



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE
NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

SANDRA INÊS DINIZ AMARAL

UM OLHAR SOBRE A BIOLOGIA E A CLÍNICA

DAS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS

- IMPLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DO PROGNÓSTICO

ARTIGO REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE HEMATOLOGIA

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:

PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO RIBEIRO

DR.ª EMÍLIA ROXO BARATA CORTESÃO

MARÇO 2012

ÍNDICE

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. DEFINIÇÃO	2
3. ETIOLOGIA	4
3.1 SMD relacionada com a terapêutica (SMD-t)	4
3.2 SMD familiar	7
4. EPIDEMIOLOGIA	9
5. FISIOPATOLOGIA	11
5.1 Alterações relacionadas com o envelhecimento	13
5.2 Alterações na regulação da apoptose	14
5.3 Stresse oxidativo	15
5.4 Alterações na regulação do ferro	16
5.5 Alterações no sistema imune	17
5.6 Alterações no microambiente	18
5.7. Anomalias genéticas mais comuns	20
5.8. Alterações epigenéticas	27

6. CLASSIFICAÇÃO	31
7. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	35
8. CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS	37
8.1 Hemograma	37
8.2 Esfregaço de sangue periférico e aspirado de medula óssea	38
8.3 Biópsia da medula óssea (Histopatologia)	40
8.4 Imunohistoquímica	46
8.5 Imunofenotipagem	47
8.6 Citogenética – cariótipos anormais	49
8.7 Bioquímica sanguínea	57
9. DIAGNÓSTICO	59
10. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	63
11. EVOLUÇÃO	65
12. PROGNÓSTICO	66
13. ABORDAGEM DIAGNÓSTICA E SEGUIMENTO	71
14. CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	75

RESUMO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) inclui um grupo de doenças clonais da célula estaminal hematopoiética caracterizadas por displasia, hematopoiese ineficaz e potencial risco de evolução para Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA). Múltiplos e complexos mecanismos genéticos e epigenéticos estão envolvidos na patogénese desta doença, originando alterações na proliferação, diferenciação e apoptose das células do sistema hematopoiético, traduzindo-se em anomalias na medula óssea (MO) e no sangue periférico (SP).

A SMD ocorre, preferencialmente, em idosos. Nota-se ainda uma maior prevalência no sexo masculino. Podem surgir de novo, SMD primárias (80 a 90% dos casos), ou em consequência da exposição a radiação, a tóxicos ambientais/ocupacionais ou a fármacos - SMD secundárias (10 a 20% dos casos).

O diagnóstico é feito com base na história clínica, na presença de hiperplasticidade e de displasia em mais de 10% das células de uma linhagem mielóide na MO (glóbulos vermelhos dimórficos e macrócitos, neutrófilos hiposegmentados e hipogranulares), anemia e outras citopenias no SP.

Para facilitar a categorização destas doenças foi recentemente adoptada uma classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2008) que as subdivide em 8 grupos: Anemia refractária (AR), Anemia refractária com sideroblastos em anel (ARSA), Citopenia refractária com displasia multilinhagem (CRDM), CRDM com sideroblastos em anel (CRDM-SA), Anemia refractária com excesso de blastos 1 (AREB-1), Anemia refractária com excesso de blastos 2 (AREB-2), Síndrome mielodisplásica não-classificada (SMD-NC) e SMD com del(5q) isolada.

Para estimar o prognóstico destas doenças utiliza-se, habitualmente, o IPSS (*International Prognostic Score System*), em que os principais parâmetros que influenciam a sobrevivência e a progressão para LMA são: o número de citopenias, a percentagem de blastos e as anomalias citogenéticas. Este índice divide os doentes em 4 categorias de risco: Baixo, Intermédio-1, Intermédio-2 e Alto risco.

O desafio do tratamento da SMD reside no facto de a única terapêutica curativa ser o transplante de medula óssea. No entanto, devido à idade avançada da maioria dos doentes, poucos são os que podem usufruir. Assim, o tratamento centra-se no atraso da progressão da doença e na manutenção da qualidade de vida do doente.

Apesar dos progressos, a SMD permanece mal caracterizada e novas estratégias têm vindo a ser desenvolvidas na abordagem da patogénese, diagnóstico e tratamento.

O objectivo do presente trabalho é reunir os conhecimentos disponíveis actualmente na literatura acerca da SMD, principalmente na área da biologia, genética, fisiopatologia e semiologia, que permitam fazer o diagnóstico e diagnóstico diferencial, avaliar o prognóstico e instituir a terapêutica adequada. Assim como lançar uma luz acerca da forma como essas informações podem contribuir para desenvolvimentos na área de medicina.

Palavras-Chave: Síndrome Mielodisplásica, célula estaminal hematopoiética, displasia, citopenia, Leucemia Mielóide Aguda, diagnóstico, classificação OMS, IPSS, clínica

ABSTRACT

The Myelodysplastic Syndrome (MDS) includes a group of clonal diseases of hematopoietic stem cell characterized by dysplasia, ineffective hematopoiesis and the potential risk of progression to acute myeloid leukemia (AML). Multiple and complex genetic and epigenetic mechanisms are involved in the pathogenesis of this disease, leading to alterations in the proliferation, differentiation and apoptosis of cells of the hematopoietic system, contributing to the abnormalities in the bone marrow (BM) and in the peripheral blood (PB).

MDS occurs, preferentially, in the elderly. Furthermore, there is a higher prevalence in males. It may be *de novo* - primary MDS (80 to 90% of cases), or as a result of exposure to radiation, toxic environmental/occupational or therapeutic drugs - secondary MDS (10 to 20% of cases).

The diagnosis is based on clinical history, in the presence of hypercellularity and dysplasia in more than 10% of cells of the myeloid lineage in the bone marrow (dimorphic macrocytic red blood cells, hyposegmentation and hypogranulation of neutrophils), anemia and other cytopenias in the PB.

In order to facilitate categorizing of these diseases have been recently adopted a classification proposed by the World Health Organization (WHO, 2008) that subdivides MDS into eight groups: Refractory anemia (RA), Refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS), Refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD), RCMD with ringed sideroblasts (RCMD-SA), Refractory anemia with excess blasts 1 (RAEB-1), Refractory anemia with excess blasts 2 (RAEB-2), Unclassified myelodysplastic syndrome (MDS-U) and MDS with isolated del (5q).

To determine the prognosis of these diseases it's usually used the IPSS (International Prognostic Score System), in which the main parameters that influence the survival and progression to AML are: the number of cytopenias, the percentage of blasts and the cytogenetic abnormalities. This index divides patients into four risk categories: Low, Intermediate-1, Intermediate-2 and High risk.

The challenge of MDS is that the only curative treatment is a bone marrow transplant. However, due to the advanced age of most patients, few are those who qualify to this therapy approach. Thus, the treatment is focused on the delay of the progression of the disease and on the maintainance of the quality of the patient's life.

Despite progress, MDS remains poorly characterized and new strategies have been developed to address the pathogenesis, diagnosis and treatment.

The objective of this work is to gather knowledge currently available in literature about MDS, specifically in biology, genetics, pathophysiology and symptomatology, which permits diagnosis and differential diagnosis, evaluate the prognosis and institute adequate therapy. On this way, it may be shed some light on how this information can contribute to developments in the medical field.

Key-words: Myelodysplastic syndrome, hematopoietic stem cell, dysplasia, cytopenia, acute myeloid leukemia, diagnosis, WHO classification, IPSS, clinical aspects

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - anemia aplástica

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ALIP - *atypical localization of immature progenitor cells*

AMA-CD34 - *multifocal accumulations of CD34+ progenitor*

AML1 - *acute myeloid leukemia 1*

AR - Anemia refractária

ARDM - Anemia refractária com displasia multilinhagem

AREB - Anemia refractária com excesso de blastos

AREB-t - Anemia refractária com excesso de blastos em transformação

AREB-1 - Anemia refractária com excesso de blastos 1

AREB-2 - Anemia refractária com excesso de blastos 2

ARSA - Anemia refractária com sideroblastos em anel

CBL - *Casitas B-lineage Lymphoma*

CDK - cinases dependentes de ciclina

c/EBP α - *CCAAT-enhancer-binding proteins*

CMV - citomagalovírus

CRDM - Citopenia refractária com displasia multilinhagem

CRDM-SA - Citopenia refractária com displasia multilinhagem com sideroblastos em anel

CRDU - Citopenia refratária com displasia unilinhagem

EBP α - *enhancer-binding protein α*

ERK - *Extracelular signal-regulated kinase*

EVI-1 – *Ecotropic viral integration site 1*

FA – fosfatase alcalina

FAB - *French-American-British*

FGFR - *fibroblast growth factor receptors*

FISH - *Fluorescence in situ hybridization*

FLT3 - *FMS-like tyrosine kinase 3*

GAT - globulina antitimócito

G-CSF - factor estimulante do crescimento de colónias de granulócitos

GEP - proteína trocadora de nucleótidos de guanina

GMSI - gamapatia monoclonal de significado indeterminado

IL - interleucina

IPSS - *International Prognostic Score System*

ISCN - *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*

ITD - Duplicações Internas em Tandem

LA - Leucemia Aguda

LDH – lactato desidrogenase

LGL T - Leucemia de Linfócitos Grandes Granulares T

LMA - Leucemia Mielóide Aguda

LMC - Leucemia Mielóide Crónica

LMML - Leucemia Mielomonocítica Crónica

MAPK - *Mitogen-activated protein kinases*

MEK – *MAP kinase/ERK kinase*

MLL - *myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia*

MO - medula óssea

NCCN - *National Comprehensive Cancer Network*

NFκB - factor nuclear κB

NMP - Neoplasias mieloproliferativas

OMS - Organização Mundial de Saúde

PDGFR - *platelet-derived growth factor receptor*

PI3K - fosfatidil inositol-3-cinase

RLO - radicais livres de oxigênio

RTK - receptor tirosina cinase

RUNX1 - *Runt-related transcription factor 1*

SMD - Síndrome mielodislásica

SMD-f - SMD com mielofibrose

SMD-NC - Síndrome mielodislásica não-classificada

SMD-NMP - Neoplasias mielodislásicas/mieloproliferativas

SMD-t - Síndrome mielodislásica secundária à terapêutica

SP - sangue periférico

SPARC - *secreted acidic cysteine rich glycoprotein*

TET2 - *Ten-Eleven Translocation Oncogene Family Member 2*

TGFβ – factor de crescimento tumoral β

TKD - domínio tirosina cinase

TNFα - factor de necrose tumoral α

TRAIL - ligando indutor da apoptose relacionado com o TNF

TRAIL-R - receptor do ligando indutor da apoptose relacionado com o TNF

VEGF - factor de crescimento do endotélio vascular

VIH - vírus da imunodeficiência humana

1. INTRODUÇÃO

A denominação de síndrome mielodisplásica (SMD) foi evoluindo à medida que se ia conhecendo mais aprofundadamente as suas características. Esta entidade foi, provavelmente, descrita pela primeira vez em 1900 como “*leukanamie*” por Leube, que acreditava que a doença tinha uma etiologia infecciosa (Nimer S.D., 2008).

Antes da década de 80, como muitos dos doentes apresentavam anemia que não respondia ao tratamento tradicional, a patologia era referida como “*anemia refratária*”. Foi só quando se começou a perceber que a doença evoluía para leucemia que a nomenclatura se alterou para “*leucemia aguda*” ou “*pré-leucemia*” (Jansen J.H. e Langemeijer S.M.C., 2010). Depois de se ter reconhecido que nem todos os doentes evoluíam para leucemia, foram também usadas designações como “*anemia pseudoaplástica*”, “*displasia hematopoiética*” e “*síndrome dismielopoiético*” (Steensma D.P. e Tefferi A., 2003). Finalmente, o termo “*síndromes mielodisplásicas*” foi usado pela comunidade científica pela primeira vez na década de 70 do século passado (Steensma D.P. e Tefferi A., 2003). Em 1982, o grupo FAB (*French American British*) atribuiu formalmente esta designação a este grupo heterogéneo de doenças (Nimer S.D., 2008).

Mas todos os termos se revelaram inapropriados. Esta constante alteração na denominação reflecte a indefinição que marcou e que, hoje ainda, paira sobre este tema (Steensma D.P. e Tefferi A., 2003). Nos últimos anos, a definição deste grupo de patologias tem sido alvo de debate por vários investigadores (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

Actualmente existem mais de 10.000 artigos publicados na *National Library of Medicine* (Pubmed) que versam este tema. Como mera estudante universitária não pretendo dar respostas a questões há muito debatidas e investigadas por inúmeros cientistas que se dedicam a esta área. Pretendo apenas reportar de forma simples e acessível a informação disponível sobre as síndromes mielodisplásicas, dando relevo aos aspectos mais importantes, em particular a caracterização biológica e clínica e as suas implicações no diagnóstico e avaliação do prognóstico.

2. DEFINIÇÃO

A síndrome mielodisplásica (SMD) compreende um grupo heterogéneo de doenças hematológicas de carácter clonal com origem numa anomalia na célula estaminal hematopoiética ou numa célula progenitora na medula óssea. Apresentam elevado potencial de transformação maligno, ou seja, risco de evolução para Leucemia Aguda (LA), em particular Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA).

A SMD caracteriza-se por alterações tanto qualitativas como quantitativas das células de uma ou ambas as linhagens mielóides (eritróide e megacariocítica) (Figura 1). Estas alterações reflectem-se numa hematopoiese inadequada e ineficaz, ou seja, na produção de células sanguíneas disfuncionais e displásicas, o que gera citopenias periféricas em uma ou mais linhagens. Por outro lado, há um número excessivo de clones de células progenitoras que proliferam a uma taxa aumentada embora sem capacidade maturativa ou de diferenciação. Este facto traduz-se por hiperplasticidade medular.

A denominação de SMD deve-se às características morfológicas de displasia, tanto no sangue periférico (SP) como na medula óssea (MO), embora na realidade se trate de uma doença neoplásica (Cortês E., 2010).

Entre os diversos subtipos de SMD existem diferenças em termos clínicos, morfológicos, citogenéticos e genéticos que se traduzem numa heterogéneo espectro de apresentação. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a SMD constitui um dos principais subgrupos de neoplasias mielóides (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação das neoplasias mielóides, de acordo com a OMS (2008)

Neoplasias mieloproliferativas (NMP)
Neoplasias mielóides/linfóides com eosinofilia e alterações de PDGFRA, PDGFRB ou FGFR1
<u>Síndromes mielodisplásicas (SMD)</u>
Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (SMD-NMP)
Leucemia mielóide aguda (LMA)

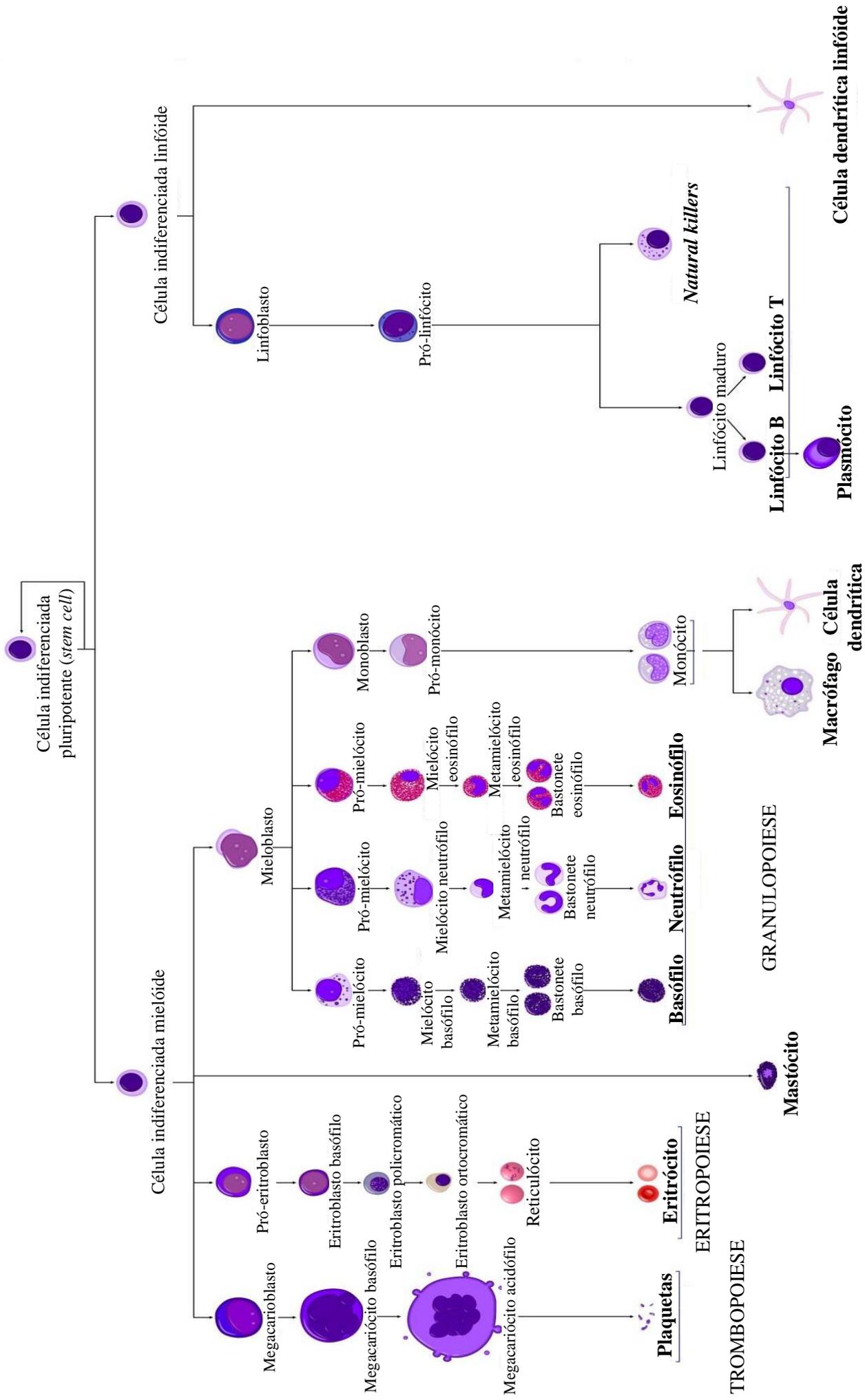


Figura 1 – Esquema ilustrativo da hematopoiese (adaptado de <http://commons.wikimedia.org>)

3. ETIOLOGIA

A maioria dos casos de SMD (80-90%) é *de novo*, ou seja, de causa desconhecida, enquanto cerca de 10 a 20% são *secundários*, isto é, subsequentes a um evento mutagénico identificado. Normalmente estão associados a factores como o tabagismo, os carcinogénicos ambientais e ocupacionais (solventes orgânicos, químicos agrícolas, pesticidas, tintas para o cabelo, etc.), a radiação ionizante e o benzeno (Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009; Leone G. *et al.*, 2007; Pedersen-Bjergaard J. *et al.*, 2007; Mufti G.J., 2004). Existem ainda alguns casos de SMD que se encontram associados a síndromes genéticas hereditárias, como, por exemplo, a síndrome de Down e de Bloom, entre outros.

3.1. SMD relacionada com a terapêutica (SMD-t)

É de destacar a SMD iatrogénica ou secundária à terapêutica (SMD-t), por exposição a quimioterapia e/ou radiação ionizante, em contexto de tratamento de neoplasia hematológica ou sólida prévia ou pré-transplante de medula óssea (Leone G. *et al.*, 2007; Mufti G.J., 2004). Esta SMD desenvolve-se, habitualmente, 4 a 7 anos após a exposição inicial a este tipo de terapêuticas (Mufti G.J., 2004) e, 10 anos após o início da exposição, o risco de SMD-t diminui bruscamente (Leone G. *et al.*, 2007).

Em comparação com as SMD *de novo*, os indivíduos afectados são mais jovens, a incidência de transformação em LMA é maior, as citopenias são mais graves, a displasia medular é mais marcada (displasia trilinear), a celularidade da medula óssea está reduzida e pode estar presente fibrose e ocorrem mais frequentemente alterações citogenéticas e resistência à terapêutica. Em suma, estas alterações conferem um prognóstico menos favorável, ou seja, menor taxa de sobrevivência (Cortesão E., 2010; Mufti G.J., 2004). A maior incidência de t-LMA foi atribuída ao aumento do uso de fármacos citotóxicos e ao aumento da sobrevivência dos doentes sujeitos a terapêutica (Leone G. *et al.*, 2007).

As alterações citogenéticas que ocorrem nas SMD *de novo* ou nas SMD-t em termos qualitativos são idênticas, apesar da frequência com que ocorrem nos 2 grupos serem diferentes (Tabelas 2 a 4).

Tabela 2 - Frequência de anomalias citogenéticas na SMD *de novo* e SMD-t

	Alterações citogenéticas		
	<i>Não balanceadas</i> del(5)/del(5q), del(7)/del(7q), ins(8)	<i>Balanceadas</i> 11q23, 21q22, 17q21, 16q22	<i>Cariótipo normal</i>
SMD <i>de novo</i>	15-25%	Raro	50-60%
SMD-t	50-70%	Raro	5-10%

(Adaptado de Pedersen-Bjergaard J. *et al.*, 2007)**Tabela 3 – Incidência de anomalias cromossômicas na SMD *de novo* e SMD-t**

Anomalia cromossômica	SMD <i>de novo</i>	SMD-t
del(5q)/monossomia 5	10-20%	30%
del(7q)/monossomia 7	10%	40%
trissomia 8	10%	10%
t(11q23)	6%	3%
del(17p)	3%	8%
del(20q)	5%	<1%
cariótipo complexo	10-20%	90%

(Adaptado de Hoffbrand A.V. *et al.*, 2005)**Tabela 4 - Frequência das mutações genéticas na SMD *de novo* e na SMD-t**

Tipo de gene	Nome do gene	Frequência em SMD <i>de novo</i>	Frequência em SMD-t
Supressor tumoral	p53 p.m.	5-10%	25-30%
Tirosina cinase	FLT3 ITD	Raro	Raro
	JAK2 p.m.	2-5%	2-5%
Via RAS/BRAF	KRAS/NRAS p.m.	10%	10%
	PTPN11 p.m.	3-5%	3-5%
Factores de transcrição	AML1 c.r.	Raro	2%
	CBFB c.r.	raro	raro
	MLL c.r.	raro	raro
	RAR c.r.	raro	raro
	EVII c.r.	raro	raro
	AML1 p.m.	10-15%	15-30%
	NPM1 p.m.	raro	4-5%
CEBPA p.m.	raro	Raro	

Abreviaturas: p.m.- *point mutations*; ITD - *internal tandem duplications*; c.r. – *chimeric rearrangement*(Adaptado de Pedersen-Bjergaard J. *et al.*, 2007)

A maioria das leucemias secundárias ao uso de fármacos citotóxicos pode ser dividida em dois grupos, de acordo com o fármaco que foi administrado: agentes alquilantes (melfalan, ciclofosfamida, mostarda nitrogenada, etc.) ou inibidores da topoisomerase II (ectoposídeo, doxorubicina, daunorrubicina, mitoxantrone, etc.). Casos relacionados com fármacos anti-metabólicos (fluorouracil, metotrexato, mercaptopurina, fludarabina, etc.) são descritos menos frequentemente (Leone G. *et al.*, 2007).

Os agentes alquilantes parecem ser os mais lesivos (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006), sendo o seu efeito dependente da dose do fármaco. Estes fármacos tendem a causar alterações não balanceadas como a deleção ou perda do braço longo do cromossoma 5 e/ou 7 ou mesmo perda da totalidade do cromossoma, visto que o ponto de quebra do cromossoma tende a situar-se junto do centrómero (Mufti G.J., 2004). Os cariótipos são frequentemente complexos. Por outro lado, os inibidores das topoisomerasas estão associados a alterações balanceadas que, normalmente, são únicas (Leone G. *et al.*, 2007).

A radiação ionizante é um agente leucemogénico cujo efeito depende não só da dose mas da duração da exposição. Tal como no caso dos agentes de quimioterapia, os principais mecanismos de lesão estão relacionados com quebras na molécula de ADN, o que pode resultar em deleções e translocações cromossómicas. Num estudo sobre os efeitos da radiação em sobreviventes da bomba atómica, os autores associaram a presença de mutações no gene AML1 (*acute myeloid leukemia 1*) com o desenvolvimento de SMD/LMA (Mufti G.J., 2004).

A combinação de quimioterapia e radioterapia potencia o risco, embora a quimioterapia isolada confira, geralmente, risco mais elevado, em comparação com a radioterapia por si só que, quando localizada e em doses terapêuticas, acarreta pouco ou nenhum risco de leucemia (Leone G. *et al.*, 2007).

No entanto, o diagnóstico de SMD-t num doente que se acreditava estar curado de uma neoplasia prévia, pode ser emocionalmente conturbado. Não só pela presença da patologia em si como pelas limitações que impõe ao tratamento preventivo de recidiva da neoplasia primária. Caso a recidiva não ocorra, é provável que o doente pereça às complicações relacionadas com a SMD (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). No

entanto, apenas uma pequena parte dos indivíduos sujeitos a estas terapêuticas desenvolve doença secundária, o que indica que a susceptibilidade das células progenitoras hematopoiéticas a estes agentes mutagênicos desempenha um papel importante. Assim, factores como polimorfismos das enzimas detoxificadoras ou reparadoras do ADN podem funcionar como factores individuais predisponentes (Leone G. *et al.*, 2007).

A probabilidade individual de cada agente de quimioterapia de causar SMD não é fácil de calcular, pois são usados múltiplos fármacos em simultâneo e as doses e esquemas de administração dos fármacos variam conforme os regimes terapêuticos. Assim, até à data, não há forma de prever, de entre os indivíduos sujeitos a quimioterapia ou radioterapia, quais irão desenvolver SMD, assim, a vigilância pós-tratamento deve ser preconizada em todos (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

3.2. SMD familiar

Os casos de SMD familiar (Tabela 5) são raros, sendo o mais documentado na literatura o distúrbio familiar da função plaquetar com propensão para transformação neoplásica mielóide (Liew E. e Owen C.J., 2011).

A maior parte dos casos diagnosticados na infância estão relacionados com doenças hereditárias que predispoem ao desenvolvimento de doenças neoplásicas, incluindo a SMD. São exemplos: as síndromes de falência medular, como a Anemia de Diamond-Blackfan, a Síndrome de Shwachman-Diamond, a Neutropenia Congénita Grave e a Disqueratose Congénita; as síndromes associados a défice na reparação do ADN, como a Anemia de Fanconi, a Síndrome de Bloom e Li Fraumeni; as alterações nas vias de transdução de sinal, como a Síndrome de Noonan e Neurofibromatose; e ainda anomalias cromossómicas numéricas como a trissomia 21 (Liew E. e Owen C.J., 2011).

Tabela 5 – Síndromes familiares com predisposição para SMD/AML

	Heredita- riedade	Gene	Locus	Incidência de SMD/AML
SMD-AML familiar associada a síndromes				
<u>Síndromes de falência da MO</u>				
Anemia Diamond-Blackfan	AD	RPS19 RPS24 RPS17 RPL5 RPL11 RPL35A RPS 7	19q13 10q22 15q25 1p22 1p35 3q29 2p	0,5 – 1%
Neutropenia Congénita Grave	AD	ELA2	19q13	10%
	AR	GF11 HAX-1	1p22 1q21	
Trombocitopenia Amegacariocítica Congénita	AR	MPL	1p34	desconhecida
Síndrome de Shwachman-Diamond	AR	SBDS	7q11	10%
Disqueratose Congénita	Lig.X AD	DKC1 TERC TERT	Xq28 3q26 5p15	3 - 5 %
	AR	TINF2 NOP10 NHP2	14q11 15q14 5q35	
<u>Síndromes de deficiência na reparação do ADN</u>				
Anemia de Fanconi	AR Lig.X	Via FANC/ BRCA		50%
Síndrome de Bloom	AR	BLM	15q26	25%
Li-Fraumeni	AD	P53	17p13	~7,5%
<u>Alterações na vias de transdução de sinal</u>				
Síndrome de Noonan	AD	Via RAS/ MAPK		desconhecida
Neurofibromatose 1		NF1	17p11	
<u>Alterações cromossômicas numéricas</u>				
Trissomia 21	esporádico			2,5%
SMD familiar pura				
Doença Plaquetar Familiar	AD	RUNX1	21q22	20-60%
Del cromossoma 21q22		RUNX1	21q22	~25%
Disqueratose Congénita Oculta	AD	TERC	3q26	desconhecida
		TERT	5p15	
Monossomia 7	AD	Desconhecida	desc.	desconhecida

Abreviaturas: AD – autossômico dominante; AR – autossômico recessivo; Lig. X – liagado ao X

(Adaptado de Liew E. e Owen C.J., 2011)

4. EPIDEMIOLOGIA

A incidência e prevalência das SMD são difíceis de quantificar devido a vários factores. Entre eles salienta-se a vasta gama de doenças que abrange, as alterações da nomenclatura ao longo do tempo, a dificuldade de diagnóstico, o facto de muitos casos permanecerem não classificados e/ou não serem reportados às entidades competentes, para além da falta de estudos epidemiológicos à escala nacional e internacional (Steensma D.P. e Tefferi A., 2003).

Na população em geral, a incidência é, aproximadamente, de 3 a 5 casos por cada 100.000 pessoas, aumentando com a idade. Os idosos, principalmente a partir de 70 anos, são o subgrupo que mais risco corre de sofrer desta patologia. A incidência nesta faixa etária está estimada em mais de 20 casos por 100.000 pessoas (WHO, 2008).

A idade média dos doentes é entre os 70 e os 75 anos e a maioria dos doentes encontra-se acima dos 60 anos de idade (Garcia-Manero G., 2010). De facto, o diagnóstico de SMD antes dos 50 anos é raro (Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009). No entanto, pode ocorrer em qualquer idade, incluindo na infância. Assim, a suspeita de SMD deve ser considerada não só em doentes idosos, como, em doentes mais jovens com factores de risco (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

Esta distribuição etária predominante em idade mais avançada contrasta com a das outras doenças que afectam a célula estaminal hematopoiética, que, tipicamente, apresentam dois picos de incidência em dois grupos etários distintos (Pfeilstöcker M. *et al.*, 2007).

A SMD é mais comum em homens que em mulheres com um ratio aproximadamente de 1.8:1 (Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009). Assume-se que a preponderância masculina estará relacionada com a maior exposição dos homens às toxinas ambientais nos locais de trabalho (Farquhar M.L. e Bowen D.T., 2003). Por outro lado, é mais prevalente em indivíduos de raça branca comparando com os de raça negra (Barzi A. e Sekeres M.A., 2010).

Apesar de alguns hematologistas acreditarem que a incidência de SMD está a aumentar, não está claro se isto está de facto a acontecer ou se é apenas uma ilusão

causada pela melhoria da capacidade dos clínicos de diagnosticar a doença, assim como pelas alterações na demografia nos países industrializados, caracterizada pelo envelhecimento populacional (Barzi A. e Sekeres M.A., 2010; Steensma D.P. e Tefferi A., 2003). De facto, segundo outros autores a incidência da doença tem-se mantido estável e o aumento inicial verificado poderá reflectir, provavelmente, um diagnóstico precoce e melhorado, e a tendência crescente em investigar doentes idosos citopénicos (Cortês E., 2010).

Por outro lado, a alta incidência de SMD-t é atribuída ao uso crescente de fármacos citostáticos e ao aumento do tempo de sobrevivência dos doentes com neoplasia após tratamento (Leone G. *et al.*, 2007).

5. FISIOPATOLOGIA

O desenvolvimento da SMD e a sua frequente progressão para leucemia aguda engloba múltiplos mecanismos e factores, hereditários e ambientais, que atingem a célula estaminal hematopoiética, levando à alteração da função celular e à emergência e consequente evolução de um clone pré-maligno (Pfeilstöcker M. *et al.*, 2007) (Figura 2). Este clone apresenta instabilidade genómica, vantagem de crescimento, displasia e disfunção celular, como, por exemplo, aumento de secreção local de citocinas inibitórias, hematopoiese ineficaz e alteração da diferenciação (Cortesão E., 2010; Nimer S. D., 2008; Mufti G.J., 2004).

Assim, a conversão de uma célula estaminal normal numa célula pré-leucémica e, posteriormente, leucémica, é um processo multifactorial e que ocorre em várias etapas e que requer a acumulação de várias lesões genéticas e/ou epigenéticas (Hirai H., 2003) (Figura 2) que resultam de inúmeros insultos ao genoma da célula estaminal hematopoiética da medula óssea (List A.F. *et al.*, 2004) assim como da incapacidade de reparação do ADN. Assim, as células progenitoras acumulam defeitos que impedem a hematopoiese normal (Liesveld J.L. *et al.*, 2004).

A conversão ocorre graças à aquisição por uma célula de uma mutação dominante que lhe confere vantagem de crescimento em relação às outras células. Posteriormente, esta sofre evolução clonal, tornando-se ainda mais propícia ao aparecimento de múltiplas mutações genéticas (Hirai H., 2003). No entanto, inicialmente, a taxa de proliferação é rapidamente balanceada pelo aumento do índice de apoptose. As células clonais não maturam nem diferenciam, permanecendo na medula óssea. Como resultado, apesar do aumento da actividade na medula, o doente apresenta citopenias periféricas (Mufti G.J., 2004). As alterações culminam na transformação neoplásica, ou seja, no desenvolvimento de leucemia, na sequência de uma fase proliferativa (Hirai H., 2003).

A história natural da SMD é altamente variável, reflectindo o conjunto inconstante de alterações citogenéticas, genéticas e epigenéticas associadas a esta patologia (Pfeilstöcker M. *et al.*, 2007).

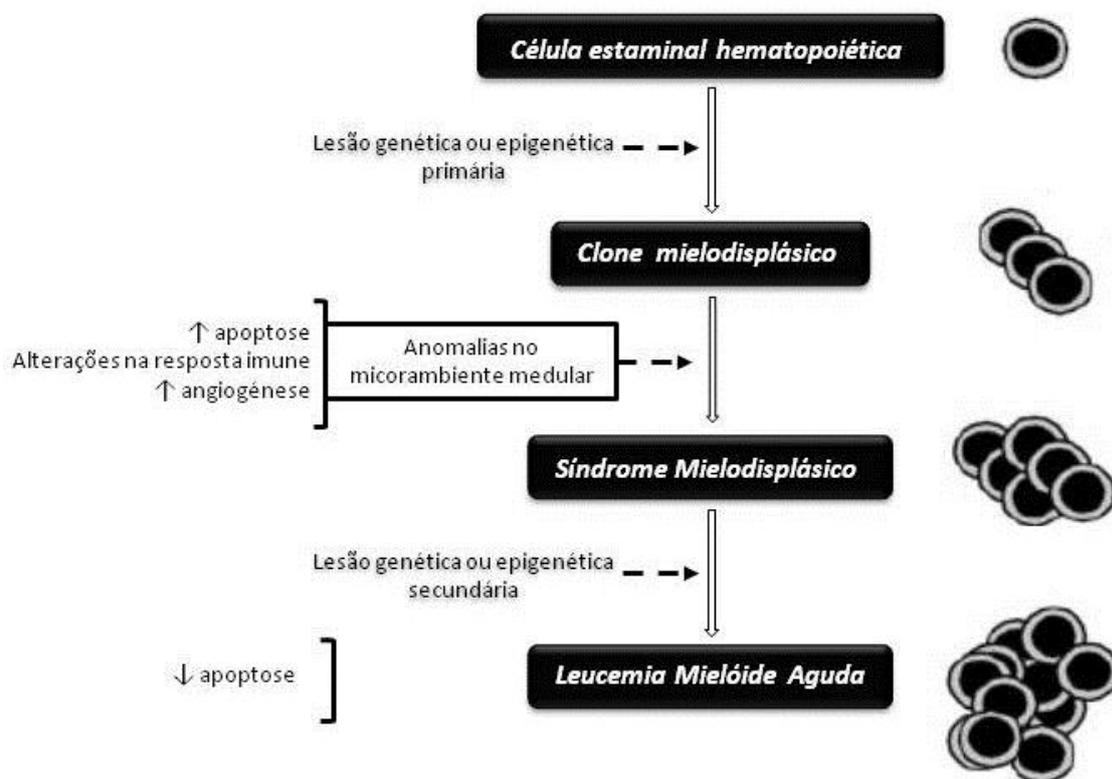


Figura 2 – Representação esquemática do modelo proposto para a patogênese e evolução da síndrome mielodisplásica. (Adaptado de Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009; Hoffbrand A.V. *et al.*, 2005; Hofmann W.K. e Koefler H.P., 2005; Proven D., 2003)

Apesar de múltiplas tentativas para explicar os mecanismos moleculares envolvidos (Nimer S.D., 2008), o evento promotor ou inicial que é capaz de dar início à cadeia de acontecimentos característicos da patogênese das SMD permanece desconhecido (Hirai H., 2003), bem como o tempo de latência entre esse evento e as primeiras manifestações clínicas da doença (Farquhar M.L. e Bowen D.T., 2003).

Como responsável inicial, tem sido referido o envolvimento de várias vias de tradução de sinal, nomeadamente a via de sinalização envolvendo as proteínas RAS. Por outro lado, a inativação do gene supressor tumoral p53 foi detectada em 5 a 10% das SMD, principalmente em estádios avançados ou com cariótipos instáveis, indicando que estas mutações podem ter um papel na progressão leucémica da SMD (Cortesão E., 2010; Nimer S. D., 2008). De igual modo, o silenciamento por hipermetilação de genes supressores tumorais como o p15 e p16, foi também associado à patogênese da doença

(Cortesão E., 2010; Hirai H., 2003). Além disso, vários estudos demonstraram o aumento da apoptose nos estádios iniciais em contraste com diminuição da taxa de morte celular com a progressão da doença (Nishino H.T. e Chang C.-C., 2005).

5.1 Alterações relacionadas com o envelhecimento

O facto de a idade de apresentação ser tardia pode ser um indício de que o processo de senescência medular pode ser um interveniente nesta patologia (Cortesão E. 2010). Mais de 80% dos doentes que apresentam SMD tem mais de 60 anos de idade. Ao longo das suas vidas, é provável que estes doentes tenham acumulado danos no ADN das células hematopoiéticas através da exposição a carcinogéneos endógenos e exógenos, o que se pode reflectir pela presença de cariótipos complexos em vários doentes com SMD. Apesar de muitos outros doentes não apresentarem este tipo de cariótipos, continua a considerar-se provável que a etiologia das SMD está relacionada com processos de envelhecimento das células estaminais da medula óssea (Tabela 6) (Farquhar M.L. e Bowen D.T., 2003).

Tabela 6 - Factores moleculares e ambientais envolvidos no envelhecimento

Lesão do ADN, reparação do ADN e declínio da função nuclear
Modificações epigenéticas
Encurtamento das telomerasas
Dano oxidativo e disfunção mitocondrial
Alterações dos factores reguladores relacionados com a dieta
Alteração da sinalização mediada pela insulina e IGF-1
Alterações na regulação do metabolismo do ferro

(Adaptado de Pfeilstöcker M. *et al.*, 2007)

5.2 Alterações na regulação da apoptose

Nos estádios precoces da patogénese da SMD, a proliferação de clones displásicos é posta em causa por um aumento da apoptose intramedular. Esta descoberta veio explicar o contraditório fenótipo característico das SMD: medula óssea celular hiperplásica acompanhada de citopenias periféricas (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010). Inúmeros mecanismos têm sido apontados como sendo responsáveis pelo aumento da actividade apoptótica mas a contribuição relativa de cada um ainda não foi esclarecida (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010).

A morte celular pode ser iniciada por linfócitos T activados (na tentativa de eliminar o clone maligno), pela secreção de proteínas de morte celular e/ou citocinas pró-inflamatórias, pela expressão de proteínas pró-apoptóticas e/ou através da deficiência de factores de crescimento hematopoiético (Cortesão E., 2010; Nimer S.D., 2008; Mufti G.J. 2004).

Foi demonstrado que, em estádios precoces da doença, a via mitocondrial extrínseca da apoptose está extremamente activa, com sobre-expressão subsequente do TNF α (factor de necrose tumoral α), ligando Fas, TRAIL (ligando indutor da apoptose relacionado com o TNF) entre outras citocinas. Além disso, estudos *in vitro*, mostram que a inibição desta via melhora a capacidade hematopoiética, aumentando o número de células sanguíneas no sangue periférico (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010; Hirai H., 2003). Outro mecanismo que deverá igualmente estar envolvido é a activação das caspases. À medida que a doença progride, alterações na via intrínseca da apoptose tomam lugar, nomeadamente, promovidas pela proteína anti-apoptótica BCL-2, que se pensa ser uma das responsáveis pela transformação leucémica. Além disso, a progressão para LMA tem vindo a ser relacionada com a sobre-expressão do factor de transcrição NF κ B (factor nuclear κ B), que contribui para a inibição da apoptose e promoção da proliferação (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010).

5.3 Stresse oxidativo

Um dos mecanismos envolvidos no processo de morte celular por apoptose pode estar relacionado com o stresse oxidativo (Farquhar M.J. e Bowen D.T., 2003), em particular com a produção de radicais livres de oxigénio (RLO) e a disfunção mitocondrial (Figura 3) (Cortesão E., 2010; Gonçalves A.C., 2008). Vários grupos de estudo encontraram níveis elevados de marcadores oxidativos nos doentes com SMD (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010; Gonçalves A.C., 2008). Este facto apoia a ideia de que as vias pró-oxidantes terão um papel potencial na manutenção/progressão do fenótipo SMD (Farquhar M.J. e Bowen D.T., 2003). Foram identificados polimorfismos em genes que codificam várias enzimas, incluindo aquelas que são responsáveis pelo metabolismo dos carcinogéneos ambientais, enzimas antioxidantes e enzimas de reparação de danos no ADN. Foi verificado que inúmeras destas enzimas estão implicadas na etiologia das SMD (Farquhar M.L. e Bowen D.T., 2003). Alguns estudos mostram aumento da actividade de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, sendo a variação dependente do subtipo de SMD (Gonçalves A.C., 2008).

A hipótese de que lesões secundárias ou adquiridas do ADN e a incapacidade das células afectadas de as repararem com sucesso seria importante na patogénese da SMD, foi colocada quando se observou que doentes a quem tinham sido administrados agentes lesivos do ADN (ex: alquilantes), apresentavam risco acrescido de desenvolver SMD (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010).

Por outro lado, o envelhecimento está associado a um declínio das funções fisiológicas resultando na progressiva e irreversível acumulação de lesão oxidativa (Farquhar M.L. e Bowen D.T., 2003). Graças à ineficácia dos sistemas de reparação os erros acumulam-se, estimulando a apoptose (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010). No entanto, está por esclarecer se o processo oxidativo se trata de uma causa ou se será uma mera consequência de outros processos patogénicos (Farquhar M.L. e Bowen D.T., 2003).

Segundo alguns autores, talvez apenas os clones capazes de resistir e sobreviver a este stresse darão origem a células maduras, uma vez foi demonstrado que o crescimento de progenitores hematopoiéticos pode ser estimulado *in vitro* recorrendo a agentes antioxidantes. Apesar disso, ainda não foi confirmado se o aumento do número

de células resultou da proliferação de células neoplásicas ou da presença de células progenitoras normais residuais (Farquhar M.L. e Bowen D.T., 2003).

5.4 Alterações na regulação do ferro

Existem evidências crescentes que indicam que a desregulação do processamento do ferro pode ter um papel na patogénese de alguns tipos de SMD (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010). O ferro contribui para a formação de radicais livres de oxigénio, que provocam lesão oxidativa (Figura 3) (Farquhar M.J. e Bowen D.T., 2003). Por sua vez, as alterações no ADN e na função da mitocôndria induzida pelos RLO, para além de desregular o metabolismo do ferro e síntese do heme, podem provocar o estímulo da apoptose (Liesveld J.L. *et al.*, 2004). A dúvida é se estes defeitos nas vias reguladoras do metabolismo do ferro estão directamente relacionados com a patogénese da SMD ou se constituem apenas epi-fenómenos (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010; Farquhar M.J. e Bowen D.T., 2003).

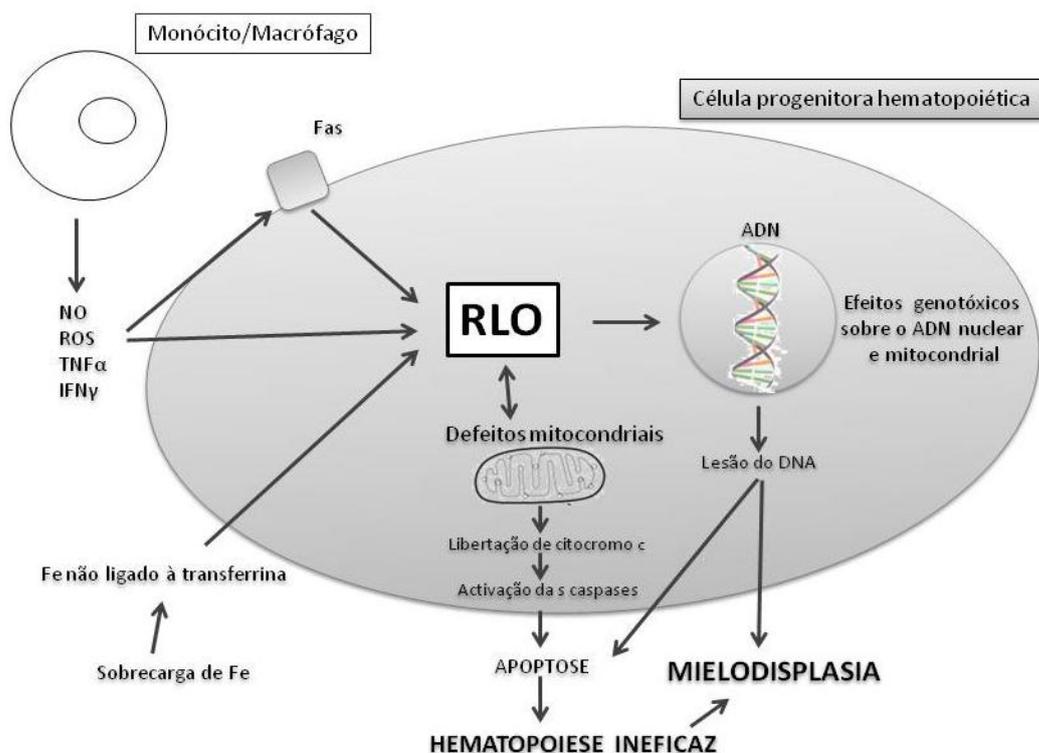


Figura 3 - O papel do dano oxidativo na SMD.

Legenda: RLO – Radicais Livres de Oxigénio; NO – Óxido Nítrico; TNF – *Tumor Necrosis Factor*; INF – Interferão

(Adaptado de Farquhar M.L. e Bowen D.T., 2003 e www.springerimages.com)

O excesso de ferro corporal devido a eritropoiese ineficaz é frequentemente observado nos doentes com SMD logo à apresentação, particularmente no sub-grupo de Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA) (Farquar M.J. e Bowen D.T., 2003). Na ARSA, verifica-se acumulações aberrantes de ferritina nas mitocôndrias dos precursores eritróides, mesmo nos mais precoces dando origem à formação dos chamados sideroblastos em anel (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010). Nestes doentes, a captação de ferro pelos eritroblastos é normal, mas o ferro acumula-se no citoplasma pois a sua entrada na mitocôndria encontra-se reduzida (Farquar M.J. e Bowen D.T., 2003).

Os sideroblastos em anel surgem ainda noutras patologias como, intoxicação por chumbo, tratamento com isoniazida e defeitos hereditários na síntese do heme. Num destes tipos de defeitos congénitos – Anemia sideroblástica ligado ao X e associada a ataxia, o gene comprometido é o ABCB7, que codifica uma proteína membranar responsável pelo transporte de ferro da mitocôndria para o citoplasma, sendo essencial para a hematopoiese. Foi demonstrado que a expressão deste gene está reduzida em doentes com ARSA e Citopenia refractária com displasia multilinhagem e sideroblastos em anel (CRDM-SA) (Jädersten M. e Hellström-Lindberg E., 2010).

A evidência mais marcante de que o excesso de ferro contribui para a hematopoiese ineficaz é o facto de dois terços dos doentes que recebem terapêutica quelante do ferro, verem a sua contagem de plaquetas e neutrófilos aumentada (Farquar M.J. e Bowen D.T., 2003).

5.5 Alterações no sistema imune

Foi descrita a alta prevalência de anomalias imunológicas, nomeadamente de doenças auto-imunes, nos doentes com SMD, o que suporta a ideia de que a falência medular típica da doença pode ser, em parte, mediada pelo sistema imune (Cortesão E., 2010; Farquar M.J. e Bowen D.T., 2003) apesar de ainda se desconhecer o mecanismo subjacente (Cortesão E., 2010).

Existem indícios de que mecanismos imunológicos responsáveis pela regulação de linfócitos B e linfócitos T estão envolvidos em alguns casos de SMD (Liesveld J.L.

et al., 2004). Tem sido demonstrado que os linfócitos T citotóxicos podem ser capazes de inibir a hematopoiese na SMD *in vitro* (Cortesão E., 2010; Liesveld J.L. *et al.*, 2004; Farquar M.J. e Bowen D.T., 2003). Para além disso, algumas características da SMD sobrepõem-se às da anemia aplástica (AA) e da leucemia de linfócitos grandes granulares T (LGL-T), duas entidades provavelmente relacionadas com linfócitos T autoreactivos (Cortesão E., 2010). Corroborando esta ideia, ensaios clínicos demonstraram que o tratamento com globulina antitimócito (GAT) e ciclosporina produzia melhoria hematológica em alguns doentes (Cortesão E., 2010; Liesveld J.L. *et al.*, 2004; Farquar M.J. e Bowen D.T., 2003).

Adicionalmente, estudos concluíram que a concentração sérica e medular de várias citocinas inflamatórias, incluindo o TNF α e o factor de crescimento tumoral (TGF) β , estão elevadas em alguns doentes com SMD (Farquar M.J. e Bowen D.T., 2003).

Foram igualmente encontradas anomalias noutras células do sistema imune como as células dendríticas (Liesveld J.L. *et al.*, 2004).

A hipótese mais provável é a de que a patogénese da SMD se baseia em lesões ou mutações na célula estaminal hematopoiética, seguidas de respostas imunológicas que afectam negativamente a sobrevivência da célula. Isto resulta na aceleração da proliferação (com prejuízo da diferenciação) e morte prematura das células da medula óssea amplificada por citocinas indutoras da apoptose. Com a progressão da doença, a proliferação continua a ser estimulada, no entanto, a apoptose diminui, ocorrendo progressão para LMA (Liesveld J.L. *et al.*, 2004).

5.6 Alterações no microambiente

Para além das células do sistema imune, o microambiente medular é composto por fibroblastos, adipócitos, células endoteliais e por uma matriz proteica que constitui o estroma de suporte medular. Existe uma evidência crescente de que as alterações no estroma podem afectar a hematopoiese na SMD (Cortesão E., 2010).

Foi demonstrado que células estromais derivadas de medula óssea de um doente com SMD são capazes de induzir displasia em células precursoras hematopoiéticas, *in vitro* (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010). Por outro lado, a susceptibilidade genética observada em doentes com SMD pode ser mediada pelo metabolismo do carcinogéneo efectuado pelas células do estroma, que produz substâncias tóxicas para as células hematopoiéticas (Farquar M.J. e Bowen D.T., 2003).

Dados recentes sugerem que as células estromais da medula óssea são importantes na nutrição e suporte das células normais e das células malignas (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010).

Estudos em células estromais encontraram anomalias cromossómicas e alterações na expressão genética num número significativo de células das amostras (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010). Existem ainda alterações na adesão celular nesta população de células (Farquar M.J. e Bowen D.T., 2003). Foi também demonstrado que o sobrenadante estromal apresenta moléculas pró-oxidantes (Farquar M.J. e Bowen D.T., 2003). Além disso, os fibroblastos e macrófagos das medulas de doentes são disfuncionais, apresentando um índice apoptótico aumentado e produção de níveis inadequadamente altos de TNF α e interleucina (IL)-6, respectivamente (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010; Liesveld J.L. *et al.*, 2004; Farquar M.J. e Bowen D.T., 2003). A expressão de mediadores da angiogénese também se encontra alterada, nomeadamente, existe aumento dos níveis de angiogina e de factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Liesveld J.L. *et al.*, 2004).

De acordo com o conhecimento das alterações que ocorrem na SMD procuram-se novos alvos terapêuticos. A expressão anormal de citocinas e o aumento da angiogénese levou ao estudo de agentes moduladores destes mecanismos como potenciais alvos terapêuticos. São exemplos: anticorpos anti-VEGF, talidomida e seus derivados, e amifostina (Liesveld J.L. *et al.*, 2004; Farquar M.J. e Bowen D.T., 2003). Estão em fase de desenvolvimento estratégias terapêuticas cujo alvo é a interacção entre células malignas e o seu microambiente (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010). Uma possibilidade seria a inactivação da interacção entre o receptor da quimiocina CXCR4 e o seu ligando CXCL12 na tentativa de mobilizar as células do seu microambiente, tornando-as mais susceptíveis à acção dos fármacos. Apesar de promissora, a utilidade

desta estratégia na SMD ainda não foi demonstrada (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010).

Permanece a dúvida se estas alterações precedem o desenvolvimento das SMD ou se são efeitos secundários induzidos pela expansão do clone SMD. O desafio é perceber as implicações funcionais de cada lesão e a interacção entre si (Jädersten M. e Hellström-Lindberg E., 2010).

Apesar de inúmeras anomalias no microambiente da medula óssea e no sistema imune dos doentes com SMD já terem sido identificadas, a atenção dos cientistas continua a focar-se na identificação de defeitos na célula estaminal hematopoiética (Nimer S.D., 2008). O estudo da biologia da SMD é um desafio, visto que se trata de uma doença rara e o diagnóstico de certeza é maioritariamente morfológico. Cada categoria de SMD inclui numerosas sub-categorias com origem genética e formas de desregulação do sistema imune diversas (Jädersten M. e Hellström-Lindberg E., 2010).

O paradoxo da doença, que reside no simultâneo aumento da proliferação e apoptose, sugere que agentes terapêuticos anti-proliferativos e anti-apoptóticos devam ser usados em conjunto. Enquanto agentes anti-apoptóticos parecem ter um efeito protector em fases precoces da doença; agentes anti-proliferativos são lesivos, servindo apenas para agravar as citopenias periféricas. Como, aparentemente, as anomalias do microambiente e de carácter imunológico parecem ser apenas fenómenos secundários, agentes terapêuticos direccionados para a produção anormal de citocinas ou modulação do sistema imune, são pouco prováveis de eliminar o clone, mas, em alguns casos, podem ser responsáveis por melhorias clínicas importantes (Liesveld J.L. *et al.*, 2004).

5.7. Anomalias genéticas mais comuns

Na SMD existem três tipos de classes de mutações genéticas, classe I, II e III. As mutações de classe I envolvem mutações activadoras das proteínas da via de sinalização celular mediada por receptores de tirosina-cinase (RTK), como, por exemplo, os receptores FLT3, c-KIT, c-FMS ou as proteínas RAS e RAF. Estas mutações conferem aumento da capacidade proliferativa da célula. Por outro lado, as mutações de classe II inactivam genes codificantes de factores de transcrição hematopoiéticos, como o

AML1, c/EBP α (*CCAAT-enhancer-binding proteins*) e MLL, levando à alteração na diferenciação celular. As mutações de classe III inativam genes supressores tumorais como o *p53*, conduzindo a uma vantagem proliferativa por parte das células mutadas (Pedersen-Bjergaard J. *et al.*, 2007; Christiansen D. *et al.*, 2005; Gilliland D. *et al.*, 2004).

Com mencionado, tem sido referido o envolvimento de várias vias de tradução de sinal, nomeadamente, a via de sinalização envolvendo as proteínas RAS (Figura 4).

A proteína RAS está associada uma molécula de GTP, a RAS/GTP, constituindo a forma activa da proteína capaz de interagir com a proteína-alvo, a proteína RAF. Por hidrólise, passa à sua forma inactiva, a RAS/GDP. Para que retorne à sua forma activa, carece da contribuição da proteína GEP (proteína trocadora de nucleótidos de guanina), mediante a activação do receptor de tirosina cinase (Hirai H., 2003).

As mutações pontuais nos genes *RAS* têm sido descritas com uma prevalência de aproximadamente 10 a 15% na SMD (Tabela 7) (Davids M.S. e Steensma D.P, 2010; Hirai H., 2003). Afectam mais frequentemente a isoforma N-RAS, seguindo-se a K-RAS e por fim a H-RAS (Morgan M.A., Reuter C.W.M., 2006; Bowen D.T. *et al.*, 2005; Christiansen D. *et al.*, 2005). A mutação pontual nos codões 12, 13 e 61, promove a activação constitutiva desta proteína por perda da sua capacidade de GTPase. A proteína RAS mutada não apresenta actividade de GTPase, o que leva ao aumento do tempo de semi-vida do complexo RAS-GTP mutante e, subsequentemente, a activação persistente de vias de sinalização a jusante (Bowen D.T. *et al.*, 2005; Hirai H., 2003) envolvidas na proliferação celular, organização do citoesqueleto e quimiotaxia, como a via RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK), a via PI3K-AKT e a via RAC-RHO (Figura 4) (Liesveld J.L. *et al.*, 2004), que culminam na activação de factores de transcrição nucleares (Hirai H., 2003).

A mutação no gene *N-RAS* confere menor sobrevivência e maior probabilidade de desenvolver LMA, sugerindo o seu envolvimento na expansão clonal e na transformação leucémica (Hirai H., 2003).

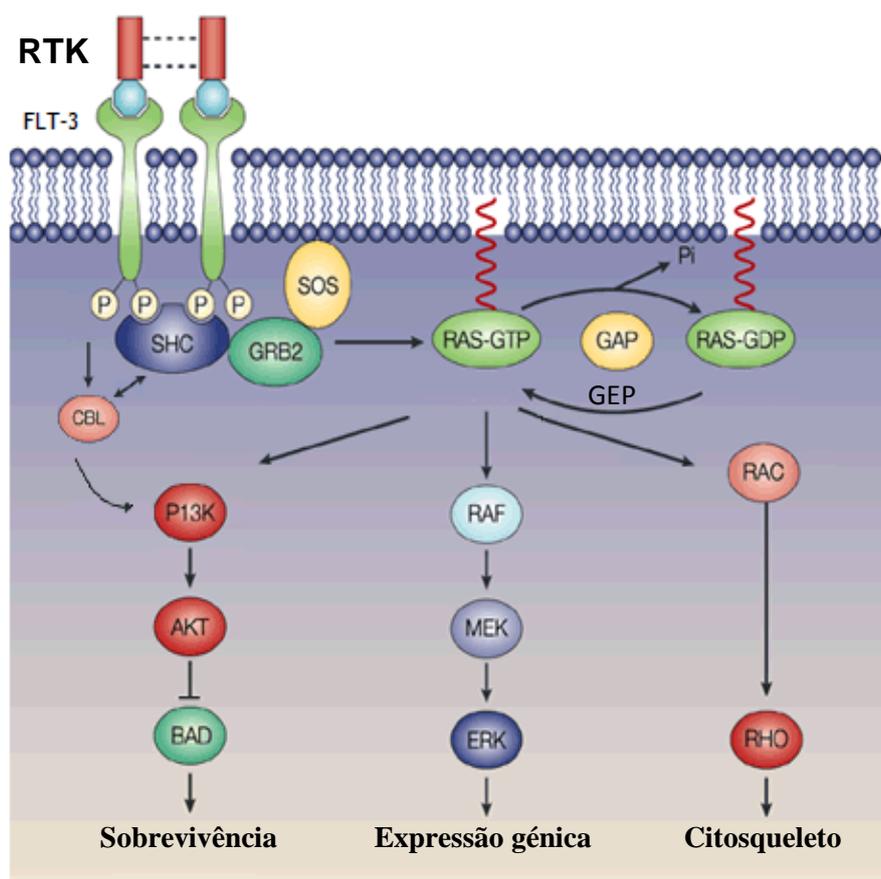


Figura 4 - Vias de sinalização activadas por receptores com actividade de tirosina cinase (RTK). Está representado a sinalização mediada pelo receptor FLT-3 e consequente activação de vias de sinalização a jusante do receptor, onde a proteína RAS desempenha um papel essencial (Adaptado de Stirewalt D.L., Radich J.P., 2003; www.nature.com).

Nas SMD as mutações nos genes *RAS* estão frequentemente associadas a mutações pontuais em outros genes, actuando em conjunto e/ou isoladamente para o desenvolvimento de mielodisplasia (Tabela 7) (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010).

Tabela 7 - Alterações genéticas moleculares na SMD e características associadas

Gene	Frequência	Papel usual	Características distintivas
<i>P53</i>	> 20% (em alto risco)	Gene supressor tumoral ubiquitário em tumores humanos	Normalmente associado a MDS secundária; mau prognóstico independentemente do IPSS
<i>AML1 (RUNX1)</i>	20%	Factor de transcrição com papel regulador - componente do <i>core binding factor</i>	É mais comum em SMD avançada e secundária ao tratamento; está associada a mau prognóstico
<i>TET2</i>	15-20%	Catalisa a reacção de desmetilação da citosina	Estas mutações estão associadas a bom prognóstico; sob investigação pelo possível papel preditor da

			resposta a hipometilantes
RAS	10-15%	Cinase com papel chave nas vias de transdução de sinal, comumente mutada nos tumores humanos	Mau prognóstico; risco acrescido de transformação leucémica
ASXL1	11%	<i>Chromatin-binding protein</i> que activa o receptor do ácido retinóico	Associada a doença de alto risco, provavelmente estimula a proliferação visto que é mais prevalente em NMP e SMD/NMP do que em SMD
ATRX	Até 8%	Proteína associada à cromatina importante na eritropoiese	Mutada nas α talassémias e SMD; sob investigação acerca do possível papel preditor da resposta a agentes hipometilantes
MDS1-EVII	2%	Regulador da transcrição	Translocações estão associadas a mau prognóstico e a trombocitose relativa
CBL	< 1%	Degrada o receptor tirosina cinase por ubiquitinação	Associada a doença de alto risco; provavelmente estimula a proliferação visto que é mais prevalente em NMP e SMD/NMP do que em SMD
IER3	desconhecido	Sobre-regulado na resposta celular ao stresse, resultando em apoptose	A sua expressão está diminuída nos estadios precoces da doença e aumentada nos estadios avançados
UTX	desconhecido	Histona demetilase; modificação da histona pós-translacional	Não está confirmada a sua alteração na SMD; sob investigação acerca do possível papel preditor da resposta a agentes hipometilantes
RPS14	desconhecida	Essencial para a formação da subunidade 40S do ribossoma	Contribui para o defeito na eritropoiese na Síndrome 5q-; haploinsuficiência é suficiente para a expressão fenotípica
miR-145 e miR-146^a	desconhecida	Micro-RNA; influencia sobre a regulação genética	Haploinsuficiência contribui para trombocitose no Síndrome 5q-
CD25c e PP2A	desconhecida	Fosfatases do ciclo celular que co-regulam os pontos de paragem G2 e M	Sobre-expressão pode conferir resistência ao tratamento com lenalidomida no Síndrome 5q-
SPARC	desconhecida	Proteína anti-adesiva com prováveis propriedades pró-apoptóticas	A deleção pode originar protecção das células malignas pelo estroma e resistência ao tratamento com lenalidomida
FLT3	3-5%	Tirosina cinase que promove a proliferação mieloide	Mutações são comuns nos doentes de alto risco; provavelmente contribui para a transformação leucémica

(Adaptado de Davids M.S. e Steensma D.P., 2010)

Entre estes genes, o gene que codifica um receptor membranar do tipo tirosina cinase, o gene *FLT3*, é o mais frequentemente mutado na Síndrome Mielodisplásica, com uma incidência de cerca de 3 a 5% dos casos de SMD (Tabela 7). Este gene codifica uma proteína que está envolvida na proliferação e diferenciação dos precursores hematopoiéticos. As Duplicações Internas em Tandem (ITD) e as mutações pontuais são as alterações que ocorrem mais frequentemente no gene *FLT3*, afectando, respectivamente, a codificação da região justamembranar e o domínio de cinase (TKD) do receptor FLT3 (Parcells B.W. *et al.*, 2006; Morgan M.A., Reuter C.W.M., 2006; Small D., 2006). No entanto, a alteração mais comum é a duplicação ITD e confere vantagem proliferativa à célula neoplásica. Esta anomalia parece ser um evento genético tardio na evolução da doença e os doentes com esta mutação apresentam mau prognóstico, sugerindo que a duplicação estará associada à transformação leucémica (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010; Hirai H., 2003).

Outro gene envolvido é o *P53*, o mais conhecido dos genes supressores tumorais (Tabela 7). Desempenha múltiplas funções, nomeadamente a promoção do bloqueio do ciclo celular em G1, activação da apoptose e dos mecanismos de reparação do ADN. Assim, a sua inactivação e/ou silenciamento, através de mutações ou deleções em ambos os alelos, e/ou por hipermetilação, respectivamente, predispõe à transformação neoplásica. Mais de 20% dos doentes com SMD apresentam alterações neste gene, a maioria dos quais são SMD de alto risco. Salienta-se os casos de SMD-t com cariótipo complexo e prognóstico desfavorável (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010; Hirai H., 2003).

O gene *AML1* (*RUNX1 - Runt-related transcription factor 1*) localiza-se no cromossoma 21q22 e codifica um factor de transcrição essencial para a hematopoiese. As mutações pontuais deste gene podem ser encontradas em cerca de 20% dos doentes com SMD, principalmente SMD-t (Tabela 7). Estas tendem a estar associadas a estádios mais avançados da doença e a pior prognóstico (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010). Evidências adicionais acerca do papel que as alterações neste gene podem ter na patogénese da SMD, provêm dos estudos de famílias com Doença Plaquetar Familiar, que apresentam uma mutação *missense* neste gene e predisposição para LMA (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010).

O gene *TET2* (*Ten-Eleven Translocation Oncogene Family Member 2*) é um gene supressor tumoral que está localizado no braço longo do cromossoma 4 (4q24). Codifica uma família de proteínas com função catalítica, dioxigenases da metilcitosina, essenciais no mecanismo de regulação da expressão génica (metilação do ADN) (Strausberg R.L. *et al.*, 2002; Hussein K. *et al.*, 2010). Neste sentido, as proteínas da família TET, parecem desempenhar um papel na regulação epigenética dos genes envolvidos na hematopoiese, em particular na mielopoiese. Mutações somáticas deste gene, que comprometem a actividade catalítica da proteína, foram identificadas em doentes com neoplasias mielóides em frequência variável (cerca de 15%). Alguns estudos sugerem que a percentagem de doentes com SMD portadores desta mutação será cerca de 20% e, que esta mutação será adquirida provavelmente no início da patogénia da doença, sendo mais comum nos doentes de baixo risco (Tefferi A. *et al.*, 2009; Abdel-Wahab *et al.*, 2009; Jankowska *et al.*, 2009). Além disso, pode ser ainda um potencial indicador da sensibilidade aos moduladores epigenéticos, nomeadamente aos agentes hipometilantes, visto que os genes da família *TET* desempenham um papel importante na regulação da metilação do ADN, como mencionado (Tabela 7) (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010).

O gene *ASXL1* situado no cromossoma 20q11.1 codifica uma *chromatin-binding protein* que activa o receptor do ácido retinóico. Está associado a SMD de alto risco. No entanto, o mecanismo através do qual a mutação neste gene contribui para a patogénia da SMD ainda não está esclarecido (Tabela 7) (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010).

O gene *CBL* é um proto-oncogene localizado no cromossoma 11q23, que se encontra envolvido na degradação do RTK. A sua inactivação resulta na sobre-expressão de receptores, condicionando aumento da proliferação e vantagem na sobrevivência da célula mutada. Está associado a SMD de alto risco e confere um mau prognóstico (Tabela 7) (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010).

O gene *RPS14* localiza-se no cromossoma 5q (numa região habitualmente delectada num subtipo de SMD, a síndrome 5q-) e codifica a proteína ribossomal S14, parte integrante da sub-unidade ribossomal 40S necessária ao funcionamento da maquinaria das ribossomas. Esta proteína é essencial no processo de diferenciação eritróide. Mutações associadas a perda da função de genes de outros componentes ribossomais idênticos ao RPS14 (ex: RPS19 e RPS24) ocorrem em síndromes

congênitos como a anemia de Diamond-Blackfan, que partilham características histológicas e clínicas com as SMD (Tabela 7) (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010).

Os genes *CDC25c* e *PP2A* estão também localizados no cromossoma 5q, e codificam fosfatases reguladoras do ciclo celular, promovendo o bloqueio do ciclo entre as fases G2 e M. A sua expressão é inibida *in vitro* pela lenalidomida, provocando paragem do ciclo e apoptose subsequente. Deste modo, a sobre-expressão destes genes pode ser responsável pela resistência ao tratamento com lenalidomida no casos de síndrome 5q- (Tabela 7) (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010; Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009).

Ainda no braço longo do cromossoma 5 (5q) localiza-se o gene *SPARC* (*secreted acidic cysteine rich glycoprotein*), um gene supressor tumoral que codifica um factor regulador das interacções célula-estroma com propriedades anti-adesivas e indutor da apoptose. A haploinsuficiência deste gene favorece a adesão das células malignas ao estroma, conferindo protecção contra os efeitos dos agentes terapêuticos como a lenalidomida. A sua expressão *in vitro* aumenta na presença de lenalidomida (Tabela 7) (Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009; Davids M.S. e Steensma D.P., 2010).

Mais dois genes localizados no 5q, os genes *CNNTA1* e *ERGI*, têm sido implicados na SMD. O primeiro codifica a catenina $\alpha 1$ e está sub-expresso na célula estaminal sendo um dos responsáveis pela iniciação leucémica (Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009). O segundo é um factor de transcrição e possível gene supressor tumoral, que desempenha um papel de relevo na quiescência das células estaminais (Jädersten M. e Hellström-Lindberg E., 2010).

O gene *p15INK4B* é um gene supressor tumoral importante na regulação do ciclo celular, cuja expressão é induzida pelo factor de crescimento TGF- β . Funciona como inibidor dos complexos de cinases dependentes de ciclina (CDK), em particular dos complexos CDK4 e CDK6. Este gene, assim como outros supressores tumorais estão, frequentemente, inactivados em tumores malignos. Um dos mecanismos de inactivação/silenciamento é a hipermetilação, permitindo-lhe escapar à regulação pelo TFG- β . Esta alteração tem sido observada em 30 a 50% dos casos de SMD e está correlacionada com a percentagem de blastos presentes na medula óssea, o risco de evolução para LMA e prognóstico desfavorável, o que sugere que a hipermetilação do

gene p15 desempenha um papel de relevo na patogénese das SMD de alto risco (Hirai H., 2003) e de baixo risco (Cortesão E., 2010).

Apesar de algumas mutações serem específicas para certas categorias de SMD, outras parecem ser transversais a todos os sub-tipos (Jädersten M. e Hellström-Lindberg E., 2010). Como a maior parte dos genes referidos contribuem para a diferenciação das células hematopoiéticas, faz sentido que as suas alterações confirmem desequilíbrio ou bloqueio do desenvolvimento normal da célula estaminal hematopoiética, que se traduz na SMD por hematopoiese ineficaz (Hirai H., 2003). O desafio consiste em saber quais destas alterações são determinantes no desenvolvimento e progressão da SMD, quais podem vir a ser alvos terapêuticos e quais são meros espectadores não tendo influência na história natural da doença (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010). Por exemplo, a ocorrência de mutações em factores de transcrição, estará associado à evolução no sentido da SMD, mas, normalmente não são encontradas nas SMD *de novo* (Liesveld J.L. *et al.*, 2004).

Só recentemente foi possível correlacionar as alterações citogenéticas relacionadas com a SMD com a sua expressão a nível molecular. No entanto, esta pesquisa tem sido dificultada pelo facto das alterações cromossómicas mais comuns cursarem com perda de material genético (List A.F. *et al.*, 2004). Além disso, o conjunto das alterações moleculares descritas até à data constitui uma minoria das que estarão por detrás desta complexa patologia. Técnicas de estudo molecular cada vez mais modernas vão-nos permitir estudar o genoma de forma mais aprofundada e conhecer outras alterações genéticas associadas à SMD. Por outro lado, ao adquirir um conhecimento mais profundo acerca da origem desta patologia vamos melhorar a nossa capacidade de tratar os doentes com SMD de forma mais eficiente (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010).

5.8. Alterações epigenéticas

Para além das alterações genéticas serem imprescindíveis na patogénese da SMD, as alterações epigenéticas também influenciam significativamente o fenótipo da doença, contribuindo para a alteração das vias de sinalização envolvidas no

crescimento, na regulação do ciclo celular e na apoptose. No entanto, o modo como cada um destes mecanismos interfere com a SMD difere do estágio e/ou dos subtipos de SMD.

O termo epigenética refere-se a um número de modificações bioquímicas da cromatina que, não alterando a sequência primária do ADN, têm um importante papel na regulação e controlo da expressão génica. As modificações epigenéticas podem ocorrer a nível do ADN, nos dinucleótidos CpG (ex.: metilação e desmetilação do ADN), e/ou afectar a estrutura das proteínas da cromatina (código das histonas, ex.: acetilação e desacetilação das histonas), entre outras, ambas potencialmente reversíveis (Yoo C.B., 2006; Esteller M., 2008).

Assim, numa célula sem alterações, ocorre normalmente hipermetilação global do genoma e hipometilação localizada, sendo que a metilação está associada à inactivação da transcrição do gene correspondente (Figura 5). Este perfil de metilação altera-se em vários tipos de neoplasias, como representado na figura 5, levando ao silenciamento de genes supressores tumorais (Herman J. G., 2003).

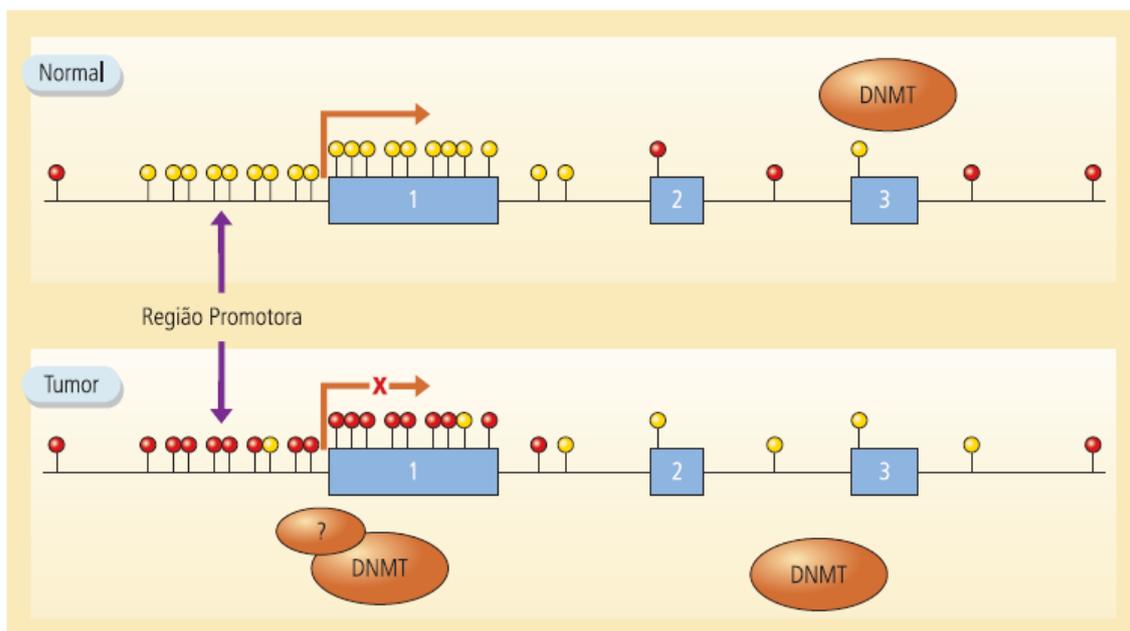


Figura 5 - Perfil de metilação dos dinucleótidos CpG no genoma humano. A figura representa as diferenças entre o padrão de metilação de uma célula normal e e o de uma célula cancerígena. Os círculos a amarelo representam as ilhas CpG não metilados e os a vermelho representam as ilhas CpG metilados. (Adaptado de Herman J. G., 2003; E Cortesão 2010).

A presença de mutações em genes reguladores do ciclo celular, como o p15, p16 e p19, têm sido raramente descritas na SMD. Pelo contrário, a hipermetilação do promotor dos genes p15INK4B e p16 tem sido observada em 30 a 50% destes doentes (Cortesão E., 2010), correlacionando-se com a percentagem de blastos medulares (Quesnel B. *et al.*, 1998; Uchida T. *et al.*, 1997). Além disso, o grau de metilação correlaciona-se com o prognóstico e risco de evolução para LMA (Quesnel B., 1998). De facto, a inativação deste gene tem vindo a ser associada com o risco de evolução da doença para LMA, conferindo mau prognóstico (Hirai H., 2003).

Deste modo, a regulação epigenética aberrante, juntamente com as modificações genéticas, permitem a fuga aos mecanismos de controlo de crescimento, diferenciação e morte, originando o fenótipo maligno das células cancerígenas (Feinberg A.P., Tycko B., 2004; Herman J.G., 2003).

Na figura 6 está representado um esquema que resume os principais genes alterados na SMD, enquanto na figura 7 se pode observar os principais mecanismos celulares e moleculares com evidência das vias de sinalização alteradas.

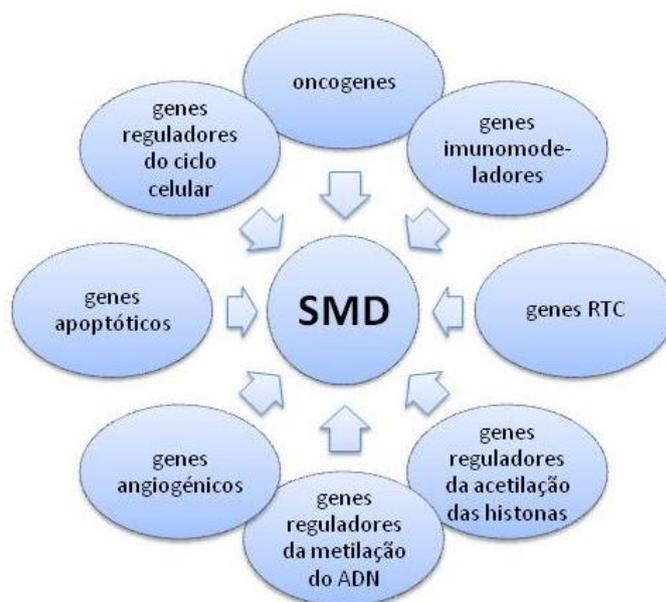


Figura 6 – Genes desregulados na SMD. (Adaptado de Nishino H.T. e Chang C.C., 2005)

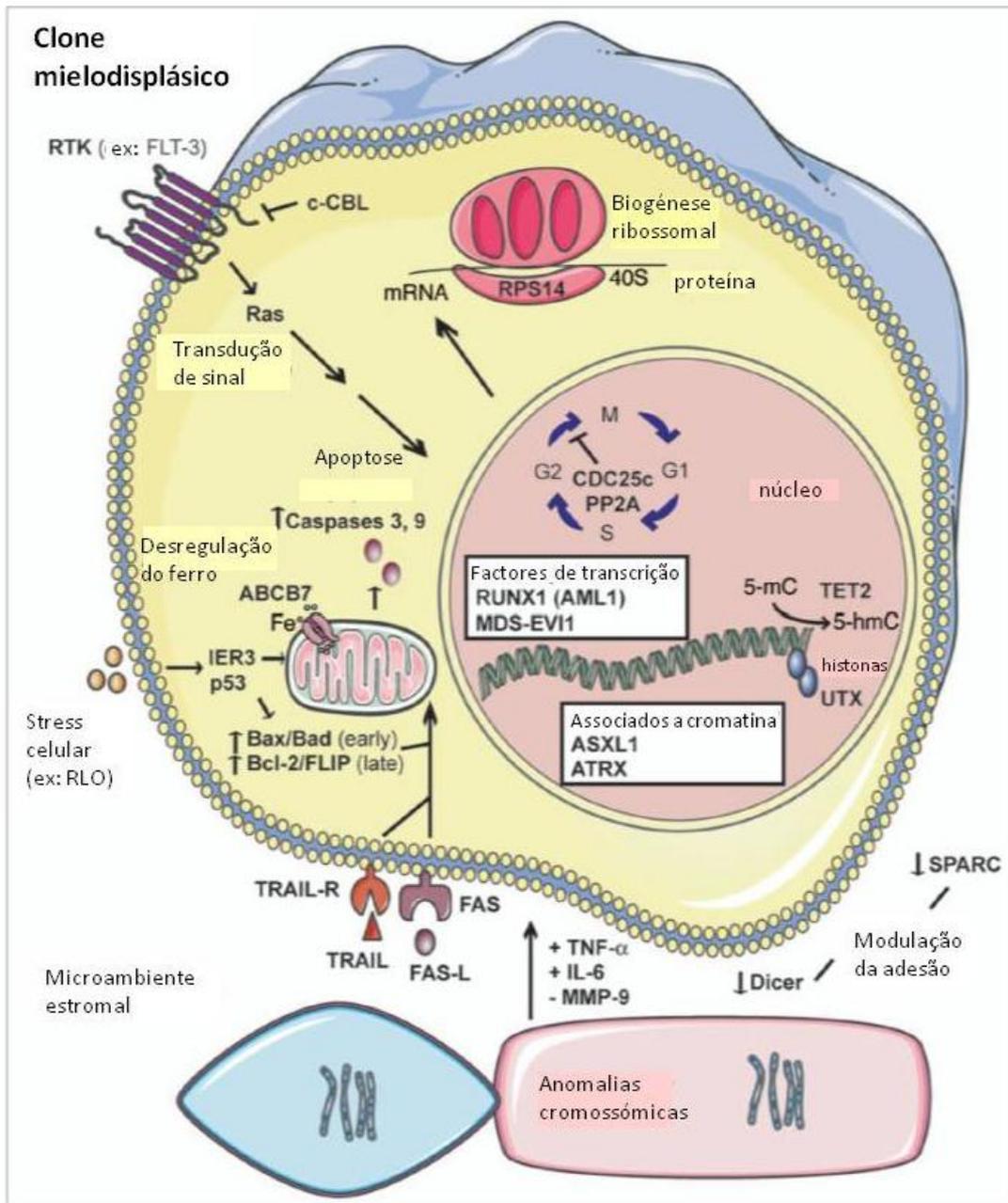


Figura 7 - Modelo geral das vias de sinalização e biologia celular subjacentes à SMD. (Adaptado de Davids M.S. e Steensma D.P., 2010)

6. CLASSIFICAÇÃO

No ano de 1976, um grupo de cientistas publicou uma proposta de classificação das SMD que foi revista em 1982 e se tornou largamente usada. Este sistema denomina-se de *French-American-British* (FAB) (Tabela 8) (Steensma D.P., Tefferi A., 2003). O FAB contém 5 subtipos diferentes de SMD, com base na morfologia das células sanguíneas e nas características da medula óssea (número de blastos) (Jansen J.H. e Langemeijer S.M.C., 2010).

O período de sobrevivência e o tempo de transformação maligna varia consoante o grupo FAB, permitindo uma previsão prognóstica e, em alguns casos antecipar a resposta à terapêutica (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008). Assim, dividimos os doentes em baixo risco, que apresentam relativa estabilidade ao longo do tempo; e em alto risco que tendem a progredir para LMA rapidamente (Steensma D.P. e Tefferi A., 2003).

Tabela 8 - Classificação FAB (1982) para as SMD

Classificação	Características		Diagnósticos
	<u>SP</u>	<u>MO</u>	
Anemia refratária (AR)	Citopenia em 1 linhagem ≤ 1% blastos	normo ou hiper celular com displasia < 5% blastos < 15% sideroblastos em anel	10-40 %
Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA)	Citopenia em 1 linhagem ≤ 1% blastos	normo ou hiper celular com displasia < 5% blastos ≥ 15% sideroblastos em anel	10-35%
Anemia refratária com excesso de blastos (AREB)	Citopenia em ≥ 2 linhagens Displasia em 3 linhagens < 5% blastos	5-19% blastos	25-30%
Anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t)	Citopenia em ≥ 2 linhagens Displasia em 3 linhagens > 5% blastos ou bastonetes de Auer	20-29% blastos ou bastonetes de Auer	10-30%
Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)	Monocitose (>1x10 ⁹ /l monócitos) < 5% blastos	≤ 20% blastos	10-20%

(Adaptado de NCCN, 2011, Malcovati L. e Nimer S.D., 2008; Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006; Nishino H.T. e Chang C.-C., 2005)

As diferentes características morfológicas e tempos de sobrevivência entre os doentes reflectem a heterogeneidade das SMD mesmo entre subgrupos (Farquhar M.L. e Bowen D.T., 2003). Deste modo, a heterogeneidade dos resultados clínicos dentro de um subtipo da classificação FAB levou ao desenvolvimento de sistemas de prognóstico por pontuação, que incorporam variáveis biológicas como o cariótipo, além da percentagem de blastos e do número de citopenias, que será mencionado posteriormente (Farquhar M.L. e Bowen D.T., 2003).

O problema desta classificação é que muitos casos de SMD não são fáceis de encaixar na classificação como acontece com a SMD com fibrose medular, a SMD hipocelular ou a SMD caracterizada por trombocitopenia e/ou neutropenia na ausência de anemia (Steensma D.P. e Tefferi A., 2003). Por outro lado, há falta de homogeneidade dentro de cada grupo, além de não refletir a biologia da doença, como o número de linhagens com displasia (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

Em 2001, a OMS baseou-se nesta classificação já implementada para criar uma nova. Desde então, esta tem sofrido actualizações, tendo sido publicada uma actualização em 2008 (Tabela 9) (Jansen J.H. e Langemeijer S.M.C., 2010). Esta classificação incorpora características morfológicas, citogenéticas e imunológicas para estabelecer a linhagem e o grau de maturação das células neoplásicas (Farquhar M.L. e Bowen D.T., 2003). Os critérios foram refinados e a atribuição de prognóstico às classes de risco intermédio foi melhorada (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008). Assim, os subtipos correlacionam-se melhor com o prognóstico, resposta ao tratamento e progressão para leucemia do que os da classificação FAB (Cortesão E., 2010).

Tabela 9 - Classificação OMS (2001) para as SMD

Classificação	Características		Diagnóstico	Classe FAB
	<i>SP</i>	<i>MO</i>		
Citopenia refratária com displasia unilinhagem (CRDU)	Uni ou bi citopenia Blastos Ø ou raros	displasia ≥ 10% células de 1 linhagem < 5% blastos < 15% sideroblastos em anel		AR
Anemia refratária com	Anemia Blastos Ø	Displasia eritróide isolada < 5% blastos	5-10%	ARSA

sideroblastos em anel (ARSA)		≥ 15% sideroblastos em anel		
Citopenia refratária com displasia multilinhagem (CRDM)	Citopenia(s) <1x10 ⁹ /L monócitos Blastos Ø ou raros	Displasia ≥10% células de ≥2 linhagens < 5% blastos +/-15% sideroblastos em anel	0-15%	
Anemia refratária com excesso de blastos-1 (AREB-1)	Citopenia(s) ≤ 2-4% blastos <1x10 ⁹ /L monócitos	Displasia em 1 ou várias linhagens Ø bastonetes de Auer 5-9% blastos	20%	AREB
Anemia refratária com excesso de blastos-2 (AREB-2)	Citopenia(s) 5-19% blastos <1x10 ⁹ /L monócitos	Displasia em 1 ou várias linhagens +/- bastonetes de Auer 10-19% blastos	20%	AREB
SMD não classificável (SMD-NC)	Citopenias	Displasia em 1 linhagem ou Ø displasia Características citogenéticas de SMD < 5% blastos	variável	
SMD associada a del(5q) isolada	Anemia Plaquetas N ou ↑	Displasia eritróide isolada < 5% blastos Del(5q) isolada	< 5%	

(Adaptado de NCCN, 2011; Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006)

As principais mudanças consistiram em:

- 1) Diminuição do limiar de blastos presentes na MO necessário para classificar como LMA (desceu de 30% para 20%) (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008). Apesar de em alguns casos, o diagnóstico de LMA ser óbvio, em outros é difícil de estabelecer uma diferença clara entre SMD e LMA. Assim, o limiar arbitrário estabelecido pelo FAB foi redefinido pela OMS com prejuízo da classe AREB-t (Steensma D.P., Tefferi A., 2003);
- 2) Subdivisão de AREB em duas categorias de acordo com número de blastos no SP e MO (menor e maior que 10%) (Steensma D.P. e Tefferi A., 2003), devido à importância atribuída ao número de blastos no prognóstico e necessidade de uma classe intermédia entre AREB e LMA (Steensma D.P. e Tefferi A., 2003);

- 3) Inclusão de informação acerca do número de linhagens com displasia. Uma vez vários estudos demonstraram que a presença de displasia multilinhagem acarreta pior prognóstico do que displasia em linhagem única é relevante incluir esta informação (Steensma D.P. e Tefferi A., 2003);
- 4) Transferência da Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC) para o grupo das doenças mielodisplásicas/mieloproliferativas;
- 5) A síndrome 5q- passou a ser considerada isoladamente (List A.F. *et al.*, 2004);
- 6) Para casos atípicos, que não se encaixam em nenhuma das categorias, surgiu um novo sub-tipo de SMD – a SMD não classificável, que se espera que venha a desaparecer à medida que o conhecimento sobre a doença avançar (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006);

No geral, os doentes podem ainda ser classificados em:

Baixo risco – se apresentam citopenias refratárias e baixa carga leucémica, juntamente com aumento marcado da apoptose e proliferação. A linhagem eritróide é, usualmente, a mais afectada, e os blastos constituem menos de 10% do número total de células nucleadas da MO (Farquhar M.L. e Bowen D.T., 2003);

Alto risco – se a SMD se acompanha de baixo índice apoptótico com a elevação correspondente da percentagem de blastos. Além disso, existe habitualmente maior frequência de anomalias citogenéticas (Farquhar M.L. e Bowen D.T., 2003).

7. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Na SMD existe uma variabilidade clínica significativa que reflete a diversidade e complexidade dos defeitos genéticos subjacentes (Cortesão E., 2010) e que também está dependente do tipo de células sanguíneas e medulares afectadas (Barzi A. e Sekeres M.A., 2010).

Aproximadamente metade dos indivíduos está assintomática na altura do diagnóstico que é feito no decurso de um hemogramas de rotina (Hofmann W.K., Koeffler H.P., 2005) ou na sequência da investigação complementar de uma anemia (Barzi A. e Sekeres M.A. 2010).

O quadro mais frequente reflete a afecção dos eritrócitos e os doentes apresentam sintomas de anemia: palidez cutânea e mucosa, hipotensão, taquicardia, cefaleias, astenia, dispneia de esforço e intolerância ao exercício (Bazi A., Sekeres M., 2010). Anemia moderada a grave é observada em 60% dos casos (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

Um terço dos doentes apresenta infecções recorrentes (Hofmann W.K., Koeffler H.P., 2005). Pneumonias bacterinas e abscessos cutâneos são as infecções mais comuns, ocorrem, particularmente, em doentes com contagens de neutrófilos inferiores a $1 \times 10^9/L$ (Hoffbrand A.V. *et al.*, 2005). No entanto, apenas uma pequena parte dos doentes que apresentam neutropenia sofrem infecções recorrentes. Este facto limita o uso de antibióticos com intuito profilático (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

Manifestações hemorrágicas como petéquias, hematomas e hemorragias mucosas, após traumas mínimos, são raras, tendo em conta a frequência de trombocitopenia (Hofmann W.K., Koeffler H.P., 2005), e surgem quando a contagem de plaquetas é inferior a $20 \times 10^9/L$ (Cortesão E., 2010). Menos de 10% dos doentes apresentam hemorragias graves, como hemorragias gastro-intestinais, hematúria macroscópica e hemorragia retiniana ou intracraniana (Hofmann W.K., Koeffler H.P., 2005).

Anomalias funcionais e morfológicas das células sanguíneas são comuns nas SMD e tendem a agravar as consequências das citopenias. Estes defeitos incluem: nos

eritrócitos – talassémias α e β e alterações da membrana e enzimáticas; nos neutrófilos – pseudo-Pelger-Huet e hipogranulação, que condiciona actividade microbicida e quimitaxica diminuída; nas plaquetas – disfunção nos fenómenos de activação e agregação, com défices no armazenamento ou baixa expressão de glicoproteínas de superfície (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

As adenopatias, esplenomegália ou hepatomegália são raras (WHO, 2008; Hoffbrand A.V. *et al.*, 2005). Alguns doentes apresentam sintomas sistémicos e características idênticas às patologias auto-imunes (Nimer S.D., 2008). Esta situação pode dever-se à associação existente entre a SMD e algumas doenças raras de cariz imunológico, como é o caso da dermatose neutrofílica aguda (Síndrome de Sweet), o pioderma gangrenoso, a vasculite cutânea e a policondrite recidivante (Cortesão E., 2010).

O maior problema em termos clínicos destes doentes é as comorbilidades subsequentes às citopenias e a potencial evolução para LMA (Greenberg, P.L. *et al.*, 2011).

Na história clínica deve estar clarificado a altura de início, a evolução e a gravidade dos sintomas relacionados com a citopenia. É ainda importante conhecer a medicação habitual do doente assim como as suas comorbilidades, história transfusional e exposição a agentes de quimioterapia. A história familiar deve ser igualmente explorada (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

8. CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS

8.1 Hemograma

A falência medular pode levar a anemia, neutropenia e trombocitopenia isoladas ou combinadas sendo este o achado dominante nas SMD (Hofmann W.K., Koeffler H.P., 2005).

Perante o hemograma, a anemia é um achado quase universal (está presente em 80% dos indivíduos à data do diagnóstico) (Hofmann W.K., Koeffler H.P., 2005). Aproximadamente 30 a 50% dos doentes apresentam pancitopenia, enquanto 20% têm anemia em combinação com neutropenia ou trombocitopenia (bicitopenia) (Hoffbrand A.V. *et al.*, 2005).

Cerca de metade dos doentes com anemia apresentam um valor de hemoglobina inferior a 10 g/dl (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). A anemia associada às SMD é, normalmente, macrocítica, mas também pode ser normocítica (Barzi A., Sekeres M., 2010). Anemia microcítica ou hipocrômica sugere hemoglobinopatia hereditária ou adquirida, deficiência de ferro concomitante ou ambas (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). Os macrócitos nas SMD apresentam conformação oval; caso sejam detectados exclusivamente macrócitos redondos é de suspeitar de endocrinopatia, defeito no metabolismo do colesterol ou patologia hepática (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). Pode ainda ser determinada a contagem de reticulócitos que, normalmente, é baixa na SMD, devido a anemia do tipo hipoproliferativo ser a mais comum. Apesar disso, o número de reticulócitos não apresenta qualquer valor prognóstico (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

A leucopenia afecta, aproximadamente, 25 a 30% dos doentes (Hofmann W.K., Koeffler H.P., 2005). Cerca de 40% apresentam neutropenia, e esta agrava-se com a evolução da doença, enquanto 30 a 45% dos casos tem trombocitopenia. A neutropenia ou a trombocitopenia podem ser detectadas na ausência de anemia. Este tipo de apresentação pode levar a confusão com outras causas, como neutropenia congénita ou de causa imunológica, efeito de fármacos ou trombocitopenia auto-imune (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). Pelo contrário podem ocorrer apenas mais tarde, com a evolução da doença (Cortesão E., 2010).

8.2 Esfregaço de sangue periférico e aspirado de medula óssea

A análise morfológica das amostras (esfregaço de SP e aspirado de MO) tem em consideração a percentagem de blastos, assim como o tipo e o grau de displasia, em particular, a extensão da displasia a uma ou mais linhagens (WHO, 2008).

→ Citopenias: as citopenias, geralmente, correspondem às células maduras da linhagem afectada, mas pode haver discordância (WHO, 2008).

→ Contagem de blastos (em percentagem): é um parâmetro importante não só para o diagnóstico e classificação mas também em termos prognósticos. Uma estimativa da sua percentagem é presença obrigatória no relatório citomorfológico. Mieloblastos, monoblastos e megacarioblastos (Figura 1), são as células imaturas que devem entrar na contagem de blastos. Os promonócitos são considerados equivalentes de blastos (WHO, 2008). Já os precursores eritróides não contam como blastos (List A.F. *et al.*, 2004).

→ Displasia: as suas características são relevantes quando se procurar distinguir entre vários tipos de SMD e pode ser importante para prever a fisiopatologia (WHO, 2008). No entanto, a morfologia displásica não é, necessariamente, sinónimo de SMD. Para que a displasia seja considerada significativa, a OMS defende que, pelo menos, 10% das células de determinada linhagem devem apresentar alterações (Orazi A. e Czader M.B., 2009). Assim, as principais alterações displásicas englobam, deseritropoiese, disgranulopoiese e dismegacariopoiese.

↪ Na deseritropoiese (Figuras 8 e 9), a linhagem eritróide é a mais afectada. A displasia manifesta-se por alteração ao nível do núcleo, incluindo protusão nuclear, pontes internucleares, cariorrexis, polinuclearidade, lobulação e alterações megaloblásticas; a nível citoplasmático observa-se depósitos perinuclear mitocondriais de ferro – sideroblastos em anel, vacuolização e positividade para ácido periódico de Schiff, difusa ou granular (WHO, 2008). A utilização do corante Azul da Prússia na preparação de aspirado de MO, permite identificar os depósitos de ferro, confirmando a ausência de défice deste metal e a presença de sideroblastos em anel (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

↪ A disgranulopoiese (Figura 8) é caracterizada pela variação do tamanho dos neutrófilos, que apresentam alteração da lobulação do núcleo, nomeadamente

hipolobulação (pseudo Pelger-Huet, pelgeroid) e hipersegmentação; a nível do citoplasma há diminuição da granulação, grânulos pseudo Chediak-Higashi e bastonetes de Auer (fusão de grânulos azurófilos granulocíticos característico dos mieloblastos) (WHO, 2008). A coloração com esterases permite avaliar com mais precisão a afecção da linhagem mielóide e monocítica (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). É ainda uma ajuda na determinação da razão mielóide:eritróide (Valent P. *et al.*, 2010).

↳ A dismegacariocitopoiese (Figura 9) traduz-se por megacariócitos pequenos, com hipolobulação nuclear e múltiplos núcleos (WHO, 2008).

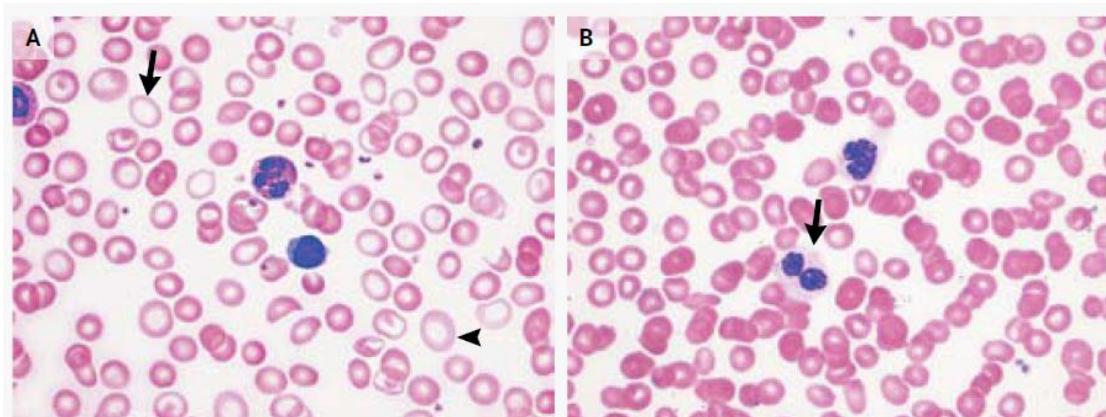


Figura 8 – Características morfológicas dos eritrócitos na SMD. Está representado um esfregaço do sangue periférico em que se observa em **A.** eritrócitos dismórficos, com anisocitose, poiquilocitose e anisocromia; e em **B.** neutrófilo com hiposegmentação (pseudo Pelger-Huet) e hipogranulação. (Adaptado de Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009)

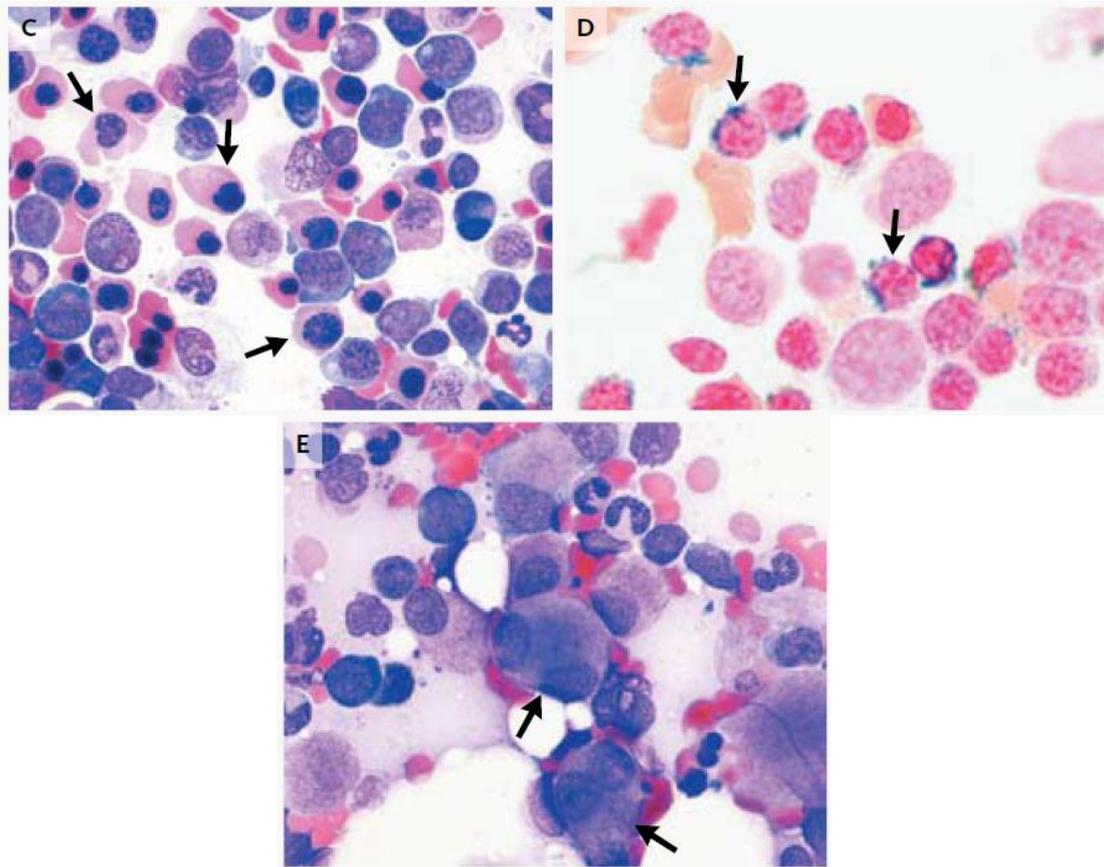


Figura 9 – Características morfológicas da MO na SMD. É visível em **C.** diseritropoiese; em **D.** sideroblastos em anel; e em **E.** megacariócitos displásicos, pequenos, com núcleos mono ou bilobados e citoplasma granular. (Adaptado de Tefferi A., Vardiman J.W., 2009)

Enquanto a displasia das células eritróides e neutrófilos é examinada, preferencialmente, no esfregaço de SP e aspirado de MO, a displasia da linha megacariocítica é avaliada com maior acuidade na biópsia de MO. Isto porque o número de megacariócitos nos esfregaços pode ser diminuído (Valent P. *et al.*, 2010).

8.3 Biópsia da medula óssea (Histopatologia)

Apesar da biópsia da MO não ser indispensável para estabelecer o diagnóstico de SMD, fornece informações valiosas para a sua confirmação, aumentando a sua acuidade, assim como, contribui para refinar a pontuação IPSS (*International*

Prognostic Score System) (WHO, 2008; List A.F. *et al.*, 2004). Este tipo de estudo contribui para a avaliação da celularidade medular, distribuição topográfica e maturação das linhas celulares, detecção de achados que sugiram processos reactivos estromais (edema, atrofia, fibrose, necrose) e avaliação de estrutura da MO (Vassallo J. e Magalhães S.M.M., 2009).

A displasia, particularmente, dos megacariócitos e as alterações da arquitectura da MO podem ser apreciadas em biópsias e são informações que suportam o diagnóstico de SMD. A biópsia é capaz de confirmar a percentagem e distribuição de blastos e serve de base a estudos de imunohistoquímica (List A.F. *et al.*, 2004).

No caso de SMD hipocelular ou associada a fibrose, a biópsia torna-se mesmo essencial para o diagnóstico (List A.F. *et al.*, 2004)

Além disso, a biópsia da MO pode detectar neoplasias mielóides que não SMD e neoplasias mieloproliferativas assim como uma SMD com uma neoplasia co-existente (hematopoiético ou não). Permite ainda a distinção entre SMD hipoplásica e AA (Valent P. *et al.*, 2010) e entre SMD e outras patologias capazes de a mimetizar clinicamente (como leucemia de *hairy cells*, linfomas ou tumores metastáticos) (Cortesão E., 2010; List A.F. *et al.*, 2004).

No entanto, segundo Vassallo J. e Magalhães S.M.M. (2009) o anatomopatologista pode não detectar anomalias em até 20% das amostras.

→ **Celularidade**

A celularidade deve ser determinada em termos de percentagem de células por área de secção da medula óssea, tendo em conta as diferenças na celularidade relacionadas com a idade (Valent P. *et al.*, 2010 e 2007). Até aos 20 a 30 anos de idade a celularidade da medula deve manter-se em 60 a 70% da amostra, os indivíduos com 40 a 60 anos apresentam uma celularidade de 40 a 50% e na faixa etária a partir de 70 anos a celularidade é inferior a 30 a 40% (Valent P. *et al.*, 2010; Thiele J. *et al.*, 2005).

Na SMD a medula é normalmente hiper celular ou normo celular (WHO, 2008). O estado de hiper celularidade na medula e as citopenias no SP parecem um paradoxo, mas estas observações são consistentes com a noção de hematopoiese ineficaz (Heaney M.L. e Golde D.W., 1999).

De salientar que uma contagem de células CD34+ elevada, ou seja superior a $1 \times 10^6/L$, é um factor de prognóstico pouco favorável na SMD (Liesveld J.L. *et al.*, 2004). Além disso, um número aumentado de células formadoras de colónias circulantes foi encontrado nos estádios avançados de SMD (Liesveld J.L. *et al.*, 2004). Numa minoria de casos, aproximadamente 10%, a medula apresenta-se hipocelular (WHO, 2008) o que é mais comum em SMD-t (Niero-Melo L. *et al.*, 2006). Esta forma é mais frequente no subtipo AR e está associada a certas características como, citopenias mais graves, menor probabilidade de evolução para LMA e hiper-regulação de genes relacionados com a regulação de fenómenos inflamatórios nas células CD34+, o que torna esta variante susceptível à terapêutica imunossupressora (Vassallo J. e Magalhães S.M.M., 2009).

Nas situações de baixa celularidade, os achados clínicos e as características morfológicas da medula podem ser difíceis de distinguir da AA (Heaney M.L. e Golde D.W., 1999). No entanto, nesta patologia não há atípias dos megacariócitos, o que é frequente encontrar na SMD hipocelular (Vassallo J. e Magalhães S.M.M., 2009). A presença de alterações citogenéticas típicas de SMD permite dissipar as dúvidas e estabelecer o diagnóstico (Heaney M.L. e Golde D.W., 1999). Por outro lado, a SMD pode resultar de AA, especialmente quando o doente com AA é tratado durante um longo período de tempo com factor estimulante do crescimento de colónias de granulócitos (G-CSF) sem resposta satisfatória. A SMD e a AA podem ainda co-existir, e uma distinção rígida pode não ser necessária ou possível (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). Num pequeno grupo de doentes com SMD é detectável, em simultâneo, uma mastocitose (proliferação clonal de mastócitos) sistémica caracterizada por organomegália e lesão cutânea característica de urticária pigmentosa. Na maior parte destes doentes são detectáveis agregados de células mastóides na medula óssea e/ou expressão de CD25 ou níveis plasmáticos elevados de triptase (>20 ng/ml), e ainda a mutação KIT D816V. A alteração pode também estar localizada apenas à MO (Valent P. *et al.*, 2010). Perante estas descobertas deve-se re-avaliar o diagnóstico de SMD, pois

a mastocitose sistémica também pode cursar com citopenia e displasia moderada (Valent P. *et al.*, 2010).

O prognóstico dos doentes com mastocitose é variável, se for localizada é sobreponível ao prognóstico da respectiva classe de SMD, se for sistémica, o componente mastóide assume maior importância (Valent P. *et al.*, 2010).

→ Distribuição e localização das células

As variantes mais agressivas (com alto risco de transformação leucémica e baixa taxa de sobrevivência) podem apresentar agregados de blastos com localização central na zona mais distante de estruturas vasculares e nas superfícies endoteliais das trabéculas ósseas (Figura 10) (WHO, 2008; Mufti G.J., 2004). A estes agregados foi atribuída a designação de ALIP (*atypical localization of immature progenitor cells*). Vários estudos comprovaram o valor prognóstico e diagnóstico dos ALIP nas SMD, inclusivé ensaios recentes que recorreram à imunohistoquímica, com anticorpos anti-CD34 (Valent P. *et al.*, 2007).

Como foram igualmente detectados focos de células imaturas nas proximidades de capilares (o que não encaixa na definição de ALIP), Valent P. e colaboradores (2010 e 2007) propuseram que fosse adoptado o termo *multifocal accumulations of CD34+ progenitors* (AMA-CD34). Como não foram detectadas outras diferenças significativas entre os dois tipos de agregados, ambos os termos deveriam emergir em AMA-CD34 e ALIP deveria ser evitado.

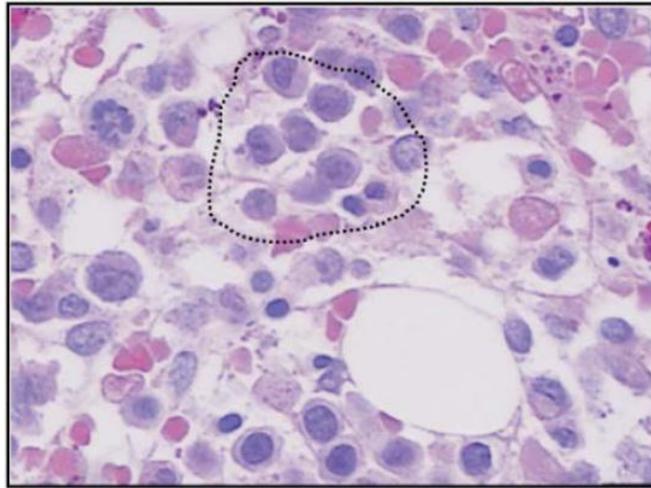


Figura 10 - Corte histológico da MO de doente com SMD com ALIP. O grupo ALIP está assinalado com uma linha tracejada. (Adaptado de Niero-Melo *et al.*, 2006)

→ Fibrose

Na SMD, a mielofibrose constitui um processo reactivo do estroma mediado por citocinas, que se traduz pelo aumento das fibras de reticulina (Thiele J. *et al.*, 2005). Thiele e colaboradores (2005) partindo dos *scores* de fibrose da MO pré-existentes e da análise de 150 amostras de biópsia de medula óssea, propuseram uma nova classificação, a *European Consensus Grading System*, que escala a mielofibrose em 4 graus. Este sistema de classificação pressupõe que a densidade das fibras de reticulina deve ser quantificada em relação apenas ao tecido hematopoiético da MO (Tabela 10).

Tabela 10 – Classificação da mielofibrose

Grau de fibrose	Descrição*
0 (normal)	Reticulina linear dispersa sem intersecções
I	Rede de reticulina lassa com algumas intersecções, especialmente nas áreas perivasculares
II	Aumento difuso e denso das fibras de reticulina com intersecções extensas, feixes de colagénio focais e/ou osteoesclerose focal
III	Aumento difuso e denso das fibras de reticulina com intersecções extensas, feixes grossos de colagénio focais e osteoesclerose significativa

* a densidade das fibras deve ser avaliada em áreas celulares (com células hematopoiéticas)

(Adaptado de Thiele J. *et al.*, 2005)

A presença de fibrose de grau II ou III é necessária para confirmar que estamos perante SMD com mielofibrose (SMD-f) e essa informação deve constar no relatório da anatomia patológica (Valent P. *et al.*, 2010), devido não só à sua importância na avaliação do processo mas também na estratificação do risco e taxa de sobrevivência e ainda nas alterações atribuíveis à terapêutica (Thiele J. *et al.*, 2005).

Um aumento ligeiro da reticulina é observado em 50% dos doentes (Hoffbrand A.V. *et al.*, 2005) mas apenas em 10% dos casos de SMD, é observável mielofibrose significativa (Figura 11). A maioria destes casos apresenta excesso de blastos e têm um curso clínico pouco favorável (WHO, 2008). Esta forma corresponde com frequência ao subtipo AREB e ostenta grande número de megacariócitos atípicos e blastos CD34+ agrupados (Vassallo J. e Magalhães S.M.M., 2009).

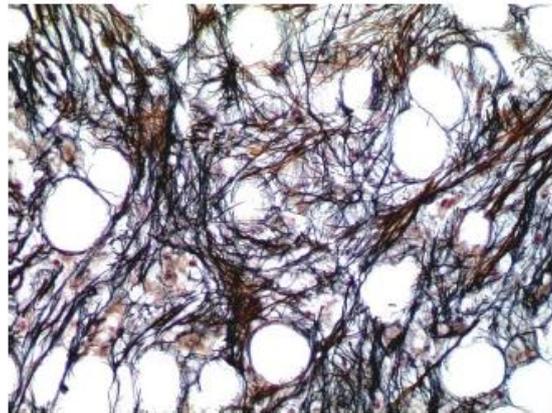


Figura 11 - Corte histológico da MO de doente com SMD com fibrose grau III evidenciada pela coloração de Gomori com prata. (Adaptado de Valent P. *et al.*, 2010)

Convém distinguir esta mielofibrose daquela causada por neoplasias mieloproliferativas (NMP), que se distinguem das SMD por provocarem esplenomegália, leucocitose e trombocitose (Valent P. *et al.*, 2010; Vassallo J. e Magalhães S.M.M., 2009).

8.4 Imunohistoquímica

A aplicação de técnicas de imunohistoquímica é recomendada em todos os doentes com (suspeita de) diagnóstico de SMD. Todas as linhagens hematopoiéticas devem ser avaliadas. Devido à variedade fenotípica e à formação de sub- clones, pode ser necessário aplicar mais de um marcador por linhagem, num mesmo doente (Valent P. *et al.*, 2010).

Este tipo de análise é especialmente útil nos casos em que a MO se apresente com fibrose ou hipocelular, assim como, em situações de SMD-t (WHO 2008).

Para além da visualização directa, os blastos, isolados ou agregados, também podem ser identificados recorrendo à imunohistoquímica. Através da marcação com anticorpo anti-CD34, pode-se identificar um antígeno expresso pelas células progenitoras e precursores precoces das células da medula óssea (Figura 12) (WHO, 2008). Quando se aplica a marcação com o CD34 deve-se ter em mente que esta também irá sinalizar os vasos sanguíneos, por ligação às células endoteliais, o que, se por um lado é vantajoso, porque permite avaliar em simultâneo a angiogénese; por outro é prejudicial, se esta for muito intensa, pois dificulta a visualização dos blastos (Valent P. *et al.*, 2007). Em alguns casos também se detecta uma expressão aberrante de CD34 nos megacariócitos, apesar de este fenómeno não ser específico da SMD (Valent P. *et al.*, 2010).

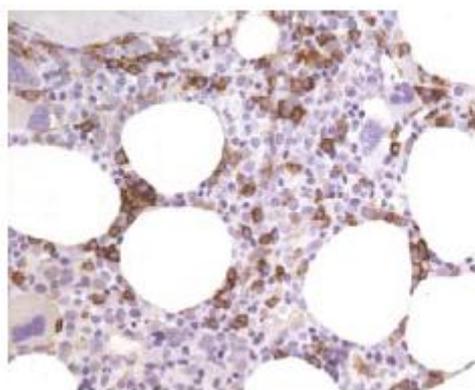


Figura 12 - Corte histológico da MO de doente com SMD, marcado com anticorpo contra CD34. (Adaptado de Valent P. *et al.*, 2010)

Para além dos anticorpos dirigidos aos blastos, como marcadores básicos, devem ainda ser usados: CD117/KIT (para sinalização das células progenitoras e mastócitos), pois nem todos os blastos são CD34+, logo, devem ser usados marcadores alternativos; triptase (para mastócitos e basófilos imaturos); CD42 ou CD61 (para identificação dos megacariócitos); CD3 (reage com as células T), CD20 (marca as células B e glicoforina A ou C (células eritróides) (Valent P. *et al.*, 2010; WHO, 2008).

Adicionalmente, pode ainda recorrer-se a marcadores dirigidos especificamente às diferentes linhagens, dependendo dos resultados da coloração histológica básica. Estes têm grande utilidade no diagnóstico diferencial, quando o diagnóstico é questionável ou há suspeita de neoplasia simultâneo. São exemplos: anticorpo anti-mieloperoxidase (a mieloperoxidase é frequentemente negativa quando aplicada aos blastos das SMD), CD25 (reage com os megacariócitos), CD33 e lisozima (Valent P. *et al.*, 2010; WHO, 2008).

A vantagem desta técnica é que permite detectar os blastos e outros tipos de células, mesmo quando o seu aumento é ligeiro ou difuso, e avaliar morfologias e distribuições celulares anormais, que tenham escapado ao estudo citológico (Valent P. *et al.*, 2007).

No entanto, nenhuma destas características imunohistoquímicas anormais é específica dos SMD (Valent P. *et al.*, 2010).

8.5 Imunofenotipagem

As alterações detectadas pela imunohistoquímica devem ser confirmadas pela citometria de fluxo (Valent P. *et al.*, 2010). Através desta técnica é possível caracterizar a população de blastos e de células mielóides, incluindo o seu número, tamanho, imunofenótipo e grau de maturação (WHO, 2008).

Este método é objectivo e fidedigno no que diz respeito à identificação da desregulação da expressão antigénica nas células neoplásicas. Pode ainda ser útil na exploração da fisiopatologia, diagnóstico e prognóstico das SMD (Valent P. *et al.*,

2007; Ogata K., 2006), embora a sua utilidade no diagnóstico de SMD ainda não seja consensual.

Os resultados quantitativos são particularmente úteis quando as amostras são pobres ou de baixa qualidade e não permitem uma análise citológica ótima. Já as ilações qualitativas ajudam a destringar se o doente sofre de uma patologia mielóide clonal ou não (Valent P. *et al.*, 2007).

Inicialmente, os investigadores procuravam padrões anómalos, comparando a expressão das células alteradas com a expressão da célula hematopoiética estaminal, mais tarde, começaram a delinear-se estratégias diagnósticas mais específicas e reprodutíveis (Ogata K., 2006). Mas, até à actualidade não foi possível identificar um marcador ou perfil específico das SMD.

Uma única alteração fenotípica não significa, necessariamente, doença mas, a sua probabilidade aumenta com o número de anomalias encontradas (Valent P. *et al.*, 2007).

A substituição da contagem visual de blastos pela detecção de células CD34+ através de citometria de fluxo é desencorajada. Apesar de as células hematopoiéticas que expressam CD34+ serem blastos, nem todos os blastos expressam CD34+. Além disso, a diluição da amostra de MO pelo SP durante a aspiração e processamento da amostra para análise pela citometria, dificulta a comparação entre as duas contagens (List A.F. *et al.*, 2004).

Esta técnica é ainda útil na determinação da presença de clones de Hemoglobinúria Paroxística Nocturna (HPN) ou para avaliar a hipótese de LGL-T (Greenberg P.L. *et al.*, 2011).

Em algumas células CD34+, regista-se diminuição da expressão do receptor do G-CSF, o qual está co-relacionado com a incidência de neutropenia (Liesveld J.L. *et al.*, 2004).

8.6 Citogenética e cariótipos anormais

A análise citogenética da medula óssea está indicada em todos os casos de SMD na altura da avaliação diagnóstica inicial. Ganha especial relevo nas situações em que há dúvidas sobre o diagnóstico, sendo que a presença de uma anomalia citogenética associada a SMD, confere alguma segurança ao diagnóstico, permitindo excluir outras patologias (Orazi A. e Czader M.B., 2009; Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

As alterações no cariótipo (tanto a sua presença como o seu tipo) (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008) tem um importante valor prognóstico, independentemente da modalidade de tratamento adoptada (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006), tendo sido incluído em vários sistemas de estratificação do prognóstico, incluindo o IPSS (Valent P. *et al.*, 2007). Isto porque é um factor a ter em conta na previsão do tempo de sobrevivência tal como no risco de evolução para LMA (List A.F. *et al.*, 2004). Pode ainda ser útil na escolha do tratamento mais adequado, como é o caso das deleções do cromossoma 5q, que respondem à lenalidomida (Orazi A. e Czader M.B., 2009).

Este tipo de estudo pode ainda ser requerido durante o seguimento de um doente para comparação com o cariótipo original, no caso de suspeita de progressão (leucémica) da patologia, pois pode ter ocorrido evolução clonal desde o momento do diagnóstico (Valent P. *et al.*, 2007; Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). Assim, permite não só detectar anomalias cromossómicas mas também esclarecer a evolução clonal (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

Anomalias citogenéticas estão presentes, em média, em 50% dos casos (Vassallo J. e Magalhães S.M.M., 2009; Haase D., 2008). Isto não significa que nos restantes não haja qualquer tipo de alteração mas sim que esta não foi detectada por não haver pistas sobre a sua natureza (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010).

Testes genéticos adicionais devem ser aplicados nos casos de doença com padrão familiar (Greenberg P.L. *et al.*, 2011).

Na SMD podem ser encontradas quer alterações estruturais quer numéricas (Pfeilstöcker M. *et al.*, 2007; Hofmann W.K., Koeffler H.P., 2005).

Embora não se possa classificar nenhuma mutação cromossômica como patognomónica de SMD, existem alterações citogenéticas que surgem consistentemente. Devido à instabilidade genética e défices na reparação do ADN (Pfeilstöcker M. *et al.*, 2007), as deleções são as alterações mais comuns, enquanto as translocações não balanceadas e perdas ou ganhos de cromossomas no seu conjunto surgem com menos frequência (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008). Raramente surgem alterações estruturais balanceadas como translocações e inversões, sendo estas mais comuns na LMA (Haase D., 2008). Deste modo, é legítimo assumir que o mecanismo molecular iniciador da SMD se baseia na perda ou inactivação de um gene supressor tumoral, enquanto a activação de oncogenes parece ter um papel secundário (Haase D., 2008). Também não existem alterações citogenéticas específicas de um sub-grupo morfológico (List A.F. *et al.*, 2004).

Além disso, as anomalias citogenéticas podem surgir isoladamente, associadas a outra alteração ou parte de um conjunto de alterações (com, pelo menos, mais 2 anomalias) (Haase, 2008).

A heterogeneidade que marca esta doença está também patente na parte genética, o que limita o estudo aprofundado às alterações genéticas mais frequentes (-5/5q-, -7/7q-, +8, 20q- e Y-), apesar das anomalias cromossômicas raras estarem presentes numa porção significativa dos doentes (Haase D., 2008).

As alterações citogenéticas descritas para as SMD, também podem existir em outras neoplasias mielóides e vice-versa. Os doentes com SMD normalmente não evidenciam alterações cromossômicas características das LMA e raramente ostentam alterações associadas a NMP – trissomia 9 e del (13q) (Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009).

Existem contudo algumas diferenças entre as SMD *de novo* e as secundárias (Tabela 11):

→ No universo dos doentes com SMD *de novo*, 30% a 50% apresentam defeitos no cariótipo (Nishino H.T. e Chang C.-C., 2005; Hofmann W.K., Koeffler H.P., 2005). A alteração citogenética mais vezes detectada (em 30% dos casos) é a deleção intersticial do braço longo do cromossoma 5 (5q- ou del(5q)). Outras modificações incluem, a

trissomia 8 (em 19% das situações), 7q-/del(7q) e monossomia 7 (15%). Adicionalmente, surge 17p-/del(17p), isocromossoma 17q, deleção intersticial dos cromossomas 3, 11, 12, 13 e 20; associados a estádios mais avançados da patologia (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

A perda do cromossoma Y também é comum mas é normalmente considerada uma alteração relacionada com a idade e não indicador de patologia clonal (Tefferi A. e Vardiman J.W. 2009). O prognóstico desta alteração é comparável ao dos cariótipos normais, ao contrário dos outros defeitos do cariótipo (Pfeilstöcker M. *et al.*, 2007).

Entre 10 a 20% dos doentes com SMD primária apresentam um cariótipo complexo (ou seja, com múltiplas alterações concomitantes) (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

→ Nos casos de SMD-t, há uma maior frequência de cariótipos com anomalias (80% dos casos) (Nishino H.T. e Chang C.-C., 2005; Hofmann W.K., Koeffler H.P., 2005) e estas são mais heterogêneas (Pfeilstöcker M. *et al.*, 2007). Prevalece a monossomia 7, 7q-/del(7q), monossomia 5 e 5q-/del(5q), nos casos relacionados com a exposição a agentes alquilantes; alterações ao nível de 11q23 são, geralmente, subsequentes ao tratamento com inibidores das topoisomerasas.

Uma percentagem significativa de doentes com SMD secundária apresenta um cariótipo complexo. Estas aberrações cromossómicas conferem pior prognóstico a estes doentes (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008)

Tabela 11 - Algumas da alterações citogenéticas recorrentes na SMD e as anomalias genéticas associadas

Anomalia citogenética	Frequência		Genes envolvidos
	SMD	SMD-t	
<i>Não balanceadas</i>			
-5 ou del(5q)	10%	40%	RPS14, EGR1, miR-145e146a, SPARC, CDC25C, entre outros
-7 ou del(7q)	10%	50%	desconhecidos
i(17q) ou t(17p)	3-5%		P53
-13 ou del(13q)	3%		desconhecidos

del(11q)	3%		MLL or CBL
del(12p) ou t(12p)	3%		ETV6
DUP 4q24	20%		TET2
<i>Balanceadas</i>			
t(11;16)(q23;p13.3)		3%	MLL, CREBBP
t(3;21)(q26.2;q22.1)		2%	MDS1-EVI1, RUNX1
t(6;9)(p23;q34)	<1%		DEK-NUP214
t(2;11)(p21;q23)	<1%		miR-125b-1
inv(3)(q21q26.2)	<1%		MDS1-EVI1, RPN1
t(1;3)(p35.3;q21.2)	<1%		PRDM16, MDS1-EVI1

Legenda: del – deleção; t- translocação; inv – inversão; i – isocromossoma; DUP – dissomia uniparental.

(Adaptado de Davids M.S. e Steensma D.P., 2010 e WHO, 2008)

Algumas das modificações citogenéticas que ocorrem em doentes com SMD estão associadas a um fenótipo clínico e características morfológicas bem definidas (Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009).

Síndrome 5q-/del(5q)

A del (5q) foi descrita pela primeira vez como entidade clínica individual em 1974, por Van den Berghe (Jädersten M. e Hellström-Lindberg E., 2010). A síndrome 5q- está associada à deleção isolada do braço longo do cromossoma 5 e é considerada um sub-tipo de SMD, pela OMS. Caracteriza-se por uma percentagem de blastos na medula óssea inferior a 5% (sem bastonetes de Auer), número de plaquetas normal ou trombocitose, megacariócitos pequenos e hipolobulados e anemia macrocítica. A medula óssea apresenta-se normo ou hiperclular com aumento do número de progenitores, sendo mais de 90% das células estaminais hemtopoiéticas clonais (Jädersten M. e Hellström-Lindberg E., 2010)

A maioria dos doentes é do sexo feminino, em contraste com a prevalência masculina da SMD (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008; Nimer S.D., 2008).

A evolução clínica é indolente (Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009), com baixa taxa de progressão para LMA (10%) e maior sobrevivência em comparação com os outros sub-grupos de SMD. A presença de alterações cromossômicas adicionais ou o aumento do número de blastos na medula óssea diminui a sobrevivência nos doentes com del (5q) (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008). A resposta favorável à lenalidomida permite que dois terços dos doentes passem a ser independentes de transfusões de concentrados eritrocitários e regista-se ainda uma remissão citogenética frequente (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

Em 2002, Boulton e os seus colaboradores, identificaram a região mais comumente afectada: 5q31-32, que contém cerca de 40 genes. Uma boa parte deles apresenta propriedades supressoras tumorais, como os genes RPS14 e SPARC, os quais têm um papel preponderante nas fases iniciais da doença; enquanto as alterações nos genes ERG1 e CTNNA1 são responsáveis pela sua evolução e transformação leucémica (Jädersten M. e Hellström-Lindberg E., 2010).

Alguns autores sugerem que deleções intersticiais dos genes de 5q resultam numa série de alterações genéticas que cooperam entre si de forma a induzir as características fenotípicas da síndrome 5q- (Jädersten M. e Hellström-Lindberg E., 2010).

Além disso, a perda de um dos alelos funcionais de genes específicos (haploinsuficiência) pode mimetizar a síndrome 5q- (Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009; Malcovati L. e Nimer S.D., 2008). Foi possível chegar a esta conclusão graças a estudos de expressão génica combinados com estudos de sequenciação subsequentes, que demonstraram que apesar de o gene não estar mutado, a sua expressão estava diminuída. Mais ainda, quando é forçada a re-expressão *in vitro* destes genes, os defeitos da eritropoiese são revertidos (Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009).

Síndrome 17p-/del(17p)

Esta alteração está associada a deleção do gene supressor tumoral p53, apresentando um alto risco de progressão para LMA. Caracteriza-se pela presença de células de Pelger-Huet contendo pequenos vacúolos (Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009).

Detecção de anomalias citogenéticas

A detecção de anomalias citogenéticas pode ser feita por técnicas de citogenética convencional ou por hibridização *in situ* com fluorescência (FISH).

O cariótipo convencional, através da aplicação de técnicas de *banding* (G-, Q- e R), continua a ser amplamente usado na avaliação diagnóstica de suspeita de SMD. Por consenso, devem ser analisadas, pelo menos, 20 a 25 metáfases, excepto se as aberrações cromossómicas forem evidentes, aí pode ser suficientes 20 ou até 10 amostras (Valent P. *et al.*, 2007).

Os cariótipos devem ser descritos de acordo com as guidelines mais recentes da ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*). Segundo estas, um clone, é definido pela presença de 2 células da medula óssea que ostentam o mesmo ganho de material genético ou a mesma alteração estrutural; ou, pelo menos, 3 células da medula óssea que tenham em falta o mesmo cromossoma. Num grupo restrito de doentes, a evolução clonal vai determinar o aparecimento de subclones. Um subclone é definido pela ocorrência de aberrações cromossómicas adicionais em, pelo menos, 2 ou 3 células que definiam a clonalidade. A presença de células da medula óssea com alterações independentes é rara. Nestes casos, é difícil distinguir entre um subclone ou um novo clone (Valent P. *et al.*, 2007).

O cariótipo aberrante complexo é definido pela presença de, pelo menos, 3 alterações cromossómicas independentes em 2 ou mais células (Valent P. *et al.*, 2007).

A FISH é usada para avaliar alterações não detectadas pela análise citogenética convencional. É particularmente útil quando não está disponível um número de metáfases suficiente para aplicar as técnicas de *banding* (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008). Por outro lado, como não depende da divisão celular pode ser aplicada em núcleos em interfase (Heaney M.L. e Golde D.W., 1999).

Em casos duvidosos, a FISH é usada como segundo passo na investigação citogenética e deve demonstrar a existência de um clone com os mesmos critérios diagnósticos usados para o cariótipo convencional (Valent P. *et al.*, 2007). Esta técnica

tem sido particularmente usada para a detecção de del(5q) em doentes com cariótipo aparentemente normal (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

As pesquisas por FISH devem incluir sondas que detectem, pelo menos, as seguintes regiões: 5q31, CEP7, 7q31, CEP8, 20q, CEPY, e p53 (Valent P. *et al.*, 2007).

A clonalidade é demonstrada com base no limiar diagnóstico definido pela sensibilidade da sonda aplicada. No caso de uma pequena percentagem de células FISH-positivo, deve proceder-se à análise da MO (Valent P. *et al.*, 2007).

Devido à sua maior sensibilidade é útil na detecção de doença residual mínima ou fases precoces de recaída (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

A maior desvantagem desta técnica é que detecta alterações apenas em *loci* pré-definidos pelas sondas aplicadas e requer sondas específicas para cada região de interesse (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

Assim, se estiver disponível, deve ser aplicada a FISH multicolor (FISHm) pois permite uma melhor caracterização dos cromossomas marcadores e das anomalias complexas. Mas, a FISHm tem de ser aplicada em metafase após cultura de células de MO, enquanto a FISH convencional é realizada em interfase e basta um esfregão de MO (Valent P. *et al.*, 2007).

Em casos seleccionados (por exemplo: não há amostras de MO disponíveis) pode ser usado o SP. De salientar que, na presença de um resultado negativo, este não exclui a presença de um cariótipo anormal (Valent P. *et al.*, 2007).

Steensma e colaboradores (2006) não recomendam o uso da FISH rotineiramente para o diagnóstico de SMD pois a importância prognóstica dos pequenos clones detectados exclusivamente por esta técnica é desconhecida e porque não existem terapêuticas moleculares específicas que se possam oferecer a estes doentes.

A PCR (*Polymerase chain reaction*) recorre a *primers* de ADN para amplificar uma determinada região de ADN de modo a permitir a detecção de translocações cromossómicas nas células do SP e MO. Trata-se de uma técnica de análise

extremamente sensível e rápida, que leva à detecção de mutações sem expressão clínica relevante (Heaney M.L. e Golde D.W., 1999). A desvantagem da aplicação da PCR, em particular da PCR em tempo real, no diagnóstico de SMD é o facto de também estar restrita a anomalias citogenéticas predefinidas e não ser útil na detecção de perdas ou ganhos de cromossomas (Heaney M.L. e Golde D.W., 1999).

As técnicas de FISH e PCR complementam a análise citogenética tradicional aumentando a sua capacidade de detecção, mas os resultados requerem integração e correlação com os achados clínicos (Heaney M.L. e Golde D.W., 1999).

Testes adicionais

Se os mastócitos se dispuserem em agregados na MO e/ou expressarem CD25, ou os níveis de triptase forem altos, é apropriado pesquisar a mutação KIT. Nesses casos é frequente existir uma mastocitose oculta (Valent P. *et al.*, 2010). Por outro lado, se for detectada uma basofilia significativa, a MO deve ser estudada para a presença de re-arranjos nos genes PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) e FGFR (*fibroblast growth factor receptors*) (Valent P. *et al.*, 2010).

Na distinção entre SMD ou LMA de novo e NMP, pode ser útil a pesquisa da mutação activadora da tirosina cinase JAK 2, visto que a sua frequência é mais alta no último caso (Greenberg P.L. *et al.*, 2011).

No caso de suspeita de NMP, deve ser pesquisada a fusão dos genes BCR/ABL através de FISH ou PCR em tempo real para excluir leucemia mielóide crónica (LMC) (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

A técnica de Southern-blot é usada quando há suspeita de LGL T, para pesquisa de re-arranjos no gene que codifica o receptor das células T (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

8.7 Bioquímica sanguínea

O nível de eritropoetina sérica e o estudo da dinâmica do ferro (ferritina, ferro sérico, capacidade total de ligação do ferro) são necessários aquando da orientação da terapêutica de suporte (Greenberg P.L. *et al.*, 2011; Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006) e para o diagnóstico diferencial de anemia hipoproliferativa e ferropénica, respectivamente. O doseamento de folato e vitamina B12 (Greenberg P.L. *et al.*, 2011) é necessário para distinguir de anemia macrocítica.

No caso de anemia hipocrómica, deve proceder-se a electroforese da hemoglobina para pesquisar talassémias (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006), que representam o distúrbio genético mais comum no mundo (Longo D.L. *et al.*, 2011).

O estudo da função plaquetar e da coagulação ganham relevo quando há alterações na coagulação (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). De igual modo, o doseamento de histamina e triptase pode estar indicado na presença de células mastóides (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

A fosfatase alcalina (FA) leucocítica pode estar anormalmente baixa na SMD. Este valor deve ser doseado se houver suspeita de NMP (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006) situação em que a FA se encontra aumentada (Longo D.L. *et al.*, 2011).

O nível sérico de lactato desidrogenase (LDH) está frequentemente elevado nas doenças que afectam a linhagem mielóide devido ao elevado *turn over* celular. Em alguns estudos, esta elevação está relacionada com prognóstico pouco favorável (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

A serologia VIH (vírus da imunodeficiência humana) deve ser considerada em indivíduos com factores de risco para esta infecção (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

Além do referido, o doseamento do nível de cobre, zinco e metais pesados, pode ser considerado num doente com possível défice alimentar ou de absorção, ou na suspeita de intoxicação por estes elementos (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

O estudo das proteínas monoclonais justifica-se pois 10 a 20% dos doentes com SMD também apresentam gamapatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI), isto acontece pois ambas as patologias são típicas da idade avançada. O significado desta concomitância é ainda desconhecido (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

Deve-se ainda proceder ao doseamento da creatinina e da bilirrubina, o que permite avaliar, respectivamente, a função renal e hepática, importantes na determinação da dose de quimioterapia e previsão da resposta a este tratamento (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

A pesquisa de HPN e HLA-DR15 é potencialmente útil para identificar quais os indivíduos que terão resposta à terapêutica imunossupressora, especialmente se estamos a lidar com doentes jovens, sem alterações citogenéticas detectáveis e medula hipoplásica (Greenberg P.L. *et al.*, 2011).

Nos doentes em que se considere a transfusão de plaquetas devido a trombocitopenia grave, deve ser realizado o mapeamento HLA (A e B) (Greenberg P.L. *et al.*, 2011). Já nos casos em que se pondere como tratamento o transplante de células estaminais tanto o doente como o potencial dador devem ser sujeitos ao mapeamento HLA completo (A, B, C, DR e DQ) e serologia do CMV (citomagalovírus) (Greenberg P.L. *et al.*, 2011) A determinação do grupo sanguíneo, o teste de aloanticorpos e a aplicação do painel de anticorpos linfocíticos congelados podem também estar indicados (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

9. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de SMD pode surgir em dois cenários clínicos distintos. Num doente com sinais e sintomas sugestivos de patologia hematológica ao qual se requisita um hemograma completo. Por outro lado, 30% dos diagnósticos de SMD (Hoffbrand A.V. *et al.*, 2005), surgem em doentes assintomáticos, nos quais são detectadas características típicas de SMD em estudos do SP e MO realizados por avaliação médica por causas não relacionadas (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

Após colheita da história clínica, realização de exame físico e análise dos resultados do hemograma completo com leucograma e contagem de reticulócitos, o exame do SP e MO constitui a abordagem diagnóstica mais apropriada perante doentes com suspeita de SMD (Cortês E., 2010; Orazi A. e Czader M.B., 2009; Valent P. *et al.*, 2007). Deve ainda ser doseado os níveis de eritropoetina, estudado o metabolismo do ferro e avaliadas alterações citogenéticas (Cortês E., 2010).

Deve ser executado um esfregaço do SP, assim como, um aspirado de MO - mielograma (estudo citológico da MO) e uma biópsia da MO (para estudo histológico da MO) (Niero-Melo L. *et al.*, 2006). As colorações básicas são: Wright-Giemsa ou Mary-Grunwald-Giemsa pois a primeira pode não ser o suficiente para demonstrar a presença de grânulos citoplasmáticos (List A.F. *et al.*, 2004) e coloração para ferro (Cortês E., 2010).

Notas sobre o diagnóstico

A OMS chama a atenção para alguns aspectos que podem ser negligenciados durante a avaliação destes doentes e estabelece que nenhum doente deve ser diagnosticado como tendo SMD sem conhecimento pelo médico da sua história clínica, incluindo a história medicamentosa. E ainda que citopenias na ausência de displasia não devem ser interpretadas como SMD. Caso existam alterações citogenéticas concordantes poderá ser feito um diagnóstico de presunção de SMD (WHO, 2008).

Existem trabalhos que chamam ainda atenção para o facto de as alterações morfológicas poderem ser subtis e, muitas vezes, subjectivas (Niero-Melo L. *et al.*,

2006). Essas alterações morfológicas das células da medula óssea por si só não estabelecem o diagnóstico de SMD; sendo necessário que excluir outras causas de displasia (Heaney M.L. e Golde D.W., 1999). Neste sentido é recomendado o acompanhamento e reavaliação a doentes cujo diagnóstico não é de certeza (Ogata K., 2006). Semanas ou meses de acompanhamento clínico-laboratorial podem ser necessários até se poder afirmar o diagnóstico definitivo de SMD (Niero-Melo L. *et al.*, 2006).

Crítérios diagnósticos mínimos

O debate sobre os critérios diagnósticos mínimos para a SMD tem-se prolongado durante anos (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). Valent e colaboradores (2007 e 2010) propuseram a adopção de uma série de normas que facilitassem o diagnóstico de SMD e permitissem uma uniformização de critérios.

A) Pré-requisitos:

- Citopenia(s) significativa(s) e persistente(s) (com duração superior a 6 meses) em uma ou mais linhagens (eritróide: Hb < 11 g/dl; neutrofílica: < 1.500 neutrófilos/ μ L; megacariocítica: < 100.000 plaquetas/ μ L) e exclusão de patologias hematopoiéticas e não-hematopoiéticas que possam ser causa de citopenias ou displasia. Notar que, em alguns casos, podem co-existir patologias que causem citopenias ou displasias.

B) Crítérios relaccionadas com SMD (decisivos):

- Displasia em, pelo menos, 10% de todas as células de uma linhagem em esfregaço de MO: eritróide, neutrofílica ou megacariocítica; ou presença de, pelo menos, 15% de sideroblastos em anel;

- Presença de anomalias cromossómicas típicas (detectadas por citogenética convencional ou FISH).

C) Co-critérios (para doentes que preencham os requisitos de A) mas não de B), e que demonstram características clínicas típicas de SMD):

- Fenótipo anormal das células da MO indicativas de população monoclonal de células eritróides e/ou mielóides, demonstrada por citometria de fluxo;
- Sinais de presença de população de células de carácter monoclonal detectados através do método HUMARA, perfil genético por chip ou análise de mutações pontuais;
- Redução marcada e persistente de unidades formadoras de colónias na medula óssea (com ou sem a formação de *clusters*) e/ou presença de células progenitoras em circulação.

O diagnóstico pode ser estabelecido quando os pré-requisitos e, pelo menos, um critério decisivo estão satisfeitos. Se nenhum dos critérios decisivos for preenchido, mas seja provável que o doente sofra de uma doença mielóide tipo clonal, devem ser aplicados os co-critérios. A partir daí decide-se se o doente tem SMD ou uma patologia altamente suspeita de SMD. Os co-critérios constituem um estudo adicional às análises normalmente preconizadas para estes doentes. Se não estiverem disponíveis, os casos altamente suspeitos devem ser monitorizados e os testes de rotina devem ser repetidos para possível diagnóstico de SMD durante o seguimento.

Se um cariótipo anormal for o único critério preenchido, deve considerar-se patologia altamente suspeita de SMD.

Dificuldades no diagnóstico

Por vezes, o diagnóstico de SMD é um verdadeiro quebra-cabeças. Isto porque a doença tem um espectro de apresentação variado, os critérios mínimos diagnósticos ainda não foram uniformizados, existe uma percentagem significativa de indivíduos normais que apresenta displasia moderada das células hematopoiéticas sem que isso comprometa a sua função, e ainda, existem uma série de patologias que mimetizam a SMD (Steensma D.P. e Tefferi A., 2003).

Apesar da investigação activa e evolução do conhecimento nesta área e do número crescente de recursos à disposição, nem sempre o diagnóstico de SMD, a sua

caracterização e a atribuição de um subtipo é uma tarefa fácil (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). Como ainda não existe um marcador biológico fiável para o diagnóstico de SMD, a morfologia continua a ser a pedra basilar do diagnóstico e um importante elemento que, juntamente com a citogenética, fornece estratificação prognóstica. Apesar disso, e particularmente em doença de baixo grau, o reconhecimento morfológico de SMD pode ser difícil, criando indecisão diagnóstica. Nestes casos, o recurso a *guidelines* básicas para a interpretação da morfologia e sua correlação com os achados clínicos e citogenéticos são essenciais na abordagem do doente (List A.F. *et al.*, 2004).

Assim, o diagnóstico diferencial de SMD pode ser um desafio dada a sua heterogeneidade natural e a subjectividade na avaliação da displasia (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008). Apesar de muitos hematologistas e patologistas saberem relatar as alterações morfológicas típicas da mielodisplasia, na prática, a reprodutibilidade inter-observador para o reconhecimento de displasia é pobre, particularmente quando se trata de SMD de baixo grau. As *guidelines* podem minimizar este problema e melhorar o reconhecimento de SMD (List A.F. *et al.*, 2004).

10. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Embora a SMD seja um dos principais diagnósticos diferenciais a considerar no caso de um idoso com anemia / displasia eritróide inexplicada (Pfeilstöcker M. *et al.*, 2007), devem ser excluídas outras situações, nomeadamente (Vassallo J. e Magalhães S.M.M., 2009; Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006):

- défices nutricionais (vitamina B12, folato e cobre, ferro);
- alcoolismo crónico;
- intoxicação por metais pesados, como chumbo ou arsénico;
- infeções virais, incluindo infeção por VIH e parvovirus B19;
- patologias orgânicas crónicas do foro renal, tiroideu, hepático e reumatológico ou auto-imune;
- uso de fármacos mielotóxicos (ex: quimioterapia, valproato de sódio, zidovudina, hidroxiureia, antagonistas do folato, etc.)

Todas as patologias mencionadas apresentam displasia mas não carácter clonal e não parecem estar associadas a alterações genéticas (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

De salientar ainda que uma pequena percentagem de células da medula óssea de indivíduos normais pode apresentar displasia (Proven D., 2003).

Tal como acontece nas SMD, outras patologias que afectam a medula óssea caracterizam-se por citopenias periféricas e risco acrescido de desenvolvimento de LMA. Estas patologias incluem a AA, HPN, leucemia de *hairy cells*, doenças linfoproliferativas, síndromes de falência medular hereditários, entre outros. O que distingue as SMD é a morfologia displásica das células da MO e SP (Orazi A. e Czader M.B., 2009; Malcovati L. e Nimer S.D., 2008; Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). A citometria de fluxo pode ser usada para excluir HPN e LGL T, como referido (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

Por outro lado, temos ainda de diferenciar as SMD de outras doenças hematológicas clonais similares, como LMA (definida pela presença de, pelo menos,

20% de mieloblastos na MO ou SP), SMD-NMP (neste caso, a diseritropoiese ou granulopoiese está associada e leucocitose ou monocitose superior a 1×10^9 células/l), como LMMC e NMP (em que tanto a displasia da linha vermelha como da linha granulocítica estão ausentes) (Tefferi A. e Vardiman J.W., 2009).

Por fim, é ainda de considerar a hipótese de sobreposição de mais de uma patologia na origem das alterações encontradas. Em muitos casos, apenas depois de se observar a evolução do doente se clarifica a natureza das alterações.

11. EVOLUÇÃO

Uma vez estabelecida, a SMD pode progredir no sentido do agravamento das citopenias devido à hematopoiese ineficaz progressiva ou à transformação em LMA. A relação entre as duas vias ainda não foi elucidada mas, é clara a diferença no índice apoptótico que caracteriza cada um dos processos. O que também não está esclarecido é se a célula leucémica está presente desde o início da doença e desenvolve uma vantagem proliferativa ao longo do tempo ou se, pelo contrário, se desenvolve posteriormente a partir de um clone ineficaz (Farquhar M.L. e Bowen D.T., 2003).

Tal como a clínica, este parâmetro também é extremamente variável, assim, a doença tanto pode ter um curso indolente e prolongado com uma esperança de vida quase normal, ou ser agressiva, caracterizada por uma progressiva falência da medula óssea e condicionar uma sobrevivência curta (Orazi A. *et al.*, 2009)

A evolução ou estabilidade da contagem de células do sangue periférico é usada para distinguir SMD da sua evolução para LMA (Greenberg P.L. *et al.*, 2011). Cerca de 20 a 30% dos doentes com SMD progride, eventualmente, para LMA (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). Apesar da progressão para LMA ser o curso natural na maior parte dos casos de SMD, a percentagem de doentes que evolui varia, substancialmente, nos vários subtipos de SMD (WHO, 2008).

O surgimento de LMA, no contexto de uma SMD, é quase sempre fatal. Mesmo na ausência de progressão para LMA, as complicações associadas às citopenias periféricas – como as infecções, são responsáveis pela morte de 40 a 65% dos doentes (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). A sobrevivência média de um doente com SMD primária é de, aproximadamente, 20 meses (Hoffbrand A.V. *et al.*, 2005).

Ao contrário de outras patologias neoplásicas, o diagnóstico precoce da SMD nunca mostrou ser útil na alteração do curso natural da história da doença, logo, daí não existir interesse em instituir qualquer programa de rastreio (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

12. PROGNÓSTICO

É crucial o desenvolvimento de instrumentos clínicos que sejam capazes de prever com um certo grau de precisão o prognóstico para os doentes com os vários subtipos específicos de SMD (Garcia-Manero G., 2010). O sistema de classificação mais usado é o IPSS (*International Prognostic Scoring System*) (Tabela 12). O IPSS foi proposto por Greenberg *et al.* em 1997, e permitiu uma abordagem mais uniforme aos doentes com SMD (Garcia-Manero G., 2010).

Foi validado em populações de doentes independentes e é extensamente usado em vários ensaios clínicos e decisões terapêuticas (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008). Baseia-se na percentagem de blastos presentes na medula óssea, no número de citopenias periféricas e nas alterações citogenéticas detectadas na medula (Garcia-Manero G., 2010). Adicionalmente a estes parâmetros temos o factor idade, sendo que os doentes com idade mais avançada têm pior o prognóstico (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). Partindo destes parâmetros, foi possível distribuir os doentes em 4 grupos prognósticos: baixo risco, risco intermédio-1, risco intermédio-2 e alto risco (Tabela 13) (Jansen J.H. e Langemeijer S.M.C., 2010).

Tabela 12 - IPSS para SMD (1997)

Valor prognóstico	Parâmetro prognóstico		
	% blastos na MO	Cariótipo	Citopenias* no SP
0	< 5	<u>Bom prognóstico:</u> Normal, -Y isolado, del (5q) isolado, del (20q) isolado	0 ou 1
0,5	5-10	<u>Prognóstico intermédio:</u> (Todos os não definidos em 0 ou 1)	2 ou 3
1		<u>Mau prognóstico:</u> Complexo (≥ 3 anomalias cromossómicas), Anomalias no cromossoma 7	-
1,5	11-20	-	-
2	21-30	-	-

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

NOTA: para obter o *score* prognóstico total somam-se os resultados parciais obtidos para cada parâmetro prognóstico.

(Adaptado de Greenberg P.L. *et al.*, 1997)

Tabela 13 - Estratificação de risco do IPSS

Pontuação total	Categoria de risco	Tempo médio de sobrevivência (anos)	Taxa de progressão para LMA (%)	Tempo até que 25% dos doentes progride para LMA (anos)
0	Baixo	5,7	19	9,4
0,5 a 1	Intermédio-1 (INT-1)	3,5	30	3,3
1,5 a 2	Intermédio-2 (INT-2)	1,2	33	1,1
≥ 2,5	Alto	0,4	45	0,2

(Adaptado de Greenberg P.L. *et al.*, 1997)

Uma das vantagens deste sistema é ter sido elaborado a partir de dados recolhidos de um grupo de doentes que nunca tinha sido exposto a terapêutica prévia, o que permitiu avaliar o curso natural da doença mas também limita a sua aplicabilidade (Garcia-Manero G., 2010).

Como limitações temos o facto de ter sido calculado de acordo com doentes que apresentavam SMD *de novo* em estádios iniciais da doença (desprezando a evolução da doença), não é muito preciso e o tempo médio de sobrevivência é altamente variável mesmo dentro de um subgrupo (Garcia-Manero G., 2010). Quanto aos casos de SMD-t, que não foram incluídos nesta análise, têm, quase todos, mau prognóstico, sendo comparável ao IPSS de maior risco (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

Durante os últimos anos tem havido grande esforço no sentido da criação de um novo sistema de classificação de prognóstico das SMD (Garcia-Manero G., 2010). Graças aos avanços na área da biologia molecular, vários parâmetros adicionais têm sido propostos e estão em fase de estudo. Por exemplo, a existência de fibrose na medula óssea e a presença de agregados de células CD34+ nas biópsias de medula óssea, parecem estar associadas a um prognóstico menos favorável (Jansen J.H. e Langemeijer S.M.C., 2010). Uma colaboração entre grupos de investigadores austríacos e alemães permitiu identificar a elevação da enzima lactato desidrogenase (LDH) como factor prognóstico adicional contribuindo para o refinamento do IPSS, através do aumento da estratificação (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

A classificação da OMS baseada na IPSS (WPSS) (Tabela 14), já leva em conta as alterações do cariótipo e a dependência de transfusões sanguíneas frequentes (que espelha a gravidade da anemia) adicionalmente às características morfológicas, segundo

critérios de OMS e características citológicas, de acordo com o IPSS (Garcia-Manero G., 2010; Jansen J.H. e Langemeijer S.M.C., 2010).

O WPSS divide os doentes em 5 subgrupos: muito baixo risco, baixo risco, risco intermédio, alto risco, muito alto risco. O tempo de sobrevivência médio varia entre os 103 meses e os 12 meses, consoante a classe de risco. O risco de evolução para LMA também aumenta com a classe (Garcia-Manero G., 2010).

Tabela 14 - WPSS para SMD

Valor prognóstico	Parâmetro prognóstico		
	Sub-grupo OMS	Cariótipo	Dependência de transfusões
0	AR, ARSA, 5q-	<u>Bom prognóstico:</u> Normal, -Y isolado, del (5q) isolado, del (20q) isolado	Não
1	CRDM, CRDM-RS	<u>Prognóstico intermédio:</u> (Todos os não definidos em 0 ou 2)	regular*
2	AREB-1	<u>Mau prognóstico:</u> Complexo (≥ 3 anomalias cromossomicas), Anomalias no cromossoma 7	-
3	AREB-2	-	-

* Dependência de transfusão regular é definida como necessidade de receber, pelo menos, 1 transfusão a cada 8 semanas durante um período de 4 meses.

NOTA: para obter o *score* prognóstico total somam-se os resultados parciais obtidos para cada parâmetro prognóstico.

(Adaptado de Malcovati L. *et al*, 2007)

Segundo este modelo, um doente é classificado num grupo de risco no momento do diagnóstico (Tabela 15); se a doença progredir, a categoria do WPSS pode mudar consoante a pontuação obtida e o doente passa a ser acompanhado de acordo com o grupo de risco em que se inclui (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

Assim, este modelo pode ser usado para estimar o tempo de sobrevivência e o risco de progressão para LMA em qualquer momento do curso da doença (Jansen J.H. e Langemeijer S.M.C., 2010).

Tabela 15 - Estratificação de risco do WPSS

Pontuação total	Grupo de risco
0	muito baixo
1	Baixo
2	Intermédio
3-4	Risco
5-6	alto risco

(Adaptado de Malcovati L. *et al*, 2007)

A necessidade de transfusão de eritrócitos foi identificada como tendo um impacto negativo no prognóstico dos doentes com diminuição na sobrevivência e maior probabilidade de transformação leucémica. Estas informações indicam que as transfusões frequentes e deposição de ferro podem alterar a história natural da patologia, não só induzindo lesões em órgãos, como o coração e fígado, como na medula óssea, prejudicando a hematopoiese (Garcia-Manero G., 2010; Malcovati L. e Nimer S.D., 2008). O número de citopenias periféricas continua a não ter um valor significativo quando o número de linhagens displásicas é incluído na análise (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

As vantagens do WPSS passam por um bom tratamento estatístico e validação, e é dinâmico, podendo ser aplicado em qualquer fase da doença. Os problemas são que se baseia em critérios diagnósticos morfológicos que podem sofrer variabilidade inter-observador e em critérios de necessidade de transfusão que também são diversos em termos geográficos (Garcia-Manero G., 2010).

A faixa etária em que prevalece esta patologia é ainda afectada por uma série de co-morbilidades que podem ter influência sobre o curso natural da doença e sobre as decisões terapêuticas. Doentes com morbilidade graves podem ver a sua sobrevivência diminuída em 50%, independentemente da idade e do grupo de risco do IPSS. Estes dados chamam a atenção para a possível necessidade de incluir nos critérios de prognóstico um alínea referente às patologias concomitantes (Garcia-Manero G., 2010).

O prognóstico para doentes com SMD é extremamente heterogéneo e é significativamente afectado pelas suas características intrínsecas (Garcia-Manero G.,

2010). Este facto prejudica a decisão clínica, não apenas por dificultar a escolha da modalidade terapêutica como do momento mais adequado de intervenção. Os doentes com SMD de baixo risco podem viver durante longos períodos sem que haja progressão da sua patologia. Para estes doentes, o risco associado ao tratamento por transplante é inaceitavelmente alto (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

Apesar de extremamente úteis, os instrumentos de estratificação do prognóstico disponíveis hoje em dia ainda não são suficientemente precisos para serem usados em todos os grupos de doentes (Garcia-Manero G., 2010). Visto que, por exemplo, as mutações recorrentes dificultam a definição de subtipos específicos de SMD (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006)

O sistema de classificação óptimo é aquele que compreende todas as características do doente, é baseado nas alterações a nível molecular, é capaz de prever a história natural da doença, e elucida sobre as potenciais respostas a terapêuticas específicas. O que se prevê um grande desafio devido à heterogeneidade característica das SMD (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006)

Deste modo, novos parâmetros deverão ser introduzidos na avaliação do prognóstico das SMD, graças ao maior domínio do conhecimento da biologia molecular e celular proporcionado pelas novas técnicas de estudo (Jansen J.H. e Langemeijer S.M.C., 2010).

13. ABORDAGEM DIAGNÓSTICA E SEGUIMENTO

Um diagnóstico inadequado de SMD pode levar ao atraso da classificação ou à sua atribuição incorrecta o que pode condicionar decisões terapêuticas inapropriadas (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008). Um diagnóstico e uma classificação correctos dependem de uma rigorosa interpretação, tanto das características clínicas como dos achados laboratoriais/patológicos. A colaboração entre o hematologista e o patologista é essencial para uma avaliação adequada (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008)

A abordagem das SMD é complicada pela idade, geralmente, avançada dos doentes, directamente e indirectamente pelas co-morbilidades não hematológicas e pela incapacidade dos doentes em tolerar certas formas de terapêutica intensiva. Além disso, quando a patologia progride para LMA, tem tendência a ter menores taxas de resposta à terapêutica convencional em comparação com os doentes que sofrem de LMA *de novo* (Greenberg, P.L., *et al.*, 2011).

Uma abordagem não invasiva, mais conservativa é indicada para os doentes que apresentam uma curta esperança de vida devida a co-morbilidades da doença (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006).

Segundo Valent P. e colaboradores (2010), de um ponto de vista prático, o diagnóstico de SMD deve ser estabelecido segundo um raciocínio passo a passo (Tabela 16). O primeiro passo consiste em verificar se o doente preenche os critérios diagnóstico mínimos para o diagnóstico de SMD. De seguida, deve-se definir qual o sub-tipo de SMD (Figura 13), de acordo com os critérios da OMS. Marcadores prognósticos relevantes, como a presença e grau de fibrose ou de AMA-CD34, devem ser incluídos no relatório. O próximo passo consiste no exame do doente para a pesquisa de factores de risco individuais de forma a estabelecer um perfil de risco global, preferencialmente de acordo com o IPSS ou WPSS. Finalmente, e se aplicável, devem ser aplicados os *scores* de tratamento, como por exemplo *score*-EPO, *score*-comorbilidade ou *score*-transplante, de forma a definir a abordagem terapêutica mais adequada a um dado doente (Valent P. *et al.*, 2010).

Tabela 16 - Abordagem passo a passo da SMD

1. Critérios diagnósticos mínimos	Estabelecer diagnóstico de SMD
2. Classificação segundo a classificação FAB ou OMS	Estabelecer o subtipo de SMD
3. Sistemas <i>score</i> IPSS, WPSS entre outros	Estabelecer risco de transformação leucémica
4. Factores de risco relacionados com o doente	Estimar o tempo de sobrevivência (livre de LMA)
5. Sistemas <i>score</i> relacionados com a terapêutica	Delinear o plano terapêutico
6. Critérios de resposta ao tratamento	Prever respostas ao plano terapêutico

(Adaptado de Valent P. *et al.*, 2010)

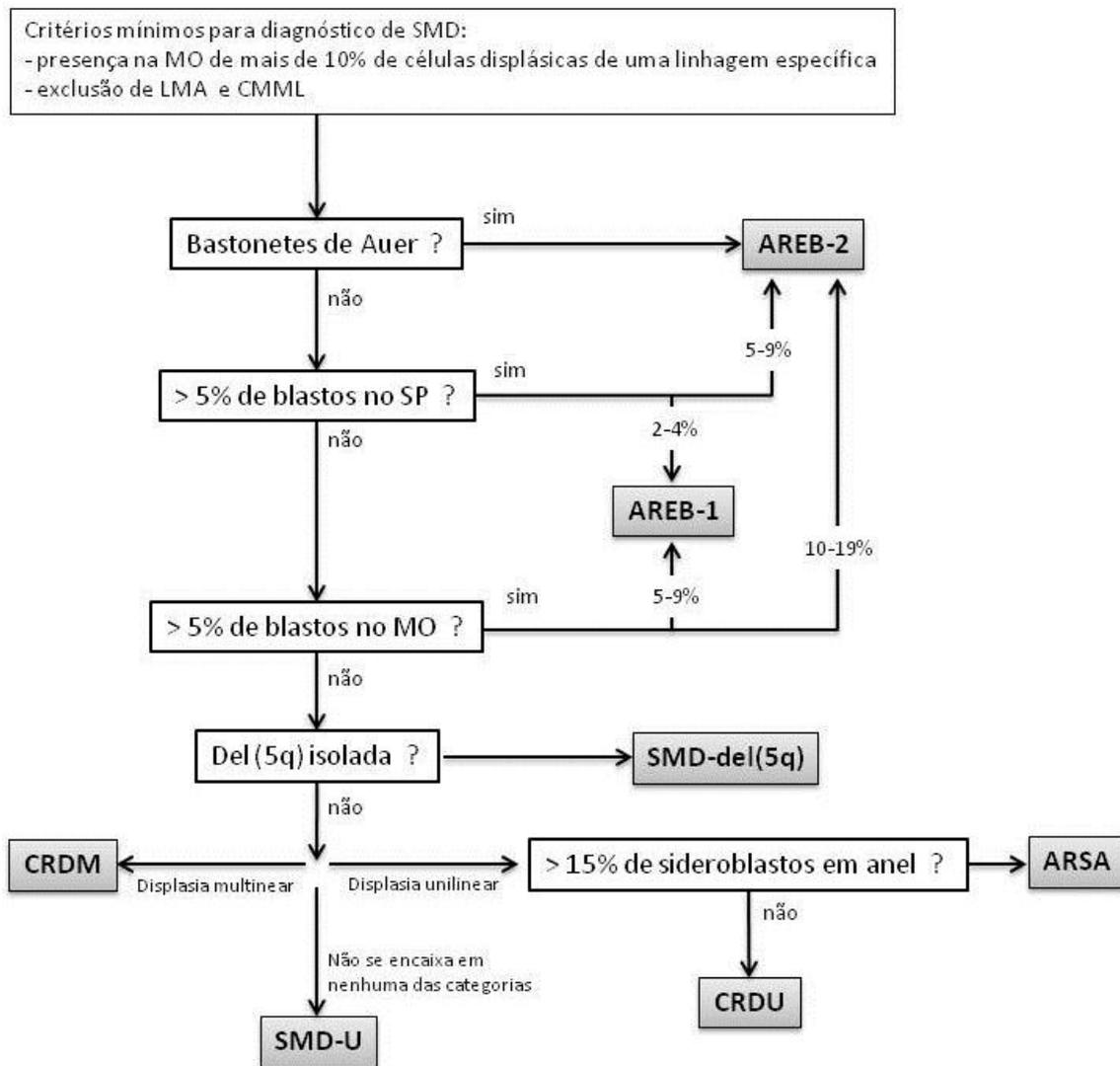


Figura 13 - Algoritmo para diagnóstico e classificação de SMD primária, baseada no sistema de classificação da OMS de 2008. (Adaptado de Tefferi A., 2009)

14. CONCLUSÃO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) inclui um grupo de doenças clonais da célula estaminal hematopoiética caracterizadas por displasia, hematopoiese ineficaz e potencial risco de evolução para Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA). Múltiplos e complexos mecanismos genéticos e epigenéticos estão envolvidos na patogénese desta doença, originando alterações na proliferação, diferenciação e apoptose das células do sistema hematopoiético, traduzindo-se em anomalias na medula óssea e no sangue periférico.

As SMD constituem, sem dúvida, um desafio para a comunidade científica (Steensma D.P. e Bennett J.M., 2006). Cada doente com SMD é único e apresenta problemas clínicos idiossincráticos. Cada doente deve ser considerado um “caso especial” devido à sua peculiar constelação de características clínicas e patológicas que apresenta (Steensma D.P. e Tefferi A., 2003).

Este tipo de patologias toma uma importância crescente com a tendência instaurada do envelhecimento populacional e aumento da esperança média de vida, principalmente, nos países desenvolvidos. Desta forma, esta patologia torna-se-á cada vez mais comum na prática clínica diária, devendo estar sempre presente no raciocínio dos clínicos como possível diagnóstico diferencial.

O diagnóstico de SMD deve ser baseado num variado leque de dados recolhidos, desde a história clínica, exame físico, achados laboratoriais, citológicos, histológicos e citogenéticos. Um diagnóstico e estratificação prognóstica adequados são fundamentais na definição da abordagem terapêutica mais adequada (Vassallo J. e Magalhães S.M.M., 2009).

Apesar de os parâmetros, estudos e sistemas de classificação terem evoluído, significativamente, nas últimas duas décadas, o diagnóstico apropriado e o estabelecimento de um prognóstico realista permanece um desafio na prática clínica corrente (Valent P. *et al.*, 2010).

Uma correcta selecção e aplicação dos recursos terapêuticas é altamente dependente de um correcto diagnóstico e estratificação prognóstica, e são a chave para

providenciar ao doente o máximo benefício terapêutico com impacto positivo na sobrevivência e qualidade de vida (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008). O desenvolvimento recente de múltiplos novos agentes terapêuticos para o tratamento das SMD, resultou no aumento do número de doentes a usufruir de terapêutica que potencialmente altera o curso natural da doença e melhora a sobrevivência (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

A aquisição de um conhecimento progressivamente mais profundo sobre os mecanismos celulares e moleculares deste complexo grupo de doenças (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010) vai permitir refinar o prognóstico e a selecção da terapêutica mais adequada para cada caso (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008) e atingir uma eficácia terapêutica para lá dos recursos limitados de que dispomos actualmente (Davids M.S. e Steensma D.P., 2010). É provável que compostos, ainda em desenvolvimento, venham a ter grande impacto em doentes de sub-grupos seleccionados, tal como o definido nos sistemas de prognóstico (Malcovati L. e Nimer S.D., 2008).

REFERÊNCIAS

- Abdel-Wahab *et al.* (2009) Genetic characterization of TET1, TET2 and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*; 114: 144-147.
- Barzi A., Sekeres M.A. (2010) Myelodysplastic syndromes: a practical approach to diagnosis and treatment. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 77(1), 37-44.
- Boulton J., Fidler C., Strickson A.J., Watkins F., Gama S., Kearney L., Tosi S., Kasprzyk A., Cheng J.F., Jaju R.J., Wainscoat J.S. (2002) Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood*, 99(12): 4638-4641.
- Bowen D.T., Frew M.E., Hills R., Gale R.E., Wheatley K., Groves M.J., Langabeer S.E., Kottaridis P.D., Moorman A.V., Burnett A.K., D.C. Linch (2005) RAS Mutation in Acute Myeloid Leukemia is Associated With Cytogenetic Subgroups but Does Not Influence Outcome in Patients Younger than 60 Years. *Blood*. 106 (6): 2113-2119.
- Christiansen D., Andersen M.K., Desta F., Pedersen-Bjergaard J. (2005) Mutations of Genes in The Receptor Tyrosine Kinase (RTK)/RAS-BRAF Signal Transduction Pathway in Therapy-Related Myelodysplasia and Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia* 19: 2232-2240.
- Cortês Emília N.B.R. (2010) Nutrição e alterações epigenéticas na síndrome mielodisplásica.
- Davids M.S., Steensma D.P. (2010) The molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Cancer Biology & Therapy*, 10(4), 309-319.
- Esteller M. (2008) Epigenetics in cancer. *The New England Journal of Medicine* 358(11), 1148–1159.
- Farquhar M.J., Bowen D.T. (2003) Oxidative Stress and the Myelodysplastic Syndromes. *International Journal of Hematology*, 77, 342-350.
- Feinberg A.P., Tycko B. (2004) The history of human cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*, 4(2):143-152.

Garcia-Manero, G. (2010) Prognosis of myelodysplastic syndromes. *Hematology*, 330-337

Gilliland D., Jordan C.T., Felix C.A. (2004). The Molecular Basis of Leukemia. American Society of Hematology Education Program Book. *Hematology* 80-97.

Gonçalves A.C., *et al.* (2009) Influência do polimorfismo ALA(9)VAL da MnSOD na SDM. *Sociedade Portuguesa de Hematologia*.

Greenberg P.L. *et al.* (2011) Myelodysplastic Syndromes – NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 9(1), 30-56.

Greenberg P.L., Cox C., LeBeau M. M., Fenaux P., Morel P., Sanz G., Sanz M., *et al.* (1997) International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 89(6), 2079-2088.

Haase D. (2008) Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Annals of Hematology*, 87(7), 515-26.

Heaney M.L., Golde D.W. (1999) Myelodysplasia. *The New England Journal of Medicine*, 340(21), 1649-1660.

Herman J.G., Baylin S.B. (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England Journal of Medicine*, 2003; 349(21):2042-54.

Hirai H. (2003) Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 33(4), 153-60.

Hoffbrand A.V., Cattofsky D., Tuddenham E.G.D. (2005) Postgraduated Haematology. 5th edition, Blackwell Publishing, 662-680.

Hoffbrand A.V., Moss P.A.H., Petit J.E. (2006) Essential Haematology. 6th edition. Blackwell Publishing.

Hofmann W.K., Koefler H.P. (2005) Myelodysplastic syndrome. *Annual Review of Medicine*, 56, 1-16.

Hussein K., Abdel-Wahab O., Lasho T.L., *et al.* (2010) Cytogenetic correlates of TET2 mutations in 199 patients with myeloproliferative neoplasms. *American Journal of Hematology*, 85: 81–83.

Jädersten M., Hellström-Lindberg E. (2010) New clues to the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes, *Experimental Cell Research*, 316(8), 1390-1396.

Jankowska *et al.* (2009) Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 113: 6403-10.

Jansen J.H., Langemeijer S.M.C. (2010) The biological basis of myelodysplastic syndromes, *Hematology Education*, 4(1), 163-170.

Leone G., Pagano L., Ben-yehuda D., Voso M.T. (2007) Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. *haematologica/the hematology journal*, 92(10), 1389-1398.

Liesveld, J.L., Jordan, C.T., Phillips II, G.L. (2004). The Hematopoietic Stem Cell in Myelodysplasia. *Stem Cells*, 22, 590-599.

Liew E., Owen C.J. (2011) Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature. *Haematologica*, 96(10), 1536-1542.

List A.F., Vardiman J.W., Issa J-P.J., DeWitte T.M. (2004). Myelodysplastic syndromes. *Hematology*, 297-317.

Longo D.L., Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Jameson J.L., Loscalzo J., *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18th edition, McGraw Hill.

Malcovati L., Nimer S.D. (2008) Myelodysplastic syndromes: diagnosis and staging. *Cancer Control*, 15(Supplement)(4), 4-13.

Malcovati L., Germing U., Kuendgen A., Della Porta M.G., Pascutto C., Invernizzi R., Giagounidis A., *et al.* (2007) Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, 25(23), 3503-3510.

Morgan M. A., Reuter C. W. M. (2006). Molecularly Targeted Therapies in Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemias. *Annals of Hematology* 85: 139-163.

Mufti G.J. (2004) Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 17(4), 543-57.

Niero-Melo L., Resende L.S.R., Gaiolla R.D., Oliveira C.T., Domingues M.A.C., Moraes Neto F.A. (2006) Diretrizes para diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 28(3), 167-174.

Nimer S.D. (2008) Myelodysplastic syndromes. *Blood*, 111(10), 4841-51.

Nimer, S. D. (2008) MDS: a stem cell disorder - but what exactly is wrong with the primitive hematopoietic cells in this disease?, *Hematology*, 43-51.

Ogata K. (2006) Myelodysplastic Syndromes: recente progress in diagnosis and understanding of their pathophysiology. *J Nippon Sch*, 73(6), 300-307.

Orazi A., Czader M.B. (2009). Myelodysplastic syndromes. *American Journal of Clinical Pathology*, 132, 290-305.

Parcells B.W., Ikeda A.K., Simms-Waldrip T., Moore T.B., Sakamoto K.M. (2006). FMS-Like Tyrosine Kinase 3 in Normal Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia. *Stem Cells* 24(5): 1174-1184.

Pedersen-Bjergaard J., Andersen M.T., Andersen, M.K. (2007) Myelodysplastic Syndromes - Genetic Pathways in the Pathogenesis of Therapy-Related Myelodysplasia and Acute Myeloid Leukemia, *Hematology*, 392-397.

Pfeilstöcker M., Karlic H., Nösslinger T., Sperr W., Stauder R., Krieger O., Valent P. (2007) Myelodysplastic syndromes, aging, and age: correlations, common mechanisms, and clinical implications. *Leukemia & Lymphoma*, 48(10), 1900-1909.

Proven D. (2003) ABC of Clinical Haematology. 2nd edition, *BMJ Book*, 33-36.

Quesnel B., Guillermin G., Vereecque R., Wattel E., Preudhomme C., Bauters F., Vanrumbeke M., Fenaux P. (1998) Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood*, 91(8):2985-90.

Small, D. (2006) FLT3 Mutations: Biology and Treatment. *Hematology*, 2, 178-184.

Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H., *et al.* Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2002; 99: 16899–16903.

Steensma D. P., Bennett J. M. (2006) The myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 81(1), 104-130.

Steensma D.P., Tefferi A. (2003) The myelodysplastic syndrome(s): a perspective and review highlighting current controversies. *Leukemia research*, 27, 95-120.

Stirewalt D.L., Radich J.P. (2003). The Role of FLT3 in Haematopoietic Malignancies. *Nature Reviews Cancer*, 3(9): 650-665.

Swerdlow Steven H. *et al.* (2008) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th edition.

Tefferi A. *et al.* (2009) Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia*, 1-3.

Tefferi A., Vardiman, J.W. (2009) Myelodysplastic syndromes. *The New England Journal of Medicine*, 361(19), 1872-1885.

Thiele J., Kvasnicka H., Facchetti F., Franco V., van der Walt J., Orazi A. (2005) European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*, 90(8), 1128-1132.

Uchida T., Kinoshita T., Nagai H., Nakahara Y., Saito H., Hotta T., Murate T. (1997) Hypermethylation of the p15INK4B Gene in Myelodysplastic Syndromes. *Blood*, 1997 90: 1403-1409.

Valent P., Horny H.-P., Bennett J., Fonatsch C., Germing U., Greenberg P.L., Haferlach T., *et al.* (2007) Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leukemia research*, 31, 727-736.

Valent P., Orazi A., Büsche G., Schmitt-Gräff A., George T. I., Sotlar K., Streubel B., *et al.* (2010) Standards and Impact of Hematopathology in Myelodysplastic Syndromes (MDS) *Oncotarget*, 1(7), 483-496.

Vassallo J., Magalhães S.M.M. (2009) Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 31(4), 267-272.

Yoo C.B., Jones P.A. (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature Reviews-Drug Discovery* 5(1): 37–50.