômicas) são provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP (colaboração com o Dr Luiz Gonzaga Tone - Departamento de Pediatria e Puericultura e Serviço de Transplante de Medula Óssea, Hematologia), Hemonúcleo Regional de Jaú, Hospital Amaral Carvalho, Jaú, SP (Dra. Maura R. V. Ikoma) e Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR (Dr. Iglenir João Cavalli). As preparações cromossômicas foram utilizadas para orientação de dados ao diagnóstico, prognóstico e tratamento das possíveis patologias hematológicas como parte da rotina nos respectivos centros. As lâminas usadas neste estudo foram provenientes do mesmo frasco de cultura celular dos quais foram obtidos os cariótipos compostos. Os casos foram reavaliados por bandamento GTG e as preparações celulares dos casos com material disponível foram submetidas à metodologia da FISH com sondas selecionadas para avaliar rearranjos cromossômicos específicos.

Os dados do seguimento clínico e informações laboratoriais e histopatológicas dos pacientes foram revisadas junto aos prontuários médicos

nas instituições em que foram coletadas as amostras. Os casos estão classificados histopatologicamente de acordo com os critérios estabelecidos pelo *French-American-British Cooperative Group* (FAB, 1982).

A Tabela 8 apresenta as informações clínicas e histopatológicas detalhadas das amostras avaliadas neste estudo.

Tabela 8. Caracterização clínica da amostra avaliada neste estudo.

CASO	SEXO/ IDADE	DATA AO DIAGNÓSTICO	SINAIS CLÍNICOS	CLASSIFICAÇÃO	CITOPENIA	BLASTOS NA MO (%)	AGENTES GENOTÓXICOS			SEGUIMENTO CLÍNICO Agosto/2005
							APÓS O PARTO			
							DURANTE A GRAVIDEZ			
1	F/3a7m	17/07/1991	Hepatoesplenomegalia, adenomegalia cervical anterior e submandibular, anemia severa.	RA	+	4	ND	ND	Óbito pela doença – 16/03/2003	
2	F/6a	18/02/1992	Baço com ponta palpável próximo ao RCE, anemia severa, petéquias.	RA	+	4	-	-	Perda do seguimento – janeiro/1993	
3	M/5a	22/01/1992	Hepatoesplenomegalia, adenomegalia cervical bilateral e submandibular, anemia severa, sangramento oral.	RAEB	+	5	ND	ND	Óbito pela doença – 29/10/1992	
4	M/6a	30/10/1995	Anemia severa desde seis meses de vida.	RA	+	<1	-	-	Vivo – 30/09/2005	
5	M/1a6m	15/06/1994	Hepatoesplenomegalia, anemia severa, petéquias.	RAEB	+	6	Etilismo e tabagismo	ND	Perda de seguimento - 28/03/1995	
6 ^a	M/5a	09/04/2002	Febre, palidez, hematomas, infecções recorrentes, eupnéico sem esforço.	RA	+	2	-	Cisplatina, Adriblastina, VCR, Ciclofosfamida, Ifosfamida, Mesna, Etoposide (Tratamento de tumor 1º - Neuroblastoma IV – 25/09/1999)	Vivo – 03/07/2006	
7 ^a	F/4a6m	06/05/1999	Hepatoesplenomegalia, anemia severa, sangramento espontâneo em mucosas.	RAEB	+	5,5	ND	ND	Vivo ND	

CASO	SEXO/ IDADE	DATA AO DIAGNÓSTICO	SINAIS CLÍNICOS	CLASSIFICAÇÃO	CITOPENIA	BLASTOS NA MO (%)	AGENTES GENOTÓXICOS			SEGUIMENTO CLÍNICO Agosto/2005
							-			
							-			
							DURANTE A GRAVIDEZ	APÓS O PARTO		
8 ^a	M/2m15d	12/07/2001	Hepatoesplenomegalia, anemia, sangramento no coto umbilical com hiperemia.	RAEB	+	8	-	-	Óbito pela doença – 22/04/2002	
9 ^a	M/13a	04/10/2002	Anemia severa, aplasia da medula óssea, pancitopenia, infecções recorrentes, epistaxes, sangramento nasal.	RA	+	2	-	-	Óbito por consequência de TMO – 25/05/2005	
10	M/1a1m	15/03/2002	Anemia severa, sangramento na gengiva, hematomas.	RAEB	+	2-3 ^c	-	-	Perda de seguimento – setembro/2003	
11 ^a	M/16a	03/03/2003	Anemia, febre, perda de peso e diarreia	CMML	+	3 ^c	-	-	Óbito pela doença – 28/11/2003	
12 ^a	M/6a	06/03/2004	Anemia severa, sangramento na gengiva, dor nas articulações, eupnéico sem esforço (março/2004); hepatoesplenomegalia (junho/2005)	RARS – março/2004 RAEB – junho/2005	+	2 ^d – março/2004 9 – junho/2004	-	-	Vivo – 12/07/2006	
13	F/14a	01/02/2001	Equimoses, fraqueza, sangramento vaginal, palidez.	RA – fevereiro/2001 RAEB – janeiro/2002	+	2 – fevereiro/ 2001 6 – janeiro/ 2002	-	-	Vivo – 26/07/2006	
14	F/18a	25/08/2005	Anemia refratária, esplenomegalia, adenomegalia submandibular esquerda.	RAEB	+	8	-	-	Vivo – 09/08/2006	
15 ^a	M/7a	15/10/2001	Anemia há cinco anos e micropoliadenopatia cervical.	RAEB	+	11	-	-	Vivo – 01/08/2006	

CASO	SEXO/ IDADE	DATA AO DIAGNÓSTICO	SINAIS CLÍNICOS	CLASSIFICAÇÃO	CITOPENIA	BLASTOS NA MO (%)	AGENTES GENOTÓXICOS			SEGUIMENTO CLÍNICO Agosto/2005
							DURANTE A GRAVIDEZ	APÓS O PARTO		
16 ^a	F/11a	02/12/2002	Anemia, epistaxe, equimoses.	RA	+	3	-	-	Vivo – junho/2006	
17	M/8a	20/05/2004	Anemia, hematomas de repetição.	ND	+	ND	-	-	Vivo – 20/06/2006	
18	F/13a	07/08/2003	Anemia, edema da face e IMMI.	RA	+	2	-	-	Perda de seguimento – 25/08/2004	
19	M/1a27d	05/10/2004	Anemia severa, febre e derrame pleural.	ND	+	ND	-	-	Perda de seguimento – dezembro/2004	
20 ^a	F/8a	06/10/2004	Amenia severa.	RA	+	2	-	predinisona	Perda de seguimento – dezembro/2004	
21	F/5a	28/10/2004	Anemia severa, hepatoesplenomegalia, mononucleose, varicela.	CMML	+	20-30	-	-	Perda de seguimento – novembro/2004	
22	M/18a	16/11/2004	Anemia severa, gengivorragia, epistaxe ocasional, necessidade transfusional semanalmente.	RA	+	<1	-	Tabagismo desde os 10a	Vivo – 21/06/2006	
23 ^{a, e, f}	M/8a	28/05/2004	Dor abdominal, palidez, epistaxe, anemia severa, hepatoesplenomegalia.	CMML	+	2,4 – 28/05/2004 15 – 15/02/2005	-	-	Óbito pela doença – 19/01/2006	

^aPacientes que receberam transplante de medula óssea (TMO). ^bPaciente que desenvolveram a doença após terapia. ^cMielograma diluído. ^dPresença de 22% sideroblastos em anel após mielograma. ^ePacientes submetidos a terapia de imunossupressão. ^fEvolução para Leucemia Mielóide Aguda; MO: medula óssea; d: dias; m: meses; a: anos; SMD: síndrome mielodisplásica; RA: anemia refratária; RARS: RA com sideroblastos em anel; RAEB: anemia refratária com excesso de blastos; Nd: não determinado até o momento.

2. Métodos

2.1.Cultura de Células

Cultura de linfócitos de sangue periférico

Amostras de sangue periférico de indivíduos normais foram usadas como controle no estudo da FISH. Foram cultivados linfócitos de sangue periférico em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) estimulados com fitohemaglutinina (Invitrogen) durante 71 horas a 37°C segundo a técnica de Moorhead et al (1960) com modificações. Adicionou-se solução de colchicina 0,0016% durante uma hora a 37°C. Utilizou-se a solução hipotônica de KCl (0,075M) e posterior fixação com metanol/ácido acético (proporção de 3:1). O procedimento de fixação do sedimento foi repetido duas vezes. Após o gotejamento do material nas lâminas, estas foram armazenadas a -20°C até sua utilização.

Cultura de aspirados de medula óssea

As amostras de medula óssea foram submetidas a ressuspensão mecânica e, posteriormente, foi adicionada solução salina balanceada de Hank's ao sedimento celular. Após a homogeneização e centrifugação, as amostras foram semeadas em frascos de cultura contendo meio RPMI 1640 (Sigma) e soro bovino fetal (Cultilab) e incubadas em estufa a 37°C, conforme descrito no projeto inicial.

Para a colheita das culturas, o preparado celular foi incubado com colchicina em estufa a 37°C e submetido à hipotonização progressiva com KCl 0,075M. Posteriormente, foi realizada a fixação do material com solução de metanol e ácido acético na razão de 3:1, conforme descrito acima.

2.2.Caracterização das amostras por bandamento GTG

As lâminas contendo as células fixadas foram submetidas a bandamento GTG segundo a metodologia de Scheres (1972), com modificações.

A análise citogenética após bandamento GTG foi realizada a partir da montagem e elaboração das fórmulas cariotípicas segundo recomendações do ISCN (2005). A análise dos cariótipos foi realizada usando o microscópio Olympus BX61 acoplado a um sistema de análise de imagens (*Applied Spectral Imaging*). Para a análise cariotípica dos casos previamente avaliados no laboratório de citogenética do Departamento de Pediatria e Puericultura da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP, foi utilizado o sistema IKAROS, Zeiss.

2.3. Metodologia de hibridação *in situ* fluorescente

Cultura de Bactérias para Obtenção dos Clones

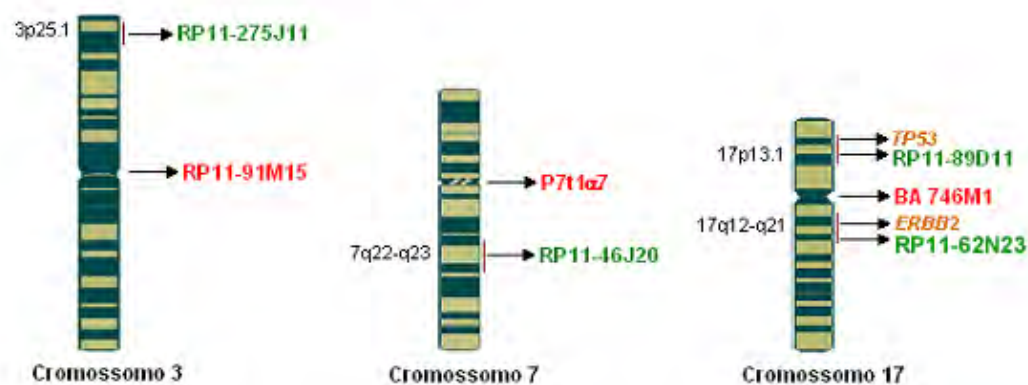
Os segmentos de DNA usados nos experimentos da FISH são inseridos em cromossomos artificiais de bactérias (BAC). Os dados sobre o mapeamento foram avaliados *in silico* nos bancos de dados da *University of California, Santa Cruz* - UCSC (<http://www.genome.ucsc.edu>), do *National Center for*

Biotechnology Information – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>) e do *The Wellcome Trust Sanger Institute* – Ensembl (<http://www.ensembl.org>). As seqüências gênicas selecionadas (<http://tcag.bioinfo.sickkids.on.ca/mrc.html>)(<http://www.ncbi.nih.gov/genome/cyto/hbrc.shtml>) foram avaliadas para verificação de homologia contra as seqüência inseridas nos BACs usando a informação dos terminais de cada inserto (BAC *ends*) e a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>). Baseados nos dados da literatura e de mapeamento cromossômico, foram selecionados três BACs contendo seqüências únicas mapeadas em 3p25.2-p25.1 (clone RP11-46J20), 7q22.3 (clone RP11-46J20) e 17q12 (clone RP11-62N23).

Procedimentos de hibridação duplos foram realizados com as sondas loco-específicas para as regiões de interesse e respectivos controles internos (sondas centroméricas ou pericentroméricas).

A sonda comercial *D17Z1* foi utilizada para avaliação de perdas na região 17p13.1 em apenas seis casos. Em vista do elevado custo, esta foi substituída pela seqüência RP11-89D11, pareada com a sonda centromérica do cromossomo 17.

A figuras 6, 7, 8, 9 e 10 mostram a caracterização dos clones utilizados neste estudo baseadas em informações do UCSC (<http://www.genome.ucsc.edu>).



Sonda	Contig	Status	Mapeamento	Terminais cromossômicos	Tamanho da sequência (pb)
RP11-275J11	NT_Q22517	Finalizado	3p25.1	AQ503972	150.810
RP11-46J20	NT_007933	Em análise	7q22.3	AQ197970; AQ197973	177.497
RP11-89D11	NT_010718	Finalizado	17p13.1	AQ283789; AQ283790	167.331
RP11-62N23	NT_010755	Finalizado	17q12	AQ195016; AQ195020	157.229

Figura 6. Localização dos clones e os respectivos controles centroméricos utilizados neste estudo. Todos os clones ilustrados foram obtidos junto ao banco de BACs do *Hospital for Sick Children, University of Toronto*, com a colaboração do Prof. Dr. Julian Zielenska, com exceção da sonda centromérica p7t1a7, cedida pela Profa. Dra. Ângela Maria Vianna Morgante, Instituto de Biociências, USP – São Paulo, SP. Em laranja, genes homólogos às sequências do cromossomo 17. O quadro abaixo apresenta as informações referentes a cada sequência utilizada. Em vermelho, as sondas centroméricas e em verde as sondas-alvo.

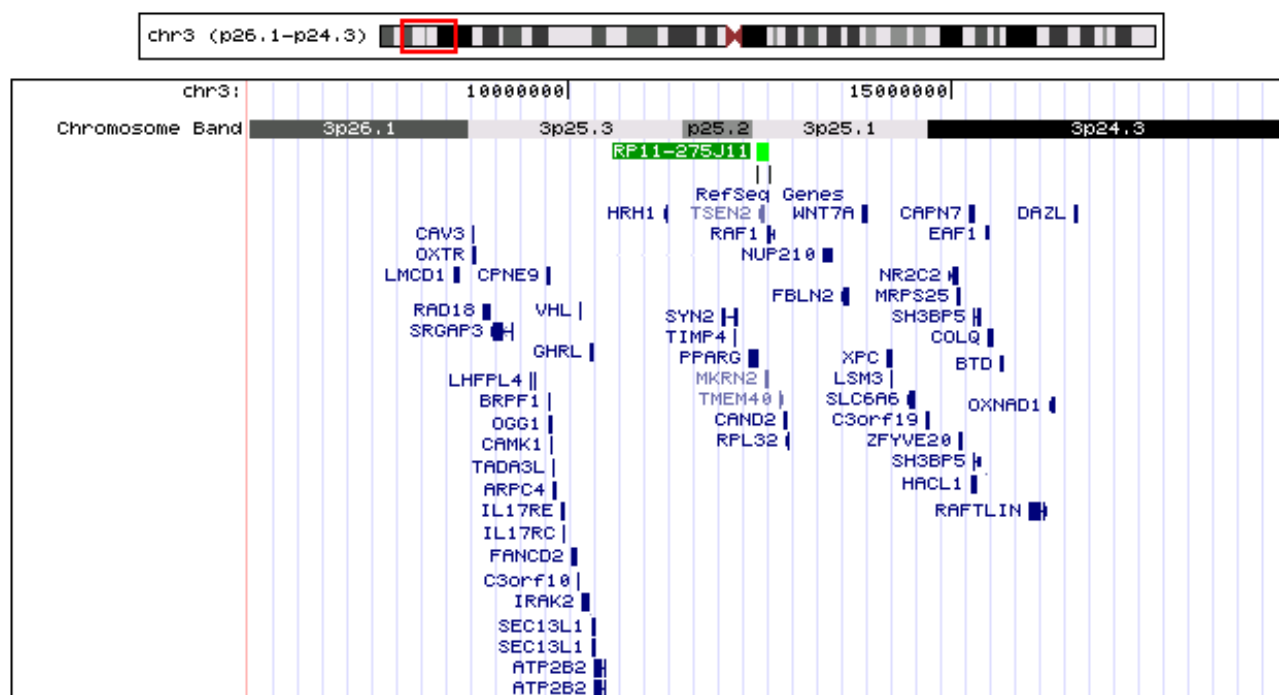


Figura 7. Localização da sonda RP11-275J11 no cromossomo 3p25.1 clonada em BAC. O esquema demonstra os genes que estão próximos e mapeados no segmento cromossômico correspondente à posição da sonda.

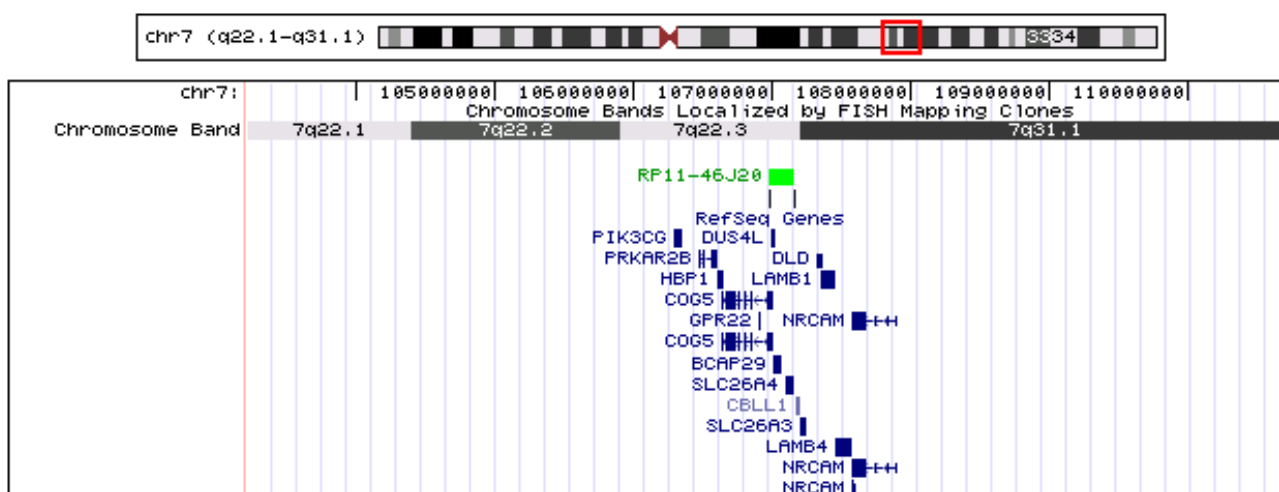


Figura 8. Localização da sonda RP11-46J20 no cromossomo 7q22.3-q31.1 clonada em BAC. Estão representados abaixo da sonda genes situados próximos ou dentro do segmento em que esta sequência está mapeada.

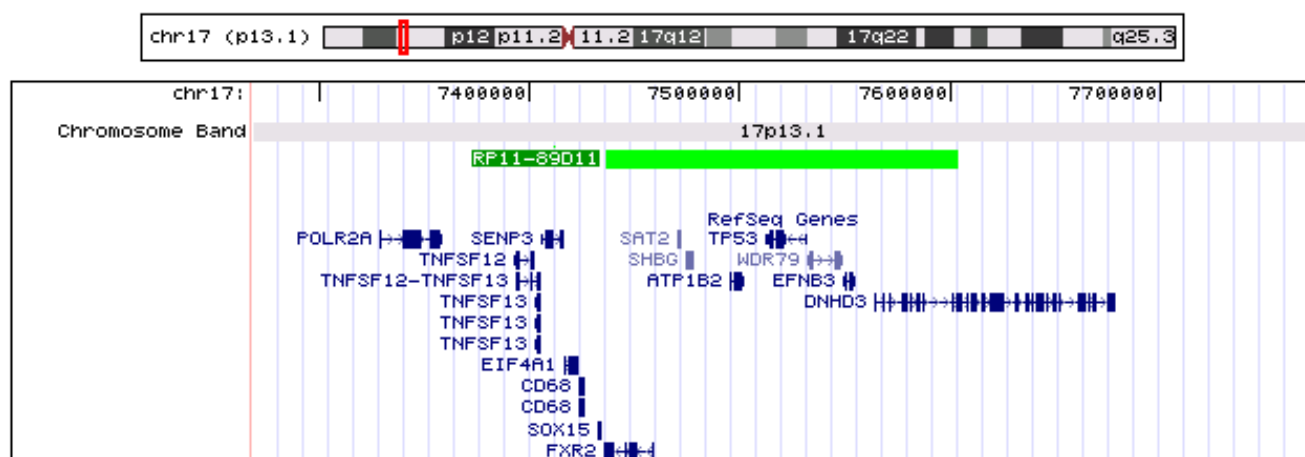


Figura 9. Localização da sonda RP11-89D11 no cromossomo 17p13 clonada em BAC. O gene *TP53* está mapeado no segmento cromossômico correspondente à sequência da sonda.

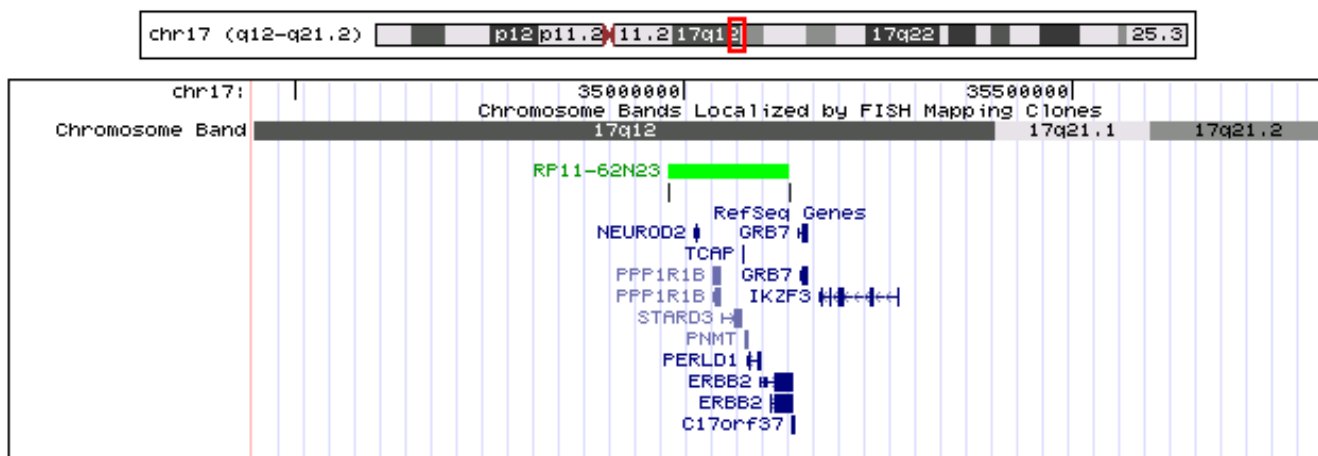


Figura 10. Localização da sonda RP11-62N23 no cromossomo 17q12 clonada em BAC. O gene *ERBB2* está contido na sequência da sonda.

Crescimento de linhagens transformadas contendo os vetores com os insertos usados como sondas

As linhagens de *E. coli* com os vetores foram semeadas em placa de Petri com meio de cultura LB- ágar e permaneceram por 16 horas a 37°C.

Colônias isoladas foram transferidas para crescimento em meio líquido em 8mL de meio LB com 0,01% de antibiótico cloranfenicol por 8h a 37°C sob agitação. Adicionou-se 20% de glicerol e estocou-se em freezer -70°C.

Extração de DNA dos BACs

Para extração do DNA, utilizou-se o Kit *TempliPhi 100 Amplification Kit* (Amersham Biosciences), segundo as recomendações do fornecedor. Inicialmente, uma alíquota de 1µL do crescimento bacteriano conservado em meio de cultura/glicerol foi desnaturada em 5µL tampão, a 95°C durante 3 minutos e imediatamente transferida para um recipiente com gelo. Adicionou-se 5 µL de uma mistura contendo tampão de reação e a enzima DNA polimerase Phi29. A reação foi incubada por um período de 18 horas a 30°C. A enzima foi inativada pelo aquecimento a 60°C durante 10 minutos.

Este procedimento permite o pareamento de oligonucleotídeos randômicos (*random hexamer primers*) ao molde de DNA circular em múltiplos sítios. A DNA polimerase atua em cada um dos oligonucleotídeos pareados sintetizando uma fita de DNA pelo modelo de círculo rolante. Esta amplificação isotérmica produz quantidades de DNA da ordem de µg a partir de quantidades

mínimas de DNA molde e elimina a necessidade de grandes volumes de crescimento bacteriano e purificação de vetores.

Reação de *Nick-Translation*

Para uma reação de volume final de 100µL, utilizou-se em média 4µL (2µg/ µL) de DNA do vetor contendo o inserto de interesse, 1ng/µL de BSA, 10mM de β-mercaptoetanol, 50mM de Tris-HCl pH 7.5, 5mM de MgCl₂, 10mM DNase I (Invitrogen) e 10U de DNA polimerase I (Invitrogen). Para a seqüência de referência (região centromérica ou pericentromérica dos cromossomos 3, 7 e 17) foi utilizada a digoxigenina como molécula repórter, sob as mesmas condições de marcação descritas acima, adicionando digoxigenina-11-dUTP (Roche) (ao invés de biotina-14dATP) acrescentando além dos demais reagentes o tampão 20X digoxigenina. A solução foi mantida a 15°C durante 1 hora.

O produto da reação de marcação foi avaliado por eletroforese em gel de agarose a 1% durante 45 minutos a 100V para determinação do tamanho dos fragmentos de DNA marcados e de sua concentração pela comparação com marcadores de peso molecular (100pb DNA Ladder Invitrogen/Life Technologies) e de concentração pré-estabelecidos (250ng, 50ng e 100ng) (Figura 11).

Para bloquear a ação das DNaseI/DNA polimerase I foi utilizada uma solução de 10µL de EDTA 0,3M. Os fragmentos foram precipitados com 10µL de DNA de espermatozoário de salmão 10µg/µL como carreador, 10µL acetato de sódio 3M e etanol absoluto. O precipitado foi ressuspensionado em água estéril na

concentração final de 10ng/μL baseado na concentração estimada no gel de agarose.

Um total de 100ng de DNA marcado (sonda) com biotina e 100ng de DNA marcado com digoxigenina foi precipitado na presença de 1μg/μL de DNA *Human Cot-1*, acetato de sódio 3M e etanol absoluto. A sonda foi ressuspensa em 35μL de hibrisol VII e desnaturada a 75°C durante 10 minutos. A sonda desnaturada permaneceu a 37°C durante uma hora para o pré-anelamento.

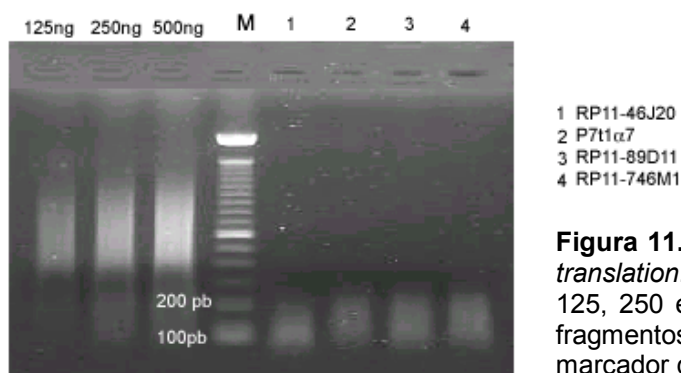


Figura 11. Sondas marcadas pela reação de *nick translation*. Os marcadores de peso molecular de 125, 250 e 500ng estão indicados. Observam-se fragmentos com tamanhos de 100 a 200pb. M: marcador de 100 pb DNA Ladder (invitrogen) .

Pré Tratamento das Lâminas com Pepsina

Lâminas contendo preparações cromossômicas estocadas a -20°C ou lâminas previamente submetidas a bandamento GTG foram utilizadas para os procedimentos da FISH. Nos casos previamente bandados, foi feita a descoloração por banhos sucessivos em 3 cubas de xilol, etanol 95% por 2 minutos, clorofórmio por 15 minutos, etanol 95% e HCl 1% por 30 segundos e finalmente metanol absoluto. As lâminas foram secas à temperatura ambiente.

Inicialmente as lâminas passaram por uma solução de 2XSSC por 5 minutos, seguido de desidratação em etanol 70%, 90% e 100% por 5 minutos

cada. Foi adicionado 15µL de solução de pepsina 10% à solução de HCl 0,01M pré-aquecida a 37°C. As lâminas foram incubadas a 37°C na solução de pepsina por 10 minutos e lavadas por 5 minutos (duas vezes) em PBS 1X à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS/MgCl₂ à temperatura ambiente. Foram incubadas em solução 1% de formaldeído em PBS/MgCl₂ por 15 minutos à temperatura ambiente e em PBS por 5 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram desidratadas em EtOH 70%, 90% e 100% durante 5 minutos cada.

Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

Após as lâminas passarem pelo tratamento acima descrito e estarem secas à temperatura ambiente, foram desnaturadas em 70% formamida/2xSSC por aproximadamente um minuto a 72°C. Logo após, foram transferidas imediatamente para EtOH 70%, 90% e 100% a -20°C, 5 minutos cada. Foram secas à temperatura ambiente e observadas ao microscópio óptico para avaliação da desnaturação. Em seguida, as lâminas foram submetidas ao tratamento com 0,5µL de proteinase K em 50mL de tampão (1mL de Tris-HCl 1M, 100µL de CaCl₂ 1M e dH₂O) por 7 minutos e 30 segundos. Foram novamente desidratadas em EtOH 70%, 90% e 100% durante 5 minutos e secas à temperatura ambiente.

Para a hibridação, 35µL da sonda foram aplicados na lâmina contendo as preparações cromossômicas e vedadas com lamínula e *rubber cement*. As lâminas foram incubadas a 37°C por 24 horas em câmara úmida.

Lavagem das Lâminas

A lavagem pós-hibridação foi feita em 70mL de 50% formamida/ 2xSSC, pH 7,0 a 45°C durante 5 minutos seguido por 50mL de 2xSSC, pH 7,0 a 45°C por 5 minutos (três vezes). Para bloqueio da hibridação foi aplicado 20µL de solução bloqueadora I (Tris-HCl 1M, NaCl 5M, BSA 100mg/mL) e 20µL de TNB (1,5g BSA 3%, Tween 20 0,1% e 4xSSC) por 20 minutos a 37°C. Para a detecção do sinal foi aplicado 45µL de *avidin fluorescein isothiocyanate* (FITC-avidina - Roche) e 5µL de anti-digoxigenina (Roche) e foi incubada sob lamínula por 30 minutos a 37°C. Foi lavada em 2xSSC/Tween 20 por 5 minutos a 45°C (3 vezes). Foi aplicado 20µL de anti-avidina (Vector) e 5µL de anticorpo *sheep-anti-mouse* (Boehringer) e foi incubada sob lamínula por 30 minutos a 37°C. Foi lavada em 2xSSC/ Tween 20 por 5 minutos a 45°C (3 vezes). Foi aplicado 45µL de FITC- avidina e 5µL de anti-digoxigenina-rodamina (Roche) e foi incubada sob lamínula por 20 minutos a 37°C. Foi lavada novamente em 2xSSC/ Tween 20 por 5 minutos a 45°C (3 vezes). As células foram contracoradas com 40mg/ml 4',6-*diamidin-2-phenylindol-dihydrochloride* (DAPI - Vectashield) em Antifade (QbioGene) (concentração final de 0,1µg/ml).

Sondas do gene *TP53* e controle α -satélite do cromossomo 17

Em cinco casos, para a investigação de perdas em 17p envolvendo o gene *TP53*, foi utilizada a sonda *D17Z1* (17p13.1) e a sonda controle centromérica α -satélite do cromossomo 17 (Oncor). As sondas de fita simples

já estão previamente marcadas com digoxigenina com sistema de detecção em espectro vermelho (Oncor).

A lâmina sofreu um pré-tratamento em solução de 2XSSC por 5 minutos à temperatura ambiente seguindo-se uma desidratação em série de EtOH 70%, 90% e 100% por 5 minutos. Após a lâmina estar seca, a mesma foi submetida à desnaturação em solução 70% formamida/2XSSC durante 3 minutos a 72°C, sucedendo-se imediatamente banhos em série de EtOH 70%, 90% e 100% gelados por 5 minutos. Posteriormente, foram incubadas em solução de proteinase K durante 7 minutos e 30 segundos à temperatura ambiente, e seguiu-se nova desidratação em série de EtOH 70%, 90% e 100% por 5 minutos nas mesmas condições de temperatura.

Para hibridação, 10µL da sonda, previamente mantida à 37°C por 5 minutos, foram aplicados sob lamínula. A lâmina foi vedada com *rubber cement* e estocada a 37°C em câmara úmida e escura por 16 horas.

A lavagem da lâmina foi realizada em solução 50% formamida/2XSSC por 5 minutos a 45°C, seguindo-se solução de 2XSSC durante 8 minutos a 37°C e 1xPBD também a 37°C durante 5 minutos. Para detecção do sinal, foram aplicados 50µL de anti-digoxigenina-rodamina e incubados sob lamínula a 37°C por 20 minutos. A lâmina foi lavada em 1xPBD a 37°C durante 2 minutos, por três vezes. As células foram contracoradas com 8µl de DAPI (concentração final 0,1µg/ml em Antifade).

Metodologia de Análise

A nomenclatura utilizada para relatar os resultados baseados na técnica de FISH foi à recomendada pelo ISCN (2005).

A análise foi feita em fotomicroscópio de fluorescência *Olympus BX61* e as imagens foram capturadas pelo sistema *Applied Spectral Imaging FISH View EXPO 2.0*.

Para os estudos em núcleos interfásicos foram analisados todos os campos da lâmina contendo células marcadas considerando os seguintes itens: exclusão de células sobrepostas, arrebitadas ou com citoplasma, fluorescência homogênea e não foram considerados células com sinais de baixa intensidade.

Para as sondas com controle interno foram considerados os núcleos com marcação positiva no sítio controle. Todos os experimentos foram realizados em indivíduos normais (metáfases/ núcleos interfásicos) como controle da hibridação.

As alterações no número de sinais detectados foram consideradas significativas quando o valor observado para cada caso foi superior à média mais dois desvios-padrão das amostras do tecido normal usado como controle, calculado para cada sonda (Hopman et al, 1988).

As deleções homozigotas ou hemizigotas foram consideradas significativas quando presentes em mais de 30% das células (Korshunov et al, 2005; Yoshimoto et al, 2006). Os ganhos (3 sinais para a sonda alvo e dois sinais para o controle centromérico) ou amplificação (≥ 4 sinais para a sonda

alvo e dois sinais para a sonda de referência) foram considerados relevantes quando presentes em $\geq 25\%$ das células analisadas.

IV - RESULTADOS

1. Citogenética Clássica

Este estudo compreende preparações cromossômicas de 23 pacientes com SMD pediátrica. A idade média dos casos é de 7,6 anos e o tempo de seguimento clínico variou de 9 a 141 meses (média de 38 meses). Deste total, 22 casos foram reavaliados por bandamento GTG. No caso 6 não foi procedida esta análise devido à baixa qualidade das preparações cromossômicas.

A descrição do cariótipo composto seguiu as recomendações do ISCN (2005) e estão apresentados na tabela 9. Em três casos (1, 7 e 23) foram obtidas preparações cromossômicas em três e dois tempos, respectivamente. No caso 7, a técnica da FISH foi realizada em lâminas da cultura 2, e no caso 23 foi utilizada a cultura 1, pois não haviam preparações cromossômicas disponíveis resultantes do primeiro tempo de cultura.

As anormalidades cromossômicas observadas após análise dos cariótipos incluíam deleções (cromossomos 4, 7, 9, 11, 12, e 17), monossomias (cromossomos 7, 10, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e Y), trissomias (cromossomos 6 e 8), cromossomos derivativos (cromossomos X, 22 e 9) e inversões (cromossomo Y) (Figura 12). Dentre as alterações citogenéticas identificadas, foram mais frequentes as deleções completas ou parciais do 17 em oito casos (1, 2, 4, 7, 11, 12, 17 e 18), perda do cromossomo 20 em quatro casos (1, 8, 10 e 12), e deleções de 12p13 em dois casos (1 e 3). Cariótipos normais também foram observados em um total de cinco casos (9, 19, 15, 20 e 21) (Figura 12). Os cariótipos compostos assim como as análises da FISH realizadas em cada caso estão descritos na tabela 9.

Tabela 9. Resultados da análise após bandamento GTG nos casos de SMD infantil. Estão indicados os casos onde foram realizadas as análises da FISH para cada uma das sondas testadas. [MI: material insuficiente; +: análise realizada]

Casos	Banda GTG	Sondas cromossomo 3	Sondas cromossomo 7	TP53	ERBB2
1	I – 38-46,XX,del(12)(p13)[7],-17[3],-20[4][cp8]/46,XX[5] II – 44-46,X,add(X)(q23)[3],+6[3],-10[3], del(12)(p13)[4],-13[3],-21[3] [cp4]/46,XX[5] III – 41-46,XX,-19[3],add(X)(p22.3)[6],del(12)(p13)[2],add(22)(q13)[5] [cp9]/46,XX[1]	MI	MI	MI	MI
2	45-46,XX,-19[3],del(17)(p11.2)[2],add(9)(q34)[3][cp4]/46,XX[7]	MI	MI	MI	MI
3	46,XY,-13[3],del(4)(p15.3)[3],del(12)(p13)[2][cp9]/46,XY[15]	MI	MI	MI	MI
4	46,XY,del(7)(q32)[4],del(17)(p12)[2][cp5]/46,XY[14]	+	MI	+	MI
5	41-46,X,-Y[3][cp5]/46,XY[4]	+	MI	+	MI
6	MI	+	+	+	+
7	I – 42-44,XX,del(17)(p12)[8],-18[5],-22[4][cp9]/46,XX[14] II – 45,XX,del(17)(p12)[3],-22[3][cp6]/46,XX[3]	MI	MI	MI	MI
8	45,XY,inv(Y)(q11.2q12)[14]/-20[3]/46,XY[10]	+	+	+	+
9	46,XY[11]	+	+	+	MI
10	46,XY,add(6)(q13)[8],-20[6][cp11]/46,XY[14]	MI	MI	MI	MI
11	46,XX,del(17)(p12)[4]/46,XY[13]	+	+	+	+
12	46,XY,del(17)(p13.1)[4],-20[3][cp6]/46,XY[12]	+	+	+	+
13	46,XX,del(11)(q23)[2]/47,XX,+11[2]/46,XX[5]	+	+	+	+
14	46,XX,del(9)(q12q31)[5]/46,XX[3]	+	+	+	+
15	46,XY[7]	+	+	+	+
16	45,XX,-7[6]/46,XX[7]	+	+	+	+
17	46,XY,del(17)(p11)[3]/46,XY[17]	+	+	+	+
18	46,XX,del(17)(p13.1)[3]/46,XX[17]	+	+	+	+
19	46,XY[22]	+	+	+	+
20	46,XX[20]	+	+	+	+
21	46,XX[20]	+	+	+	+
22	45,XY,-15[4]/46,XY[16]	+	+	+	+
23	I - 47,XY,+8[10]/46,XY[10] (28/05/2004) II - 47,XY,+8[20] (15/02/2005)	MI	MI	MI	MI
		+	+	+	+

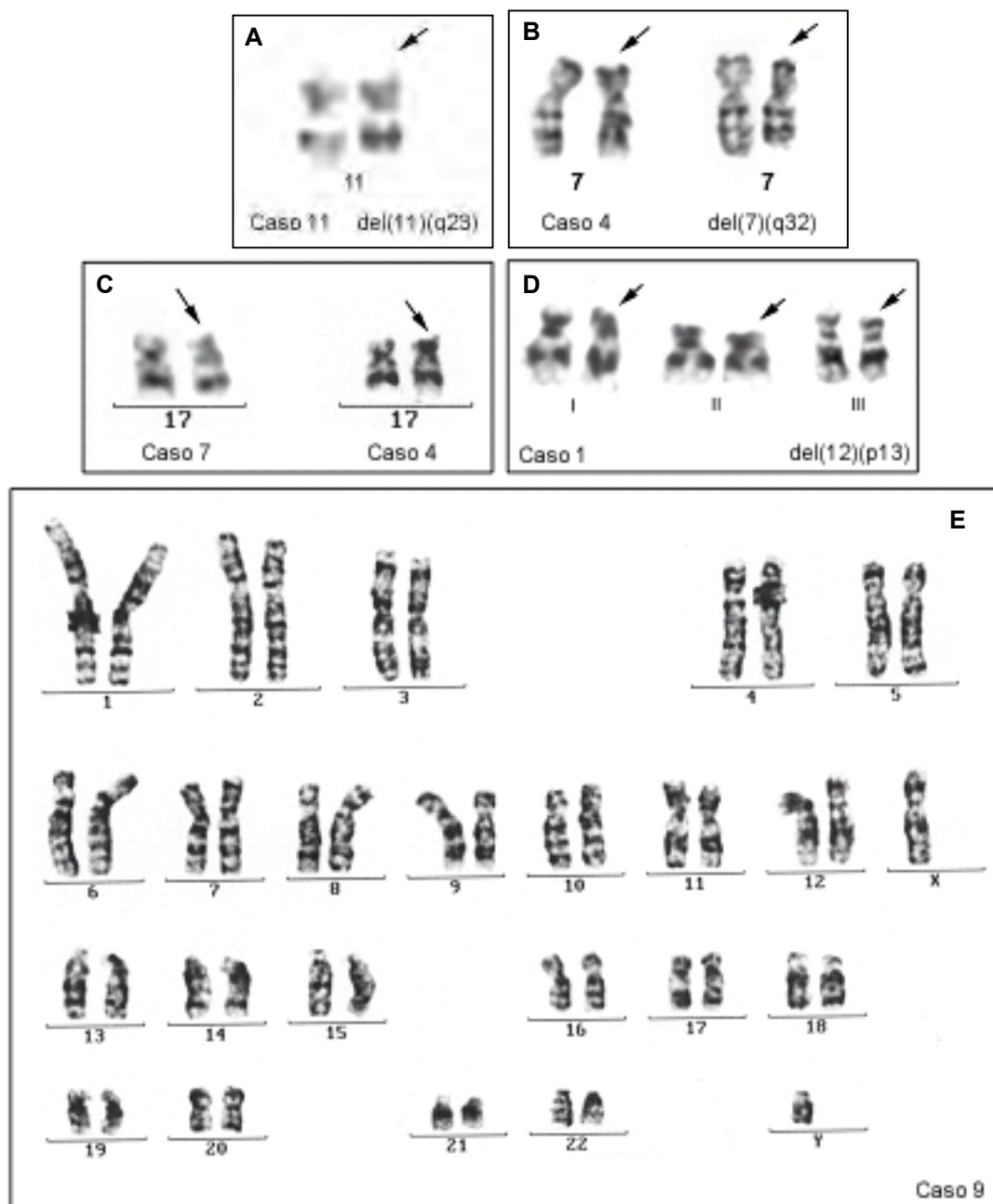


Figura 12. Alterações cromossômicas identificadas após a análise por bandamento GTG. A) A del(11)(q23) identificada como anormalidade clonal no caso 11. B) As setas indicam a del(7)(q32) observada no caso 4. C) A del(17)(p12) nos casos 4 e 7; em ambos os casos esta alteração foi observada nas culturas analisadas como anormalidade clonal. D) As setas indicam a alteração clonal del(12)(p13) observada no caso 1 nas metáfases dos três tempos de cultura. E) Metáfase com cariótipo 46,XY (normal) observada em todas as células do caso 9.

2. Hibridação *in situ* fluorescente

Um total de 19 amostras de aspirado de medula óssea de pacientes pediátricos foram avaliadas pela FISH: 19 casos foram analisados para a sonda do cromossomo 3, 17 para a sonda do cromossomo 7, 19 para a sonda onde se mapeia o gene *TP53* e 16 onde se mapeia o gene *ERBB2*.

Em muitos dos casos selecionados para este trabalho, o número de células com qualidade para análise foi bastante limitado, havendo a necessidade de repetição do procedimento em diferentes lâminas, quando disponíveis. Da mesma forma, em alguns casos não foi possível a análise para todas as seqüências propostas no estudo devido à indisponibilidade do material para realização da FISH.

Para a confirmação dos dados de mapeamento das sondas usadas, foram utilizadas preparações cromossômicas (metáfases) obtidas após cultura temporária de linfócitos do sangue periférico de voluntários normais, analisadas por bandamento GTG e subsequentemente utilizadas para FISH. Durante a condução dos experimentos da FISH, foram utilizadas lâminas controles (de indivíduos normais, sem câncer) juntamente com um conjunto de seis casos, em média, analisados num mesmo procedimento de hibridação.

A contagem do número de sinais correspondentes às sondas teste RP11-275J11, RP11-46J20, *D17Z1*, RP11-89D11 e RP11-62N23 mostrou, respectivamente, que 95%, 97%, 99%, 96% e 98% dos núcleos analisados em lâminas controles mostravam os dois sinais esperados.

2.1. Cromossomo 3

A sonda selecionada para o cromossomo 3 foi RP11-275J11 (3p25.1), marcada com biotina (detectadas com FITC-Avidina - fluorescência verde) e a RP11-91M15 foi marcada com digoxigenina (detectadas com anti-digoxigenina rodamina - fluorescência vermelha) e utilizada como controle interno. Nos 19 casos analisados para esta sonda foi verificada alta porcentagem de núcleos normais (2 sinais para cada sonda), com frequência variando de 31% a 78%. Foi observada uma baixa frequência de três (média de 6,6% - três casos) e quatro ou mais sinais (média de 7,3% - três casos) para a sonda alvo e dois sinais para o controle centromérico.

Considerando os resultados da análise obtida nas lâminas controles $\pm$ dois desvios-padrão e o valor de *cut-off* ($>30\%$), para a sonda RP11-275J11, a perda de uma cópia desta sequência (1 sinal para a sonda alvo e dois sinais para o controle centromérico) foi observada em 17 casos (Figura 13). Em oito casos (4, 8, 11, 12, 18, 19, 20 e 23), a frequência de perda foi igual ou superior a 50% das células analisadas, com variação de 50% a 61%. A perda homozigota para a região 3p25 foi observada em baixa frequência (variação de 4% a 14%) em nove casos. A tabela 10 mostra os resultados obtidos da análise da FISH em todos os casos avaliados para a sequência referente ao cromossomo 3.

Não foram observadas alterações no cromossomo 3 entre os 19 casos avaliados por bandamento GTG.

Tabela 10. Proporção do número de sinais fluorescentes da sonda RP11-275J11 detectados em células dos controles (linfócitos normais do sangue periférico) e das amostras analisadas.

Sonda	Controles	Ausência de sinal (DB ^a /%)	1 sinal (DB/%)	2 sinais (DB/%)	3 sinais (DB/%)	4 ou + sinais (DB/%)	Total
3p25.1 (RP11-275J11)^b	Controle I	1/1	5/4	111/93	1/1	1/1	120
	Controle II	2/1	4/2	192/96	2/1	0/0	200
	Controle III	1/1	4/2	175/97	0/0	0/0	181
	Média ^c	1	3	95	1	0	-
	Casos						
	4	3/3	68/57	45/38	1/1	3/3	120
	5	0/0	17/35	26/54	1/2	4/8	48
	6	1/1	19/22	55/63	5/6	7/8	87
	7	4/3	41/32	73/57	8/6	2/2	128
	8	4/3	58/50	39/34	1/1	7/6	115
	9	2/1	46/32	86/59	10/7	2/1	146
	11	9/10	92/55	75/32	5/2	3/1	183
	12	1/1	64/50	55/43	3/2	4/3	127
	13	3/2	50/40	63/51	4/3	3/2	124
	14	3/3	18/15	92/78	1/1	4/3	118
	15	33/14	189/34	110/48	7/2	3/2	342
	16	8/6	62/44	70/50	0/0	0/0	140
	17	11/7	63/41	74/49	3/2	1/1	152
	18	9/4	123/61	62/31	6/3	1/0	201
	19	12/6	108/51	83/40	6/3	1/0	210
	20	6/5	74/56	50/38	2/2	0/0	132
	21	5/2	84/41	107/53	7/3	0/0	203
	22	12/8	69/46	67/45	2/1	0/0	150
	23	7/4	115/58	76/38	2/1	0/0	200

^a DB: Dados Brutos; ^b Hibridação dupla com sonda centromérica RP11-91M15; ^c Média em porcentagem.

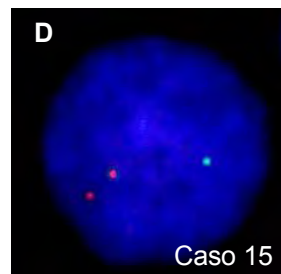
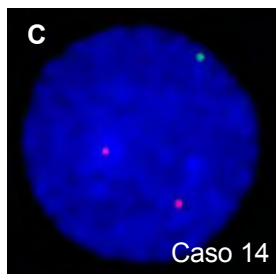
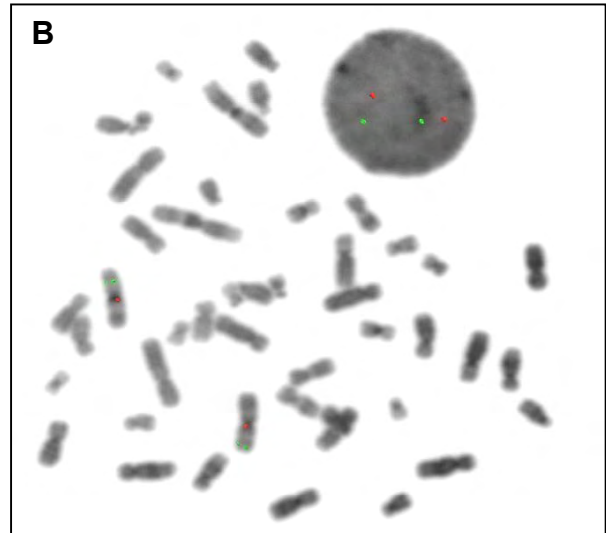
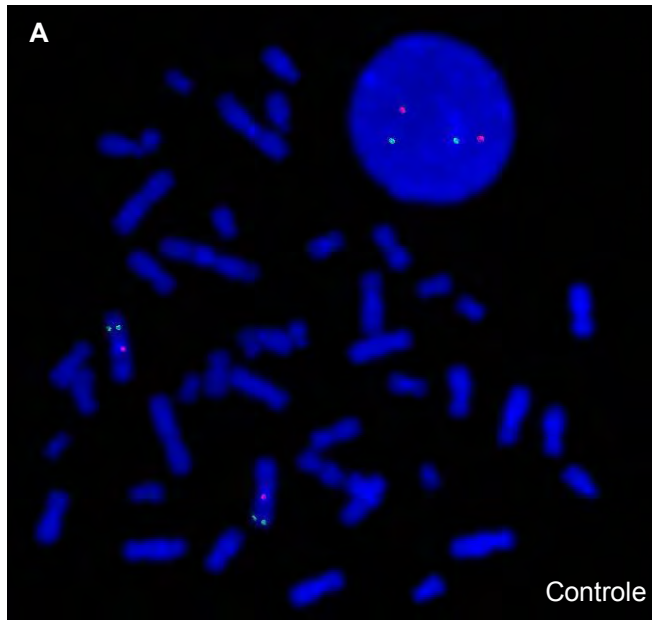


Figura 13. Análise citogenética para sonda RP11-275J11. A) Metáfase normal obtida após cultura temporária de linfócitos do sangue periférico confirmando a região da sonda no braço curto do cromossomo 3. B) Imagem da metáfase em DAPI reverso. C e D) Exemplos de núcleos interfásicos de casos de SMD infantil mostrando a deleção de uma cópia de 3p25.

2.2. Cromossomo 7

Para a análise da região 7q22.3, foi utilizada a sonda RP11-46J20 marcada com biotina (detectadas com FITC-Avidina - fluorescência verde) e sonda controle centromérica P7t1 α 7 marcada com digoxigenina (detectadas com anti-digoxigenina rodamina - fluorescência vermelha).

Em 15 casos avaliados para esta sonda foi detectada a perda de uma cópia deste segmento (1 sinal para seqüência alvo e dois sinais para sonda centromérica) em uma média de 46,5% das células (variação de 31% a 58%) (Figura 14). Em cinco casos (12, 19, 20, 21 e 22) foi detectada a perda de um alelo em 50% a 58% dos núcleos analisados. Deleção homozigota desta seqüência foi observada, em baixa freqüência, em 15 casos (3% a 9% das células).

A presença de núcleos normais para este segmento do cromossomo 7 (2 sinais para cada sonda) foi verificada em alta freqüência nos 17 casos analisados, variando de 37% a 66% das células analisadas. A tabela 11 mostra a freqüência de sinais correspondentes à sonda RP11-46J20 em todos casos avaliados.

Entre as 17 amostras analisadas, 16 foram avaliadas por bandamento GTG e apenas no caso 16 foi detectada alteração numérica no cromossomo 7 {45,XX,-7[6]/46,XX[7]}.

Tabela 11. Proporção do número de sinais fluorescentes da sonda RP11-46J20 detectados em células dos controles (linfócitos normais do sangue periférico) e das amostras analisadas.

Sonda	Controles	Ausência de sinal (DB ^a /%)	1 sinal (DB/%)	2 sinais (DB/%)	3 sinais (DB/%)	4 ou + sinais (DB/%)	Total
7q22.3 (RP11-46J20) ^b	Controle I	0/0	5/3	191/96	4/2	0/0	200
	Controle II	1/0	2/1	199/99	0/0	0/0	202
	Controle III	2/1	1/0	200/98	1/0	0/0	204
	Controle IV	0/0	5/2	212/98	0/0	0/0	217
	Média ^c	0	2	97	1	0	-
	Casos						
	6	10/9	46/42	49/45	3/3	2/2	110
	7	8/6	39/31	62/50	14/11	1/1	124
	8	12/3	34/26	62/63	6/3	6/0	120
	9	7/7	82/47	64/48	6/1	1/1	160
	11	4/2	82/41	104/52	10/5	1/0	201
	12	9/4	118/54	90/41	3/1	0/0	220
	13	11/7	75/45	76/46	1/1	2/1	165
	14	13/6	91/45	95/47	3/1	1/0	203
	15	6/4	35/23	99/66	8/5	2/1	150
	16	6/3	70/38	102/56	4/2	1/1	183
	17	9/6	71/47	67/45	3/2	0/0	150
	18	5/2	116/58	76/38	4/2	0/0	201
	19	9/4	113/55	75/37	5/2	2/1	204
	20	9/4	102/50	89/44	3/1	0/0	203
	21	6/4	86/54	64/40	2/1	1/1	159
	22	7/4	89/45	102/51	2/1	0/0	200
	23	5/3	91/46	93/47	9/5	2/1	200

^a DB: Dados Brutos; ^b Hibridação dupla com sonda centromérica P7t1α7; ^c Média em porcentagem.

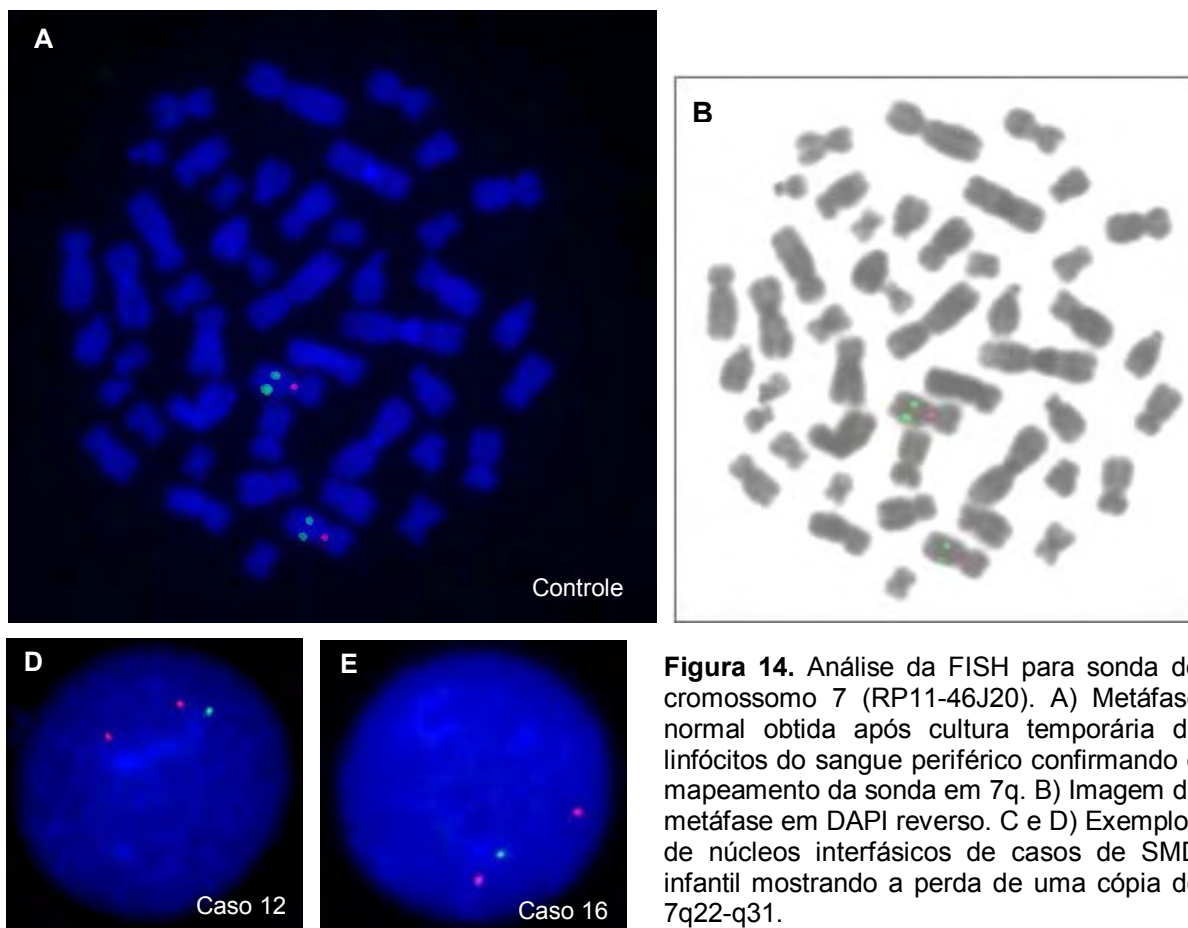


Figura 14. Análise da FISH para sonda do cromossomo 7 (RP11-46J20). A) Metáfase normal obtida após cultura temporária de linfócitos do sangue periférico confirmando o mapeamento da sonda em 7q. B) Imagem da metáfase em DAPI reverso. C e D) Exemplos de núcleos interfásicos de casos de SMD infantil mostrando a perda de uma cópia de 7q22-q31.

2.3. Cromossomo 17

2.3.1. Gene *TP53*

Para avaliar perdas do gene *TP53*, procedeu-se à análise da FISH com a sonda comercial *D17Z1* em cinco casos. A presença de quatro sinais é considerada normal e foi observada em 99% dos núcleos da cultura controle. Quatro casos apresentaram uma alta frequência de deleção da região 17p13.1 (36% a 85% dos núcleos analisados); o caso 6 apresentou perda deste segmento cromossômico somente em 15% das células; os casos 7 e 8 apresentaram perda de um alelo de *TP53* em 85% e 68% dos núcleos analisados, respectivamente (Figura 13). Dos quatro casos com perda significativa deste segmento pela FISH, dois casos (7 e 11) apresentaram del(17)(p12) após análise de bandamento GTG.

A sonda do gene *TP53*, avaliada com a sequência RP11-89D11 (marcada com biotina) para região alvo (17p13.1), e respectivo controle centromérico BA-746M1 (marcada com digoxigenina) foi investigada em 14 casos. Em 13 casos foi verificada perda de uma cópia do gene *TP53* (1 sinal da sonda teste e 2 sinais do controle centromérico) em uma média de 51% dos núcleos analisados (variação de 35% a 69%). Em sete casos (5, 13, 17, 18, 19, 21 e 22) a perda de um alelo deste gene foi superior a 50% das células analisadas (Figura 15). A ausência dos dois alelos deste gene foi verificada em 12 casos, em baixa frequência, variando de 4% a 15% das células. A presença de 3 e 4 ou mais sinais para sequência alvo foi observada, em baixa frequência, em três e dois casos, respectivamente.

Entre os casos avaliados por FISH, seis mostraram alterações em 17p na análise após bandamento GTG: três casos (4, 7 e 11) com del(17)(p12), o caso 17 com del(17)(p11) e os caso 12 e 18 com del(17)(p13.1).

Entre os casos, a frequência de células normais para o gene *TP53* variou de 15% a 85% nos casos avaliados com a sonda *D17Z1* e 26% a 49% para a sonda RP11-89D11.

As frequências de sinais fluorescentes correspondentes às sondas *D17Z1* e RP11-89D11 observadas em cada caso estão demonstradas na tabela 12.

Tabela 12. Proporção do número de sinais fluorescentes das sondas *D17Z1* e RP11-89D11 detectados em células dos controles (linfócitos normais do sangue periférico) e das amostras analisadas.

Sondas	Controle	Ausência de sinal (DB ^a /%)	1 sinal (DB/%)	2 sinais (DB/%)	3 sinais (DB/%)	4 ou + sinais (DB/%)	Total
<i>TP53</i> (<i>D17Z1</i>)^b	Controle	-	-	-	5/1	529/99	534
	Casos						
	6	-	-	-	13/15	71/85	84
	7	-	-	-	127/85	23/15	150
	8	-	-	-	69/68	33/32	102
	9	-	-	-	40/39	62/61	102
<i>TP53</i> (17p13.1) (RP11-89D11)^c	11	-	-	-	40/36	70/64	110
	Controles	Ausência de sinal (DB^a/%)	1 sinal (DB/%)	2 sinais (DB/%)	3 sinais (DB/%)	4 ou + sinais (DB/%)	Total
	Controle I	3/2	4/3	116/93	2/2	0/0	125
	Controle II	0/0	4/2	197/98	0/0	0/0	201
	Controle III	0/0	5/2	197/97	1/1	0/0	203
	Controle IV	1/0	4/2	197/98	0/0	0/0	202
	Média ^d	1	2	96	1	0	-
	Casos						
	4	4/5	29/35	41/49	4/5	5/6	83
	5	5/6	41/51	33/41	1/1	0/0	80
	12	15/15	45/44	39/38	2/2	1/1	102
	13	12/10	64/51	47/37	2/2	1/1	126
	14	20/15	36/26	66/49	8/6	6/4	136
	15	12/6	95/47	82/41	8/4	4/2	201
	16	5/4	61/49	57/46	1/1	0/0	124
	17	6/5	76/58	47/36	1/1	0/0	130
	18	6/3	141/69	54/26	2/1	1/0	204
	19	9/5	116/58	71/36	3/2	1/1	200
	20	8/5	74/45	81/49	3/2	0/0	166
	21	9/5	105/55	72/38	3/2	2/1	191
	22	7/4	108/54	83/42	2/1	0/0	200
	23	7/3	94/47	97/48	4/2	0/0	202

^a DB: Dados Brutos; ^b Não foram observados mais de 4 sinais para estas sondas ^c Hibridação dupla com sonda centromérica BA 746M1; ^d Média em porcentagem.

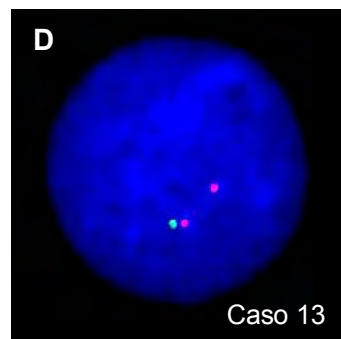
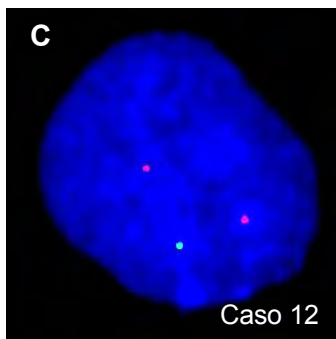
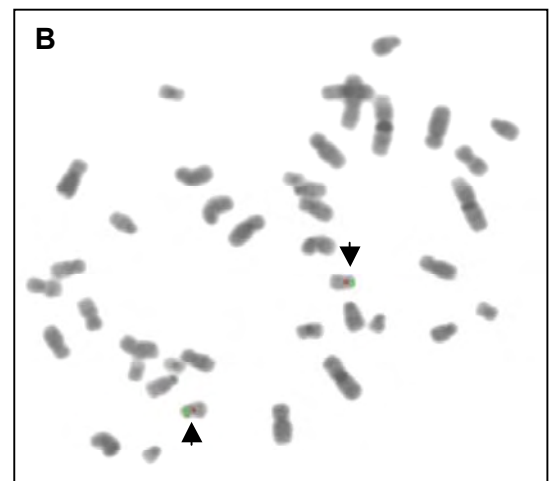
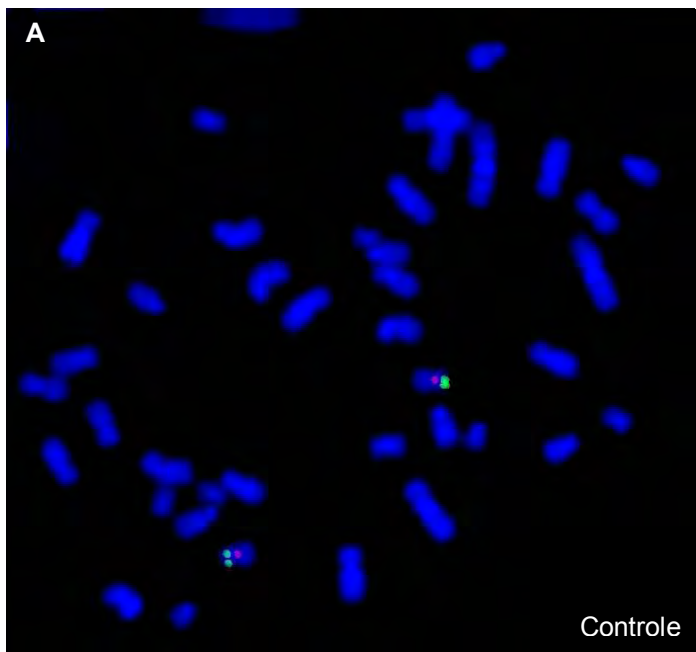


Figura 15. Análise da FISH para sonda do gene *TP53*. A) Metáfase normal obtida após cultura temporária de linfócitos do sangue periférico confirmando a localização da sonda RP11-89D11 em 17p. B) Imagem da metáfase em DAPI reverso. C e D) Exemplos de núcleos interfásicos de casos de SMD infantil mostrando a perda de um alelo do gene *TP53*.

2.3.2. Gene *ERBB2*

A análise de ganhos e amplificações do gene *ERBB2* usando a sonda RP11-62N23 e respectiva seqüência centromérica foi realizada em um total de 16 casos.

A presença de três ou mais sinais para seqüência alvo foi verificada em baixa freqüência (3% a 9% das células) em treze casos. Elevada freqüência de células normais foi detectada em todos os casos, variando de 56% a 84% das células analisadas. A perda de uma cópia desta seqüência foi observada, em baixa freqüência, em todos os casos, em 7% a 25% das células analisadas (Figura 16). No caso 8 apresentou perda hemizigota e homozigota desta seqüência em 33% das células avaliadas. A tabela 13 representa a freqüência de sinais fluorescentes correspondentes à seqüência RP11-62N23 observada em cada caso.

Dentre os 16 casos analisados para esta seqüência, os cariótipos de 15 destes foram reavaliados e não verificado rearranjos ou ganho de material cromossômico envolvendo esta região.

Tabela 13. Proporção do número de sinais fluorescentes das sondas RP-62N23 detectados em células dos controles (linfócitos normais do sangue periférico) e das amostras analisadas.

Sonda	Controles	Ausência de sinal (DB ^a /%)	1 sinal (DB/%)	2 sinais (DB/%)	3 sinais (DB/%)	4 ou + sinais (DB/%)	Total
ERBB2 (17q12) (RP11-62N23) ^b	Controle I	0/0	9/9	87/91	0/0	0/0	96
	Controle II	2/1	2/1	206/98	0/0	0/0	210
	Controle III	1/0	5/3	194/97	0/0	0/0	200
	Média ^c	1	1	98	0	0	-
	Casos						
	6	11/8	19/14	103/74	7/5	0/0	140
	7	4/3	34/25	85/63	11/8	2/1	136
	8	25/11	53/23	131/56	22/9	4/2	235
	11	5/3	39/20	148/74	6/3	2/1	200
	12	7/5	31/21	108/72	4/3	0/0	150
	13	6/3	29/17	125/73	12/7	5/3	172
	14	6/3	32/18	119/66	17/9	6/3	180
	15	8/5	27/18	99/65	8/5	2/1	152
	16	6/5	12/10	102/84	0/0	0/0	121
	17	5/3	20/13	122/80	5/3	0/0	152
	18	4/3	35/22	118/74	2/1	1/1	160
	19	14/7	30/15	139/69	14/7	4/2	201
	20	9/5	21/12	147/82	3/2	0/0	180
	21	16/8	25/13	149/75	8/4	2/1	200
	22	9/6	14/9	124/83	3/2	0/0	150
	23	3/2	34/17	157/79	4/2	2/1	200

^a DB: Dados Brutos; ^b Hibridação dupla com sonda centromérica BA 746M1; ^c Média em porcentagem.

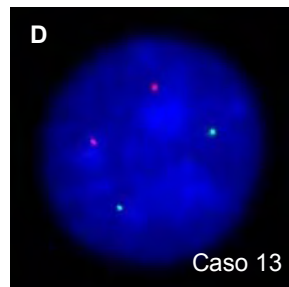
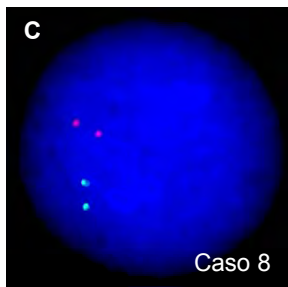
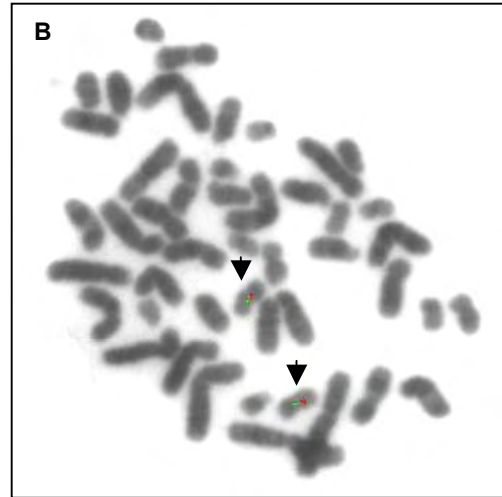
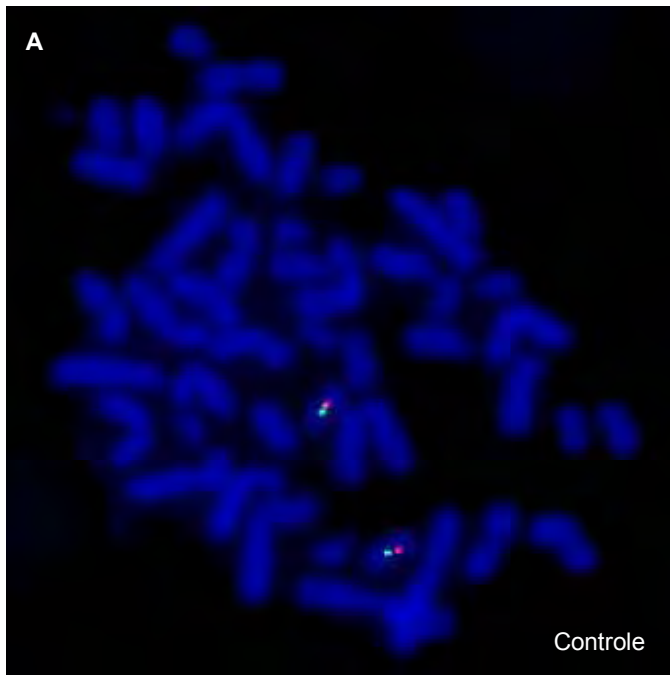


Figura 16. Análise citogenética para sonda RP11-62N23/*ERBB2*. A) Metáfase normal obtida após cultura temporária de linfócitos do sangue periférico confirmando a localização da sondas do gene *ERBB2* no braço longo do cromossomo 17. B) Imagem da metáfase em DAPI reverso. C e D) Exemplos de núcleos interfásicos de casos de SMD infantil mostrando os dois sinais para região do gene.

2.4. ANÁLISE COMPARATIVA

Foi realizada uma análise comparativa dos resultados da FISH para todas as seqüências avaliadas. Deleções hemizigotas e homozigotas significativas para as sondas dos cromossomos 3 e 7, e do gene *TP53* foi detectada simultaneamente em treze (Figura 17). Nos casos 12, 18, 19 e 20 a perda para cada seqüência foi observada em uma freqüência igual ou superior a 50% das células analisadas.

	RP11-275J11	RP11-46J20	RP11-89D11	RP11-62N23
Caso 4	●	+	●	+
Caso 5	●	+	●	+
Caso 6	○	●	○	○
Caso 7	●	●	●	○
Caso 8	●	○	●	○
Caso 9	●	●	●	+
Caso 11	●	●	●	○
Caso 12	●	●	●	○
Caso 13	●	●	●	○
Caso 14	○	●	●	○
Caso 15	●	○	●	○
Caso 16	●	●	●	○
Caso 17	●	●	●	○
Caso 18	●	●	●	○
Caso 19	●	●	●	○
Caso 20	●	●	●	○
Caso 21	●	●	●	○
Caso 22	●	●	●	○
Caso 23	●	●	●	○

○ < 30%
 ● > 30% e < 50%
 ● ≥ 50%
 + Análise não realizada (material insuficiente)

Figura 17. Análise comparativa das perdas hemizigotas e homozigotas para as regiões avaliadas pela FISH. Não foram observados ganhos ou ampliações para estas seqüências em nenhum dos casos. Nos casos 12, 18, 19 e 20 foi observada deleções de 3p25.1, 7q22.3 e 17p13.1 em uma freqüência igual ou superior a 50% das células.

V- DISCUSSÃO

A síndrome mielodisplásica infantil é extremamente rara compreendendo menos de 5% de todas as neoplasias hematológicas pediátricas malignas (Rytting, 2004). Embora integrante do grupo das neoplasias hematológicas, a SMD pediátrica difere das demais mielodisplasias clinicamente e quanto às anormalidades citogenéticas associadas às quais podem definir entidades biológicas específicas na SMD infantil (Hasle et al, 2004).

A variedade de anormalidades cromossômicas envolvida na síndrome mielodisplásica reflete um cenário complexo de diferentes mecanismos moleculares que lidera a transformação maligna. A freqüente associação de deleções, inversões, translocações, trissomias e monossomias sugere a participação de oncogenes e genes supressores tumorais na patogenia e evolução desta doença hematológica (Steensma e List, 2005). Particularmente, nas SMD pediátricas são freqüentes deleções completas ou parciais do cromossomo 7, monossomia do 17, trissomia do 8 e perdas no braço longo do cromossomo 12 (Mitelman et al, 2006).

A análise citogenética das células tumorais tem sido o ponto inicial para estudos moleculares que visam a identificação de genes envolvidos na patogênese de vários cânceres humanos. Desde a descrição do número de cromossomos como 46 (Tjio e Levan, 1956) e do desenvolvimento das técnicas de bandamento cromossômico na década de 70 (Scheres e Merkx, 1976), inúmeros relatos têm mostrado que alterações na dosagem gênica em nível cromossômico estão envolvidas em diferentes processos tumorais.

O advento da técnica de hibridação *in situ* descrita, independentemente, por Pinkel et al. e Cremer et al. em 1986, permitiu o desenvolvimento de novas metodologias extremamente eficientes para triagem de rearranjos genéticos,

utilizando ferramentas da biologia molecular aplicadas à citogenética. Atualmente, é possível utilizar fluorocromos conjugados a nucleotídeos ou moléculas repórteres (como biotina-dUTP) por *nick translation*, *random primers*, PCR ou outras técnicas moleculares para marcar as sondas usadas para FISH. Por estas técnicas de marcação, tornou-se possível a utilização de núcleos interfásicos em pesquisas científicas, eliminando assim a necessidade da cultura de células para obtenção de metáfases. Assim, um maior número de células pode ser analisado, já que uma grande quantidade de núcleos interfásicos é encontrado nas preparações celulares acrescido ao fato da não necessidade de cultivo celular. A elevada sensibilidade, especificidade e rapidez destes procedimentos permitiram a sua utilização como adjuvante na identificação de anormalidades cromossômicas, localização de genes relacionados a tumores bem como a enumeração de cópias de genes ou cromossomos em neoplasias hematopóéticas (Yan et al, 2000; Romeo et al, 2001).

Nas duas últimas décadas, houve um aumento significativo do número de estudos sobre as alterações numéricas e estruturais presentes em tumores humanos (Nowell et al, 1998). Estes estudos têm proporcionado o conhecimento sobre os eventos que determinam o desenvolvimento das neoplasias, novos métodos para o diagnóstico e prevenção dos tumores (Humphrey et al, 1998) assim como permitido o delineamento de fármacos desenvolvidos a partir do reconhecimento de alterações genéticas específicas.

As alterações citogenéticas podem ser consideradas marcadores eficazes tanto para diagnóstico quanto prognóstico de tumores malignos, uma vez que a recorrência dessas alterações pode ser indicativa de regiões chaves no desenvolvimento e progressão de vários tumores. As mielodisplasias são

altamente heterogêneas e há cada vez mais a necessidade de marcadores que permitam definir o subtipo clínico e que possam aperfeiçoar o tratamento dos pacientes, como indicadores prognósticos e preditivos.

Neste estudo, as análises após bandamento GTG foram realizadas em 22 casos e revelaram anormalidades cromossômicas clonais envolvendo principalmente os cromossomos 7 [del(7)(p12)], 12 [del(12p)], 17 [del(17p) e monossomia 17], 20 (monossomia 20) e aneussomia do Y. Estes resultados são, em sua maioria, concordantes com dados da literatura. Pela FISH foi avaliado o número de cópias de regiões específicas dos cromossomos 3 (3p25.1), 7 (7q22.3) e 17 (17p13.1 e 17q12) em um total de 19 amostras de aspirado de medula óssea de portadores pediátricos de SMD coincidentes com a localização de genes potencialmente relacionados a tumorigênese.

Neste estudo, a análise da FISH em lâminas controles de indivíduos normais (sem câncer) revelou elevada eficiência de hibridação das sondas, indicando que estavam adequadas para a análise. A eficiência de hibridação de uma sonda é definida como a porcentagem de células com o número de sinais correspondentes a um padrão esperado (Devilee et al, 1988; Hopman et al, 1988; Van Dekken et al, 1990; Dewald et al, 1996).

A interpretação dos dados da FISH em núcleos interfásicos é dependente de análise estatística e apresenta vários problemas técnicos inerentes. A presença do sinal fluorescente é dependente da sonda, da acessibilidade ao alvo, das condições de hibridação e da estringência das lavagens pós-hibridação. Assim, não são raros achados de ganhos e perdas de sinais que refletem artefatos técnicos ou resultados falso-positivos. Desta forma, a precisão da análise é dependente do reconhecimento destes

problemas técnicos e da padronização adequada para os critérios de escores (Beatty et al, 2002).

A investigação de deleções da região 3p25 pela metodologia da FISH foi realizada em 19 casos pediátricos de síndrome mielodisplásica. Preparações cromossômicas a partir de indivíduos normais (sem câncer ou história de câncer na família) revelaram que a perda de uma cópia de 3p25 foi de 2,7%. Considerando a média percentual $\pm$ dois desvios-padrão, foi observada perda significativa de uma cópia deste segmento cromossômico em 17 casos analisados (32% a 61% das células).

As anormalidades citogenéticas envolvendo o cromossomo 3 são freqüentemente relatadas em mielodisplasias e incluem deleções e anormalidades estruturais complexas (Mhaweche e Saleem, 2001).

Johansson et al. (1997) relataram diferentes pontos de quebra das deleções no cromossomo 3 detectados em neoplasias hematológicas, incluindo SMD. Estas quebras ocorriam em regiões distais, sugerindo a existência de diferentes genes supressores tumorais neste segmento cromossômico.

Na presente investigação, foi verificada que a sequência RP11-275J11 mapeada em 3p25.1 contém ou está próxima a genes com características compatíveis à perda de função (Figura 18). Neste estudo, entre os dezessete casos de SMD com deleção de 3p25, quatorze eram portadores de anemia severa, seis casos apresentaram hepatoesplenomegalia e sangramentos espontâneos; dois desses casos foram a óbito pela doença em um período inferior a um ano (casos 8 e 11), e outros dois foram a óbito em um tempo médio de 25 meses (casos 9 e 23).

A região onde está mapeada a sequência RP11-275J11 coincide com a localização dos genes *RAF1* (*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog*

1), *MKRN2* (*Makorin, ring finger protein, 2*) e *TSEN2* (*tRNA splicing endonuclease 2 homolog*).

O proto-oncogene *RAF1* codifica uma enzima pertencente à família das MAP quinases (MAP3K) a qual atua na via de ativação da proliferação celular mediada pela proteína RAS (Wu et al, 1996). Considerando sua função, este gene não foi considerado como um potencial candidato envolvido na SMD.

O *MKRN2* codifica uma ribonucleoproteína que apresenta um domínio característico do tipo *zinc finger* (Gray et al, 2001). Entretanto, os processos biológicos nos quais esta proteína atua ainda não foram elucidados.

O gene *TSEN2* codifica uma subunidade da endonuclease responsável pela remoção de introns durante o processamento de tRNA, evento fundamental para o crescimento e divisão celular (Paushkin et al, 2004). Para o nosso conhecimento, não há relatos que associem a inativação destes genes com a carcinogênese. Este gene não pode ser descartado como um candidato a perdas na SMD.

O gene *PPARG* está mapeado em 3p25.1, apenas a 0,024 Mb da sequência RP11-275J11. Este gene codifica um receptor nuclear que está envolvido no controle da proliferação e diferenciação celular, e apoptose (Fajas et al, 2003).

Inúmeros estudos têm demonstrado os efeitos anti-neoplásicos de *PPARG* em linhagens celulares derivadas de tumores sólidos e leucemias, associados com a inibição do ciclo celular e angiogênese, bem como na indução de apoptose (Wang et al, 2006).

A promoção da parada do ciclo celular pela inibição da atividade das ciclinas dependentes de quinase (*CDK*) mediada por agonistas de *PPARG* foi verificada em várias linhagens celulares tumorais incluindo aquelas derivadas

de câncer pancreático (Toyota et al, 2002), tumores mamários (Yin et al, 2001), carcinomas de células não-pequenas de pulmão (Chang e Szabo, 2000) e câncer de bexiga (Guan et al, 1999).

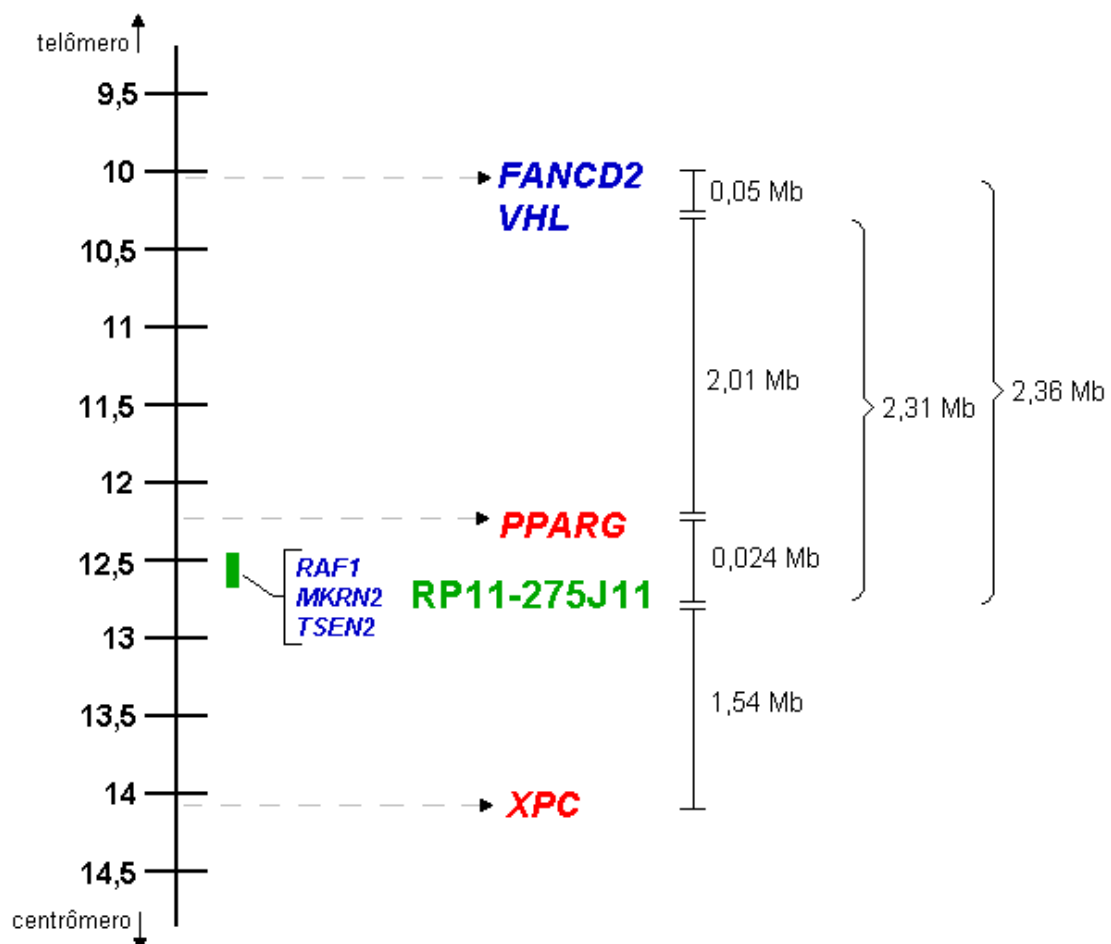


Figura 18. Mapa físico apresentando as regiões do cromossomo 3. Está apresentado o clone analisado neste estudo em verde, genes candidatos incluídos no clone em azul. Em vermelho, genes candidatos para perda de função.

Guan et al. (1999) relataram que o tratamento com o agonista de PPAR, troglitazone, resultou no bloqueio do ciclo celular em G1 e na indução da apoptose em células T24 derivadas de câncer de bexiga. Os autores relataram também que estes eventos foram acompanhados pelo aumento de expressão

dos inibidores de *CDKs*, *p21* e *p16*, e redução dos níveis de expressão da *ciclina D1*. Utilizando o mesmo fármaco, Sugimura et al. (1999) e Yin et al. (2001) demonstraram inibição da proliferação em células mielóides tumorais e derivadas de carcinoma mamário, respectivamente, na fase G1 do ciclo celular.

Patel et al. (2001) verificaram, após análises de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR), um aumento de expressão de *PTEN* (gene envolvido no *checkpoint* do ciclo celular e apoptose) em células de câncer colo retal (Caco2) e mamário (MCF7) tratadas com agonistas de PPARG. Em um outro estudo, utilizando citometria de fluxo, Shao et al. (2002) demonstraram que a ativação dos receptores PPARG resultou em efeitos anti-neoplásicos nas células do epitélio intestinal *Ras*-ativo, inibindo a atividade fosfatilinositol 3'-quinase e reduzindo a expressão das *ciclina D1*.

Yamakawa-Karakida et al. (2002) descreveram que a ativação de receptores PPAR por ligantes naturais e/ou sintéticos levaram à inibição da proliferação de células hematopoéticas tumorais pela indução da apoptose mediada por ativação da caspase-3.

Karger et al. (2005) detectaram, por qRT-PCR, que a expressão do transcrito de *PPARG* estava significativamente diminuída em amostras de carcinoma de tireóide quando comparados com amostras de tireóide normal ou com presença de nódulos benignos. Utilizando a mesma metodologia, Jung et al. (2005) relataram expressão significativamente diminuída de *PPARG* em dez amostras de carcinoma cervical quando comparado com amostras de tecido cervical normal.

Mais recentemente, Bonofiglio et al. (2006), após análises de qRT-PCR, relataram inibição da proliferação celular e aumento da expressão de *TP53* e *p21* em linhagem celular de carcinoma mamário MCF7 tratadas com agonista

de PPARG. Esses achados sugerem que nestas células o bloqueio do ciclo celular pode estar associado à ativação transcricional do gene *TP53*.

Considerando que a perda verificada neste estudo envolva um segmento cromossômico maior, outro importante gene candidato mapeado a 1,54 Mb de RP11-275J11 é o *XPC*. Este gene codifica uma fosfoproteína nuclear envolvida na via de reparo por excisão de nucleotídeos, da qual participa o gene *TP53* (Spatz et al, 2001; Wang et al, 2003).

Utilizando linhagens de células progenitoras hematopoéticas de camundongos expostos ao benzeno por inalação, Faiola et al. (2004), após análises de qRT-PCR, relataram níveis aumentados de expressão de genes envolvidos no reparo de danos no DNA por NER, incluindo o *XPC*. Esses achados revelaram a importância desta via celular na capacidade de reparar de lesões no DNA em células hematopoéticas expostas a agentes genotóxicos.

Em um estudo semelhante, Kuramoto et al. (2002), após análises de RT-PCR, verificaram expressão diminuída de genes relacionados à via NER, incluindo o *XPC*, em 22/23 pacientes adultos com SMD expostos previamente à radiação atômica. Nesse grupo de casos com expressão alterada, 15 apresentavam anormalidades cromossômicas após análises de bandamento GTG, sugerindo que defeitos no reparo a danos no DNA estão envolvidos na patogênese das mielodisplasias.

Hollander et al. (2005), relataram que camundongos homozigotos para ausência do gene *XPC* desenvolveram múltiplos tumores de pulmão espontâneos com a minoria progredindo para adenocarcinoma de pulmão de células não-pequenas, ocasionalmente com metástase em linfonodos adjacentes. Segundo os autores, pelo fato da capacidade de reparo do DNA estar comprometida em células *XPC*^{+/-}, é possível que a perda de um único

alelo deste gene no pulmão humano confira um fenótipo mutador. Associado a carcinógenos do cigarro, a diminuição do reparo a danos no DNA poderia resultar em mutações adicionais em genes como o *TP53*, que são alvos freqüentes em câncer de pulmão (Campling et al, 2003).

Recentemente, Pinto et al. (2005) identificaram, após realização da metodologia de bandamento GTG, a presença da deleção de 3p25 como anormalidade clonal em células medulares de um paciente adulto com SMD cujas características clínicas envolviam citopenia severa e aplasia medular intensa, sugerindo que a perda deste segmento cromossômico é indicativa de pior prognóstico.

Nesta análise, todos os dezessete casos de SMD com deleção de 3p25 também demonstraram perda significativa de uma cópia da seqüência RP11-89D11, a qual abrange o gene *TP53*. Destes casos, quatorze apresentaram quadro clínico agressivo e quatro foram a óbito pela doença.

Shali et al. (2006), após análises de bandamento GTG e *Multicolor* FISH, detectaram monossomia do 17 e deleção em 3p em um caso pediátrico de RAEB que evoluiu para LMA. Baseando-se neste achado e nos resultados obtidos em nosso estudo, é possível que a perda da região 3p25 esteja envolvida em neoplasias mielóides e que a presença desta alteração juntamente com a inativação de *TP53* esteja associada a formas mais agressivas de SMD.

A identificação de mutações em *TP53* em estágios precoces da SMD sugere que a perda de função deste gene está envolvida no desenvolvimento da doença. O *TP53* encontra-se mapeado em 17p13.1 e a perda da função deste gene está freqüentemente associada com mutações e deleção de 17p. Soenen et al. (1998) e Kuribayashi et al. (2005) relataram que estas alterações

estão relacionadas com uma forma típica de SMD caracterizada por desgranulopoesse combinada com hipoblobulação pseudo-Pelger-Huet em neutrófilos.

A proteína codificada pelo gene supressor tumoral *TP53* é o ponto chave dos processos de regulação do ciclo celular, manutenção da integridade do DNA e apoptose. Células com alterações em *TP53* não reconhecem os sinais de inibição de crescimento e dessa forma podem propiciar o surgimento de instabilidade genômica e contribuir para a evolução de clones mutantes e progressão tumoral (Peters et al, 2001).

Em vários tipos de neoplasias, e particularmente em leucemias e linfomas, a perda da função normal de *TP53* ocorre durante o desenvolvimento tumoral e está associada a um curso clínico agressivo e a piores prognósticos (Kirsch e Kastan, 1998; Wallace-Brodeur e Lowe, 1999). A inativação do gene *TP53* é detectada em aproximadamente 15% dos casos de SMD primária e está relacionada preferencialmente a pacientes com estadio clínico avançado e cariotipicamente instável (Steensma e List, 2005). Em SMD infantil, não foi estabelecida a frequência desta alteração.

Quatro casos foram avaliados pela FISH utilizando a sonda *DZ171* e apresentaram perda significativa de uma cópia de 17p13.1 (média de 57% das células). Com relação à sonda *RP11-89D11*, treze casos apresentaram perda hemizigota significativa desta região cromossômica em uma média de 51% das células.

Em análise de *microarrays*, Ueda et al. (2003) correlacionaram os níveis de expressão gênica de 2304 genes entre amostras dos *Balst Bank* derivadas de 30 pacientes com SMD e voluntários saudáveis. Os resultados obtidos demonstraram expressão elevada de um grupo de genes em células de

pacientes com anemia refratária e indivíduos controles. Contudo, a expressão desses genes apresentava-se reduzida em pacientes com estágios mais avançados da doença. O produto de um destes genes compõe o complexo PIASy, uma ligase E3 associada à via de ubiquitinação celular e conhecida como SUMO, o qual constitui um potencial inibidor de transdução de sinal e ativador de transcrição (Liu et al, 2001). A redução do nível de expressão de PIASy pode contribuir para o crescimento dos blastos leucêmicos e progressão para estágios mais agressivos da SMD. Um dado interessante, é que a proteína SUMO é conjugada com uma variedade de proteínas, incluindo RanGAP1, PML, I κ B- α e p53 apoiando a teoria de que a baixa expressão de PIASy resulta na não ativação da proteína p53 (Kahyo et al, 2001; Sachdev et al, 2001). Isto reforça a importância da perda de expressão de *TP53* na SMD.

Em outro estudo por análise de PCR-SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*), Side et al. (2004) e três outros relatos prévios (Ben-Yehuda et al, 1996; Horiike et al, 1999; Christiansen et al, 2001) identificaram elevada prevalência de mutações no gene *TP53* (27% - 38% de um total de 23 casos) em SMD-t em relação a outras neoplasias hematológicas. Uma série de experimentos em camundongos transgênicos E μ -*MYC* revelou o papel crucial do *TP53* na modulação dos efeitos terapêuticos de agentes citotóxicos *in vivo* (Schmitt et al, 2000; Schmitt et al, 2001; Schmitt et al, 2002). Estes dados sugerem que a inativação deste gene pode estar associada a fenótipos quimioresistentes e prognósticos mais agressivos (Nakano et al, 1999; Stirewalt et al, 2001).

Em um outro estudo, Watanabe et al. (2004) relataram, por análises citogenéticas e moleculares, a deleção de um dos alelos de *TP53* em dois de

31 portadores de neoplasias hematológicas e mutação em ponto em cinco pacientes deste mesmo grupo amostral.

Neste estudo, a perda de 17p foi um achado freqüente, presente em 17/19 casos de SMD avaliados pela FISH, dentre os quais quatorze apresentaram anemia severa e seis hemorragias nas mucosas e hepatoesplenomegalia. Entre os quatorze casos com quadro clínico agressivo, dois foram a óbito pela doença em poucos meses, um foi a óbito por outra causa e outros dois continuam vivos com seguimento de 20 e 47 meses.

Nakamura et al (2004), após avaliação por bandamento GTG e análises moleculares de aspirados de medula óssea de 24 pacientes portadores de neoplasias hematológicas mielóides, descreveram a predominância de mutações do gene *TP53* em 4/23 casos com prognósticos agressivos e resistentes a quimioterápicos.

Mais recentemente, Tsurusawa et al. (2005), utilizando a técnica de bandamento GTG, avaliaram o cariótipo de 36 casos pediátricos de SMD-t (média de idade 7,7) e identificaram monossomia do 17 em três pacientes. Em outro estudo, Barouk-Simonet et al. (2005) relataram a presença de deleção de um alelo de *TP53* em 12/23 pacientes adultos com SMD após análises combinadas de M-FISH e FISH com a mesma sonda utilizada em nosso projeto (*D17Z1*). Destes doze pacientes, onze apresentavam cariótipos complexos e encontravam-se em estágios mais avançados da SMD (RAEB e RAEB-t). Andersen et al. (2005), também utilizando a técnica de M-FISH, identificaram em 11 dos 116 casos de SMD-t e LMA-t translocações não-balanceadas do cromossomo 17. Este rearranjo resultou na perda de segmentos de 17p em 10 destes pacientes os quais apresentavam prognósticos intermediários.

Usando FISH, Sindelarova et al. (2005) relataram que em 34 dos 206 casos de leucemia linfocítica crônica B, avaliados para região 17p13, foi identificada deleção do gene *TP53* e todos os pacientes apresentavam sobrevida significativamente curta e resistência ao tratamento.

Na análise da FISH para o gene *TP53* realizada neste estudo, apenas o caso 6 não apresentou deleção hemizigota/homozigota significativa deste *locus*. Em nosso grupo amostral, este caso, que também não apresentou perda significativa em 3p25.1, é o único portador de SMD secundária a tratamento de tumor primário (neuroblastoma tipo IV) com agentes alquilantes e inibidores de topoisomerase II. Assim, é possível que diferentes vias metabólicas estejam alteradas em casos de SMDt.

Inúmeros estudos têm associado o desenvolvimento de leucemias secundárias, incluindo SMD, com uso de agentes alquilantes e inibidores de topoisomerase II para o tratamento de doenças primárias (Pedersen-Biergaard et al, 1991; Winick et al, 1993; Horibe et al, 1993, Wierecky et al, 2005). Os agentes alquilantes são compostos reativos que transferem um grupo metil à molécula de DNA, causando a inibição da duplicação e transcrição. (Allan e Travis, 2005). Os inibidores de topoisomerasas, por sua vez, induzem quebras de dupla fita no DNA e rearranjos de diversas seqüências gênicas (Richardson e Jasin, 2000).

Em um estudo utilizando análises de LOH e seqüenciamento, Panizo et al. (2003) identificaram mutação em ponto no exón 7 do gene *TP53* e ausência de perda alélica deste segmento em um caso adulto de SMD relacionada à terapia, alterações estas que não foram detectadas na amostra do tumor primário. Este paciente não apresentou alterações em 17p após análises de bandamento GTG.

Entre os casos com perda em 17p13.1 avaliados pela FISH, seis deles apresentaram, após análise de bandamento GTG, deleção em 17p como anormalidade clonal (casos 4, 7, 11, 12, 17 e 18). O caso 7 apresentou esta alteração nos dois tempos de cultura avaliados após banda GTG. Nestes seis casos, foi observada a perda significativa da sonda do gene *TP53* em uma média de 59% das células. Outros dois casos em que não foi realizada a metodologia da FISH para esta sequência também apresentaram monossomia 17 e deleção em 17p pela análise citogenética clássica.

Em três casos com perda de 17p pela FISH (casos 4, 7 e 8) e em seis casos com del(17p) após bandamento G (casos 1, 2, 3, 4, 7 e 12), foi observada a presença de mais de uma anormalidade cromossômica clonal.

A associação de perdas em 17p e inativação de *TP53* com a presença de instabilidade cromossômica também foi relatada por Schoch et al. (2006). Esses autores verificaram que 53% dos 125 casos de LMA com perda de um alelo deste gene apresentavam inúmeras anormalidades citogenéticas clonais após análises de banda GTG e cariótipo espectral. Em um estudo anterior, Andersen et al. (2005) relataram a presença de cariótipo complexo em sete casos de LMA-t e SMD-t que apresentavam mutações na sequência de *TP53*.

Entre as inúmeras anormalidades descritas, alterações citogenéticas envolvendo o cromossomo 7, como a deleção completa ou parcial de 7q bem como a monossomia do 7 estão frequentemente associadas a neoplasias mielóides (Shen et al, 2001). O cromossomo 7 possui uma região eucromática de 153 milhões de pares de base que abriga 1.150 genes codificadores de proteínas, dentre as quais algumas são polimórficas para mutações que interferem na estrutura de leitura dos genes. Em adição, estão também mapeados nesse cromossomo 941 genes prováveis, supostamente

codificadores de outras proteínas que participam do ciclo celular (Hillier et al, 2003).

Monossomia do cromossomo 7 e deleções intersticiais em 7q são típicas de neoplasias mielóides e estão frequentemente associadas a cariótipos complexos nas SMD (Mecucci, 1998). A presença de perdas no cromossomo 7 em leucemias mielóides sugere que essas alterações podem liderar a perda de genes importantes na regulação do crescimento e diferenciação de células mielóides (Maserati et al, 2004).

Neste estudo, análise de bandamento GTG detectou a del(7)(q32) em um caso de SMD – RA (caso 4) e monossomia 7 no caso 17. O caso 4 também apresentou a del(17)(p12) em baixa frequência após análise citogenética convencional. Este paciente tem história de SMD há mais de 10 anos e continua em seguimento clínico.

Utilizando análise após bandamento GTG, Brandwein et al. (1990) relataram que seis dos 14 casos de SMD pediátrica primária apresentavam monossomia 7. Em outro estudo semelhante, Rubin et al. (1991) detectaram a presença de monossomia 7 e deleções em 7q [del(7)(q31q36)] em quatro e dois casos, respectivamente, entre os oito pacientes com SMD infantil relacionada à terapia com agentes alquilantes. Neste mesmo ano, utilizando análises de bandamento GTG e FISH com a sonda centromérica específica do cromossomo 7, Minelli et al. (2001) identificaram um caso pediátrico de anemia refratária com monossomia 7.

Baseados em estudos de alelotipagem e bandamento G, foram delineados três *loci* distintos que estão frequentemente deletados em neoplasias mielóides: 7q22, 7q31.1 e 7q31.3 (Le Beau et al, 1996; Johnson e

Cotter, 1997). Em SMD, a perda de segmento genômico em 7q22 parece ser crítica (Johnson et al, 1996).

Nesta investigação, a avaliação de perdas em 7q22.3 pela FISH foi realizada em 17 casos; 16 apresentaram perda hemizigota significativa em mais de 30% das células.

Baseados em análises de hibridação genômica comparativa (CGH) e FISH, de Babicz et al. (2005) identificaram a perda do cromossomo 7 em 3/9 casos pediátricos de LMA e SMD (1 LMA e 2 SMD). Em um estudo mais recente, Babicka et al. (2006), combinando os dados obtidos após a aplicação de citogenética convencional, FISH e bandamento multicolorido, relataram que alterações no cromossomo 7 estavam presentes em 12 dos 311 casos de SMD e LMA avaliados, sendo que cinco deles (4 LMA e 1 SMD) eram portadores de monossomia e outros quatro (3 LMA e 1 SMD) apresentavam rearranjos ou perdas em 7q31.

Em um estudo prévio, Liang et al. (1998), utilizando mais de 20 marcadores de microssatélites correspondentes ao intervalo 7q22-7q31 em células normais e neoplásicas de pacientes com LMA, detectaram perda alélica, na maioria dos casos, para todos os *loci* avaliados. Entretanto, três casos apresentaram perda de três regiões distintas indicando a possibilidade de que genes supressores tumorais localizados em 7q atuam independentes ou em cooperação.

Em nosso estudo, o caso 6, portador de SMD relacionada à terapia com agentes alquilantes e inibidores de topoisomerase II, também apresentou perda homozigota e heterozigota significativa de 7q22.3 em 51% das células avaliadas.

As leucemias, incluindo as SMD, relacionadas à terapia com agentes alquilantes têm sido freqüentemente associadas com monossomia 7 e deleções em 7q (Rowley et al, 1977, 1981; Pedersen-Bjergaard et al, 1981; Le Beau et al, 1986; Johansson et al, 1991).

Após análise de bandamento GTG, Smith et al. (2003) relataram anormalidades envolvendo o cromossomo 7 em 85/306 casos adultos e pediátricos de SMD e LMA relacionadas à terapia com agentes alquilantes e inibidores de topoisomerase II. Em um estudo semelhante, Andersen et al. (2005), após análise combinada de banda GTG e M-FISH identificaram deleções em 7q em nove casos adultos de SMD e LMA relacionadas ao mesmo tipo de terapia. Em um estudo com SMD-t infantil já citado anteriormente, Tsurusawa et al. (2006) também verificaram a presença de anormalidades envolvendo o cromossomo 7 em 41% dos pacientes avaliados por banda G, sendo que oito desses casos eram portadores de monossomia do 7 e 12 outros apresentavam perda em 7q (três casos com del(7q) e nove com rearranjos não-balanceados). Estes achados sugerem que a perda desta região cromossômica é bastante relevante na tumorigênese destes tipos de neoplasias.

Para análise desta região foi selecionada a seqüência RP11-46J20, a qual contém ou está próxima a genes que apresentam funções compatíveis com supressão tumoral (Figura 19).

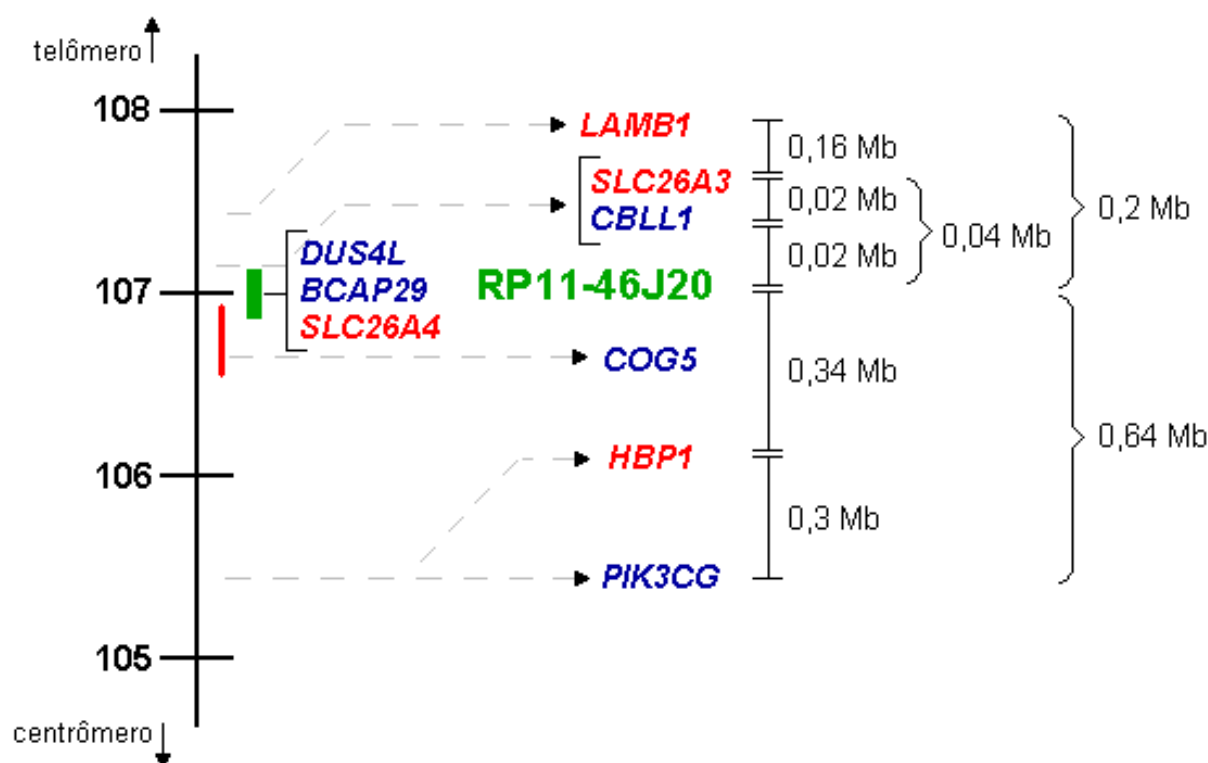


Figura 19. Mapa físico apresentando as regiões do cromossomo 7. Está apresentado o clone em verde, genes contidos ou próximos ao clone em azul. Em vermelho, genes candidatos para perda de função.

Análises *in silico* demonstraram que a região onde está mapeada a seqüência RP11-46J20 contém os genes *SLC26A4* (*pendrin*), *DUS4L* (*Dihydrouridine synthase 4-like*) e *BCAP29* (*B-cell receptor-associated protein 29*).

A proteína codificada pelo *DUS4L* apresenta uma atividade oxidoreductase e atua no processamento de tRNA. O gene *BCAP29* codifica uma proteína integrante da membrana celular e do complexo de Golgi responsável pelo transporte de partículas e pela regulação da secreção de imunoglobulinas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>). Para o nosso conhecimento, não há relatos associando deficiências nestes genes com o processo tumoral.

O gene *SLC26A4* é rico em ilhas CpG e pertence a um grupo de genes altamente conservados (*SLC26*) cuja função está associada ao desenvolvimento do esqueleto (Hastbacka et al, 1994), síntese do hormônio da tireóide (Everett et al, 1997), transporte iônico transepitelial (Hoglund et al, 1996; Knauf et al, 2001; Xie et al, 2002), excreção e secreção de bicarbonato (Royaux et al, 2001; Ko et al, 2002). O *SLC26A4* foi caracterizado durante o seqüenciamento do cromossomo 7 e alguns estudos têm demonstrado que deleções e/ou mutações neste gene estão associados à Síndrome de Pendred, uma doença autossômica recessiva caracterizada pelo desenvolvimento de bócio e perda da capacidade auditiva (Reardon et al, 2000).

Devido à importância do gene *SCL26A4* no metabolismo da tireóide, Xing et al. (2003) avaliaram, por estudos de metilação e qRT-PCR, o padrão de expressão deste gene em tumores primários de tireóide e detectaram que o gene estava hipermetilado e com expressão diminuída em 44% das amostras de adenomas benignos, 46% e 71% dos casos de tumores tireoideanos foliculares e papilíferos, respectivamente, e em 71% dos tumores do tipo anaplásicos. Mais recentemente, Wang et al. (2005), usando análises de *ChIP-on-chip*, verificaram que o gene *SCL26A4* estava hipermetilado em linhagens de células derivadas de tumores de próstata. Esses achados são indicativos de que a inativação de *SCL26A4* pode ser um evento importante na tumorigênese.

A glicoproteína transmembrana *SLC26A3* é muito semelhante a *SLC26A4*, apresentando 44% de identidade e 60% de similaridade (Mount e Romero, 2004). A seqüência codificadora desta proteína (*SLC26A3* ou *DRA* – *Solute carrier family 26, member 3*) está localizada a 0,04 Mb da sonda utilizada neste estudo e tem como principal função facilitar o transporte de ânions. A expressão de *SLC26A3* é predominantemente observada no

duodeno e cólon normal (Yang et al, 1998; Jacob et al, 2002). Outras áreas de expressão incluem vesícula seminal intraprostática, túbulos proximais dos rins e glândulas sudoríparas (Haila et al, 2000).

O *SLC26A3* tem sido caracterizado como um potencial gene supressor tumoral cuja expressão estava diminuída ou ausente em adenomas e adenocarcinomas de cólon (Schweinfest et al, 1993; Byeon et al, 1996; Antalis et al, 1998). Recentemente, Chapman et al. (2002) transfectaram vetores de *SLC26A3* em várias linhagens celulares tumorais (DLD-1, HT-29, HCT-15, SW837, SW480, MCF-7, NIH3T3, CaSki e HeLa) e verificaram inibição da proliferação dessas células em cultura e a diminuição do número de colônias resistentes à droga. Entretanto, o papel de *SCL26A3* na regulação do ciclo celular não está completamente elucidado.

Outro importante gene é o *COG5* (*component of oligomeric golgi complex 5*). A posição deste gene coincide com a localização da sonda usada em nosso estudo e codifica um componente do complexo multiprotéico localizado na membrana do complexo de Golgi (*conserved oligomeric Golgi – COG*), o qual é responsável pelo transporte intracelular e metabolização de glicoproteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/gene>). Contudo, nenhum estudo tem relacionado alterações neste gene com o desenvolvimento de neoplasias.

O gene *LAMB1* (*Laminin beta 1*) pertence à família das lamininas, glicoproteínas da matriz extracelular, e são os principais constituintes da estrutura da membrana celular. As lamininas estão envolvidas em uma variedade de processos biológicos incluindo adesão celular, diferenciação, migração, angiogênese e metástase (Gonzales et al, 2001; Li et al, 2003). Particularmente, o *LAMB1*, localizado a 0,2 Mb da sonda, é expresso em vários

tipos de tecidos e tem sido associado com interação celular (Fujiwara et al, 2004).

Embora alguns estudos correlacionem níveis aumentados de *LAMB1* com a progressão tumoral (Fujita et al, 2005; Ljubimova et al, 2006), Saito et al. (2005) relataram que em 5/21 casos de leiomioma uterino com desequilíbrio alélico do cromossomo 7 apresentaram expressão diminuída deste gene após análises de qRT-PCR.

A aproximadamente 0,34 Mb da sonda está mapeado o gene *HBP1* (*HMG-box transcription factor 1*), um importante repressor transcricional de uma variedade de proto-oncogenes, incluindo o *NMYC* e *RB* (Tevosian et al, 1997). O *HBP1* é um inibidor do ciclo celular, regulando a progressão na fase G1 como também a diferenciação celular em vários tipos de tecido (Shih et al, 1998; 2001; Sampson et al, 2001).

Yao et al. (2005) avaliaram os efeitos ectópicos da expressão aumentada de *HBP1* em linhagens de células mieloblásticas *in vitro* e observaram redução da proliferação celular e formação de colônia, retardo da progressão na fase S do ciclo, diminuição da expressão das *ciclinas D1 e D3*, e aumento no nível de transcritos de *p21*. Também foi observada indução de apoptose e diferenciação celular. O aumento de expressão de *HBP1* modulou os níveis de fatores de transcrição mielóides específicos (*C/EBP χ* , *c-MYB*, *c-MYC* e *JUNB*) e linhagens específicas (*PU.1*, *GATA-1* e *RUNX1*). Esses achados sugerem que o gene *HBP1* atua como supressor tumoral e indutor de diferenciação celular em células mielóides.

O gene *PIK3CG* (fosfoinositidil-3-quinase), mapeia-se próximo à região em estudo (0,37 Mb) e codifica uma enzima a qual modula a sinalização extracelular nos processos de adesão célula-célula mediados pela E-caderina,

importante para manutenção da integridade estrutural e funcional do epitélio (Kratz et al, 2002). Contudo, nenhum estudo tem relacionado à perda de função deste gene com o desenvolvimento de neoplasias.

Recentemente, Liang et al. (2005) avaliaram um caso de LMA com monossomia do 7 e deleções não contínuas utilizando um grupo distinto de marcadores microssatélites para regiões críticas em 7q, e definiram um novo ponto de quebra em 7q31.1-q31.2. Baseados em dados do sequenciamento do cromossomo 7, sugeriram que o supressor tumoral *DOCK4* seria um potencial gene candidato localizado neste intervalo. Este gene codifica uma proteína ativadora de GTPase e está frequentemente deletado em tumores sólidos agressivos.

A perda total ou parcial do cromossomo 7 e 7q em SMD estão associadas a piores prognósticos, com baixa sobrevida e progressão para leucemia (Morel et al, 1993; Bernasconi et al, 1994; Fenaux et al, 1996; Velloso et al, 1996). Bernasconi et al. (2005) avaliaram 331 casos de SMD *de novo* e confirmaram prognósticos desfavoráveis e baixa sobrevida em 36 pacientes com deleções em 7q e monossomia do 7. Knipp et al. (2005), após análises de banda G, relataram que 7/14 casos adultos de SMD-t portadores de anormalidades no cromossomo 7 (cinco casos com -7 e dois casos com deleção de 7q22) e diagnosticados em estágios mais avançados da doença (RAEB e CMML) evoluíram para leucemia.

Em nosso estudo, dentre os dezessete casos avaliados pela FISH em 7q22.3, cinco casos apresentaram quadro clínico agressivo caracterizado por hepatoesplenomegalia, onze casos com anemia severa, e quatro (8, 9, 11 e 23) foram a óbito pela doença.

Considerando os 19 casos analisados para as sondas mapeadas em 3p25.1 e 17p13.1 e os 17 casos avaliados para a sequência do cromossomo 7, pode-se verificar uma significativa frequência de células normais. Para a sonda RP11-275J11, sete casos mostravam mais de 50% de células normais; para a sonda RP11-46J20 foram seis casos e para a sequência do *TP53* foram três casos. Nestes casos com alta frequência de células normais, foram observadas perdas homozigota e heterozigota significativas em seis casos para sonda do cromossomo 3, quatro casos para a sonda do cromossomo 7 e em dois casos para sequência do gene *TP53*. Estes resultados revelam que as alterações envolvendo perdas para todas as sondas testadas estavam presentes em subpopulações celulares. A presença de alta frequência de células com o padrão de hibridação esperado para dissomia pode revelar contaminação com células normais, não tumorais, ou um padrão normal para as sequências estudadas. A análise por bandamento GTG também revelou a presença de subpopulações celulares com cariótipos normais (46 cromossomos) em todos os casos. As preparações celulares utilizadas nas análises de bandamento GTG e da FISH são obtidas após cultura celular e podem ser selecionadas populações celulares específicas. Em adição, a separação de células não tumorais após cultivo *in vitro* ainda é um problema sem solução.

Amplificações no braço longo do cromossomo 17 envolvendo o gene *ERBB2* foram descritas em vários tipos de tumores sólidos e estão particularmente associados a prognósticos agressivos no câncer de mama (Wang e Hung, 2001). Níveis aumentados de expressão de *ERBB2* não são eventos comuns em neoplasias hematológicas e estão associados à doença agressiva e prognóstico desfavorável em SMD.

Neste estudo, dezesseis casos foram avaliados para a região 17q12 pela FISH e a presença de três ou mais sinais não foi significativa sendo observada em aproximadamente 5% das células.

No fim da década de 80, Fukushima et al. (1986) e Kaneko et al. (1987) identificaram a existência de um ponto de quebra na região 17q12 envolvendo o gene *ERBB2/HER2* em casos de leucemia promielocítica aguda. Em outro estudo, Bühring et al. (1995), utilizando técnicas de imunofluorescência e citometria de fluxo, compararam a expressão de HER2 em células hematopoéticas de indivíduos saudáveis e em blastos anormais de portadores de leucemia linfocítica aguda (LLA) e crônica (LLC), LMA e leucemia mielóide crônica (LMC) e verificaram aumento dessa expressão em 2/15 pacientes pediátricos e em 10/21 pacientes adultos com LLA.

Potti et al. (2001) também identificaram aumento de expressão da proteína HER2 em 9/14 pacientes adultos não-fumantes que apresentavam LLC de prognóstico desfavorável e carcinoma pulmonar agressivo. No ano seguinte, esse mesmo grupo de pesquisa, utilizando metodologia similar, mostrou expressão aumentada desta proteína em 12,9% dos 31 casos de mieloma múltiplo avaliados.

Martin-Subero et al. (2001) relataram amplificação no cromossomo 17q em um paciente adulto inicialmente com SMD e que evoluiu para LMA. No mesmo ano, Morerio et al. (2001) descreveram um caso pediátrico de SMD com t(9;11)(p12;q23) ao diagnóstico, que progrediu para LMA extremamente agressiva como consequência da evolução clonal da doença a qual resultou no surgimento de células mutantes quimioresistentes e portadoras de trissomia 17q21-qter.

Müller et al. (2003) avaliaram a expressão de HER2 em blastos primários de pacientes de LLA utilizando anticorpos monoclonais específicos e verificaram que cinco dos 33 casos apresentavam expressão elevada deste gene. Interessantemente, todos os cinco pacientes apresentavam prognósticos agressivos e resistência a terapias. Usando a técnica da FISH, Chevallier et al. (2004) também verificaram ganhos de seqüências de *ERBB2* em 15/100 casos de LLA adultos (31%) e pediátricos (3,4%), os quais eram resistentes à terapia.

Mais recentemente, Martínez-Ramírez et al. (2005) detectaram pela CGH e confirmaram pela FISH ampliações do gene *ERBB2* em 35% dos 37 pacientes adultos com SMD os quais apresentavam cariótipos complexos pela análise citogenética convencional.

Em nosso estudo, os dezesseis casos avaliados pela análise da FISH com a sonda RP11-62N23 não apresentaram amplificação significativa do braço longo do cromossomo 17.

Padrão normal no número de seqüências de *ERBB2* também foram relatados por Musolino et al. (2005) nos quarenta casos de LLC avaliados pela metodologia da FISH com sonda *locus*-específica desse gene. Recentemente, Lee et al. (2006) verificaram a ausência de mutações na seqüência deste gene em amostras de DNA extraídas de 143 casos de LMA após PCR-SSCP e seqüenciamento.

A presença de deleções no braço curto do cromossomo 12 é extremamente comum e heterogênea em neoplasias hematológicas e, particularmente, estão envolvidas em cerca de 5% dos casos de SMD, mais freqüentemente em RAEB, RAEB-t e CMML. Nas SMD *de novo*, deleções intersticiais de 12p ocorrem isoladamente, ao contrário das SMD secundárias,

em que perda deste segmento cromossômico resulta de translocações não-balanceadas (Mecucci, 1998).

No presente estudo, a análise cariotípica por bandamento GTG identificou dois pacientes com deleções clonais da região 12p13 (casos 1 e 3). No caso 1, SMD-RA, a del(12)(p13) foi observada em três culturas de medula óssea obtidas em diferentes tempos. A paciente foi a óbito pela doença após 12 anos do diagnóstico e apresentava um cariótipo complexo. O caso 3, SMD-RAEB, apresentou a deleção 12p outras alterações estruturais clonais em baixa frequência e foi a óbito pela doença em 9 meses.

As deleções em 12p envolvem pontos de quebra em regiões próximas a 12p13, e resultam na perda dos genes localizados entre as bandas p11 e p13, tais como *TEL* e *KIP1*, que apresentam propriedades de supressores tumorais. O gene *TEL*, localizado em 12p13, é membro da família de fatores de transcrição e codifica proteínas que são responsáveis pela regulação negativa do processo transcricional. O gene *KIP1*, mapeado nesta mesma região, é responsável pela codificação da proteína p27, a qual atua como inibidora de quinases ciclina-dependentes, participando significativamente no processo de *checkpoints* do ciclo celular e no controle da proliferação celular.

A caracterização molecular utilizando a técnica da FISH demonstra que o gene *ETV6* e o gene inibidor da enzima quinase dependente de ciclina G1 (*CDKN1B*) estão situados em regiões comumente deletadas peculiares a neoplasias hematológicas com del(12p) (Hoglund et al, 1996).

Utilizando um conjunto de sondas específicas do cromossomo 12 para aplicação da FISH, Wlodarska et al. (1996) detectaram perda de 12p em 22 casos portadores de diferentes doenças hematológicas. Um caso era pediátrico e portador de SMD-RAEB-t. Solè et al. (2000) relataram que 26 de 640 casos

de SMD primária apresentavam deleções em 12p e a presença desta alteração estava correlacionada a prognósticos favoráveis. Em contrapartida, Bernasconi et al. (2005) identificaram esta alteração em 11 dos 331 casos de SMD *de novo*, os quais apresentavam curso clínico agressivo e baixa sobrevida. Em outro estudo, Van Limbergen et al. (2002) detectaram, pela FISH, deleção de um alelo de *ETV6* nos 5/36 casos adultos de SMD e LMA (3 SMD e 2 LMA) portadores de rearranjos envolvendo 12p13.

Evidências acumuladas sugerem que deleções ou mutações em 12p13 ou em regiões próximas podem causar o comprometimento funcional desses genes, promovendo o processo carcinogênico (Hayashi et al, 1996).

A perda do cromossomo 20 foi detectada como anormalidade clonal em cinco casos avaliados após banda GTG (casos 1-cultura I, 8, 10 e 12). Para nosso conhecimento e consultando o banco de dados de Mitelman et al. (2006), não há relatos de monossomia 20 em casos de SMD pediátrico.

Alterações no cromossomo 20 são freqüentes em doenças hematopoéticas mielóides, sendo raramente observada em neoplasias linfóides (Mitelman et al, 1997). Particularmente, as deleções em 20q são mais freqüentes que a monossomia 20 e estão presentes em aproximadamente 4% dos casos de SMD, sendo geralmente associadas a bom prognóstico (Fenaux et al, 1996).

Hasle et al. (1995) relataram um caso pediátrico de SMD-RAEB-t que apresentava deleção em 20q11 após análise de bandamento G. Recentemente, Trost et al. (2006) relataram a presença de monossomia 20 em um caso de SMD (1/17 casos) e em um caso de LMA (1/3 casos) após análises de cariótipo espectral. Em um estudo semelhante, Shali et al. (2006) identificaram deleção de 20q em 5% dos 43 casos de SMD-t e LMA-t avaliados.

Entre os quatro casos identificados com monossomia 20 neste estudo, três foram classificados como subtipo RAEB ao diagnóstico; um caso (12) evoluiu do subtipo RARS para RAEB após 15 meses do diagnóstico. Os casos 1 e 8 foram a óbito pela doença.

A importância prognóstica das deleções no cromossomo 20 não está completamente esclarecida. Alguns estudos sugerem que portadores de SMD com deleção em 20q apresentam bons prognósticos (Greenberg et al, 1997), condição esta que não foi confirmada por outros autores (Campbell e Garson, 1994). Brezinova et al. (2005) relataram que os casos adultos de SMD com 20q- e alterações cromossômicas adicionais apresentavam uma menor sobrevida em relação aos portadores de deleção 20q como única anormalidade citogenética. Nos quatro casos com monossomia 20 do nosso estudo, todos apresentavam alterações cromossômicas adicionais.

No presente estudo, a análise de bandamento GTG identificou a perda do cromossomo Y como anormalidade clonal no caso 5. Contudo, o significado dessa anormalidade citogenética ainda é objeto de controvérsias.

Alguns estudos sugerem que a perda do Y não está envolvida na patogênese de neoplasias hematológicas, pelo fato de que casos de síndrome mielodisplásica com essa alteração apresentam prognósticos brandos e expectativa de vida elevada. Concomitantemente, outras pesquisas demonstram associações consistentes entre a perda desse cromossomo com cursos clínicos agressivos e prognósticos intermediários (Wiktor et al, 2000).

Recentemente, Babicz et al. (2005), utilizando CGH e FISH, identificaram a perda do cromossomo Y em um caso pediátrico com estágio avançado de LMA.

Neste estudo, esta correlação foi observada no caso 5, com perda do cromossomo Y, uma vez que o paciente apresentava quadro clínico agressivo caracterizado por hepatoesplenomegalia e anemia severa. Neste paciente houve perda de seguimento clínico.

Em nosso estudo, outras anormalidades cromossômicas foram observadas em menor frequência entre os 22 casos avaliados após bandamento GTG e incluíam deleções nos cromossomos 4, 9 e 11, monossomias 10, 13, 15, 18, 19, 20, 21, e 22, trissomias 6 e 8, cromossomos derivativos cromossomos X, 22 e 9 e inversão no cromossomo Y. Para nosso conhecimento, essas alterações citogenéticas não têm sido freqüentemente relatadas em SMD pediátrica, excetuando-se a deleção em 11q, identificada neste estudo como única anormalidade clonal no caso 13.

Baseados nos banco de dados de Mitelman et al. (2006), apenas quatro casos pediátricos foram descritos com deleção em 11q até o presente.

Anormalidades envolvendo o braço longo do cromossomo 11 são freqüentemente observadas em neoplasias mielóides e apresentam um ponto de quebra comum em 11q23. As deleções desta região, na qual se mapeia o gene *MLL* (*mixed-lineage leukemia*), estão presentes em 5% dos casos de SMD e, freqüentemente, estão acompanhadas por anormalidades cromossômicas adicionais e pior prognóstico (Panani e Roussos, 2006). Neste estudo, entretanto, del(11)(q23) foi observada como única alteração cromossômica em duas metáfases do caso 13, o qual estava classificado com RA ao diagnóstico e evoluiu para RAEB em menos de um ano.

Deleções de 11q23 como única anormalidade cromossômica têm sido descritas em um pequeno número de casos de neoplasias mielóides (Mitelman et al, 2006). Somente 15 casos de SMD foram relatados na literatura até o

momento (Hyder et al, 1978; Raskind et al, 1984; Pedersen e Kerndrup, 1986; Taniwaki et al, 1987; Cuneo et al, 1989; Ohyashiki et al, 1993; Harbott et al, 1998; de Souza Fernandez et al, 2000). Todos os pacientes faziam parte de estudos amplos e a descrição clínica era limitada. Três dos pacientes estavam classificados com RA, quatro eram RARS, outros quatro pertenciam ao subtipo RAEB-t, dois eram portadores de CMML e em dois a SMD não foi categorizada. Particularmente, no estudo de Souza Fernandez et al. (2000), dois dos quatro casos com del(11)(q23) eram pediátricos e estavam classificados como RAEB.

A existência de cariótipos normais tem sido amplamente descrita em portadores de SMD avaliados por metodologias convencionais. De fato, em 40-60% das SMD primárias e em 20% das SMD-t não são detectadas anormalidades cromossômicas ao diagnóstico (Catenacci e Schiller, 2005).

Neste estudo, cinco casos de SMD (casos 9, 19, 15, 20 e 21) apresentaram cariótipos normais na maioria das metáfases analisadas após bandamento GTG. Pela FISH, a perda significativa das seqüências dos cromossomos 3 e 7 e do gene *TP53* foi observada em quatro casos. Em dois casos (19 e 20) a perda das três seqüências avaliadas foi detectada em mais de 50% das células. No caso 15 esta alteração foi observada somente para as sondas de 3p25.1 e do gene *TP53*. Dentre estes casos, três estão classificados com RA (casos 9, 19 e 21), o caso 15 pertence ao subtipo RAEB e o caso 20 a SMD não foi categorizada. O caso 9 foi a óbito em um período de 30 meses após o diagnóstico e o caso 15 continuava em seguimento. Nos outros três casos houve perda de seguimento clínico.

O padrão citogenético normal é indicativo de bom prognóstico e baixo risco de progressão para LMA conforme os critérios propostos pelo IPSS.

Contudo, a maioria dos pacientes cariotipicamente normais após análise por citogenética clássica apresenta-se bastante heterogêneo quanto ao curso clínico da doença e prognóstico final (Sole et al, 2000).

Dessa forma, a detecção deste perfil citogenético ao diagnóstico pode ser atribuída a estágios iniciais pré-malignos da SMD e/ou a limitações das técnicas convencionais na identificação anormalidades cromossômicas complexas (Catenacci e Schiller, 2005).

Uma variedade de estudos aponta a importância de investigações citogenéticas moleculares mais sensíveis em pacientes com cariótipos normais por métodos clássicos. Rigolin et al. (2001) e Romeo et al. (2002) relataram a presença de anormalidades cromossômicas após análises moleculares em 17,8 e 29,6% dos pacientes, respectivamente, os quais se apresentavam cariotipicamente normais pela citogenética convencional.

Ketterling et al. (2002) avaliaram 32 portadores de SMD com cariótipo normal após bandamento G, e em posterior análise pela FISH, verificaram que um desses casos apresentava alteração citogenética.

Em outro estudo, Bernasconi et al. (2003), utilizando técnicas de hibridação *in situ* fluorescente, identificaram a presença de alterações cromossômicas clonais em 15% dos 18 pacientes portadores de cariótipos normais avaliados por citogenética clássica. Mais recentemente, Breccia et al. (2005) realizaram estudo semelhante e relataram anormalidades citogenéticas pela análise da FISH em 63/98 pacientes com SMD e cariótipos normais após bandamento GTG.

Bennett et al. (2005) relataram que 58% dos 98 casos diagnosticados com ausência de anormalidades citogenéticas por banda G apresentavam curso clínico heterogêneo e prognósticos de intermediário a agressivo,

discordando com o perfil clínico de bom prognóstico proposto pelo critério do IPSS em pacientes com cariótipo normal.

Em um estudo recente de Yilmaz et al. (2005), 80,8% dos 26 casos de SMD-t adulta avaliados após bandamento GTG apresentavam cariótipos normais e, portanto, foram classificados no grupo de bom prognóstico. Entretanto, esses autores detectaram, pela FISH, uma frequência significativa de perdas nos cromossomos 5 e 7 em nove deste pacientes, três dos quais evoluíram posteriormente para leucemia.

A análise comparativa entre as alterações nas quatro sondas avaliadas pela FISH demonstrou a presença de perda homozigota ou heterozigota significativa para as seqüências dos cromossomos 3 e 7 e do gene *TP53* em 13 casos. Entre esses casos, os pacientes 9 (SMD-RA) e 23 (SMD-CMML) foram a óbito em um período de 31 meses e 19 meses, respectivamente, mesmo após transplante de medula óssea e tratamento quimioterápico. No caso 13 a doença evoluiu de RA para RAEB em um período de 15 meses. Em quatro casos (12, 18, 19 e 20) as alterações para estas três seqüências foram verificadas em mais de 50% das células avaliadas. Nos casos 18 (SMD-RA), 19 e 20 (SMD não categorizada) não foi possível avaliar a evolução clínica pois houve perda de seguimento clínico. O caso 12, por sua vez, evoluiu do subtipo RA para RAEB em um período inferior a um ano. Entre os 17 casos com perda significativa para as seqüências do cromossomo 3 e *TP53*, um caso (caso 8 - RAEB) apresentava sinais clínicos agressivos caracterizado por hepatoesplenomegalia e anemia severa e foi a óbito em um período inferior a um ano. Esses achados podem sugerir que a perda significativa da região 3p25.1 e do gene *TP53* estão preferencialmente associadas a doença agressiva e risco elevado de progressão tumoral.

As análises citogenéticas são cruciais para o diagnóstico e na avaliação prognóstica de pacientes com SMD embora, apresentem limitações. De fato, a interpretação de cariótipos na análise cromossômica convencional pode ser complexa devido ao pequeno número de metáfases nas preparações celulares, sobreposições cromossômicas, baixa sensibilidade do bandamento cromossômico na identificação de alterações complexas, pequenas inserções e deleções. Apesar da elevada sensibilidade para detecção de microdeleções e rearranjos de pequenas regiões cromossômicas, a técnica de FISH, por sua vez, é um procedimento limitado para dois a três cromossomos por análise além de requerer amplo conhecimento do segmento cromossômico de interesse para seleção de sondas apropriadas (Steensma e List, 2005).

Esses achados demonstram a importância das técnicas de citogenética molecular como adjuvante dos métodos convencionais, principalmente nos casos em que bandamento GTG detectar padrão cromossômico normal. Essa correlação foi observada em todos os casos, nos quais identificamos padrão cromossômico normal utilizando citogenética clássica e perda significativa para as seqüências dos cromossomos 3, 7 e 17p avaliadas pela metodologia de FISH.

Entretanto, o uso da citogenética convencional faz-se também muito importante no diagnóstico e estudo de doenças hematológicas uma vez que permite a análise de todos os cromossomos num único experimento, a avaliação da heterogeneidade tumoral e a identificação de anormalidades cromossômicas menos freqüentes, mas que podem ser cruciais para o desenvolvimento tumoral. A FISH é uma ferramenta bastante útil para confirmar e revelar detalhes de resultados citogenéticos (Yilmaz et al, 2005). Nossos resultados indicam que quando aplicadas simultaneamente, a

citogenética clássica e FISH permitem detectar alterações cromossômicas clinicamente significantes para portadores de SMD, desvendando marcadores diagnósticos e prognósticos.

A qualidade cromossômica, em muitos casos de doenças hematopoéticas, torna difícil a identificação de pequenos marcadores e rearranjos estruturais. A técnica de FISH pode ser usada como adjuvante na definição de rearranjos e esta investigação pode auxiliar de forma significativa no diagnóstico, prognóstico e a definição da conduta terapêutica (Deeg, 2004).

VI- CONCLUSÕES

Entre os 22 casos analisados por bandamento GTG foi identificada a presença de alterações cromossômicas envolvendo principalmente as deleções nos cromossomos 12 e 17 e monossomia 20. Outras anormalidades citogenéticas foram detectadas em menor frequência.

Na maioria dos casos avaliados pela FISH foi observada perdas homozigotas e heterozigotas significativas das seqüências mapeadas nos cromossomos 3 e 7 e do gene *TP53*, independentemente do subtipo clínico. A análise da FISH para seqüência do *ERBB2/HER-2* foi normal para os dezesseis casos avaliados.

As perdas homozigotas ou heterozigotas para a seqüência mapeada em 3p25.1 foi significativa em 17/19 casos avaliados. Destes casos, quatorze apresentaram quadro clínico agressivo e quatro foram a óbito pela doença. A região onde esta sonda se mapeia coincide com a localização do gene *TSEN2* e está próxima ao gene *PPARG*, potenciais candidatos a etiologia ou progressão da SMD.

Quinze de 17 casos mostraram perdas homozigotas ou heterozigotas significativas. Cinco destes casos apresentaram quadro clínico agressivo caracterizado por hepatoesplenomegalia, onze casos com anemia severa, e quatro foram a óbito pela doença. A região onde está mapeada a seqüência RP11-46J20 contém os genes *SLC26A4*, *DUS4L* e *BCAP29* e está próxima aos genes *SLC26A3*, *LAMB1* e *HBP1*. Estes genes são compatíveis com perda de função e podem estar associados ao desenvolvimento das SMD.

As perdas homozigotas ou heterozigotas significativas da sonda do gene *TP53* foram verificadas em 18/19 casos, dentre os quais quatorze apresentaram quadro clínico agressivo. Quatro casos foram a óbito pela doença e dois deles haviam sido submetidos a transplante de medula óssea e terapia. A perda deste gene não foi

observada apenas no caso de SMD relacionada à terapia. Estes achados sugerem que o gene *TP53* é um importante marcador nas SMD infantis primárias.

A análise para sequência do *ERBB2/HER-2* mostrou padrão normal em todos os casos, sugerindo que este gene não está envolvido nas SMD infantis analisadas.

A análise comparativa das alterações observadas para todas as seqüências avaliadas pela FISH demonstrou perda homozigota e heterozigota significativa para as sondas dos cromossomos 3 e 7 e do gene *TP53* em 13 casos. Alguns destes casos apresentaram quadro clínico agressivo e risco elevado de progressão da doença. Esses achados sugerem que estas alterações são importantes na progressão das SMD pediátricas.

Os cariótipos normais por bandamento GTG também foram achados freqüentes e foram identificados em cinco casos. Entretanto, estes casos apresentaram perdas homozigotas e/ou heterozigotas significativas das seqüências mapeadas em 3p25.1, 7q22.3 e 17p13.1 avaliadas pela FISH. A maioria dos casos em que foi detectada perda significativa para as seqüências avaliadas pela FISH, não foi detectada anormalidades citogenéticas por banda G envolvendo os respectivos cromossomos. Estes achados indicam a elevada sensibilidade da metodologia de hibridação *in situ* em detectar alterações cromossômicas que não podem ser identificadas pelas técnicas de bandamento. Isto reforça a importância do uso da citogenética molecular como adjuvante das metodologias convencionais, principalmente nos casos em que for detectado padrão cromossômico normal.

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIMOOLAM S, Ford JM. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*. 2003; 2(9):947-54.
- ALLAN JM, Travis LB. Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(12):943-55.
- ANDERSEN MK, Christiansen DH, Pedersen-Bjergaard J. Centromeric breakage and highly rearranged chromosome derivatives associated with mutations of TP53 are common in therapy-related MDS and AML after therapy with alkylating agents: an M-FISH study. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005; 42(4):358-71.
- ANTALIS TM, Reeder JA, Gotley DC, Byeon MK, Walsh MD, Henderson KW, Papas TS, Schweinfest CW. Down-regulation of the down-regulated in adenoma (DRA) gene correlates with colon tumor progression. *Clin Cancer Res*. 1998; 4(8):1857-63.
- 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. *Leuk Res*. 1996; 20(9):709-16.
- ATLAS OF GENETICS AND CYTOGENETICS IN ONCOLOGY AND HAEMATOLOGY (<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/>). Acessado em agosto de 2006.
- AUL C, Gattermann N, Germing U, Runde V, Heyll A, Schneider W. Risk assessment in primary myelodysplastic syndromes: validation of the Dusseldorf score. *Leukemia*. 1994; 8(11):1906-13.
- BABICKA L, Ransdorfova S, Brezinova J, Zemanova Z, Sindelarova L, Siskova M, Maaloufova J, Cermak J, Michalova K. Analysis of complex chromosomal rearrangements in adult patients with MDS and AML by multicolor FISH. *Leuk Res*. 2006; [Epub ahead of print]
- BABICZ M, Kowalczyk JR, Winnicka D, Gaworczyk A, Lejman M, Dmowski R, Kaczanowska K. The effectiveness of high-resolution-comparative genomic hybridization in detecting the most common chromosomal abnormalities in pediatric myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005; 158(1):49-54.
- BADER-MEUNIER B, Mielot F, Tchernia G, Buisine J, Delsol G, Duchayne E, Lemerle S, Leverger G, de Lumley L, Manel AM. Myelodysplastic syndromes in childhood: report of 49

- patients from a French multicentre study. French Society of Paediatric Haematology and Immunology. *Br J Haematol*. 1996; 92(2):344-50.
- BARNARD DR, Alonzo TA, Gerbing RB, Lange B, Woods WG. Comparison of childhood myelodysplastic syndrome, AML FAB M6 or M7, CCG 2891: Report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2006. [Epub ahead of print]
- BAROUK-SIMONET E, Soenen-Cornu V, Roumier C, Cosson A, Lai JL, Fenaux P, Preudhomme C. Role of multiplex FISH in identifying chromosome involvement in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias with complex karyotypes: a report on 28 cases. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005; 157(2):118-26.
- BASELGA J, Albanell J. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann Oncol*. 2001; 12 Suppl 1:S35-41.
- BEATTY B, Mai S, Squire J, FISH; practical approach , Oxford University Press, 2002, 255p.
- BENNETT JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982; 51(2):189-99.
- BENNETT JM, Kouides PA, Forman SJ. The myelodysplastic syndromes: morphology, risk assessment, and clinical management (2002). *Int J Hematol*. 2002; 76 Suppl 2:228-38.
- BENNETT JM. A comparative review of classification systems in myelodysplastic syndromes (MDS). *Semin Oncol*. 2005; (4 Suppl 5):S3-10.
- BEN-YEHUDA D, Krichevsky S, Caspi O, Rund D, Polliack A, Abeliovich D, Zelig O, Yahalom V, Paltiel O, Or R, Peretz T, Ben-Neriah S, Yehuda O, Rachmilewitz EA.. Microsatellite instability and p53 mutations in therapy-related leukemia suggest mutator phenotype. *Blood*. 1996; 88(11):4296-303.
- BERNASCONI P, Alessandrino EP, Boni M, Bonfichi M, Morra E, Lazzarino M, Campagnoli C, Astori C. Karyotype in myelodysplastic syndromes: relations to morphology, clinical evolution, and survival. *Am J Hematol*. 1994; 46(4):270-7.
- BERNASCONI P, Cavigliano PM, Boni M, Calatroni S, Klersy C, Giardini I, Rocca B, Crosetto N, Caresana M, Lazzarino M, Bernasconi C. Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study on 57 patients. *Leukemia*. 2003; 17(11):2107-12.

- BERNASCONI P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Calatroni S, Giardini I, Rocca B, Zappatore R, Caresana M, Quarna J, Lazzarino M, Bernasconi C. Incidence and prognostic significance of karyotype abnormalities in de novo primary myelodysplastic syndromes: a study on 331 patients from a single institution. *Leukemia*. 2005; 19(8):1424-31.
- BJORK J, Albin M, Mauritzson N, Stromberg U, Johansson B, Hagmar L. Smoking and myelodysplastic syndromes. *Epidemiology*. 2000; 11(3):285-91.
- BLANK J, Lange B. Preleukemia in children. *J Pediatr*. 1981; 98(4):565-8.
- BLOCK M, Jacobson LO, Bethard WF. Preleukemic acute human leukemia. *J Am Med Assoc*. 1953; 152(11):1018-28.
- BONOFIGLIO D, Aquila S, Catalano S, Gabriele S, Belmonte M, Middea E, Qi H, Morelli C, Gentile M, Maggiolini M, Ando S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) gamma activates p53 gene promoter binding to the NFkB sequence in human MCF7 breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2006. [Epub ahead of print]
- BRANDWEIN JM, Horsman DE, Eaves AC, Eaves CJ, Massing BG, Wadsworth LD, Rogers PC, Kalousek DK. Childhood myelodysplasia: suggested classification as myelodysplastic syndromes based on laboratory and clinical findings. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1990; 12(1):63-70.
- BRECCIA M, Mancini M, Nanni M, D'Elia GM, Carmosino I, Latagliata R, Sarlo C, Mandelli F, Alimena G. Clinical features of prognostic significance in myelodysplastic patients with normal karyotype at high risk of transformation. *Leuk Res*. 2005; 29(1):33-9.
- BREZINOVA J, Zemanova Z, Ransdorfova S, Sindelarova L, Siskova M, Neuwirtova R, Cermak J, Michalova K. Prognostic significance of del(20q) in patients with hematological malignancies. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005; 160(2):188-92.
- BUHRING HJ, Sures I, Jallal B, Weiss FU, Busch FW, Ludwig WD, Handgretinger R, Waller HD, Ullrich A. The receptor tyrosine kinase p185HER2 is expressed on a subset of B-lymphoid blasts from patients with acute lymphoblastic leukemia and chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1995; 86(5):1916-23.
- BUNWORASATE U, Arnouk H, Minderman H, O'Loughlin KL, Sait SN, Barcos M, Stewart CC, Baer MR. Erythropoietin-dependent transformation of myelodysplastic syndrome to acute monoblastic leukemia. *Blood*. 2001; 98(12):3492-4.
- BYEON MK, Westerman MA, Maroulakou IG, Henderson KW, Suster S, Zhang XK, Papas TS, Vesely J, Willingham MC, Green JE, Schweinfest CW. The down-regulated in adenoma

- (DRA) gene encodes an intestine-specific membrane glycoprotein. *Oncogene*. 1996; 12(2):387-96.
- CABELLO AI, Collado R, Ruiz MA, Martinez J, Navarro I, Ferrer R, Sosa AM, Carbonell F. A retrospective analysis of myelodysplastic syndromes with thrombocytosis: reclassification of the cases by WHO proposals. *Leuk Res*. 2005; 29(4):365-70.
- CAMPBELL LJ, Garson OM. The prognostic significance of deletion of the long arm of chromosome 20 in myeloid disorders. *Leukemia*. 1994; 8(1):67-71.
- CAMPLING BG, El-Deiry WS. Clinical implication of p53 mutation in lung cancer. *Mol Biotechnol*. 2003; 24(2):141-56.
- CATENACCI DVT, Schiller GJ. Myelodysplastic syndromes: A comprehensive review. *Blood Rev*. 2005; 19(6):301-19.
- CERMAK J, Belickova M, Krejcova H, Michalova K, Zilovcova S, Zemanova Z, Brezinova J, Sieglova Z. The presence of clonal cell subpopulations in peripheral blood and bone marrow of patients with refractory cytopenia with multilineage dysplasia but not in patients with refractory anemia may reflect a multistep pathogenesis of myelodysplasia. *Leuk Res*. 2005; 29(4):371-9.
- CHANG TH, Szabo E. Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2000; 60(4):1129-38.
- CHAPMAN JM, Knoepp SM, Byeon MK, Henderson KW, Schweinfest CW. The colon anion transporter, down-regulated in adenoma, induces growth suppression that is abrogated by E1A. *Cancer Res*. 2002; 62(17):5083-8.
- CHEN G, Zeng W, Miyazato A, Billings E, Maciejewski JP, Kajigaya S, Sloand EM, Young NS. Distinctive gene expression profiles of CD34 cells from patients with myelodysplastic syndrome characterized by specific chromosomal abnormalities. *Blood*. 2004; 104(13):4210-8.
- CHERRY AM, Brockman SR, Paternoster SF, Hicks GA, Neuberg D, Higgins RR, Bennett JM, Greenberg PL, Miller K, Tallman MS, Rowe J, Dewald GW. Comparison of interphase FISH and metaphase cytogenetics to study myelodysplastic syndrome: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study. *Leuk Res*. 2003; 27(12):1085-90.
- CHEVALLIER P, Robillard N, Wuilleme-Toumi S, Mechinaud F, Harousseau JL, Avet-Loiseau H. Overexpression of Her2/neu is observed in one third of adult acute lymphoblastic

- leukemia patients and is associated with chemoresistance in these patients. *Haematologica*. 2004; 89(11):1399-401.
- CHRISTIANSEN DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol*. 2001; 19(5):1405-13.
- CILLONI D, Messa F, Carturan S, Arruga F, Defilippi I, Messa E, Gottardi E, Saglio G. Myelodysplastic syndromes. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1028:400-8.
- CREMER T, Landegent J, Bruckner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devilee P, Pearson P, van der Ploeg M. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet*. 1986; 74(4):346-52.
- CUNEO A, Tomasi P, Ferrari L, Balboni M, Piva N, Fagioli F, Castoldi G. Cytogenetic analysis of different cellular populations in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1989; 37(1):29-37.
- DATTA R, Sherman ML, Kufe DW. Regulation of proto-oncogene and tumor necrosis factor gene expression by ethanol in HL-60 myeloid leukemia cells. *Blood*. 1990; 76(2):298-301.
- DE SOUZA FERNANDEZ T, Ornellas MH, Otero de Carvalho L, Tabak D, Abdelhay E. Chromosomal alterations associated with evolution from myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2000; 24(10):839-48.
- DEEG HJ. What is in a name? Refined diagnostic criteria for prognostic assessment in myelodysplastic syndrome (MDS). *Leuk Res*. 2004; 28(6):543-4.
- DEVILEE P, Thierry RF, Kievits T, Kolluri R, Hopman AH, Willard HF, Pearson PL, Cornelisse CJ. Detection of chromosome aneuploidy in interphase nuclei from human primary breast tumors using chromosome-specific repetitive DNA probes. *Cancer Res*. 1988; 48(20):5825-30.
- DEWALD GW, Stallard R, Bader PI, Chen K, Zenger-Hain J, Harris CJ, Higgins R, Hirsch B, Hsu WT, Johnson E, Kubic V, Kurczynski TW, Malone JM, McCorquodale DJ, Meilinger K, Meisner LF, Moore JW, Schwartz S, Siembieda S, Storto PD, Vance G, Van Tuinen P, Wiktor A, Yung JF. Toward quality assurance for metaphase FISH: a multicenter experience. *Am J Med Genet*. 1996; 65(3):190-6.

- DUNKLEY SM, Manoharan A, Kwan YL. Myelodysplastic syndromes: prognostic significance of multilineage dysplasia in patients with refractory anemia or refractory anemia with ringed sideroblasts. *Blood*. 2002; 99(10):3870-1.
- ENSEMBL - The Wellcome Trust Sanger Institute – (<http://www.ensembl.org>). Acessado em agosto de 2006.
- ESTEY EH, Pierce S, Keating MJ. Identification of a group of AML/MDS patients with a relatively favorable prognosis who have chromosome 5 and/or 7 abnormalities. *Haematologica*. 2000; 85(3):246-9.
- EVERETT LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, Adawi F, Hazani E, Nassir E, Baxevanis AD, Sheffield VC, Green ED. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet*. 1997; 17(4):411-22.
- FAIOLA B, Fuller ES, Wong VA, Pluta L, Abernethy DJ, Rose J, Recio L. Exposure of hematopoietic stem cells to benzene or 1,4-benzoquinone induces gender-specific gene expression. *Stem Cells*. 2004; 22(5):750-8.
- FAJAS L, Egler V, Reiter R, Miard S, Lefebvre AM, Auwerx J. PPARgamma controls cell proliferation and apoptosis in an RB-dependent manner. *Oncogene*. 2003; 22(27):4186-93.
- FENAUX P, Morel P, Lai JL. Cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol*. 1996; 33(2):127-38.
- FENAUX P. Myelodysplastic syndromes: From pathogenesis and prognosis to treatment. *Semin Hematol*. 2004; 41:6-12.
- FRANCIS GA, Annicotte JS, Auwerx J. PPAR-alpha effects on the heart and other vascular tissues. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285(1):H1-9.
- FUJITA M, Khazenzon NM, Bose S, Sekiguchi K, Sasaki T, Carter WG, Ljubimov AV, Black KL, Ljubimova JY. Overexpression of beta1-chain-containing laminins in capillary basement membranes of human breast cancer and its metastases. *Breast Cancer Res*. 2005; 7(4):R411-21.
- FUJIWARA H, Gu J, Sekiguchi K. Rac regulates integrin-mediated endothelial cell adhesion and migration on laminin-8. *Exp Cell Res*. 2004; 292(1):67-77.
- FUKUSHIGE S, Matsubara K, Yoshida M, Sasaki M, Suzuki T, Semba K, Toyoshima K, Yamamoto T. Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Mol Cell Biol*. 1986; 6(3):955-8.

- GERMING U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M, Aul C. Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk Res.* 2000; 24(12):983-92.
- GIAGOUNIDIS AA, Germing U, Haase S, Hildebrandt B, Schlegelberger B, Schoch C, Wilkens L, Heinsch M, Willems H, Aivado M, Aul C. Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia.* 2004; 18(1):113-9.
- GONZALES M, Weksler B, Tsuruta D, Goldman RD, Yoon KJ, Hopkinson SB, Flitney FW, Jones JC. Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Mol Biol Cell.* 2001; 12(1):85-100.
- GRAY PC, Bilezikjian LM, Vale W. Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan-glycan. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 180(1-2):47-53.
- GREENBERG P, Anderson J, de Witte T, Estey E, Fenaux P, Gupta P, Hamblin T, Hellstrom-Lindberg E, List A, Mufti G, WHO reclassification of myelodysplastic syndromes. Members of the International MDS Study Group. *J Clin Oncol.* 2000; 18(19):3447-52.
- GREENBERG P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997 Mar 15;89(6):2079-88. Erratum in: *Blood* 1998; 91(3):1100.
- GREENBERG PL. Risk factors and their relationship to prognosis in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 1998; 22 Suppl 1:S3-6.
- GROMMES C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol.* 2004; 5(7):419-29.
- GUAN YF, Zhang YH, Breyer RM, Davis L, Breyer MD. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGgamma) in human transitional bladder cancer and its role in inducing cell death. *Neoplasia.* 1999; 1(4):330-9.
- HAILA S, Saarialho-Kere U, Karjalainen-Lindsberg ML, Lohi H, Airola K, Holmberg C, Hastbacka J, Kere J, Hoglund P. The congenital chloride diarrhea gene is expressed in seminal vesicle, sweat gland, inflammatory colon epithelium, and in some dysplastic colon cells. *Histochem Cell Biol.* 2000; 113(4):279-86.

- HARBOTT J, Mancini M, Verellen-Dumoulin C, Moorman AV, Secker-Walker LM. Hematological malignancies with a deletion of 11q23: cytogenetic and clinical aspects. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia*. 1998; 12(5):823-7.
- HASLE H, Arico M, Basso G, Biondi A, Cantu Rajnoldi A, Creutzig U, Fenu S, Fonatsch C, Haas OA, Harbott J, Kardos G, Kerndrup G, Mann G, Niemeyer CM, Ptoszkova H, Ritter J, Slater R, Stary J, Stollmann-Gibbels B, Testi AM, van Wering ER, Zimmermann M. Myelodysplastic syndrome, juvenile myelomonocytic leukemia, and acute myeloid leukemia associated with complete or partial monosomy 7. European Working Group on MDS in Childhood (EWOG-MDS). *Leukemia*. 1999; 13(3):376-85.
- HASLE H, Baumann I, Bergstrasser E, Fenu S, Fischer A, Kardos G, Kerndrup G, Locatelli F, Rogge T, Schultz KR, Stary J, Trebo M, van den Heuvel-Eibrink MM, Harbott J, Nollke P, Niemeyer CM; European Working Group on childhood MDS. The International Prognostic Scoring System (IPSS) for childhood myelodysplastic syndrome (MDS) and juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia*. 2004; 18(12):2008-14.
- HASLE H, Clausen N, Pedersen B, Bendix-Hansen K. Myelodysplastic syndrome in a child with constitutional trisomy 8 mosaicism and normal phenotype. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995; 79(1):79-81.
- HASLE H, Niemeyer CM, Chessells JM, Baumann I, Bennett JM, Kerndrup G, Head DR. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia*. 2003; 17(2):277-82.
- HASTBACKA J, de la Chapelle A, Mahtani MM, Clines G, Reeve-Daly MP, Daly M, Hamilton BA, Kusumi K, Trivedi B, Weaver A, et al. The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. *Cell*. 1994; 78(6):1073-87.
- HAYASHI S, Miهارu N, Okamoto E, Samura O, Hara T, Ohama K. Detection of chromosomal abnormalities of chromosome 12 in uterine leiomyoma using fluorescence in situ hybridization. *Jpn J Hum Genet*. 1996; 41(1):193-202.
- HIDDEMANN W, Jahns-Streubel G, Verbeek W, Wormann B, Haase D, Schoch C. Intensive therapy for high-risk myelodysplastic syndromes and the biological significance of karyotype abnormalities. *Leuk Res*. 1998; 22 Suppl 1:S23-6.
- HILLIER LW, Fulton RS, Fulton LA, Graves TA, Pepin KH, Wagner-McPherson C, Layman D, Maas J, Jaeger S, Walker R, Wylie K, Sekhon M, Becker MC, O'Laughlin MD, Schaller ME, Fewell GA, Delehaunty KD, Miner TL, Nash WE, Cordes M, Du H, Sun H, Edwards J, Bradshaw-Cordum H, Ali J, Andrews S, Isak A, Vanbrunt A, Nguyen C, Du F, Lamar B,

- Courtney L, Kalicki J, Ozersky P, Bielicki L, Scott K, Holmes A, Harkins R, Harris A, Strong CM, Hou S, Tomlinson C, Dauphin-Kohlberg S, Kozlowicz-Reilly A, Leonard S, Rohlfing T, Rock SM, Tin-Wollam AM, Abbott A, Minx P, Maupin R, Strowmatt C, Latreille P, Miller N, Johnson D, Murray J, Woessner JP, Wendl MC, Yang SP, Schultz BR, Wallis JW, Spieth J, Bieri TA, Nelson JO, Berkowicz N, Wohldmann PE, Cook LL, Hickenbotham MT, Eldred J, Williams D, Bedell JA, Mardis ER, Clifton SW, Chisoe SL, Marra MA, Raymond C, Haugen E, Gillett W, Zhou Y, James R, Phelps K, Iadanoto S, Bubbs K, Simms E, Levy R, Clendenning J, Kaul R, Kent WJ, Furey TS, Baertsch RA, Brent MR, Keibler E, Flicek P, Bork P, Suyama M, Bailey JA, Portnoy ME, Torrents D, Chinwalla AT, Gish WR, Eddy SR, McPherson JD, Olson MV, Eichler EE, Green ED, Waterston RH, Wilson RK. The DNA sequence of human chromosome 7. *Nature*. 2003; 424(6945):157-64.
- HIRAI H. Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome. *Jpn J Clin Oncol*. 2003; 33(4):153-60.
- HOEFSLOOT LH, van Amelsvoort MP, Broeders LC, van der Plas DC, van Lom K, Hoogerbrugge H, Touw IP, Lowenberg B. Erythropoietin-induced activation of STAT5 is impaired in the myelodysplastic syndrome. *Blood*. 1997; 89(5):1690-700.
- HOFMANN WK, de Vos S, Komor M, Hoelzer D, Wachsman W, Koeffler HP. Characterization of gene expression of CD34+ cells from normal and myelodysplastic bone marrow. *Blood*. 2002; 100(10):3553-60.
- HOFMANN WK, Lubbert M, Hoelzer D, Phillip Koeffler H. Myelodysplastic syndromes. *Hematol J*. 2004; 5(1):1-8.
- HOGLUND M, Johansson B, Pedersen-Bjergaard J, Marynen P, Mitelman F. Molecular characterization of 12p abnormalities in hematologic malignancies: deletion of KIP1, rearrangement of TEL, and amplification of CCND2. *Blood*. 1996; 87(1):324-30.
- HOLLANDER MC, Philburn RT, Patterson AD, Velasco-Miguel S, Friedberg EC, Linnoila RI, Fornace AJ Jr. Deletion of XPC leads to lung tumors in mice and is associated with early events in human lung carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(37):13200-5.
- HOPMAN AH, Ramaekers FC, Raap AK, Beck JL, Devilee P, van der Ploeg M, Vooijs GP. In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochemistry*. 1988; 89(4):307-16.
- HORIBE K, Matsushita T, Numata S, Miyajima Y, Katayama I, Kitabayashi T, Yanai M, Sekiguchi N, Egi S. Acute promyelocytic leukemia with t(15;17) abnormality after chemotherapy containing etoposide for Langerhans cell histiocytosis. *Cancer*. 1993; 72(12):3723-6.

- HORIIE S, Misawa S, Kaneko H, Sasai Y, Kobayashi M, Fujii H, Tanaka S, Yagita M, Abe T, Kashima K, Taniwaki M. Distinct genetic involvement of the TP53 gene in therapy-related leukemia and myelodysplasia with chromosomal losses of Nos 5 and/or 7 and its possible relationship to replication error phenotype. *Leukemia*. 1999; 13(8):1235-42.
- HOU L, Liu T. Relationship of mitochondrial DNA mutation with myelodysplastic syndromes - review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2005; 13(4):709-12.
- HOWE RB, Porwit-MacDonald A, Wanat R, Tehranchi R, Hellstrom-Lindberg E. The WHO classification of MDS does make a difference. *Blood*. 2004; 103(9):3265-70.
- HUMPHREY GM, Squire R, Lansdown M, Markham A, MacLennan K. Cytogenetics and the surgeon: an invaluable tool in diagnosis, prognosis and counselling of patients with solid tumours. *Br J Surg*. 1998; 85(6):725-34.
- HURET JL, Dessen P, Le Minor S, Bernheim A. The "Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology" on the internet and a review on infant leukemias. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000; 120(2):155-9.
- HYDER DM, Bottomley SS, Bottomley RH. A new chromosome abnormality in idiopathic sideroblastic anemia: 46,XY,del11q23. *Am J Hematol*. 1978; 5(3):239-5.
- IDO M, Nagata C, Kawakami N, Shimizu H, Yoshida Y, Nomura T, Mizoguchi H. A case-control study of myelodysplastic syndromes among Japanese men and women. *Leuk Res*. 1996; 20(9):727-31.
- ISCN (2005). An Internacional System for Human Cytogenetic Nomenclature (Mitelman, F., ed.). S. Karger, Basel, Switzerland.
- JACOB P, Rossmann H, Lamprecht G, Kretz A, Neff C, Lin-Wu E, Gregor M, Groneberg DA, Kere J, Seidler U. Down-regulated in adenoma mediates apical Cl-/HCO3- exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology*. 2002; 122(3):709-24.
- JEKIC B, Novakovic I, Lukovic L, Kuzmanovic M, Popovic B, Milasin J, Bunjevacki G, Damjanovic T, Cvjeticanin S, Bunjevacki V. Lack of TP53 and FMS gene mutations in children with myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006; 166(2):163-5.
- JOHANSSON B, Billstrom R, Kristoffersson U, Akerman M, Garwicz S, Ahlgren T, Malm C, Mitelman F. Deletion of chromosome arm 3p in hematologic malignancies. *Leukemia*. 1997; 11(8):1207-13.

- JOHANSSON B, Mertens F, Heim S, Kristoffersson U, Mitelman F. Cytogenetics of secondary myelodysplasia (sMDS) and acute nonlymphocytic leukemia (sANLL). *Eur J Haematol*. 1991; 47(1):17-27.
- JOHNSON E, Cotter FE. Monosomy 7 and 7q--associated with myeloid malignancy. *Blood Rev*. 1997; 11(1):46-55.
- JOHNSON EJ, Scherer SW, Osborne L, Tsui LC, Oscier D, Mould S, Cotter FE. Molecular definition of a narrow interval at 7q22.1 associated with myelodysplasia. *Blood*. 1996; 87(9):3579-86.
- JUNG TI, Baek WK, Suh SI, Jang BC, Song DK, Bae JH, Kwon KY, Bae JH, Cha SD, Bae I, Cho CH. Down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2005; 97(2):365-73.
- KAHYO T, Nishida T, Yasuda H. Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell*. 2001; 8(3):713-8.
- KANEKO Y, Homma C, Maseki N, Sakurai M, Toyoshima K, Yamamoto T. Human c-erbB-2 remains on chromosome 17 in band q21 in the 15;17 translocation associated with acute promyelocytic leukemia. *Jpn J Cancer Res*. 1987; 78(1):16-9.
- KARGER S, Berger K, Eszlinger M, Tannapfel A, Dralle H, Paschke R, Fuhrer D. Evaluation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in benign and malignant thyroid pathologies. *Thyroid*. 2005; 15(9):997-1003.
- KEARNEY L, Horsley SW. Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma*. 2005; 114(4):286-94.
- KEARNS WG, Sutton JF, Maciejewski JP, Young NS, Liu JM. Genomic instability in bone marrow failure syndromes. *Am J Hematol*. 2004; 76(3):220-4.
- KETTERLING RP, Wyatt WA, VanWier SA, Law M, Hodnefield JM, Hanson CA, Dewald GW. Primary myelodysplastic syndrome with normal cytogenetics: utility of 'FISH panel testing' and M-FISH. *Leuk Res*. 2002; 26(3):235-40.
- KIRSCH DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol*. 1998; 16(9):3158-68.
- KNAUF F, Yang CL, Thomson RB, Mentone SA, Giebisch G, Aronson PS. Identification of a chloride-formate exchanger expressed on the brush border membrane of renal proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(16):9425-30.

- KNIPP S, Hildebrandt B, Richter J, Haas R, Germing U, Gattermann N. Secondary myelodysplastic syndromes following treatment with azathioprine are associated with aberrations of chromosome 7. *Haematologica*. 2005; 90(5):691-3.
- KO SB, Luo X, Hager H, Rojek A, Choi JY, Licht C, Suzuki M, Muallem S, Nielsen S, Ishibashi K. AE4 is a DIDS-sensitive Cl(-)/HCO(-)(3) exchanger in the basolateral membrane of the renal CCD and the SMG duct. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 283(4):C1206-18.
- KODERA Y, Takeyama K, Murayama A, Suzawa M, Masuhiro Y, Kato S. Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J Biol Chem*. 2000; 275(43):33201-4.
- KOMROKJI RS, Bennett JM. The clinical implications of the World Health Organization's classification of myelodysplastic syndromes. *Curr Hematol Rep*. 2005; 4(3):175-81.
- KORSHUNOV A, Sycheva R, Gorelyshev S, Golanov A. Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in nonbrainstem glioblastomas of childhood. *Mod Pathol*. 2005; 18(9):1258-63.
- KRATZ CP, Emerling BM, Bonifas J, Wang W, Green ED, Beau MM, Shannon KM. Genomic structure of the PIK3CG gene on chromosome band 7q22 and evaluation as a candidate myeloid tumor suppressor. *Blood*. 2002; 99(1):372-4.
- KURAMOTO K, Ban S, Oda K, Tanaka H, Kimura A, Suzuki G. Chromosomal instability and radiosensitivity in myelodysplastic syndrome cells. *Leukemia*. 2002; 16(11):2253-8.
- KURIBAYASHI K, Matsunaga T, Sakai T, Wada Y, Tateno K, Murase K, Fujimi A, Takimoto R, Terui T, Kato J, Sasaki A, Satoh M, Niitsu Y. A patient with TP53 germline mutation developed Bowen's disease and myelodysplastic syndrome with myelofibrosis after chemotherapy against ovarian cancer. *Intern Med*. 2005; 44(5):490-5.
- LAHORTIGA I, Vazquez I, Agirre X, Larrayoz MJ, Vizmanos JL, Gozzetti A, Calasanz MJ, Odero MD. Molecular heterogeneity in AML/MDS patients with 3q21q26 rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004; 40(3):179-89.
- LE BEAU MM, Espinosa R 3rd, Davis EM, Eisenbart JD, Larson RA, Green ED. Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 7 commonly deleted in malignant myeloid diseases. *Blood*. 1996; 88(6):1930-5.
- LEE JH, Lee JH, Shin YR, Lee JS, Kim WK, Chi HS, Park CJ, Seo EJ, Lee KH. Application of different prognostic scoring systems and comparison of the FAB and WHO classifications in Korean patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2003; 17(2):305-13.

- LEE JW, Soung YH, Kim SY, Nam SW, Park WS, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Kinase domain mutation of ERBB family genes is uncommon in acute leukemias. *Leuk Res.* 2006; 30(2):241-2.
- LEE MY, Kong HJ, Cheong J. Regulation of activating transcription factor-2 in early stage of the adipocyte differentiation program. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 281(5):1241-7.
- LEHRKE M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. *Cell.* 2005; 123(6):993-9.
- LESSARD M, Herry A, Berthou C, Leglise MC, Abgrall JF, Morice P, Flandrin G. FISH investigation of 5q and 7q deletions in MDS/AML reveals hidden translocations, insertions and fragmentations of the same chromosomes. *Leuk Res.* 1998; 22(4):303-12.
- LEVINE EG, Bloomfield CD. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. *Semin Oncol.* 1992; 19(1):47-84.
- LI J, Rao H, Burkin D, Kaufman SJ, Wu C. The muscle integrin binding protein (MIBP) interacts with alpha7beta1 integrin and regulates cell adhesion and laminin matrix deposition. *Dev Biol.* 2003; 261(1):209-19.
- LIANG H, Castro PD, Ma J, Nagarajan L. Finer delineation and transcript map of the 7q31 locus deleted in myeloid neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005; 162(2):151-9.
- LIANG H, Fairman J, Claxton DF, Nowell PC, Green ED, Nagarajan L. Molecular anatomy of chromosome 7q deletions in myeloid neoplasms: evidence for multiple critical loci. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(7):3781-5.
- LIESVELD JL, Jordan CT, Phillips GL 2nd. The hematopoietic stem cell in myelodysplasia. *Stem Cells.* 2004; 22(4):590-9.
- LINMAN JW. Myelomonocytic leukemia and its preleukemic phase. *J Chronic Dis.* 1970; 22(11):713-6.
- LIST AF. Emerging data on IMiDs in the treatment of myelodysplastic syndromes (MDS). *Semin Oncol.* 2005; 32(4 Suppl 5):S31-5.
- LIU S, Qin S, Wang J. Clinical and cytogenetic analysis of patients with lymphoid malignancies carrying 14q32 abnormality. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2001; 22(11):569-72.
- LJUBIMOVA JY, Fujita M, Khazenzon NM, Ljubimov AV, Black KL. Changes in laminin isoforms associated with brain tumor invasion and angiogenesis. *Front Biosci.* 2006; 11:81-8.

- LORAND-METZE I, Pinheiro MP, Ribeiro E, de Paula EV, Metze K. Factors influencing survival in myelodysplastic syndromes in a Brazilian population: comparison of FAB and WHO classifications. *Leuk Res.* 2004; 28(6):587-94.
- MALCOVATI L, Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglini E, Passamonti F, Arcaini L, Maffioli M, Bernasconi P, Lazzarino M, Cazzola M. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol.* 2005; 23(30):7594-603.
- MANDEL K, Dror Y, Poon A, Freedman MH. A practical, comprehensive classification for pediatric myelodysplastic syndromes: the CCC system. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2002; 24(7):596-605.
- MARTINEZ-RAMIREZ A, Urioste M, Melchor L, Blesa D, Valle L, de Andres SA, Kok K, Calasanz MJ, Cigudosa JC, Benitez J. Analysis of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes by high-resolution comparative genomic hybridization and subtelomeric CGH array. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005; 42(3):287-98.
- MARTIN-SUBERO JI, Harder L, Gesk S, Schoch R, Novo FJ, Grote W, Calasanz MJ, Schlegelberger B, Siebert R. Amplification of ERBB2, RARA, and TOP2A genes in a myelodysplastic syndrome transforming to acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001; 127(2):174-6.
- MASERATI E, Minelli A, Menna G, Cecchini MP, Bernardo ME, Rossi G, De Filippi P, Lo Curto F, Danesino C, Locatelli F, Pasquali F. Familial myelodysplastic syndromes, monosomy 7/trisomy 8, and mutator effects. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004; 148(2):155-8.
- MECUCCI C. Molecular features of primary MDS with cytogenetic changes. *Leuk Res.* 1998; 22(4):293-302.
- MHAWECH P, Saleem A. Myelodysplastic syndrome: review of the cytogenetic and molecular data. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2001; 40(3):229-38.
- MINELLI A, Maserati E, Giudici G, Tosi S, Olivieri C, Bonvini L, De Filippi P, Biondi A, Lo Curto F, Pasquali F, Danesino C. Familial partial monosomy 7 and myelodysplasia: different parental origin of the monosomy 7 suggests action of a mutator gene. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001; 124(2):147-51.
- MITELMAN DATABASE OF CHROMOSOME ABERRATIONS IN CANCER (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/CytList>). Acessado em agosto de 2006.

- MITELMAN F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet.* 1997; 15 Spec No:417-74.
- MITELMAN F, Mertens F, Johansson B. Prevalence estimates of recurrent balanced cytogenetic aberrations and gene fusions in unselected patients with neoplastic disorders. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005; 43(4):350-66.
- MOORHEAD PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 1960; 20:613-6.
- MOREL P, Hebbar M, Lai JL, Duhamel A, Preudhomme C, Wattel E, Bauters F, Fenaux 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.* 1993; 7(9):1315-23.
- MORERIO C, Russo I, Rosanda C, Rapella A, Leszl A, Basso G, Maserati E, Pasquali F, Panarello C. 17q21-qter trisomy is an indicator of poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001; 124(1):12-5.
- MOUNT DB, Romero MF. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch.* 2004; 447(5):710-21.
- MUFTI GJ. Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2004; 17(4):543-57.
- MULLER MR, Grunebach F, Kayser K, Vogel W, Nencioni A, Brugger W, Kanz L, Brossart P. Expression of her-2/neu on acute lymphoblastic leukemias: implications for the development of immunotherapeutic approaches. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(9):3448-53.
- MULLER-BERNDORFF H, Haas PS, Kunzmann R, Schulte-Monting J, Lubbert M. Comparison of five prognostic scoring systems, the French-American-British (FAB) and World Health Organization (WHO) classifications in patients with myelodysplastic syndromes: results of a single-center analysis. *Ann Hematol.* 2006; 85(8):502-13.
- MUSOLINO A, Bozzetti C, Bonomini S, Sammarelli G, Pezzuolo D, Bonati A, Ardizzoni A. Lung cancer in patients with chronic lymphocytic leukemia: does the HER-2 oncogene play a role? *Lung Cancer.* 2005; 50(3):419-20.
- NAIR R, Athale UA, Iyer RS, Nair CN, Pai SK, Kurkure PA, Kadam PR, Advani SH. Childhood myelodysplastic syndromes: clinical features, cytogenetics and prognosis. *Indian J Pediatr.* 1992; 59(4):443-8.

- NAKAMURA H, Inokuchi K, Yamaguchi H, Dan K. Abnormalities of p51, p53, FLT3 and N-ras genes and their prognostic value in relapsed acute myeloid leukemia. *J Nippon Med Sch.* 2004; 71(4):270-8.
- NAKANO Y, Kiyoi H, Miyawaki S, Asou N, Ohno R, Saito H, Naoe T. Molecular evolution of acute myeloid leukaemia in relapse: unstable N-ras and FLT3 genes compared with p53 gene. *Br J Haematol.* 1999; 104(4):659-64.
- NAVARRO I, Ruiz MA, Cabello A, Collado R, Ferrer R, Hueso J, Martinez J, Miguel A, Orero MT, Perez P, Nolasco A, Carbonell F. Classification and scoring systems in myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 311 patients. *Leuk Res.* 2006; 30(8):971-7.
- NCBI - National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/OMIN>. Acessado em agosto de 2006.
- NEUMAN WL, Rubin CM, Rios RB, Larson RA, Le Beau MM, Rowley JD, Vardiman JW, Schwartz JL, Farber RA. Chromosomal loss and deletion are the most common mechanisms for loss of heterozygosity from chromosomes 5 and 7 in malignant myeloid disorders. *Blood.* 1992; 79(6):1501-10.
- NOSSLINGER T, Reisner R, Koller E, Gruner H, Tuchler H, Nowotny H, Pittermann E, Pfeilstocker M. Myelodysplastic syndromes, from French-American-British to World Health Organization: comparison of classifications on 431 unselected patients from a single institution. *Blood.* 2001; 98(10):2935-41.
- NOWELL PC, Rowley JD, Knudson AG Jr. Cancer genetics, cytogenetics--defining the enemy within. *Nat Med.* 1998; 4(10):1107-11.
- OCCHIPINTI E, Correa H, Yu L, Craver R. Comparison of two new classifications for pediatric myelodysplastic and myeloproliferative disorders. *Pediatr Blood Cancer.* 2005; 44(3):240-4.
- OHYASHIKI K, Iwabuchi A, Sasao I, Ohyashiki JH, Ito H, Toyama K. Clinical and cytogenetic significance of myelodysplastic syndromes with disease evolution. *Cancer Genet Cytogenet.* 1993; 67(1):71-8.
- PANANI AD, Roussos C. Cytogenetic aspects of adult primary myelodysplastic syndromes: clinical implications. *Cancer Lett.* 2006; 235(2):177-90.
- PANIZO C, Patino A, Lecumberri R, Calasanz MJ, Odero MD, Bendandi M, Rocha E. Secondary myelodysplastic syndrome after treatment for promyelocytic leukemia: clinical and genetic features of two cases. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003; 143(2):178-81.

- PAPENHAUSEN PR, Griffin S, Tepperberg J. Oncogene amplification in transforming myelodysplasia. *Exp Mol Pathol*. 2005; 79(2):168-75.
- PASSMORE SJ, Hann IM, Stiller CA, Ramani P, Swansbury GJ, Gibbons B, Reeves BR, Chessells JM. Pediatric myelodysplasia: a study of 68 children and a new prognostic scoring system. *Blood*. 1995; 85(7):1742-50.
- PATEL L, Pass I, Coxon P, Downes CP, Smith SA, Macphee CH. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr Biol*. 2001; 11(10):764-8.
- PAUSHKIN SV, Patel M, Furia BS, Peltz SW, Trotta CR. Identification of a human endonuclease complex reveals a link between tRNA splicing and pre-mRNA 3' end formation. *Cell*. 2004; 117(3):311-21.
- PEDERSEN B, Kerndrup G. Another case of myelodysplastic syndrome with a chromosome mode in the tetraploid range. *Cancer Genet Cytogenet*. 1986; 23(2):175-8.
- PEDERSEN B, Koch J, Bendix Hansen K, Hindkjaer J, Lindbjerg Andersen C. The monosomy 7 clone in interphase and metaphase cell population: a combined chromosome and primed in situ labeling study. *Acta Haematol*. 1997; 97(4):216-21.
- PEDERSEN-BJERGAARD J, Daugaard G, Hansen SW, Philip P, Larsen SO, Rorth M. Increased risk of myelodysplasia and leukaemia after etoposide, cisplatin, and bleomycin for germ-cell tumours. *Lancet*. 1991; 338(8763):359-63.
- PEDERSEN-BJERGAARD J, Philip P, Mortensen BT, Ersboll J, Jensen G, Panduro J, Thomsen M. Acute nonlymphocytic leukemia, preleukemia, and acute myeloproliferative syndrome secondary to treatment of other malignant diseases. Clinical and cytogenetic characteristics and results of in vitro culture of bone marrow and HLA typing. *Blood*. 1981; 57(4):712-23.
- PEKMEZOVIC T, Suvajdzic Vukovic N, Kistic D, Grgurevic A, Bogdanovic A, Gotic M, Bakrac M, Brkic N. A case-control study of myelodysplastic syndromes in Belgrade (Serbia Montenegro). *Ann Hematol*. 2006; 85(8):514-9.
- PELLAGATTI A, Fidler C, Wainscoat JS, Boultonwood J. Gene expression profiling in the myelodysplastic syndromes. *Hematology*. 2005; 10(4):281-7.
- PETERS J, Loud J, Dimond E, Jenkins J. Cancer genetics fundamentals. *Cancer Nursing* 2001; 24(6):446-61;quiz 462.

- PINKEL D, Gray JW, Trask B, van den Engh G, Fuscoe J, van Dekken H. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986; 51 Pt 1:151-7.
- PINTO GR, Overall DJ, Moraes LS, Van Den Berg AV, Lemos JAR, Smith MAC, Burbano RR. Cytogenetic characteristics of patients with signs and symptoms of myelodysplastic syndromes in the State of Pará, Brazil. Genet Mol Res. 2005; 4(1):18-30.
- PISANI FD, Rainaldi A. Management of high-risk myelodysplastic syndromes. Crit Rev Oncol Hematol. 2001; 40(3):215-28.
- POLYCHRONOPOULOU S, Panagiotou JP, Kossiva L, Mavrou A, Anagnostou D, Haidas S. Clinical and morphological features of paediatric myelodysplastic syndromes: a review of 34 cases. Acta Paediatr. 2004; 93(8):1015-23.
- POTTI A, Ganti AK, Koch M, Mehdi SA, Levitt R. Identification of HER-2/neu overexpression and the clinical course of lung carcinoma in non-smokers with chronic lymphocytic leukemia. Lung Cancer. 2001; 34(2):227-32.
- POTTI A, Malik AA, Ganti AK, Koch M, Leitch J. Immunoglobulin and T-cell receptor gene-gene rearrangement in pleural cavity-based T-cell rich B-cell lymphoma in an immunocompetent patient. Leuk Lymphoma. 2002; 43(1):195-8.
- PUPA SM, Tagliabue E, Menard S, Anichini A. HER-2: a biomarker at the crossroads of breast cancer immunotherapy and molecular medicine. J Cell Physiol. 2005; 205(1):10-8.
- RASKIND WH, Tirumali N, Jacobson R, Singer J, Fialkow PJ. Evidence for a multistep pathogenesis of a myelodysplastic syndrome. Blood. 1984; 63(6):1318-23.
- RAZA A, Gezer S, Mundle S, Gao XZ, Alvi S, Borok R, Rifkin S, Iftikhar A, Shetty V, Parcharidou A, et al. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. Blood. 1995; 86(1):268-76.
- REARDON W, OMahoney CF, Trembath R, Jan H, Phelps PD. Enlarged vestibular aqueduct: a radiological marker of pendred syndrome, and mutation of the PDS gene. QJM. 2000; 93(2):99-104.
- RIBEIRO E, Lima CS, Metze K, Souza CA, Lorand-Metze I. Changes in hemopoietic precursors after treatment of low-risk myelodysplasia with amifostine. In Vivo. 2003; 17(2):181-4.

- RICHARD S, Croisille L, Yvart J, Casadeval N, Eschwege P, Aghakhani N, David P, Gaudric A, Scigalla P, Hermine O. Paradoxical secondary polycythemia in von Hippel-Lindau patients treated with anti-vascular endothelial growth factor receptor therapy. *Blood*. 2002; 99(10):3851-3.
- RICHARDSON C, Jasin M. Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 2000; 20(23):9068-75.
- RICOTE M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998; 391(6662):79-82.
- RIGOLIN GM, Bigoni R, Milani R, Cavazzini F, Roberti MG, Bardi A, Agostini P, Della Porta M, Tieghi A, Piva N, Cuneo A, Castoldi G. Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia*. 2001; 15(12):1841-7.
- ROMEO M, Chauffaille Mde L, Silva MR, Bahia DM, Kerbaudy J. Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodysplastic syndrome patients. *Leuk Res*. 2002; 26(11):993-6.
- ROSS JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. HER-2/neu testing in breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 2003; 120 Suppl:S53-71.
- ROWLEY JD, Golomb HM, Vardiman JW. Nonrandom chromosome abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia in patients treated for Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 1977; 50:759 -70.
- ROWLEY JD, Golomb HM, Vardiman JW. Nonrandom chromosome abnormalities in acute leukemia and dysmyelopoietic syndromes in patients with previously treated malignant disease. *Blood*. 1981; 58:759 -67.
- ROYAUX IE, Wall SM, Karniski LP, Everett LA, Suzuki K, Knepper MA, Green ED. Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(7):4221-6.
- RUBIN CM, Arthur DC, Woods WG, Lange BJ, Nowell PC, Rowley JD, Nachman J, Bostrom B, Baum ES, Suarez CR, et al. Therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in children: correlation between chromosomal abnormalities and prior therapy. *Blood*. 1991; 78(11):2982-8.
- RYTTING ME. Pediatric myelodysplastic syndromes. *Curr Hematol Rep*. 2004; 3(3):173-7.

- SACHDEV S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F, Grosschedl R. PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev.* 2001; 15(23):3088-103.
- SAITO E, Okamoto A, Saito M, Shinozaki H, Takakura S, Yanaihara N, Ochiai K, Tanaka T. Genes associated with the genesis of leiomyoma of the uterus in a commonly deleted chromosomal region at 7q22. *Oncol Rep.* 2005; 13(3):469-72.
- SAKUMA T, Hayashi Y, Kanomata N, Murayama T, Matsui T, Kajimoto K, Hanioka K, Chihara K, Maeda S. Histological and cytogenetic characterization of bone marrow in relation to prognosis and diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Pathol Int.* 2006; 56(4):191-9.
- SALMAN M, Jhanwar SC, Ostrer H. Will the new cytogenetics replace the old cytogenetics? *Clin Genet.* 2004; 66(4):265-75.
- SAMPSON EM, Haque ZK, Ku MC, Tevosian SG, Albanese C, Pestell RG, Paulson KE, Yee AS. Negative regulation of the Wnt-beta-catenin pathway by the transcriptional repressor HBP1. *EMBO J.* 2001; 20(16):4500-11.
- SASAKI T, Irie-Sasaki J, Horie Y, Bachmaier K, Fata JE, Li M, Suzuki A, Bouchard D, Ho A, Redston M, Gallinger S, Khokha R, Mak TW, Hawkins PT, Stephens L, Scherer SW, Tsao M, Penninger JM. Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma. *Nature.* 2000; 406(6798):897-902.
- SAVAGE P, Frenck R, Paderanga D, Emperor J, Shannon KM. Parental origins of chromosome 7 loss in childhood monosomy 7 syndrome. *Leukemia.* 1994; 8(3):485-9.
- SCHERES JM, Merckx GF. Banding of human chromosomes with basic fuchsin. *Hum Genet.* 1976; 32(2):155-69.
- SCHERES JM. Human chromosome banding. *Lancet.* 1972; 1(7755):849.
- SCHMITT CA, Fridman JS, Yang M, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW. Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell.* 2002; 1(3):289-98.
- SCHMITT CA, Lowe SW. Bcl-2 mediates chemoresistance in matched pairs of primary E(mu)-myc lymphomas in vivo. *Blood Cells Mol Dis.* 2001; 27(1):206-16.
- SCHMITT CA, Wallace-Brodeur RR, Rosenthal CT, McCurrach ME, Lowe SW. DNA damage responses and chemosensitivity in the E mu-myc mouse lymphoma model. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2000; 65:499-510.

- SCHOCH C, Kohlmann A, Dugas M, Kern W, Schnittger S, Haferlach T. Impact of trisomy 8 on expression of genes located on chromosome 8 in different AML subgroups. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006; [Epub ahead of print]
- SCHWEINFEST CW, Henderson KW, Suster S, Kondoh N, Papas TS. Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. *Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(9):4166-70.
- SENGUPTA S, Harris CC .p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6(1):44-55.
- SHALI W, Helias C, Fohrer C, Struski S, Gervais C, Falkenrodt A, Leymarie V, Lioure B, Raby P, Herbrecht R, Lessard M. Cytogenetic studies of a series of 43 consecutive secondary myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukemias: conventional cytogenetics, FISH, and multiplex FISH. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006; 168(2):133-45.
- SHAO J, Sheng H, DuBois RN. Peroxisome proliferator-activated receptors modulate K-Ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells. *Cancer Res*. 2002; 62(11):3282-8.
- SHEARER BG, Hoekstra WJ. Recent advances in peroxisome proliferator-activated receptor science. *Curr Med Chem*. 2003; 10(4):267-80.
- SHEN Y, Xue Y, Li J, Guo Y, Pan J, Wu Y. Detection of monosomy 7 or 7q- in cases of myelodysplastic syndrome. *Zonghua* 2001; 4:225-8.
- SHIH HH, Tevosian SG, Yee AS. Regulation of differentiation by HBP1, a target of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*. 1998; 18(8):4732-43.
- SHIH HH, Xiu M, Berasi SP, Sampson EM, Leiter A, Paulson KE, Yee AS. HMG box transcriptional repressor HBP1 maintains a proliferation barrier in differentiated liver tissue. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(17):5723-32.
- SIDE L, Taylor B, Cayouette M, Conner E, Thompson P, Luce M, Shannon K. Homozygous inactivation of the NF1 gene in bone marrow cells from children with neurofibromatosis type 1 and malignant myeloid disorders. *N Engl J Med*. 1997; 336(24):1713-20.
- SIDE LE, Curtiss NP, Teel K, Kratz C, Wang PW, Larson RA, Le Beau MM, Shannon KM. RAS, FLT3, and TP53 mutations in therapy-related myeloid malignancies with abnormalities of chromosomes 5 and 7. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004; 39(3):217-23.
- SINDELAROVA L, Michalova K, Zemanova Z, Ransdorfova S, Brezinova J, Pekova S, Schwarz J, Karban J, Cmunt E. Incidence of chromosomal anomalies detected with FISH and their

- clinical correlations in B-chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005; 160(1):27-34.
- SIREN AL, McCarron R, Wang L, Garcia-Pinto P, Ruetzler C, Martin D, Hallenbeck JM. Proinflammatory cytokine expression contributes to brain injury provoked by chronic monocyte activation. *Mol Med.* 2001; 7(4):219-29.
- SMITH RE. Risk for the development of treatment-related acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome among patients with breast cancer: review of the literature and the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *Clin Breast Cancer.* 2003; 4(4):273-9.
- SOENEN V, Preudhomme C, Roumier C, Lai JL, Lepelley P, Facon T, Pagniez D, Fenaux P. Myelodysplasia during the course of myeloma. Restriction of 17p deletion and p53 overexpression to myeloid cells. *Leukemia.* 1998 Feb;12(2):238-41.
- SOLE F, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Luno E, Prieto F, Granada I, Hernandez JM, Cigudosa JC, Diez JL, Bureo E, Marques ML, Arranz E, Rios R, Martinez Climent JA, Vallespi T, Florensa L, Woessner S. Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. Grupo Cooperativo Espanol de Citogenetica Hematologica. *Br J Haematol.* 2000; 108(2):346-56.
- SPATZ A, Giglia-Mari G, Benhamou S, Sarasin A. Association between DNA repair-deficiency and high level of p53 mutations in melanoma of Xeroderma pigmentosum. *Cancer Res.* 2001;61(6):2480-6.
- STEENSMA DP, List AF. Genetic testing in the myelodysplastic syndromes: molecular insights into hematologic diversity. *Mayo Clin Proc.* 2005;80(5):681-98.
- STIREWALT DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001; 97(11):3589-95.
- STROM SS, Gu Y, Gruschkus SK, Pierce SA, Estey EH. Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia.* 2005; 19(11):1912-8.
- STRUPP C, Gattermann N, Giagounidis A, Aul C, Hildebrandt B, Haas R, Germing U. Refractory anemia with excess of blasts in transformation: analysis of reclassification according to the WHO proposals. *Leuk Res.* 2003; 27(5):397-404.

- SUGIMURA A, Kiriya Y, Nochi H, Tsuchiya H, Tamoto K, Sakurada Y, Ui M, Tokumitsu Y. Troglitazone suppresses cell growth of myeloid leukemia cell lines by induction of p21WAF1/CIP1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 261(3):833-7.
- TANIWAKI M, Horiike S, Inazawa J, Nishida K, Misawa S, Takino T, Abe T. Cytogenetic studies in 32 patients with myelodysplastic syndrome: insights to specific chromosomal abnormalities and prognosis. *Jpn J Clin Oncol.* 1987; 17(2):141-50.
- TCAG - The Centre for Applied Genomics (<http://tcag.bioinfo.sickkids.on.ca/mrc.html>) Acessado em agosto de 2006.
- TEVOSIAN SG, Shih HH, Mendelson KG, Sheppard KA, Paulson KE, Yee AS. HBP1: a HMG box transcriptional repressor that is targeted by the retinoblastoma family. *Genes Dev.* 1997; 11(3):383-96.
- TJIO, JH, Levan, A. The chromosome number of man. *Hereditas* 1956; 42,1.
- TOYOTA M, Miyazaki Y, Kitamura S, Nagasawa Y, Kiyohara T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma reduces the growth rate of pancreatic cancer cells through the reduction of cyclin D1. *Life Sci.* 2002; 70(13):1565-75.
- TROST D, Hildebrandt B, Beier M, Muller N, Germing U, Royer-Pokora B. Molecular cytogenetic profiling of complex karyotypes in primary myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006; 165(1):51-63.
- TSURUSAWA M, Manabe A, Hayashi Y, Akiyama Y, Kigasawa H, Inada H, Noguchi Y, Sawai N, Kobayashi R, Nagatoshi Y, Kawakami K, Kojima S, Nakahata T; MDS committee of the Japanese Society of Pediatric Hematology. Therapy-related myelodysplastic syndrome in childhood: a retrospective study of 36 patients in Japan. *Leuk Res.* 2005; 29(6):625-32.
- TUNCER MA, Pagliuca A, Hicsonmez G, Yetgin S, Ozsoylu S, Mufti GJ. Primary myelodysplastic syndrome in children: the clinical experience in 33 cases. *Br J Haematol.* 1992; 82(2):347-53.
- UCSC Genome Browser Home - University of California, Santa Cruz - (<http://www.genome.ucsc.edu>). Acessado em agosto de 2006.
- UEDA M, Ota J, Yamashita Y, Choi YL, Ohki R, Wada T, Koinuma K, Kano Y, Ozawa K, Mano H. DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 2003; 123(2):288-96.

- VALLESPÍ T, Imbert M, Mecucci C, Preudhomme C, Fenaux P. Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 1998; 83(3):258-75.
- VAN DEKKEN H, Pizzolo JG, Reuter VE, Melamed MR. Cytogenetic analysis of human solid tumors by in situ hybridization with a set of 12 chromosome-specific DNA probes. *Cytogenet Cell Genet*. 1990; 54(3-4):103-7.
- VAN ETTEN RA, Shannon KM. Focus on myeloproliferative diseases and myelodysplastic syndromes. *Cancer Cell*. 2004; 6(6):547-52.
- VAN LIMBERGEN H, Poppe B, Michaux L, Herens C, Brown J, Noens L, Berneman Z, De Bock R, De Paepe A, Speleman F. Identification of cytogenetic subclasses and recurring chromosomal aberrations in AML and MDS with complex karyotypes using M-FISH. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002; 33(1):60-72.
- VELLOSO ER, Michaux L, Ferrant A, Hernandez JM, Meeus P, Dierlamm J, Criel A, Louwagie A, Verhoef G, Boogaerts M, Michaux JL, Bosly A, Mecucci C, Van den Berghe H. Deletions of the long arm of chromosome 7 in myeloid disorders: loss of band 7q32 implies worst prognosis. *Br J Haematol*. 1996; 92(3):574-81.
- WALLACE-BRODEUR RR, Lowe SW. Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci*. 1999; 55(1):64-75.
- WANG JC. Finding primary targets of transcriptional regulators. *Cell Cycle*. 2005; 4(3):356-8.
- WANG QE, Zhu Q, Wani MA, Wani G, Chen J, Wani AA. Tumor suppressor p53 dependent recruitment of nucleotide excision repair factors XPC and TFIIH to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2003; 2(5):483-99.
- WANG SC, Hung MC. HER2 overexpression and cancer targeting. *Semin Oncol*. 2001; 28(5 Suppl 16):115-24.
- WANG T, Xu J, Yu X, Yang R, Han ZC. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006; 58(1):1-14.
- WATANABE A, Inokuchi K, Yamaguchi H, Mizuki T, Tanosaki S, Shimada T, Dan K. Near-triploidy and near-tetraploidy in hematological malignancies and mutation of the p53 gene. *Clin Lab Haematol*. 2004; 26(1):25-30.
- WIERECKY J, Kollmannsberger C, Boehlke I, Kuczyk M, Schleicher J, Schleucher N, Metzner B, Kanz L, Hartmann JT, Bokemeyer C. Secondary leukemia after first-line high-dose

- chemotherapy for patients with advanced germ cell cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005; 131(4):255-60.
- WIKTOR A, Rybicki BA, Piao ZS, Shurafa M, Barthel B, Maeda K, Van Dyke DL. Clinical significance of Y chromosome loss in hematologic disease. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000; 27(1):11-6.
- WINICK NJ, McKenna RW, Shuster JJ, Schneider NR, Borowitz MJ, Bowman WP, Jacaruso D, Kamen BA, Buchanan GR. Related Articles, Links Secondary acute myeloid leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia treated with etoposide. *J Clin Oncol*. 1993; 11(2):209-17.
- WLODARSKA I, Marynen P, La Starza R, Mecucci C, Van den Berghe H. The ETV6, CDKN1B and D12S178 loci are involved in a segment commonly deleted in various 12p aberration in different hematological malignancies. *Cytogenet Cell Genet*. 1996; 72(2-3):229-35.
- WU X, Noh SJ, Zhou G, Dixon JE, Guan KL. Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells. *J Biol Chem*. 1996; 271(6):3265-71.
- WYANDT HE, Chinnappan D, Ioannidou S, Salama M, O'Hara C. Fluorescence in situ hybridization to assess aneuploidy for chromosomes 7 and 8 in hematologic disorders. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998; 102(2):114-24.
- XING M, Tokumaru Y, Wu G, Westra WB, Ladenson PW, Sidransky D. Hypermethylation of the Pendred syndrome gene SLC26A4 is an early event in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res*. 2003; 63(9):2312-5.
- YAMAKAWA-KARAKIDA N, Sugita K, Inukai T, Goi K, Nakamura M, Uno K, Sato H, Kagami K, Barker N, Nakazawa S. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces apoptosis of leukemia cells by down-regulating the c-myc gene expression via blockade of the Tcf-4 activity. *Cell Death Differ*. 2002; 9(5):513-26.
- YAN J, Guilbault E, Masse J, Bronsard M, DeGrandpre P, Forest JC, Drouin R. Optimization of the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique for high detection efficiency of very small proportions of target interphase nuclei. *Clin Genet*. 2000; 58(4):309-18.
- YANG H, Jiang W, Furth EE, Wen X, Katz JP, Sellon RK, Silberg DG, Antalis TM, Schweinfest CW, Wu GD. Intestinal inflammation reduces expression of DRA, a transporter responsible for congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol*. 1998; 275(6 Pt 1):G1445-53.
- YAO CJ, Works K, Romagnoli PA, Austin GE. Effects of overexpression of HBP1 upon growth and differentiation of leukemic myeloid cells. *Leukemia*. 2005; 19(11):1958-68.

- YILMAZ Z, Sahin FI, Kizilkilic E, Karakus S, Boga C, Ozdogu H. Conventional and molecular cytogenetic findings of myelodysplastic syndrome patients. *Clin Exp Med*. 2005; 5(2):55-9.
- YIN F, Wakino S, Liu Z, Kim S, Hsueh WA, Collins AR, Van Herle AJ, Law RE. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 286(5):916-22.
- YOSHIDA Y, Anzai N, Kawabata H. Apoptosis in myelodysplasia: a paradox or paradigm. *Leuk Res*. 1995; 19(12):887-91.
- YOSHIDA Y. Physician Education: Myelodysplastic Syndrome. *Oncologist*. 1996; 1(4):284-287.
- YOSHIDA Y. Progress in research on myelodysplastic syndrome in the last 100 years. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. 2002; 91(7):2095-9.
- YOSHIMOTO M, Cutz JC, Nuin PA, Joshua AM, Bayani J, Evans AJ, Zielenska M, Squire JA. Interphase FISH analysis of PTEN in histologic sections shows genomic deletions in 68% of primary prostate cancer and 23% of high-grade prostatic intra-epithelial neoplasias. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006; 169(2):128-37.