



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

LETICIA RODRIGUES SAMPAIO

Avaliação da expressão gênica da via STING em camundongos C57BL/6 submetidos a um modelo de clareamento de pelos com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e amônia (NH₃) (banho de lua) e em pacientes com neoplasia mielodisplásica

FORTALEZA

2023

LETICIA RODRIGUES SAMPAIO

Avaliação da expressão gênica da via STING em camundongos C57BL/6 submetidos a um modelo de clareamento de pelos com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e amônia (NH₃) (banho de lua) e em pacientes com neoplasia mielodisplásica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S184a Sampaio, Leticia Rodrigues.

Avaliação da expressão gênica da via STING em camundongos C57BL/6 submetidos a um modelo de clareamento de pelos com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e amônia (NH₃) (banho de lua) e em pacientes com neoplasia mielodisplásica / Leticia Rodrigues Sampaio. – 2023.

138 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

1. Espécies reativas de oxigênio. 2. Agentes clareadores. 3. Interferons. 4. Síndrome Mielodisplásica.
I. Título.

CDD 610

LETICIA RODRIGUES SAMPAIO

Avaliação da expressão gênica da via STING em camundongos C57BL/6 submetidos a um modelo de clareamento de pelos com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e amônia (NH₃) (banho de lua) e em pacientes com neoplasia mielodisplásica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovada em: 30/11/2023.

BANCA EXAMINADORA

Ronald Feitosa Pinheiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Sílvia Maria Meira Magalhães
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Danielle Calheiros Campelo Maia
Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC-UFC)

Sara Teresinha Olalla Saad
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Niels Olsen Saraiva Câmara
Universidade de São Paulo (USP)

A Deus.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que durante todo esse tempo me proporcionou bem-estar físico e mental para a realização de todas as minhas atividades. Minha fonte inesgotável de ânimo e segurança.

Aos pais, Levie e Mirian, pelo amor, pela torcida, pelo cuidado e pelos valores transmitidos.

Às minhas duas irmãs, Milena e Luiza, que me dão forças e me dão ânimo pra enfrentar qualquer circunstância.

Às minhas avós, dona Raimunda e dona Ziula, que juntamente com minhas tias manifestam interesse pelas minhas atividades e torcem para o meu sucesso.

Aos meus amigos do Citogenômica: Dyllan, João Vitor, Mateus e Sharlene. Essa pesquisa não teria sido realizada sem a ajuda técnica e o apoio mental que vocês me proporcionaram. Sei que posso contar com cada um de vocês.

À Dani, Mayara e Roberta. Pesquisadoras do Citogenômica que são um exemplo para mim e que me inspiram. Ao Wesley, que, mesmo a distância, consegue ser um exemplo de profissional.

Aos demais que fazem parte do Laboratório de Citogenômica do Câncer pela colaboração que vocês proporcionam dentro do laboratório.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite de avaliar esse trabalho e pelas sugestões fornecidas. É uma honra poder apreender com vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronald Feitosa, que acreditou no meu potencial para pesquisa desde minha iniciação científica. Que me proporcionou alegrias diversas e muitos desafios também. O senhor é um exemplo não só de docente, mas de ser humano.

À Universidade Federal do Ceará, que me deu as bases da minha formação acadêmica e fornece uma estrutura ímpar de ensino, pesquisa e extensão.

Ao CNPq e à CAPES, pelo apoio financeiro a essa pesquisa.

“Todas as grandes coisas são difíceis e raras.”

Spinoza

RESUMO

Espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio, causam estresse oxidativo e instabilidade genética – uma marca registrada do câncer. A via do Estimulador de Genes do Interferon (STING) atua no reconhecimento de fragmentos de dupla fita de DNA localizados no citoplasma, seja por agentes infecciosos ou por instabilidade genética. No Brasil, há uma prática comum de clareamento de pelos corporais e cabelo com produtos à base de peróxido de hidrogênio e amônia que tem sido associada, em histórias clínicas, ao desenvolvimento de neoplasias da medula óssea. O objetivo do estudo foi avaliar a expressão gênica da via STING em camundongos C57BL/6 submetidos ao clareamento de pelos corporais (banho de lua) e em pacientes com Neoplasia Mielodisplásica. No protocolo experimental final, 35 camundongos C57BL/6 machos e 35 camundongos fêmeas foram intoxicados topicamente no dorso com soluções de água oxigenada e amônia durante 10 minutos, 1-2 vezes por semana durante 8-10 semanas. Os seguintes grupos foram examinados: a) grupo controle – 500µL de PBS (n = 7); b) grupo peróxido – intoxicação com 500µL de fórmula comercial de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) com 12% de concentração (40 volumes) (n = 7); c) grupo controle acetilcisteína (NAC) - 500µL de PBS + solução salina (5mL/Kg, i.p) (n = 7); d) grupo amônia – intoxicação com 250µL de fórmula comercial de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) com 12% de concentração (40 volumes) + 250µL de fórmula comercial clareadora de pelos com base de amônia a 5,8% de concentração (n = 7) e e) grupo amônia acetilcisteína (NAC) - intoxicação com 250µL de fórmula comercial de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) com 12% de concentração (40 volumes) + 250µL de fórmula comercial clareadora de pelos com base de amônia a 5,8% de concentração + N-acetilcisteína (100mg/Kg, i.p) (n = 7). Após eutanásia, o baço foi retirado para análise de expressão gênica da via STING e o fêmur foi retirado para análise citogenética e histopatológica. O estudo citogenético foi realizado por banda-G, para a expressão gênica foi utilizada a metodologia de PCR em tempo real (RT-qPCR) e a histopatologia foi realizada pela leitura de 5 campos em objetiva de 40x por dois avaliadores independentes. Não foram encontradas alterações citogenéticas relacionada à exposição de amônia ou peróxido de hidrogênio. Na análise morfológica, camundongos do grupo peróxido e do grupo amônia apresentaram hiperplasia de megacariócitos agrupados sugestivos de doença mieloproliferativa da medula óssea. Em relação à análise de expressão gênica, foram quantificados os genes da via STING: *Cgas*, *Ddx41*, *Sting*, *Tbk1* e os receptores Toll *Tlr3* e *Tlr4*. Para os camundongos machos, o grupo amônia apresentou maior expressão do gene *Cgas* em relação ao grupo amônia NAC (p = 0,035). Com relação ao gene *Sting*, os camundongos do grupo peróxido apresentaram maior expressão de *Sting* em relação ao grupo controle (p = 0,050) e os animais do grupo amônia apresentaram maior expressão de *Sting* do que os animais dos grupos controle NAC (p = 0,050) e amônia NAC (p = 0,050). Para os camundongos fêmeas, observamos que os animais do grupo peróxido apresentaram maior expressão de *Cgas* em relação aos animais do grupo controle (p = 0,047). Na coorte de pacientes com SMD, verificamos que *DDX41* apresentava maior nível de expressão em pacientes com contagem de blastos na medula óssea superior a 10% em relação aos pacientes que tinham ≤2% blastos e entre 5% -10% de blastos (p=0,002 e p=0,037, respectivamente) e maior expressão em pacientes com o subtipo SMD com excesso de blastos tipo-2 (SMD-EB 2) em relação a pacientes do subtipo de baixo risco SMD-DM (p=0,004). *STING* apresentou maior expressão em pacientes com contagem de blastos na medula óssea entre 5%-10% quando comparados aos pacientes que tinham ≤2% blastos (p=0,016); maior expressão em pacientes com o subtipo SMD-EB1 em relação a pacientes do subtipo Sideroblastos em anel (p=0,013) e maior expressão em pacientes com cariótipo alterado (p=0,002). Esta pesquisa proporcionou associações significantes com relação a expressão da STING, demonstrando que esses genes podem estar desregulados por exposição ao H₂O₂ e NH₃ e em SMD, sugerindo um possível link entre a exposição a esses fatores e o desenvolvimento de neoplasia da medula óssea.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio; Agentes clareadores; Interferons; Síndrome Mielodisplásica.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide, cause oxidative stress and genetic instability - a hallmark of cancer. The STING pathway works by recognizing double-stranded DNA fragments located in the cytoplasm, either by infectious agents or by genetic instability. In Brazil, there is a common practice of bleaching body hair and hair with products based on hydrogen peroxide and ammonia, which has been associated in clinical histories with the development of bone marrow neoplasms. The aim of the study was to evaluate the gene expression of the STING pathway in C57BL/6 mice subjected to body hair bleaching (skin hair bleaching) and in patients with Myelodysplastic Neoplasia. In the final experimental protocol, 35 male and 35 female C57BL/6 mice were topically intoxicated on the back with solutions of hydrogen peroxide and ammonia for 10 minutes, 1-2 times a week for 8-10 weeks. The following groups were examined: a) control group - 500 μ L of PBS (n = 7); b) peroxide group - intoxication with 500 μ L of a commercial formula of hydrogen peroxide (hydrogen peroxide) with a 12% concentration (40 volumes) (n = 7); c) acetylcysteine (NAC) control group - 500 μ L of PBS + saline solution (5mL/Kg, i. p) (n = 7); d) ammonia group - intoxication with 250 μ L of commercial hydrogen peroxide formula (hydrogen peroxide) with 12% concentration (40 volumes) + 250 μ L of commercial hair lightening formula based on ammonia at 5, 8% concentration (n = 7) and e) ammonia-acetylcysteine (NAC) group - intoxication with 250 μ L of commercial hydrogen peroxide formula (hydrogen peroxide) with 12% concentration (40 volumes) + 250 μ L of commercial hair lightening formula based on ammonia at 5.8% concentration + N-acetylcysteine (100mg/Kg, i. p) (n = 7). p) (n = 7). After euthanasia, the spleen was removed for gene expression analysis of the STING pathway and the femur was removed for cytogenetic and histopathological analysis. The cytogenetic study was carried out using G-banding, real-time PCR (RT-qPCR) was used for gene expression and histopathology was carried out by reading 5 fields under a 40x objective by two independent evaluators. No cytogenetic alterations were found in relation to exposure to ammonia or hydrogen peroxide. In the morphological analysis, mice in the peroxide group and the ammonia group showed hyperplasia of grouped megakaryocytes suggestive of myeloproliferative bone marrow disease. Gene expression analysis quantified the genes of the STING pathway: Cgas, Ddx41, Sting, Tbk1 and the Toll receptors Tlr3 and Tlr4. For male mice, the ammonia group showed greater expression of the Cgas gene than the NAC ammonia group (p = 0.035). With regard to the Sting gene, the mice in the peroxide group showed greater expression of Sting than the control group (p = 0.050) and the animals in the ammonia group showed greater expression of Sting than the animals in the NAC control (p = 0.050) and NAC ammonia (p = 0.050) groups. For the female mice, we observed that the animals in the peroxide group showed greater expression of Cgas than the animals in the control group (p = 0.047). In the cohort of patients with MDS, we found that DDX41 showed a higher level of expression in patients with a bone marrow blast count of more than 10% compared to patients who had \leq 2% blasts and between 5% and 10% blasts (p=0.002 and p=0.037, respectively) and higher expression in patients with the MDS subtype with excess type-2 blasts (MDS-EB 2) compared to patients with the low-risk MDS-DM subtype (p=0.004). STING showed greater expression in patients with a bone marrow blast count between 5%-10% compared to patients with \leq 2% blasts (p=0.016); greater expression in patients with the SMD-EB1 subtype compared to patients with the ring sideroblast subtype (p=0.013) and greater expression in patients with an altered karyotype (p=0.002). This research provided significant associations regarding STING expression, demonstrating that these genes may be deregulated by exposure to H₂O₂ and NH₃ and in SMD, suggesting a possible link between exposure to these factors and the development of bone marrow neoplasia.

Keywords: Reactive oxygen species; Bleaching Agents; Interferons; Myelodysplastic Syndrome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção de espécies reativas de oxigênio provenientes da redução do O ₂	15
Figura 2 – Efeitos fisiológicos e patológicos das EROs no organismo	16
Figura 3 – Estrutura química na <i>N</i> -acetilcisteína	18
Figura 4 – Via de sinalização STING	21
Figura 5 – Receptores do tipo Toll e seus ligantes	26
Figura 6 – Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R	32
Figura 7 – Classificação clínica da SMD segundo a OMS 2016	33
Figura 8 – Aplicação das substâncias utilizadas no dorso dos animais com auxílio de um pincel e mantendo os animais semi-contidos	38
Figura 9 – Caixa de ponteira 1000µL adaptadas para simular um ambiente pouco arejado	39
Figura 10 – Esquema de clareamento do protocolo piloto	40
Figura 11 – Esquema de clareamento do protocolo final (grupos controle e peróxido) ...	42
Figura 12 – Esquema de clareamento do protocolo final (grupos controle NAC, amônia e amônia NAC)	42
Figura 13 – Ferida apresentada no dorso dos animais do grupo amônia e amônia NAC ..	43
Figura 14 – Flush da medula óssea utilizando <i>eppendorf</i>	45
Figura 15 – Efeito do clareamento sobre a dosagem de ALT/TGP (UI/L) em camundongos do protocolo piloto	57
Figura 16 – Efeito do clareamento sobre a dosagem de AST/TGO (UI/L) em camundongos do protocolo piloto	58
Figura 17 – Efeito do clareamento sobre a concentração de creatinina (mg/dL) em camundongos do protocolo piloto	59

Figura 18 – Representação dos resultados encontrados na citogenética por banda G	62
Figura 19 – Achados histopatológicos	64
Figura 20 – Níveis de expressão do gene <i>Cgas</i> nos grupos controle e peróxido	65
Figura 21 – Níveis de expressão do gene <i>Cgas</i> nos grupos controle NAC, amônia e amônia NAC	67
Figura 22 – Níveis de expressão do gene <i>Ddx41</i> em todos os grupos experimentais	68
Figura 23 – Nível de expressão do gene <i>Sting</i> nos grupos controle e peróxido	71
Figura 24 – Nível de expressão do gene <i>Sting</i> nos grupos controle NAC, amônia e amônia NAC	72
Figura 25 – Níveis de expressão do gene <i>Tbk1</i> em todos os grupos experimentais	74
Figura 26 – Níveis de expressão do gene <i>Tlr3</i> em todos os grupos experimentais	76
Figura 27 – Níveis de expressão do gene <i>Tlr4</i> em todos os grupos experimentais	79
Figura 28 – Análise de correlações classificadas em muito forte entre os genes nos camundongos machos	82
Figura 29 – Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes <i>Tlr3</i> e <i>Tlr4</i> em camundongos C57BL/6 fêmeas	83
Figura 30 – Análise de correlações classificadas em forte entre os genes nos camundongos machos	84
Figura 31 – Análise de correlações classificadas em forte entre os genes nos camundongos fêmeas	85
Figura 32 – Análise de correlações classificadas em moderada entre os genes nos camundongos machos	86
Figura 33 – Análise de correlações classificadas em moderada entre os genes nos camundongos fêmeas	87
Figura 34 – Matriz de correlação de Pearson entre os genes nos camundongos C57BL/6 machos	89
Figura 35 – Matriz de correlação de Pearson entre os genes nos camundongos C57BL/6 fêmeas	91

Figura 36-	Níveis de expressão de <i>DDX41</i> e <i>STING</i> em pacientes com SMD de acordo com o resultado do exame de cariótipo	98
Figura 37-	Níveis de expressão de <i>DDX41</i> e <i>STING</i> em pacientes com SMD de acordo com a porcentagem de blastos segundo IPSS-R	99
Figura 38-	Níveis de expressão de <i>DDX41</i> e <i>STING</i> em pacientes com SMD de acordo com a classificação da OMS 2016	101
Figura 39-	Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes <i>STING</i> e <i>DDX41</i> nos pacientes com SMD	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais do protocolo piloto	40
Tabela 2 – Grupos experimentais do protocolo final	41
Tabela 3 – – Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR para os camundongos C57BL/6	47
Tabela 4 – Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR para os pacientes com SMD	53
Tabela 5 – Parâmetros hematológicos verificados em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 do protocolo piloto	55
Tabela 6 – Parâmetros bioquímicos dosados em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 do protocolo piloto	56
Tabela 7 – Resultados dos achados citogenéticos	62
Tabela 8 – Achados histopatológicos para os camundongos machos	63
Tabela 9 – Achados histopatológicos para os camundongos fêmeas	63
Tabela 10 – Descrição estatística para o gene <i>Cgas</i> nos grupos controle e peróxido	66
Tabela 11 – Descrição estatística para o gene <i>Cgas</i> nos grupos controle NAC, amônia e amônia NAC	67
Tabela 12 – Descrição estatística para o gene <i>Ddx41</i> em todos os grupos experimentais	69
Tabela 13 – Descrição estatística para o gene <i>Sting</i> nos grupos controle e peróxido	71
Tabela 14 – Descrição estatística para o gene <i>Sting</i> nos grupos controle NAC, amônia e amônia NAC	73
Tabela 15 – Descrição estatística para o gene <i>Tbk1</i> em todos os grupos experimentais ..	75
Tabela 16 – Descrição estatística para o gene <i>Tlr3</i> em todos os grupos experimentais ...	77
Tabela 17 – Descrição estatística para o gene <i>Tlr4</i> em todos os grupos experimentais ...	80
Tabela 18 – Descrição estatística para as correlações entre os genes nos camundongos C57BL/6 machos	88

Tabela 19 – Descrição estatística para as correlações entre os genes nos camundongos C57BL/6 fêmeas	90
Tabela 20 – Descrição clínica dos pacientes com Neoplasia Mielodisplásica incluídos no estudo	93
Tabela 21 – Níveis de expressão de <i>DDX41</i> e <i>STING</i> em pacientes com SMD de acordo com o resultado do exame citogenético	98
Tabela 22 – Descrição estatística de <i>DDX41</i> e <i>STING</i> em pacientes com SMD frente a variável percentual de blastos de acordo com IPSS-R	100
Tabela 23 – Descrição estatística de <i>DDX41</i> e <i>STING</i> em pacientes com SMD frente a classificação da OMS 2016	101
Tabela 24 – Descrição estatística para a correlação entre os genes <i>DDX41</i> e <i>STING</i> nos pacientes com SMD	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACGIH	<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>
ATP	Adenina trifosfato
BTK	Quinase de Bruton
CAT	Enzimas catalases
CDNs	Dinucleotídeos cíclicos
cGAS	Sintase GMP-AMP
CTE	Cadeia transportadoras de elétrons
CTH	Células tronco hematopoéticas
DAMPs	Padrões moleculares associados a dano
DDX41	Helicase DEAD-box 41
dsDNA	DNA dupla fita
dsRNA	RNA dupla fita
ERGIC	Região perinuclear entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
GTP	Guanina trifosfato
HR	Recombinação homóloga
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IFNs	Interferons
IKK	Inibidor da subunidade beta do fator nuclear kappa-B
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IPSS	Índice Internacional de Escore Prognóstico
IRFs	Fatores reguladores de interferons
LAMPs	Padrões moleculares associados ao estilo de vida
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
LRRs	Regiões ricas em leucina

MD2	Proteína de diferenciação mielóide 2
MDA5	Receptor associado à diferenciação de melanoma 5
mRNA	RNA mensageiro
MyD88	Proteína 88 da resposta primária de diferenciação mielóide
NAC	N-acetilcisteína
NF- κ B	Fator nuclear potenciador da cadeia leve kappa de células B ativadas
NOXs	Enzimas NADPH oxidases transmembrana
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PARP1	Poli ADP-ribose polimerase 1
PDL1	Ligante de morte programada 1
RE	Retículo endoplasmático
RIG-I	Receptor induzido por ácido retinóico
rRNA	RNA ribossomal
RRPs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
siRNA	RNA de interferência
SMD	Neoplasia Mielodisplásica
SODs	Enzimas superóxido dismutases
STING	Gene estimulador de interferons
TBK1	Quinase de ligação TANK1
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF	Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral
TRIF	Domínio TIR contendo a molécula adaptadora 1
UFC	Universidade Federal do Ceará
XO	Xantinas oxidases

LISTA DE SÍMBOLOS

NH_4	Amônia
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Ânion superóxido
NO_2	Dióxido de nitrogênio
e^-	Elétron
O_2	Oxigênio molecular
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
ROOH	Peróxidos orgânicos
RO^\bullet	Radical alcoxila
HO^\bullet	Radical hidroxila
$\text{RO}_2^{\bullet-}$	Radical peroxila
CO_3	Trióxido de carbono

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Espécies reativas de oxigênio (EROs)	14
1.1.1	<i>Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)</i>	16
1.2	<i>N</i>-acetilcisteína	18
1.3	Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs)	19
1.3.1	<i>Via cGAS-STING</i>	19
1.3.1.1	<i>DDX41: ativação não canônica</i>	21
1.3.1.2	<i>STING e EROs</i>	23
1.3.1.3	<i>STING e Câncer</i>	24
1.3.2	<i>Receptores Toll-like</i>	25
1.3.2.1	<i>Toll-like 3</i>	26
1.3.2.2	<i>Toll-like 4</i>	27
1.4	Câncer	28
1.4.1	<i>Câncer hematológico: Neoplasia Mielodisplásica</i>	30
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	35
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo Geral	36
3.2	Objetivo Específico	36
4	METODOLOGIA	37
4.1	Animais	37
4.1.1	<i>Aspectos éticos</i>	37
4.1.2	<i>Intoxicação tópica com descolorante</i>	37
4.1.2.1	<i>Protocolo piloto</i>	39
4.1.2.2	<i>Protocolo final</i>	41
4.1.3	<i>Hemograma</i>	43
4.1.4	<i>Avaliação bioquímica</i>	43
4.1.4.1	<i>ALT/TGP</i>	44
4.1.4.2	<i>AST/TGO</i>	44
4.1.4.3	<i>Creatinina</i>	44
4.1.5	<i>Cariótipo por banda-G</i>	44
4.1.6	<i>Análises histopatológicas da medula óssea</i>	46

4.1.7	<i>Análise da Expressão do mRNA por RT-qPCR</i>	46
4.1.7.1	<i>Extração do RNA total</i>	46
4.1.7.2	<i>Síntese do cDNA</i>	46
4.1.7.3	<i>RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)</i>	47
4.2	<i>Pacientes com SMD</i>	49
4.2.1	<i>Aspectos éticos</i>	49
4.2.2	<i>Obtenção das amostras de medula</i>	49
4.2.3	<i>Cariótipo por banda-G</i>	50
4.2.4	<i>Análise da Expressão do mRNA por RT-qPCR</i>	51
4.2.4.1	<i>Extração do RNA total</i>	51
4.2.4.2	<i>Síntese do cDNA</i>	52
4.2.4.3	<i>RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)</i>	52
4.3	<i>Análises estatísticas</i>	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Animais	55
5.1.1	<i>Protocolo piloto</i>	55
5.1.1.1	<i>Hemograma</i>	55
5.1.1.2	<i>Análise bioquímicas</i>	56
5.1.1.2.1	ALT/TGP	57
5.1.1.2.2	AST/TGO	58
5.1.1.2.3	Creatinina	59
5.1.2	<i>Protocolo final</i>	60
5.1.2.1	<i>Análise citogenética</i>	60
5.1.2.2	<i>Análise histopatológica</i>	63
5.1.2.3	<i>Análise da Expressão do mRNA por RT-qPCR</i>	64
5.1.2.3.1	<i>Cgas</i>	65
5.1.2.3.2	<i>Ddx41</i>	68
5.1.2.3.3	<i>Sting</i>	70
5.1.2.3.4	<i>Tbk1</i>	73
5.1.2.3.5	<i>Tlr3</i>	76
5.1.2.3.6	<i>Tlr4</i>	78
5.1.2.4	<i>Análise de correlação entre os níveis de expressão gênica</i>	81
5.2	Pacientes com SMD	91

5.2.1	<i>Caracterização dos pacientes</i>	91
5.2.2	<i>Análise da Expressão do mRNA por RT-qPCR</i>	97
5.2.2.1	<i>Cariótipo por banda-G</i>	97
5.2.2.2	<i>Porcentagem de blastos na medula óssea (IPSS-R)</i>	98
5.2.2.3	<i>Classificação OMS 2016</i>	99
5.2.3	<i>Análise de correlação entre os níveis de expressão gênica</i>	101
6	DISCUSSÃO	103
7	CONCLUSÃO	112
	REFERÊNCIAS	113
	ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL (CEUA- NPDM)	134
	ANEXO B - TERMO DE CONSECIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	136

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

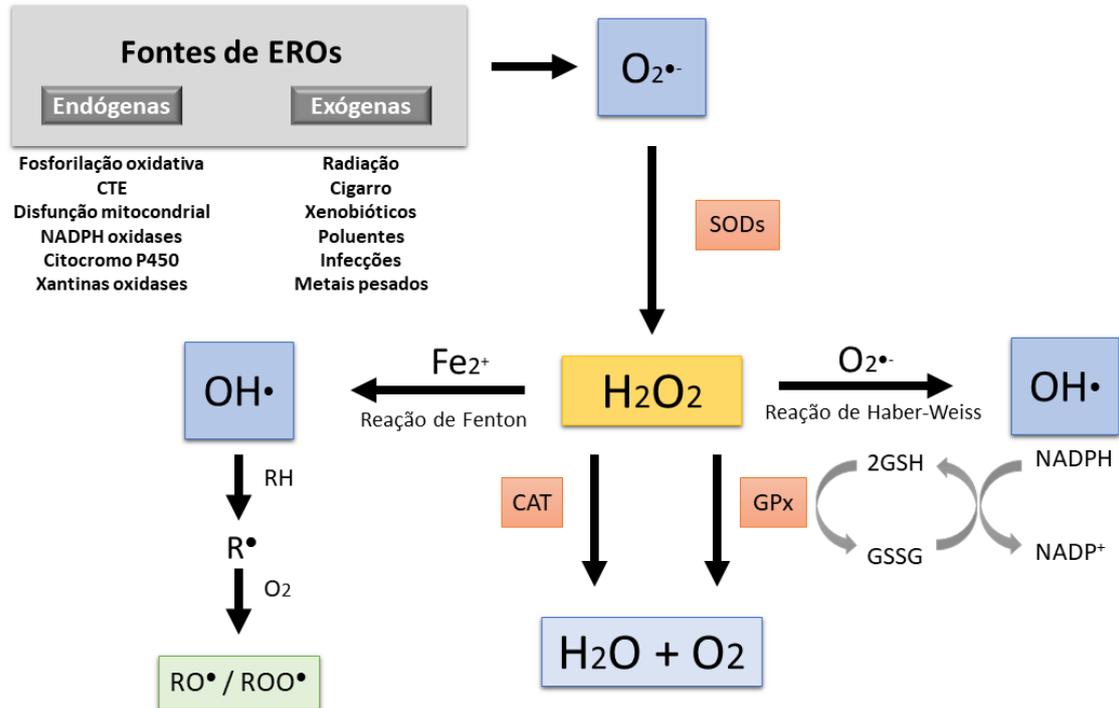
Espécies reativas de oxigênio (EROs) são um grupo de moléculas altamente reativas formadas a partir da redução parcial do oxigênio. As EROs são, geralmente, divididas em dois tipos: radicais livres, que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada mais externa, e não radicais, que não possuem elétrons desemparelhados (Tretter, 2022). As principais espécies radicais são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hioxila (HO^{\bullet}), peroxila ($RO_2^{\bullet-}$) e alcoxila (RO^{\bullet}). Já entre as principais EROs não radicalares, destacam-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e peróxidos orgânicos (ROOH). Apesar das espécies não radicalares não possuírem radicais livre, elas podem facilmente ocasionar reações de radicais livres em organismos vivos (Camargo & Touyz, 2019; Phaniendra *et al.*, 2015)

Nas células eucarióticas, as EROs têm sua origem principalmente em reações bioquímicas associadas aos processos de respiração celular mitocondrial, especificamente nos complexos I e III localizados na membrana interna da mitocôndria. Além disso, as enzimas NADPH oxidases transmembrana (NOXs) são outra fonte endógena significativa de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , juntamente com a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (CTE) (Zhao *et al.*, 2019). No entanto, essas EROs também têm outras origens, como os peroxissomos, a xantina oxidase (XO), as enzimas lipoxigenase e ciclo-oxigenase, além do citocromo P450 no retículo endoplasmático (Brown & Borutaite, 2012; Buonocore *et al.*, 2010). As EROs também podem ser geradas por fontes exógenas, como: tabaco, poluição, metais pesados, substâncias químicas estranhas ou radiação ionizante, resultando em efeitos irreversíveis no desenvolvimento de tecidos em animais e plantas (Baxter *et al.*, 2014; Jager *et al.*, 2017; J. Zhao & Hopke, 2012).

Nos sistemas biológicos, o oxigênio molecular (O_2) é a molécula mais suscetível a formação de radicais por conter dois elétrons desemparelhados presentes em sua camada de valência. Por ser uma molécula abundante nos sistemas biológicos e fazer parte de diversas reações bioquímicas nos processos metabólicos, o O_2 presente no organismo pode receber um elétron (e^-) e ser reduzido em $O_2^{\bullet-}$ caso haja disfunção em alguma etapa (Hsueh *et al.*, 2022; Valle *et al.*, 2010). Apesar de muito reativo, o $O_2^{\bullet-}$ é relativamente instável e não consegue se difundir pelas membranas, sendo logo convertido em H_2O_2 por enzimas superóxido dismutase (SODs) (Figura 1). O H_2O_2 gerado é parcialmente eliminado por enzimas catalases (CAT), enzimas derivadas da glutathione (GSH) e peroxidases ligadas à tioredoxina, mas, como essa eliminação tem baixa eficiência, parte do H_2O_2 é liberado para a célula (Campos *et al.*, 2019;

Hopkins & Neumann, 2019). No organismo, duas reações importantes envolvendo o H_2O_2 acontecem para formar o radical $\text{HO}\cdot$: a reação de Fenton e a reação de Haber-Weiss (Fenton, 1894; Haber *et al.*, 1934) (Figura 1).

Figura 1 – Produção de espécies reativas de oxigênio provenientes da redução do O_2

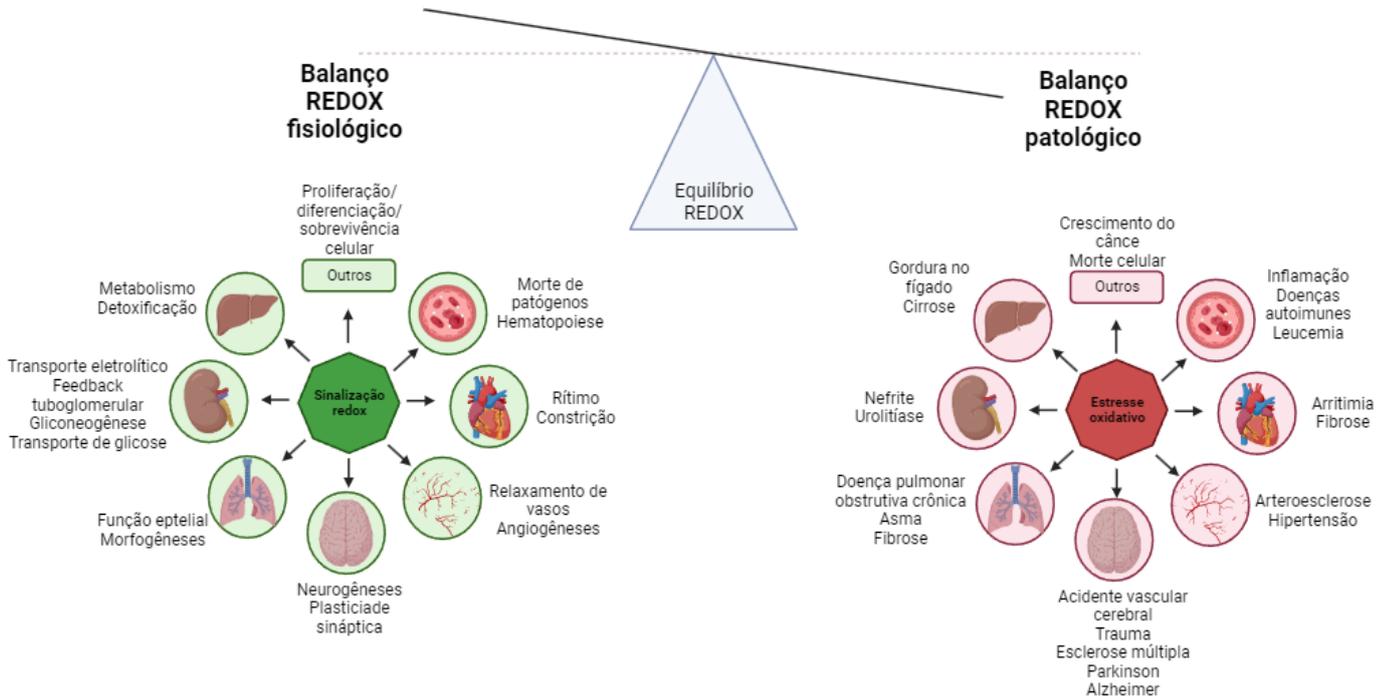


Legenda: CAT: catalase; SODs: superóxido desmutases; GPx: glutatona peroxidase; GSH: glutatona; GSSG: glutatona dissulfeto.

Fonte: Adaptado de Ajuwon e colaboradores (2015)

Sob condições fisiológicas normais, as EROs desempenham um papel importante em vários processos fisiológicos, como proliferação e diferenciação celular, expressão gênica, modificação proteica pós-tradução, homeostase e adaptação à hipóxia, que requerem quantidades mínimas dessas moléculas no organismo (Figura 2) (Lennicke & Cochemé, 2021; Zhang *et al.*, 2022). O estresse oxidativo ocorre quando as EROs sobrecarregam os sistemas de defesa antioxidante celular, aumentando os níveis de EROs ou reduzindo a capacidade antioxidante. O estresse oxidativo causa danos diretos e indiretos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídios e está associado ao processo de envelhecimento, senescência e doenças como o câncer (Ray *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2016).

Figura 2 – Efeitos fisiológicos e patológicos das EROs no organismo



Fonte: Adaptado de Anik e colaboradores (2022).

1.1.1 *Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)*

O peróxido de hidrogênio é um oxidante presente em todos os organismos aeróbicos. No organismo, sabe-se o H₂O₂ atua como uma molécula sinalizadora e mensageiro secundário em muitas vias de transdução de sinal, como na sinalização da insulina, proliferação celular e apoptose (Hopkins, 2017; Rani *et al.*, 2015). No organismo, um vasto sistema de enzimas são responsáveis por realizar a desintoxicação do H₂O₂. Uma vez que há desregulação no controle dos níveis de H₂O₂, este pode se difundir e oxidar alvos biológicos causando disfunções celulares e doenças (Rampon *et al.*, 2018).

Quimicamente, o peróxido de hidrogênio é um líquido límpido e incolor completamente miscível com água, conhecido popularmente como “água oxigenada”. Devido suas propriedades como agente oxidante, um dos principais usos do peróxido de hidrogênio é como agente de branqueamento na fabricação de papel e celulose na indústria (Ciriminna *et al.*, 2016). Além disso, o H₂O₂ é usado em vários produtos domésticos, incluindo desinfetantes de uso geral, alvejantes sem cloro, removedores de manchas em tecidos, desinfetantes para lentes de contato, tinturas de cabelo e é um componente de alguns produtos de clareamento dental (Abdelshafy *et al.*, 2023; Murdoch *et al.*, 2016; Ventura & Yuan, 2000).

De modo particular, com exceção da aplicação diretamente por via oral para o clareamento dental, a via dérmica se destaca como uma das principais vias de possível exposição direta ao H_2O_2 . Na indústria de cosméticos, o peróxido de hidrogênio é um composto encontrado em concentrações de 6 a 12% em diversos produtos de descoloração capilar (Alessandrini & Piraccini, 2016; Guerra-Tapia & Gonzalez-Guerra, 2014). O mecanismo de clareamento dos cabelos/pelos ocorre devido à capacidade do H_2O_2 em penetrar na fibra capilar, abrir as escamas da cutícula e despigmentar quimicamente a melanina no córtex, ação que pode ser catalisada em meio básico contendo amônia (da França *et al.*, 2015; Neuser & Schlatter, 2010; Rust & Schlatter, 2015). Quando esse processo de clareamento ocorre na superfície da pele para descolorir os pelos pode receber o nome popular de “banho de lua”.

A pele é o maior órgão do corpo humano e a prática do banho de lua expõem o organismo aos componentes oxidantes (Chambers & Vukmanovic-Stejic, 2020). O primeiro alvo da exposição é a camada epidérmica da pele, que é formada principalmente por queratinócitos. Essas células respondem ativamente a alérgenos e EROs pela indução de citocinas inflamatórias e pela estimulação direta do sistema imunológico (Bito & Nishigori, 2012; Zanoni *et al.*, 2015). Um estudo de Helaskoski e colaboradores observou que a manipulação de tinturas de cabelo oxidativas podem causar urticária de contato alérgica ocupacional, asma e rinite entre cabeleireiros (Helaskoski *et al.*, 2014). Além disso, estudos já apontam para o uso de tinturas oxidativas e o possível desenvolvimento do câncer, tendo destaque o câncer de mama, próstata e hematopoiético (Jacob *et al.*, 2018; Lim *et al.*, 2022; Miligi *et al.*, 2005).

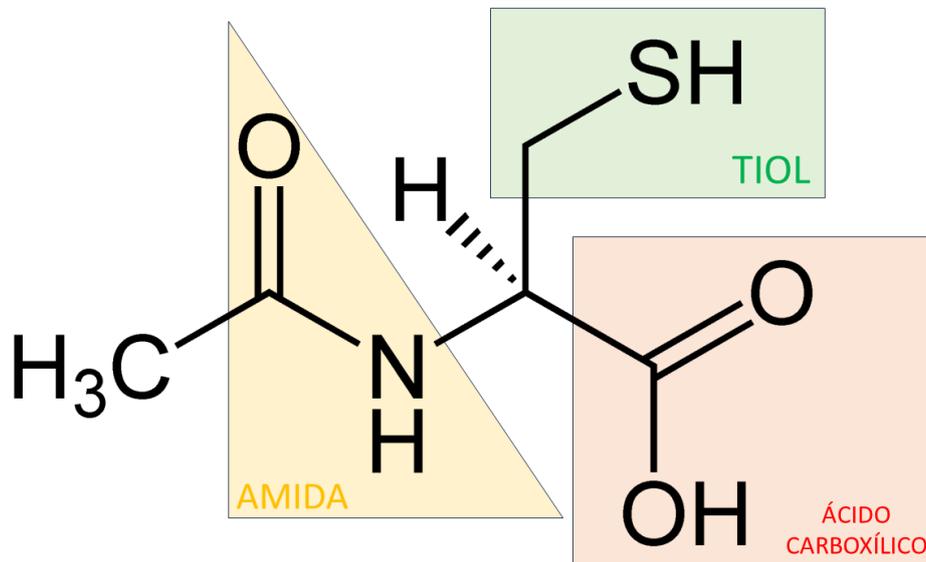
Quanto à genotoxicidade, apesar de o H_2O_2 ter sido descrito como genotóxico e mutagênico em estudos *in vitro*, não há evidências suficientes que suportem a genotoxicidade ou mutagenicidade em condições *in vivo* (Abdollahi & Hosseini, 2014). Com relação a carcinogenicidade, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) define que não há evidências adequadas em humanos e há evidências limitadas em animais experimentais sobre a carcinogenicidade do peróxido de hidrogênio (IARC, 1999). Apesar deste posicionamento, outras agências, como a Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais (ACGIH) classifica o H_2O_2 como um conhecido carcinógeno animal com relevância desconhecida para os humanos (ACGIH, 2014). A disparidade em definir a carcinogenicidade do peróxido de hidrogênio por órgãos ou agências realça a necessidade de estudos conclusivos sobre o tema.

1.1.2 *N*-acetilcisteína

A *N*-acetilcisteína (NAC) é um derivado do aminoácido cisteína com um grupo acetil ligado ao átomo de nitrogênio (Figura 3). Como medicamento, o uso da NAC está estabelecido desde a década de 60 e faz parte da Lista Modelo de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2023). A aplicação clínica da NAC é principalmente direcionada para intoxicação por paracetamol, doenças respiratórias, e disfunções neurológicas e psiquiátricas (Frye & Berk, 2018; Mokhtari *et al.*, 2017). A NAC também possui um papel central como agente antioxidante.

A atividade antioxidante direta da NAC envolve reações redox entre seu grupo tiol e EROs ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs), especialmente radicais hidroxila (HO•), dióxido de nitrogênio (NO₂•) e trióxido de carbono (CO₃•⁻) e apresenta menor potencial redutor em relação ao radical superóxido (O₂•⁻) e peróxido de hidrogênio. Como mecanismo antioxidante indireto, a desacetilação da NAC é responsável pelo aumento na disponibilidade de cisteína para biossíntese de glutatona (GSH), que irá atuar na remoção celular de H₂O₂ (Aldini *et al.*, 2018; Tenório *et al.*, 2021) (Figura 1).

Figura 3 – Estrutura química na *N*-acetilcisteína



Fonte: Elaborado pelo autor.

Além de seu papel antioxidante, a NAC também exerce atividade anti-inflamatória ao inibir o fator nuclear potenciador da cadeia leve kappa de células B ativadas (NF-κB), que desempenha um papel crítico na cascata inflamatória e na resposta imune envolvida na resposta

ao estresse oxidativo (Oka *et al.*, 2000; Pei *et al.*, 2018; Samuni *et al.*, 2013). A NAC bloqueia a translocação e ativação nuclear do fator de transcrição NF- κ B, responsável pela regulação da expressão gênica pró-inflamatória. Foi demonstrado que a NAC suprime a liberação de citocinas inflamatórias TNF α , interleucina (IL)-1 β e IL-6 em macrófagos ativados por lipopolissacarídeos (Abdel-Wahab & Moussa, 2019; Palacio *et al.*, 2011).

Desde a década de 1980, o potencial terapêutico da NAC tem sido investigado em uma ampla gama de condições em que o estresse oxidativo é considerado um fator determinante no início da doença e/ou progressão (Frye & Berk, 2018). Quanto a intoxicação por outros compostos, o uso da NAC também já foi investigado contra intoxicação pelo herbicida paraquat e contra envenenamento por metais pesados, como chumbo e mercúrio (Blanusa *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012; Gawarammana & Buckley, 2011).

1.3 Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs)

A imunidade dos mamíferos é regulada por dois sistemas imunológicos principais: o sistema imunológico inato e o sistema imunológico adaptativo, que devem responder aos patógenos invasores e manter a homeostase do hospedeiro (Spiering, 2015). O sistema imunológico inato é um sistema de defesa inerente que atua como a primeira linha de defesa, detectando patógenos invasores por meio de receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), como os receptores do tipo Toll, receptores do tipo NOD, receptores do tipo RIG-I, receptores do tipo lectina C e diversos sensores citoplasmáticos (de Oliveira Mann & Hornung, 2021; Kaur & Secord, 2019; Kumar *et al.*, 2011).

Os RRP reconhecem padrões moleculares derivados de patógenos (PAMPs), bem como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) liberados das células hospedeiras após lesão ou estresse celular (Li & Wu, 2021; Zindel & Kubers, 2020). A ligação destas moléculas canônicas aos RRP ativa cascatas de sinalização apropriadas e gera citocinas inflamatórias e interferons tipo I (IFNs) que desempenham papéis importantes na ativação de respostas imunes subsequentes. Em contraste, o sistema imunológico adaptativo é uma resposta específica do antígeno e estimula a memória imunológica de longo prazo que depende dos linfócitos (Andersen, 2018; Iwasaki & Medzhitov, 2015).

1.3.1 Via cGAS-STING

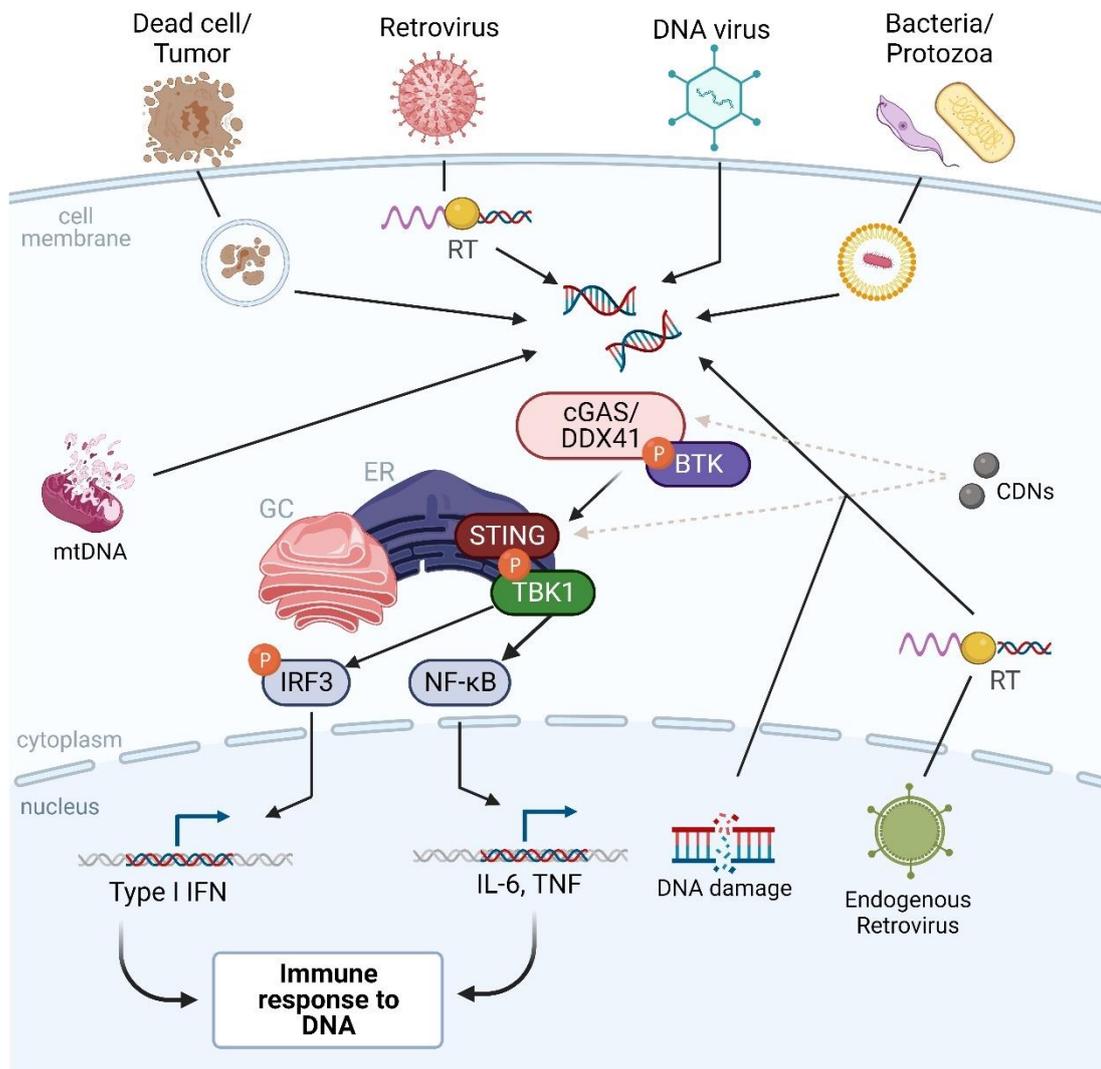
A via cGAS-STING atua reconhecendo fragmentos de dupla-fita de DNA (dsDNA)

no citoplasma celular e acionando a transcrição de vários genes de defesa do hospedeiro, que incluem genes que codificam interferons do tipo I e citocinas pró-inflamatórias, que coletivamente desencadeiam a resposta imune (Hopfner & Hornung, 2020). O gene *STING1* (anteriormente *TMEM173*) localiza-se na região 31.2 do braço longo do cromossomo 5 (5q31.2) e, em humanos, codifica uma proteína transmembrana de 379 aminoácidos localizada no retículo endoplasmático (RE) que atua como um estimulador de gene de interferons no sistema imune inato. Em camundongos, o gene *Sting1* (anteriormente *Tmem173*) fica localizado no cromossomo 18 (Cr 18B3) e a proteína codificada possui 378 aminoácidos. A descoberta da molécula central da via STING ocorreu através de uma triagem de aproximadamente 5.500 DNAs complementares humanos e 9.000 murinos que foram transfectados individualmente em células 293T contendo um gene de luciferase sob controle do promotor de IFN- β (IFN- β -Luc) (Ishikawa *et al.*, 2009; Ishikawa & Barber, 2008; Zhong *et al.*, 2008).

Dentre as funções de STING no sistema imune inato, uma que recebe destaque é a atuação da proteína como uma molécula adaptadora a jusante de sensores de DNA citosólico. A sintase GMP-AMP cíclica, codificada por *cGAS/Cgas* (anteriormente *MB21D1/Mb21d1*), é o sensor de dsDNA que atua na via canônica de STING, de modo que a via ficou conhecida pela nomenclatura cGAS-STING (Schoggins *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2013). O mecanismo de detecção do dsDNA citosólico por cGAS ocorre maneira dependente do comprimento do DNA, mas independente da sequência de DNA. O dsDNA curto (< 20 pb) liga-se, mas não consegue ativar o cGAS devido à incapacidade de induzir a dimerização do cGAS. Por outro lado, o dsDNA mais longo (> 20 pb) ativa o cGAS através da dimerização e formação de um complexo 2:2 DNA/cGAS, permitindo a ação catalítica de cGAS e subsequente ligação dos substratos adenina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) para induzir a síntese do dinucleotídeo cíclico 2'3'-cGAMP (Blest & Chauveau, 2023; Hertzog & Rehwinkel, 2020; Yu & Liu, 2021). Este dinucleotídeo cíclico atua como segundo mensageiro e ativa STING.

Uma vez ativado, STING transloca-se do retículo endoplasmático (RE) através do complexo de Golgi para uma região perinuclear distinta entre as duas organelas (ERGIC) (Zhang *et al.*, 2022). Durante este processo, STING recruta e ativa a quinase de ligação TANK1 (TBK1), que por sua vez fosforila o fator regulador de interferon 3 (IRF3). Quando fosforilado, IRF3 se dimeriza e entra no núcleo para acionar a transcrição de INFs do tipo I e citocinas. Além disso, a quinase TKB1 também interage com quinases IKK para ativar o fator de transcrição NF- κ B (Chen *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2020; Shu *et al.*, 2014) (Figura 4).

Figura 4 – Via de sinalização STING



Fonte: Adaptado de Barber (2011), Lee e colaboradores (2015) e Jiang e colaboradores (2017)

1.3.1.1 DDX41: ativação não canônica

O gene *DDX41* codifica uma proteína helicase de RNA. As helicases de RNA são enzimas altamente conservadas que utilizam ATP para reorganizar RNAs ou interações entre RNA-proteína (complexos ribonucleoproteicos). As helicases podem ser classificadas em seis superfamílias (SF1-6) e aquelas compostas por RNA podem pertencer à superfamília 1 (SF1) ou superfamília 2 (SF2) (Jankowsky, 2011). Dentro da SF2, a subfamília com a maior quantidade de membros é a família de proteínas DEAD-box (DDX), assim chamada por causa da presença do bloco de motivo conservado dos seguintes aminoácidos: aspartato (D) – glutamato (E) – alanina (A) – aspartato (D). É nesta subfamília que está presente *DDX41* (Jiang *et al.*, 2017). O gene *DDX41* humano está localizado na porção do braço longo do cromossomo

5, na região 35.3 (5q35.3), sendo composto por 17 éxons e 16 íntrons. Estudos mostram que esse gene está em múltiplos papéis celulares, contribuindo para várias vias e processos, incluindo *splicing* de mRNA, processamento de rRNA e sensor de DNA intracelular em células dendríticas mieloides, contribuindo com a imunidade inata (Jiang *et al.*, 2017).

Algumas helicases de RNA já são conhecidas pelo papel que desempenham no sistema imune inato, como os receptor induzido por ácido retinóico I (RIG-I) e o receptor associado à diferenciação de melanoma 5 (MDA5). RIG-I e MDA5 são RRP's localizados no citoplasma celular que possuem capacidade de reconhecer PAMPs e acionar resposta imunológica. Em 2011, Zhang e colaboradores realizaram um estudo que utilizou pequenos RNAs de interferência (siRNA) para triagem de membros da subfamília de helicases DEAD-box e, como resultado, o estudo identificou DDX41 como um sensor de DNA intracelular em células dendríticas mieloides (Zhang *et al.*, 2011). Além disso, o DDX41 consegue se ligar diretamente a dinucleotídeos cíclicos bacterianos e transcritos da replicação retroviral, como o intermediário RNA/DNA (Parvatiyar *et al.*, 2012; Stavrou *et al.*, 2018).

Na sinalização imune, a fosforilação de DDX41 pela quinase de Bruton (BTK) permite o reconhecimento dos ligantes por DDX41. Após o reconhecimento, o DDX41 liga-se ao adaptador STING localizado na membrana do retículo endoplasmático. STING subsequentemente promove a fosforilação de TBK1 e IRF3 que finalmente induzem a produção de INF- β e NF- κ B (Omura *et al.*, 2016). Embora DDX41 atue no eixo STING/TBK1/IRF3, ele não faz o papel principal de promotor a montante de STING (Andreou, 2021).

Com relação ao processamento de ácidos nucleicos, em humanos, os defeitos no *DDX41* podem estar associados à desregulação do *splicing* do pré-mRNA e ao processamento do RNA (Shinriki *et al.*, 2022). Setenta por cento dos casos de câncer com mutação em *DDX41* estão associados à SMD/LMA (Polprasert *et al.*, 2015). Com relação ao tipo de mutação, mais de 80% são de natureza germinativa e cerca de 15% são somáticas, o que faz com que *DDX41* esteja no quadro “neoplasias mieloides com predisposição de linhagem germinativa” na revisão de 2016 da OMS (Andreou, 2021; Badar & Chlon, 2022; Makishima *et al.*, 2023). Uma opção terapêutica possível em cânceres da medula é o transplante de medula óssea e a busca por um doador compatível começa, geralmente, entre os familiares (Döhner *et al.*, 2015; Gangat *et al.*, 2016). Dessa forma, um estudo de predisposição hereditária pode mudar completamente a terapêutica utilizada.

1.3.1.2 STING e EROs

O papel natural das células imunológicas é produzir moléculas para remover substâncias tóxicas, como substâncias estranhas nocivas e moléculas oxidantes, e desencadear a inflamação. Durante o envelhecimento, as células do sistema imune sofrem uma desregulação em suas funções que desencadeia uma inflamação estéril crônica (Franceschi *et al.*, 2000; Franceschi & Campisi, 2014). Tal inflamação também é consequência direta do acúmulo de danos progressivos aos componentes celulares e aumento das espécies reativas de oxigênio, o que resulta na perda progressiva da função celular normal e redução da capacidade redox e homeostática inflamatória – processo chamado por imunossenescência (Bauer & De la Fuente, 2016; Pawelec, 2018).

Nesse contexto, duas teorias recebem destaque: 1) A “teoria do envelhecimento dos radicais livres”, que relaciona a geração de EROs com o acúmulo gradual de dano macromolecular e a consequente perda da função celular como o principal mecanismo subjacente ao envelhecimento (Harman, 1956) e 2) A teoria do “estresse oxidativo mitocondrial”, que sugere que durante o envelhecimento, o aumento dos produtos oxidantes, bem como a falha progressiva dos mecanismos antioxidantes, causam danos às macromoléculas, que se acumulam com a idade e estão intimamente relacionados ao declínio da função celular (Miquel *et al.*, 1980). As duas teorias defendem, cada uma ao seu modo, que o aumento de EROs geram dano oxidativo ao DNA, instabilidade genômica e ativação de vias de sinalização imune e da senescência.

A sinalização de resposta a danos no DNA (RDD) atua garantindo a integridade genômica na célula por conferir resistência contra fontes internas (metabolismo celular e erros na replicação do DNA) e externas (agentes genotóxicos e estresse oxidativo) de danos (Taffoni *et al.*, 2021). Quando o dano ao DNA é persistente, e os mecanismos de reparo não conseguem neutralizar o dano, a célula ativa a senescência e regula a morte celular através das vias p53-p21 e p16, gerando parada irreversível no ciclo celular (Ragu *et al.*, 2020; Wang, 2019). Além disso, diversas nucleases atuam para degradar os fragmentos dispersos de DNA, o que limita a exposição e, conseqüentemente, a ativação da via STING (Santa *et al.*, 2021).

De modo geral, todas essas informações sugerem que as modificações do DNA por EROs podem ser reconhecidas pela via de sinalização STING, ativando sua sinalização e potencializando a indução de senescência e a resposta inflamatória. Os danos no DNA aumentam com o envelhecimento e os danos no DNA induzidos por EROs são um efeito celular típico do envelhecimento e aumentam progressivamente ao longo da vida, levando à inflamação.

Portanto, acredita-se que a via de sinalização STING participe da regulação inflamatória desencadeada por EROs no DNA (Andrade *et al.*, 2022). Contudo, mais estudos são necessários para comprovar essa relação.

1.3.1.3 STING e Câncer

O papel de STING no câncer é ambíguo. Agentes prejudiciais ao DNA podem liberar DNA nuclear/mitocondrial no citoplasma, estimulando a produção de citocinas dependentes de STING e a infiltração fagocítica. Tal resposta pode ser importante para eliminar células danificadas e gerar respostas de células T antitumorais, porém a estimulação crônica também pode promover o câncer que é agravado pela inflamação (Barber, 2015; He *et al.*, 2017).

Com relação ao papel antitumoral de STING, a regulação positiva de genes inflamatórios, como IFN-I, é capaz de atuar nos tumores exercendo um efeito citotóxico direto e induzindo a parada celular e apoptose. Além disso, a ativação do STING pode aumentar a atividade antitumoral das células T citotóxicas através do direcionamento de STING para reconhecer fragmentos de células tumorais mortas nas células dendríticas (Corrales *et al.*, 2015; Li & Chen, 2018). Por fim, recentemente foi descrito o papel de STING na autofagia, de modo que Nassour e colaboradores demonstraram que a autofagia mediada por STING previne a proliferação celular em face da crise de replicação para impedir a tumorigênese (Nassour *et al.*, 2019).

Devido ao efeito antitumoral de STING, diversas imunoterapias vêm sendo desenvolvidas com base no funcionamento de agonistas do STING. Uma combinação promissora foi a dos agonistas de STING com tratamentos que envolvem radioterapia e quimioterapia, uma vez que o aumento do dano ao DNA por conta do tratamento levou a maior ativação da via STING e, com os agonistas, houve aumento da resposta imune citotóxica (Deng *et al.*, 2014; Yum *et al.*, 2019). O uso de agonistas do STING isoladamente também tem sido amplamente investigado, sendo o sistema de entrega droga-alvo uma das principais limitações (Li *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020).

Com relação ao papel pró-tumoral, a sinalização cGAS-STING apresenta maior expressão em diversos tipos de câncer, como câncer colorretal, carcinoma renal de células claras, adenocarcinoma gástrico e câncer de tireoide. Além disso, a maior expressão da via estava negativamente correlacionada com a infiltração de células imunes em alguns tumores, o que prediz um prognóstico desfavorável (Na *et al.*, 2019). Ademais, a instabilidade cromossômica, uma característica neoplásica, cria uma preponderância de micronúcleos cuja

ruptura expõem o DNA genômico no citosol, ativando a sinalização não canônica de NF- κ B a jusante de cGAS-STING e aumentando a sobrevivência do tumor e conduzindo metástase tumoral (Bakhoun *et al.*, 2018). Por fim, estudos já demonstraram que o cGAS pode se translocar para o núcleo em resposta a danos no DNA e interagir com a poli ADP-ribose polimerase 1 (PARP1), impedindo a formação do complexo PARP1 e inibindo o reparo da recombinação homóloga (HR) (Jiang *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018).

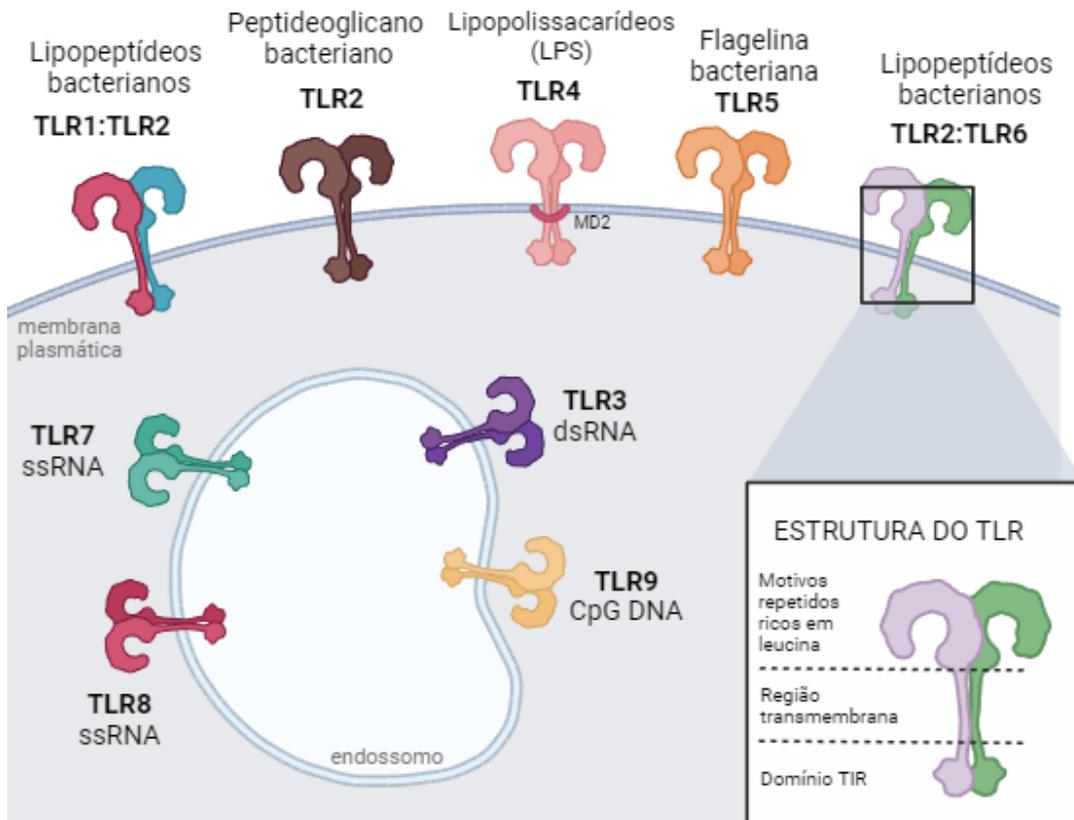
1.3.2 Receptores do tipo Toll

Os receptores Toll-like (TLRs) são uma família de receptores de reconhecimento de padrões que formam a base da resposta imune inata (Sadik *et al.*, 2015). Até o momento, foram identificados 10 subtipos humanos e 13 murinos de TLRs, embora o TLR10 não seja funcional em camundongos (Fitzgerald & Kagan, 2020; Wang *et al.*, 2016). Essa classe de receptores pode reconhecer tanto PAMPs quanto DAMPs e são expressos nas células do sistema imunológico inato (McCarthy *et al.*, 2014; Takeda & Akira, 2015; Zhang & Liang, 2016).

De acordo com a localização celular, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 estão localizados nas membranas celulares e reconhecem predominantemente componentes bacterianos, como lipídios, lipoproteínas e proteínas. O outro grupo é composto por TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, que estão localizados nos endolisossomos, onde reconhecem ácidos nucleicos microbianos (Chaturvedi & Pierce, 2009; Gay *et al.*, 2014; Newman, 2019). A ativação de TLRs desencadeia cascatas de sinalização que induzem a geração de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , e interferons tipo I (IFNs). As citocinas liberadas medeiam a indução de citocinas inflamatórias adicionais e das enzimas que sintetizam mediadores inflamatórios (Aluri *et al.*, 2021; Qian & Cao, 2013) (Figura 5).

A estrutura dos TLRs consiste em três partes: um domínio extracelular amino (N)-terminal contendo repetições ricas em leucina (LRRs), que se dobra em uma estrutura característica em forma de ferradura e é responsável pelo reconhecimento do ligante; uma região transmembranar; e um domínio de sinalização do receptor citoplasmático globular Toll/interleucina-1 (IL-1) (TIR) carboxila (C). Após o reconhecimento do ligante, os TLRs recrutam adaptadores intracelulares (ex. MyD88 - proteína 88 da resposta primária de diferenciação mieloide; TRIF - Adaptadores do domínio TIR que ativam interferons), cinases (ex. IRAK1/IRAK4) e moléculas efetoras (ex. TRAF6 - ligase com atividade de ubiquitinação) para que a resposta imune seja desencadeada.

Figura 5 – Receptores do tipo Toll e seus ligantes



Fonte: Adaptado de Abbas (2017)

1.3.2.1 Receptor do tipo Toll 3

O receptor Toll-like 3 (TLR3) é um receptor transmembrana RRP com um domínio extracelular localizado em endossomos. O TLR3 reconhece o RNA de fita dupla (dsRNA) exógeno ou endógeno, incluindo o dsRNA sintético poli (I·C). O mecanismo de ação do receptor Toll-like 3 é dependente do adaptador TRIF (O'Neill & Bowie, 2007; Vidya *et al.*, 2018).

Uma vez que o dsRNA se liga ao TLR3, a proteína adaptadora TRIF (ou TICAM1) é recrutada através de uma interação do domínio TIR. Em seguida, TRIF recruta moléculas de sinalização a jusante, como a proteína 1 associada a NAK (NAP1), fator 3 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF3), quinases ativadoras de IRF-3, TBK1 e quinase I κ B (IKK- α), que irão se ligar à região N-terminal do TRIF. Isto resulta na ativação, fosforilação e dimerização de IRF3 e IRF7, que induzem a secreção de IFNs tipo I (Zheng *et al.*, 2021).

O TLR3 também pode ativar NF- κ B através da interação TRIF e a proteína 1 que interage com o receptor (RIP1). Após a ativação do TLR3, RIP1 é recrutado para TRIF, onde é fosforilado e poliubiquitinado por Peli1, uma ubiquitina ligase E3. Após a ubiquitinação, ocorre a formação de um complexo envolvendo o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6), a proteína de ligação a TAK1 TAB2, a MAP3K ativada por ubiquitina, TAK1 e a quinase PKR dependente de dsRNA. Este complexo então se transloca para o citoplasma. Em seguida, o TAK1 é fosforilado e ativado, o que resulta na formação do complexo IKK e NF- κ B (Jiang *et al.*, 2003; Perales-Linares & Navas-Martin, 2013). A ativação do NF- κ B induz a expressão de genes que mantêm a proliferação celular, promovem a invasão e ativam citocinas inflamatórias. TAK1 também pode ativar vias de sinalização de MAP quinase através da fosforilação de MKK6 (Chang *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2021).

Com relação as EROs, Koarai e colaboradores avaliaram se o estresse oxidativo induzido por H₂O₂ aumentava a resposta imune de IL-8 via TLR3 em células epitélio brônquico normal (BEAS-2B). Como resultado, houve um aumento na dosagem de IL-8 nas células intoxicadas com H₂O₂ e o uso de NAC inibiu a potencialização do estímulo com H₂O₂. Além disso, o TLR3 foi regulado positivamente pelo tratamento com H₂O₂ nas células BEAS-2B (Koarai *et al.*, 2010). Em um estudo realizado em nosso Laboratório de Citogenômica do Câncer-UFC, Magalhães e colaboradores demonstraram que pacientes com Neoplasia Mielodisplásica (SMD), o câncer mais comum primário na medula óssea, apresentavam aumento bastante significativo de IL-8, estando altamente correlacionados ao aumento de NF- κ B e aumento de blastos na medula óssea (células imaturas) (Matos *et al.*, 2017). Mais recentemente demonstramos que pacientes com SMD também apresentavam o aumento de expressão de *TLR3* que estava associada à presença de displasia de linhagem eritroide, um achado bastante característico da doença (de Oliveira *et al.*, 2021).

1.3.2.2. Receptor do tipo Toll 4

O receptor Toll-like 4 (TLR4) foi o primeiro homólogo humano identificado e ele se liga a proteínas que expressam diversos padrões moleculares associados a patógenos, sendo o mais bem caracterizado o lipopolissacarídeo (LPS). Para esse reconhecimento, o TLR4 utiliza uma proteína acessória, MD-2 (proteína de diferenciação mieloide 2) que desempenha a função de conduzir corretamente o TLR4 para a superfície celular, reconhecendo assim os LPSs (Buccini *et al.*, 2022; Miyake, 2004). A ativação de TLR4 pode desencadear duas vias de

resposta imune distintas: a via dependente de MyD88 e a via independente de MyD88, que compreendem a via TLR3 e a via TLR4 (Kawasaki & Kawai, 2014).

Na via dependente de MyD88, o sinal é transmitido através das quinases 4 e 1 associadas ao receptor de interleucina 1 (IRAK4 e IRAK1) e do TRAF6. A ativação do TRAF6 leva à fosforilação de inibidores do fator nuclear κ B quinases (IKKs), que por sua vez ativa o I κ B. A ativação de I κ B leva ao início da ativação de NF κ B e à produção de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, fator de necrose tumoral (TNF), IL-1 β e IL-6 (Anwar *et al.*, 2019; Roy *et al.*, 2016). Em contraste, a via independente de MyD88 adota a proteína adaptadora TRIF e transduz o sinal através de TRAF3, TBK1 e IKK ϵ , que então fosforila o fator regulador de interferon 3 (IRF3). O IRF3 então se transloca para o núcleo e promove a transcrição de interferons tipo 1 (Wu & Li, 2020).

Dentre os TLR estudados na SMD, o TLR4 tem um papel de destaque. Sua ativação exacerbada pela ligação aos seus ligantes LPS e S100A8/A9 está relacionada a lesão do DNA mediado por espécies reativas de oxigênio (ERO) que, por sua vez, contribuem para a genotoxicidade e para a transformação maligna (Esplin *et al.*, 2011).

1.4 Câncer

O câncer é uma doença com alta incidência e mortalidade, sendo um problema de saúde pública mundial. Em relação ao sexo, o câncer de próstata é o mais incidente nos homens; nas mulheres, prevalece a incidência do câncer de mama (Siegel *et al.*, 2023). No Brasil, são esperados 704 mil novos casos de câncer para o triênio 2023-2025 (De Oliveira Santos *et al.*, 2023).

A origem do câncer não é totalmente elucidada, contudo, sabe-se que seu desenvolvimento está relacionado às alterações em nível molecular e metabólico que regulam o funcionamento normal das células. Nesse contexto, o câncer é considerado uma doença genética, apesar de nem sempre ocorrer de forma hereditária (Dancey *et al.*, 2012; Nakagawa & Fujita, 2018).

Para compreender melhor como se desenvolve o câncer, desde os anos 2000, Hanahan e Weinberg descrevem o que ficou conhecido como “características do câncer” (*hallmarks of cancer*). Nesses estudos, os autores discutem fatores básicos que coordenam a transformação de células humanas normais em células malignas que promovem o câncer. Na última atualização, de 2022, são reconhecidas 14 características que suportam o desenvolvimento do câncer (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

O processo de carcinogênese ou oncogênese ocorre de forma geral em três estágios: 1) Iniciação, onde os genes sofrem ação dos agentes cancerígenos e desenvolvem mutações; 2) Promoção, no qual a célula alterada sofre ação de agentes oncopromotores e 3) Progressão, que tem como característica a multiplicação descontrolada e irreversível da célula (Compton, 2020; Rubin, 2003). Desde o início até a progressão do tumor, além das mutações genéticas, ocorrem diversas alterações epigenéticas, incluindo hipometilação de alguns genes e aumento da metilação do promotor das ilhas CpG (Brait & Sidransky, 2011; Ilango *et al.*, 2020; Thakur & Chen, 2019).

Existem diversos fatores de risco para o câncer. Fatores hereditários já possuem associação direta com o risco aumentado de câncer (Walsh *et al.*, 2019). O campo de exploração aumenta quando são avaliados os fatores ambientais de risco ao câncer. O termo ambiente é frequentemente usado de forma ampla na literatura médica para incluir todos os fatores não genéticos, como dieta, estilo de vida e fontes de infecção (Boffetta & Nyberg, 2003). Estimasse-se que 18% dos cânceres da população mundial estejam relacionados a infecções por agentes infecciosos, como os vírus da hepatite B e C, vírus da imunodeficiência humana (HIV), alguns tipos de papilomas vírus humano (HPV) e a bactéria *Helicobacter pylori* (Kutikhin *et al.*, 2013; Masrour-Roudsari & Ebrahimpour, 2017).

Dentre os fatores ambientais que podem ocasionar câncer, há um destaque para os compostos químicos pois existe uma lista extensa de compostos sabidamente cancerígenos ou em processo de investigação. No século XVIII, o médico Sir Percivall Pott apresentou um trabalho no qual mostrava que a exposição à fuligem leva a uma alta incidência de câncer da bolsa escrotal em homens que trabalhavam como limpadores de chaminés (Brown & Thornton, 1957). Esta foi a primeira associação de materiais como a fuligem (uma mistura complexa de produtos químicos) à etiologia do câncer.

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer possui um sistema de classificação dos compostos químicos quanto à carcinogenicidade. Os agentes com evidência suficiente de carcinogenicidade em seres humanos são atribuídos à categoria mais elevada, “cancerígeno para humanos” (Grupo 1), enquanto as categorias de “provavelmente” (Grupo 2A), “possivelmente” (Grupo 2B) carcinogênico para humanos e “não classificável quanto à sua carcinogenicidade para humanos” (Grupo 3) são atribuídas de acordo com avaliação das evidência humana, animal e mecanicista. Alguns exemplos de compostos químicos que estão na lista são: urânio, tabaco, formaldeído e benzeno no grupo 1; mostarda nitrogenada e glifosato no grupo 2A; metilmercúrio e naftalina no grupo 2B e; peróxido de hidrogênio e tinturas de cabelo no grupo 3.

Em 2021, em trabalho realizado em nosso Laboratório de Citogenômica do Câncer-UFC, demonstramos que agricultores expostos a agrotóxicos (predominantemente o glifosato) apresentavam reduções significativas da expressão dos genes do sistema de reparo do DNA em amostras de medula óssea (Costa *et al.*, 2021). Esse estudo realça a importância da necessidade de constante revisão dos elementos tóxicos avaliados pela IARC. O processo é dinâmico.

No mundo moderno, após a revolução industrial, nosso sistema imune inato passou a ser desafiado com outros padrões moleculares que geraram respostas não tradicionais, bastante diferentes das comumente apresentadas aos patógenos. Dentre esses novos padrões moleculares imunostimuladores estéreis capazes de desencadear inflamação (funcionando como DAMPs), podemos citar os LAMPs do inglês: *Lifestyle-Associated Molecular Patterns* (Zindel & Kubas, 2020). Esses novos LAMPs (por exemplo., benzeno, tolueno, fenóis, butanos, naftaleno) perpetuam a inflamação, possivelmente gerando o desvio de diferenciação da célula tronco da medula óssea para o setor mielóide (Shift Mielóide), fenômeno comumente encontrado na patogênese dos cânceres de medula óssea como a LMA e SMD, criando instabilidade genômica.

1.4.1 Câncer hematológico: Neoplasia Mielodisplásica

A Neoplasia Mielodisplásica (SMD) é um câncer da medula óssea caracterizado pela disfunção da diferenciação e maturação celular, que resultam em displasias em uma ou mais linhagens celulares, citopenia(s) no sangue periférico, medula óssea (MO) hipocelular/hipercelular e, em 30% a 40% dos casos, risco de evolução para leucemia mielóide aguda (LMA) (Bejar *et al.*, 2011; Weinberg & Hasserjian, 2019). A SMD é considerada uma doença senil, pois acomete principalmente indivíduos idosos, com a maioria dos pacientes possuindo mais de 70 anos ao diagnóstico (Lee *et al.*, 2016). A fisiopatologia da SMD compreende múltiplos estágios e pode acometer diversas vias de sinalização, o que confere alto grau heterogeneidade na doença (Bejar, 2014; Marques & Sabino, 2022).

Etiologicamente, a exposição ocupacional ao benzeno, formol, tabaco, pesticidas e radiação ionizante é um fator risco para o desenvolvimento da SMD (Adès *et al.*, 2014; Chamseddine *et al.*, 2016). Ademais, indivíduos com variantes patogênicas germinativas nos genes *GATA2*, *DDX41*, anemia de Fanconi ou complexo de telomerase podem ter medula óssea hipoplásica e evoluir para SMD e/ou LMA e não responder ao tratamento imunossupressor (Khoury *et al.*, 2022).

Os fatores etiológicos da SMD têm sido um grande foco de pesquisa do nosso grupo, com vários estudos já publicados e outros em andamento. Recentemente, relatamos uma associação significativa entre a exposição crônica a pesticidas e a expressão prejudicada de genes envolvidos nos sistemas de reparo do DNA, alterações nas marcas epigenéticas associadas à maquinaria de síntese da tradução e identificação de alterações cromossômicas na medula óssea de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos, demonstrando o impacto da exposição a venenos agrícolas nas células da medula óssea (*Cavalcante et al., 2022; Costa et al., 2021*). Além disso, estamos iniciando os estudos com modelos animais e já observamos que camundongos C57BL/6 intoxicados com metilmercúrio sofrem alteração nos níveis de expressão de genes de reparo do DNA e aumento de translocações cromossômicas (*Roque et al., 2021*).

A patogênese da SMD ainda não foi totalmente elucidada, o modelo proposto mais aceito para fisiopatologia da doença é o modelo de múltiplos passos que engloba alterações funcionais nas células tronco hematopoéticas (CTH). Essas alterações funcionais são decorrentes de modificações moleculares, genéticas e epigenéticas e, como consequência, ocasionam imunidade inata desregulada, hematopoese ineficaz e alterações no processo de apoptose, mecanismos de reparo do DNA e maquinaria do ciclo celular, sendo tais fenômenos gerados de modo independente ou inter-relacionados (*Adès et al., 2014; Chamseddine et al., 2016; Garcia-Manero, 2015*). Nosso grupo também investiga a desregulação imune presente em pacientes com SMD, tendo publicado artigos que realçam a desregulação de membros do sistema imune como: interleucina 8 (IL-8), NF- κ B, receptor do tipo Toll 3 (*TLR3*), ligante de morte programada 1 (*PDL1*) e toda família dos fatores reguladores de interferon (*de Oliveira et al., 2021; de Sousa et al., 2019; Matos et al., 2017; Sampaio et al., 2023*).

Em relação ao prognóstico da SMD, a citogenética é uma das variáveis mais importante na determinação prognóstica da doença. As alterações cromossômicas estão presentes em aproximadamente 40 a 60% dos pacientes com SMD *de novo* e em até 80% dos pacientes com SMD secundária, cuja doença se desenvolveu após radioterapia e/ou quimioterapia prévia (*P. Greenberg et al., 1997; Swerdlow et al., 2016a*). Em 1997, Greenberg e colaboradores desenvolveram o Índice Internacional de Escore Prognóstico (IPSS) para SMD. Esta é uma forma de estratificação prognóstica que pode prever o risco de transformação leucêmica e o tempo médio de sobrevivência esperado para cada paciente (*Greenberg et al., 1997*). Este sistema de predição de prognóstico teve a colaboração da Prof. Dra. Sílvia Magalhães, coordenadora do nosso grupo de pesquisa e, em 2012, foi publicada a revisão do IPSS (IPSS-R), trazendo um refinamento nos parâmetros (Figura 6) (*Greenberg et al., 2012*).

Figura 6 – Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R

Classificação prognóstica - Cariótipo	ESCORES							
	VARIÁVEIS	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Muito Favorável Única: del(11q) ou -Y	Cariótipo	Muito Favorável		Favorável		Intermediário	Desfavorável	Muito Desfavorável
Favorável Normal Única: del(5q), del(12p) ou del(20p) Dupla: Incluindo del(5q)	Blastos MO (%)	≤2		>2 a <5		5 a 10	>10	
	Hb (g/dL)	≥10		8 a <10	<8			
Intermediário Única: del(7q), +8, i(17q), +19 ou qualquer outra simples ou dupla	ANC (mm ³)	≥800		<800				
	Plaquetas (mil cél/mm ³)	≥100	50 a <100	≤50				
Desfavorável Única: del(3q) ou -7 Dupla: Incluindo -7/7q- Complexo: 3 alterações	GRUPOS DE RISCO							
	Categoria	Muito Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Muito Alto		
	Escores	≤1,5	>1,5- 3	>3-4,5	>4,5-6	>6		
Muito Desfavorável Muito complexo: > 3 alterações	Sobrevida (anos)	8,8	5,3	3	1,6	0,8		

Legenda: MO: Medula óssea; ANC: Contagem Absoluta de Neutrófilos

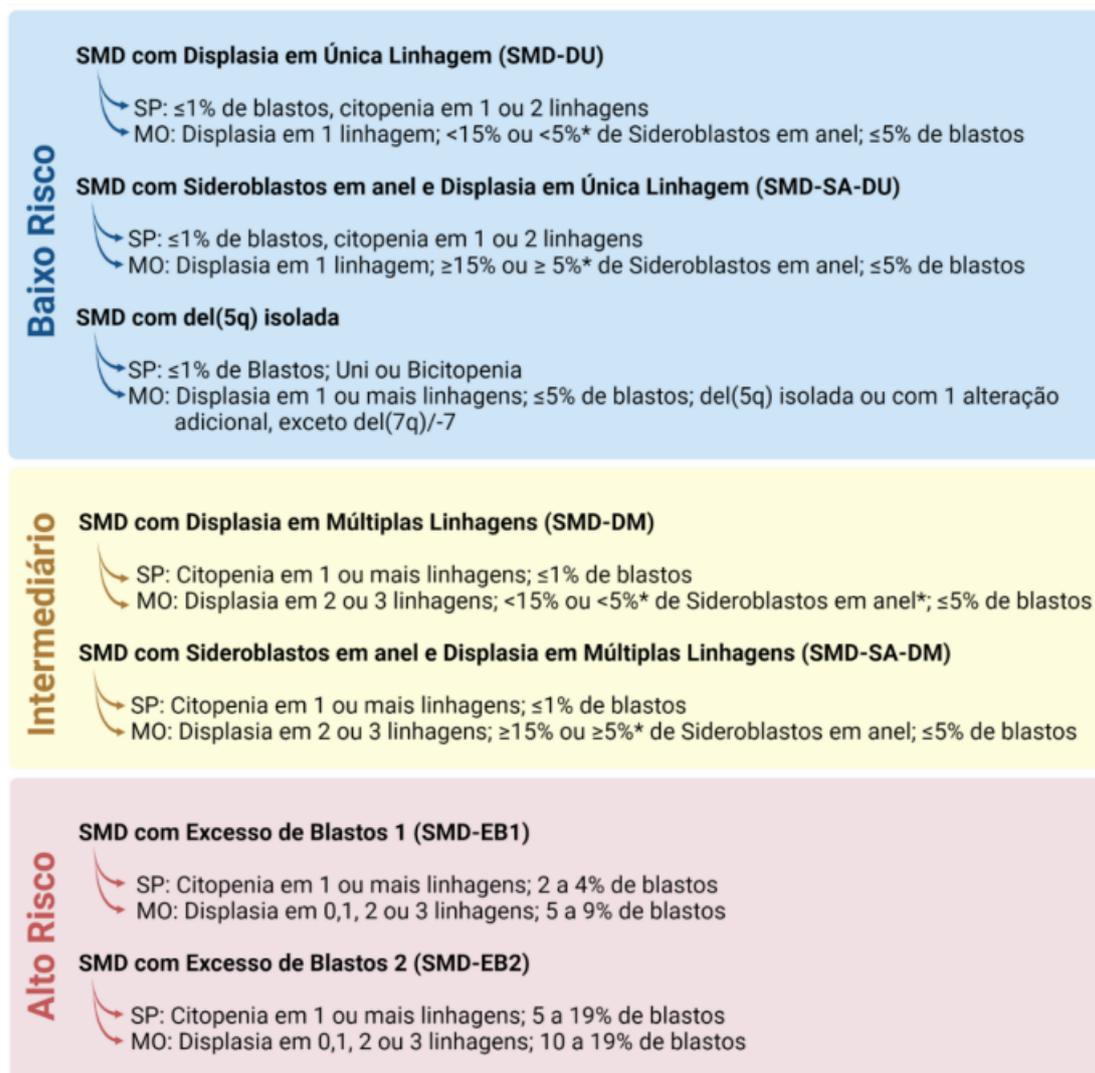
Fonte: Adaptado de Greenberg *et al.* (2012)

O advento do Sequenciamento de Nova Geração revolucionou o tratamento de pacientes com SMD e forneceu novos conhecimentos sobre a base genética e molecular da patogênese, permitindo a descoberta das principais mutações associadas ao desenvolvimento e progressão da doença. Vários estudos de rastreamento genético identificaram pela primeira vez mutações que são, atualmente, biomarcadores da doença, apresentando grande significado clínico e com impacto direto no prognóstico e na sobrevida dos pacientes (Bejar *et al.*, 2011; Haferlach *et al.*, 2013; Papaemmanuil *et al.*, 2013). Considerando as novas informações acerca da doença, em 2022, Elsa e colaboradores publicaram o *International Prognostic Scoring System-Molecular* (IPSS-M), um método prognóstico validado que incorpora mutações somáticas aos dados clínicos e citogenéticos para melhorar a estratificação de risco dos pacientes com SMD (Bernard *et al.*, 2022). Vale ressaltar que novamente nosso grupo participou do desenvolvimento de um escore prognóstico, desta vez com a participação do Dr. Ronald Feitosa, também coordenador do nosso grupo de pesquisa.

Por ser uma doença heterogênea e com manifestações comuns a outras doenças, a classificação da SMD passou por diversas modificações até chegar na classificação clínica atual. A Organização Mundial da Saúde vem aperfeiçoando a classificação da doença, utilizando características biológicas e genéticas para definir o significado clínico de cada entidade patológica da SMD (Swerdlow *et al.*, 2016b; Vardiman *et al.*, 2009). As variáveis utilizadas para definir os subgrupos da doença são: análise de exames clínicos, morfológicos,

citogenéticos e alterações moleculares. Em 2016, houve um avanço na introdução de análises genéticas: a OMS recomendou a pesquisa de mutação no gene *SF3B1* por apresentar grande relação com a presença de sideroblastos em anel na medula óssea, definindo o subtipo SMD com sideroblastos em anel (SMD-SA). Além disso, a deleção no braço longo do cromossomo 5 se tornou o único subtipo em que uma alteração cromossômica é definidora, SMD com del(5q) isolada (Swerdlow *et al.*, 2016b) (Figura 7).

Figura 7 – Classificação clínica da SMD segundo a OMS 2016



Legenda: SMD: Síndrome Mielodisplásica; SP: Sangue Periférico; MO: Medula Óssea; *Na presença de mutação do gene *SF3B1*.

Fonte: Adaptado de Arber *et al.* (2016)

A última atualização da classificação da SMD pela OMS foi publicada em 2022 e substituiu o termo “Síndrome Mielodisplásica” por “Neoplasia Mielodisplásica”. Essa classificação teve ênfase nas alterações genéticas e incorporou mutações oncogênicas na

estratificação dos subtipos da doença. Em resumo, esta nova classificação dividiu a SMD em dois grandes grupos principais: SMD com anormalidades genéticas definidoras e SMD definida pela morfologia, em que os critérios morfológicos foram padronizados e o número de subtipos reduzido (Khoury *et al.*, 2022). A incorporação das pesquisas moleculares à prática científica ou à prática clínica, entretanto, ainda é uma realidade distante no Brasil, dificultando o uso da classificação da OMS de 2022 nestes pacientes. Dessa forma, no estudo em questão, utilizamos a classificação da OMS de 2016 por não ser factível a realização de testes genéticos adicionais na coorte de pacientes utilizados.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa de oxigênio com potencial de produzir instabilidade genética. Baixas concentrações dessa substância são utilizadas em muitos produtos de limpeza e antissépticos. Além disso, é um composto utilizado para o clareamento de roupas e de cabelo. Concentrações mais elevadas desse composto são utilizadas na indústria como branqueador para tecidos e papel, componente de combustíveis de foguete, na fabricação de espuma de borracha, na síntese orgânica e inorgânica, no tratamento da água e de efluentes, por exemplo.

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) identifica o peróxido de hidrogênio como não classificável quanto a sua carcinogenicidade para o ser humano (Grupo 3), o que reflete a necessidade de estudos que avaliem esse potencial. Um estudo de Seo e colaboradores aplicou no dorso de camundongos C57BL/6 misturas comerciais de produtos para descolorir cabelo contendo peróxido de hidrogênio e monoetanolamina. Como resultado, o estudo percebeu a ocorrência de queda de pelo dos camundongos e dermatite (Seo *et al.*, 2012). Um outro estudo de Nazik e colaboradores aplicaram formulações comerciais de descolorantes de cabelo, cremes oxidantes e tintura henna em ratos Wistar albinos e perceberam o aumento do efeito oxidativo e hepatotoxicidade nos animais (Nazik *et al.*, 2020). Tais estudos corroboram com a necessidade de se compreender cada vez mais os efeitos que compostos utilizados com frequência, como peróxido de hidrogênio, podem causar.

Apesar dos malefícios do peróxido de hidrogênio já serem descritos em alguns artigos, ainda não há conscientização do quanto à exposição a essa substância possa ser um fator etiológico para o surgimento de doenças, incluindo o câncer. A aplicação tópica de peróxido de hidrogênio para fins de descoloração dos pelos é um hábito no Brasil e as consequências dessa exposição ainda não foram analisadas com profundidade e apresentadas em forma de alerta à sociedade. Nessa perspectiva, pretendemos desenvolver um protocolo de intoxicação tópica por peróxido de hidrogênio e analisar os efeitos que essa exposição possa ter no perfil inflamatório de resposta a danos no DNA, através da análise da via STING e de receptores Toll-like. Além disso, também será avaliado o perfil de expressão gênica de *DDX41* e *STING* em pacientes com SMD, um câncer de medula em que a exposição ocupacional a agentes químicos tóxicos sabidamente faz parte da sua etiologia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o nível de expressão gênica da via STING em camundongos C57BL/6 submetidos a um modelo de clareamento de pelos com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e amônia (NH₃) (Banho de lua) e em pacientes com Neoplasia Mielodisplásica

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar os níveis de expressão dos genes *Cgas*, *Ddx41*, *Sting1*, *Tbk1*, *Tlr3* e *Tlr4* em camundongos controles e intoxicados;
2. Avaliar o possível efeito protetor da *N*-acetilcisteína sobre a expressão dos genes da via STING em camundongos controles e intoxicados;
3. Avaliar os resultados citogenéticos em camundongos controles e intoxicados;
4. Avaliar os resultados morfológicos da medula óssea de camundongos controles e intoxicados;
5. Avaliar os níveis de expressão dos genes *DDX41* e *STING* em uma coorte de pacientes com Neoplasia Mielodisplásica;
6. Associar os níveis de expressão dos genes *DDX41* e *STING* às variáveis clínico-laboratoriais.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas isogênicos da linhagem C57BL/6, com peso entre 20-30g. Os animais foram fornecidos pelo biotério setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC). Os animais permaneceram em gaiolas em um ambiente com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ em um ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão *ad libitum*, respeitando o número máximo de animais por gaiola.

Para o protocolo piloto foram utilizados dez camundongos C57BL/6 fêmeas com 4-5 meses de idade. Para a execução do protocolo final foram utilizados 35 camundongos C57BL/6 machos e 35 fêmeas, ambos com idade equivalente a 4-5 meses. Todos os animais passaram por um período de adaptação de 4 semanas antes de iniciar o protocolo experimental. Chumaço de algodão, papel picado e tubos falcon de 50mL foram fornecidos como enriquecimento ambiental durante todos os protocolos.

4.1.1 Aspectos éticos

Os experimentos foram conduzidos conforme as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (CEUA-NPDM), protocolado sob o CEUA N° 24310522-0 (Anexo A).

4.1.2 Intoxicação tópica com descolorante

Todos os protocolos experimentais foram desenvolvidos de modo a simular como acontece, geralmente, o processo de descoloração de pelos nos seres humanos. Desse modo, o método de intoxicação utilizado foi via tópica, haja vista que os produtos clareadores são expostos na superfície da pele ou do couro cabeludo.

Passado o período de adaptação, todos os animais foram tricotomizados no dorso com máquina elétrica (5x3cm de área) para diminuir a abrasão e permitir o melhor contato com as substâncias aplicadas. A aplicação das substâncias ocorreu da seguinte forma: o animal ficava semi-contido nas mãos de um operador enquanto outro passava a substância na dorsal do animal

(Figura 8). As substâncias PBS, peróxido de hidrogênio 12% (água oxigenada 40 volumes - comercial) e amônia 5,8% (solução clareadora de pelos - comercial) foram aliquotadas em *eppendorfs* de 1,5mL para cada animal e um pincel foi utilizado para garantir uniformidade durante as aplicações. Alguns grupos também utilizaram solução salina (5mg/Kg, i.p) e N-acetilcisteína (100mg/Kg, i.p) diluída em solução salina.

Com relação ao tempo de exposição, todos os animais foram submetidos a 10 minutos de intoxicação tóxica em ambiente pouco arejado, que foi feito utilizando caixas de ponteiros de 1000 μ L (Figura 9). Ao término do tempo de exposição, foram utilizadas gazes e água destilada para limpar e secar o dorso dos animais.

Figura 8 – Aplicação das substâncias utilizadas no dorso dos animais com auxílio de um pincel e mantendo os animais semi-contidos

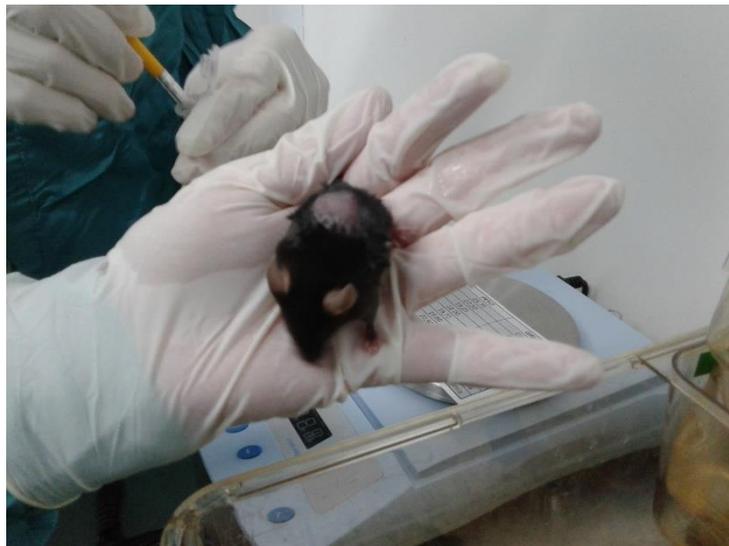
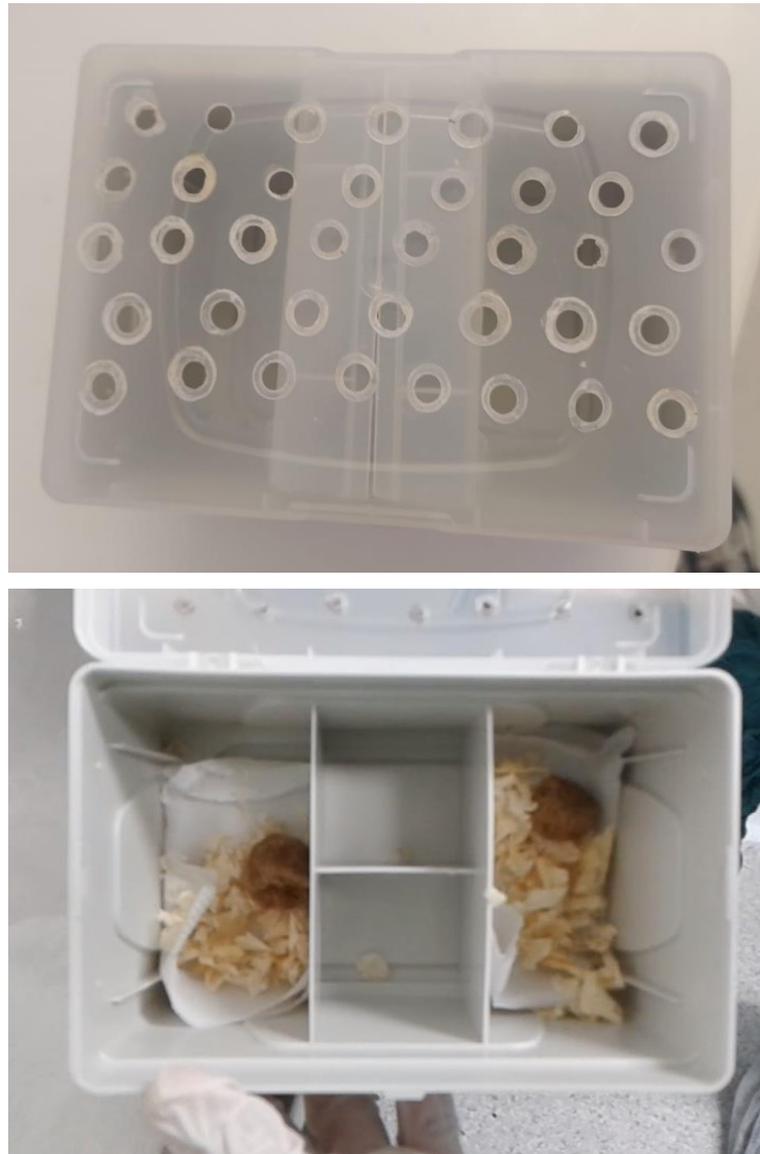


Figura 9 – Caixa de ponteira 1000 μ L adaptadas para simular um ambiente pouco arejado



Fonte: Autor

4.1.2.1 Protocolo piloto

Primeiramente, foi realizado um protocolo piloto para avaliar a mortalidade dos animais, a nefrotoxicidade e a hepatotoxicidade utilizando o modelo de dose igual ao utilizado em humanos. Para isso, foram utilizados 10 animais C57BL/6 fêmeas. Após o período de adaptação, os animais foram divididos de forma randômica em 3 grupos: **a) grupo controle** – 500 μ L de PBS (n = 4); **b) grupo peróxido** – intoxicação com 500 μ L de fórmula comercial de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) com 12% de concentração (40 volumes) (n = 3); **c) grupo amônia** – intoxicação com 250 μ L de fórmula comercial de peróxido de hidrogênio

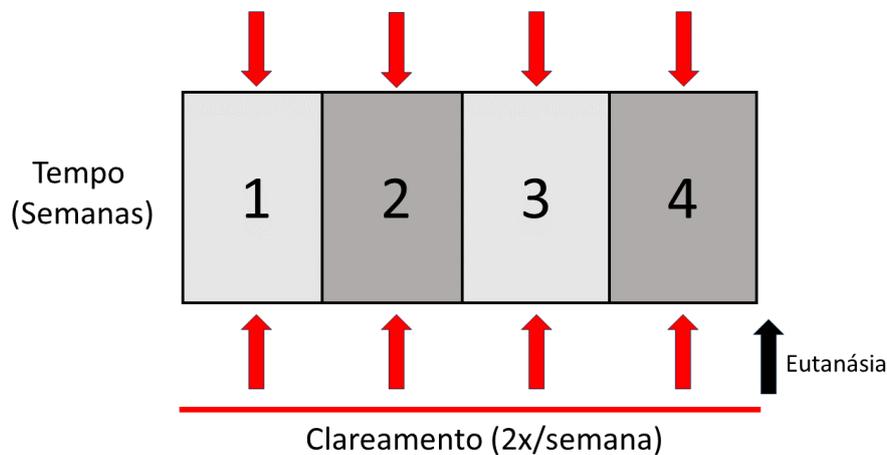
(água oxigenada) com 12% de concentração (40 volumes) + 250 μ L de fórmula comercial clareadora de pelos a base de amônia com 5,8% de concentração (n = 3) (Tabela 1).

Tabela 1 – Grupos experimentais do protocolo piloto

Grupo	Controle	Peróxido	Amônia
Número de animais	4	3	3
PBS 1X	+	-	-
Peróxido de hidrogênio 12% (água oxigenada 40 v/v comercial)	-	+	+
Amônia 5,8% (solução clareadora comercial)	-	-	+

O protocolo piloto teve duração de 4 semanas e as intoxicações aconteceram conforme descrito no item 4.1.2 Foram realizadas duas intoxicações por semana em dias alternados. Os animais foram pesados semanalmente. Após o período de intoxicação, os animais foram eutanasiados através da administração de cetamina e xilasina (80/10 mg/kg, i.p.) seguida de punção cardíaca. Após a administração da sobredose de cetamina e xilasina, os sinais de dor foram verificados dor por meio da pressão caudal e das patas para avaliação do efeito dos anestésicos e continuidade no procedimento. Amostras de sangue foram coletadas para o hemograma e avaliação de hepatotoxicidade (Figura 10).

Figura 10 – Esquema de clareamento do protocolo piloto



4.1.2.2 Protocolo final

Foram utilizados 35 camundongos C57BL/6 machos e 35 camundongos fêmeas, com peso entre 20-30g e com 4-5 meses de idade. Todos os animais foram provenientes do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Dois novos grupos foram adicionados ao protocolo final com objetivo de avaliar o efeito protetor da N-acetilcisteína (NAC) contra espécies reativas de oxigênio.

Desse modo, após o período de adaptação, os animais foram divididos de forma randômica em 5 grupos: **a) grupo controle** – 500µL de PBS (n = 7); **b) grupo peróxido** – intoxicação com 500µL de fórmula comercial de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) com 12% de concentração (40 volumes) (n = 7); **c) grupo controle NAC** - 500µL de PBS + solução salina (5mL/Kg, i.p) (n = 7); **d) grupo amônia** – intoxicação com 250µL de fórmula comercial de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) com 12% de concentração (40 volumes) + 250µL de fórmula comercial clareadora de pelos com base de amônia a 5,8% de concentração (n = 7) e **e) grupo amônia NAC** - intoxicação com 250µL de fórmula comercial de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) com 12% de concentração (40 volumes) + 250µL de fórmula comercial clareadora de pelos com base de amônia a 5,8% de concentração + N-acetilcisteína (100mg/Kg, i.p) (n = 7) (Tabela 2). Os animais receberam a injeção de N-acetilcisteína 60 minutos antes da intoxicação.

Tabela 2 – Grupos experimentais do protocolo final

Grupo	Controle	Peróxido	Controle NAC	Amônia	Amônia NAC
Número de animais	7	7	7	7	7
PBS 1X	+	-	+	-	-
Peróxido de hidrogênio 12% (água oxigenada 40 v/v comercial)	-	+	-	+	+
Amônia 5,8% (solução clareadora comercial)	-	-	-	+	+
Solução salina (5mg/Kg, i.p)	-	-	+	-	-
N-acetilcisteína	-	-	-	-	+

A aplicação ocorreu conforme descrito anteriormente no item 4.1.2. A cada semana os animais foram pesados para correção das doses de solução salina e de N-acetilcisteína. O protocolo final teve duração de 8 semanas para os grupos controle e peróxido e de 10 semanas para os grupos controle NAC, amônia e amônia NAC. As intoxicações aconteceram inicialmente duas vezes por semana em dias alternados, semelhante ao protocolo piloto. Na segunda semana de intoxicação, os animais dos grupos amônia e amônia NAC apresentaram lesões no dorso (Figura 13). Seguindo recomendação veterinária, realizou-se um intervalo de descanso das aplicações nos grupos e retomada das intoxicações apenas uma vez por semana seguindo o esquema da imagem abaixo (Figuras 11 e 12). Ao final do protocolo, todos os grupos receberam um total de dez intoxicações.

Figura 11 – Esquema de clareamento do protocolo final (grupos controle e peróxido)

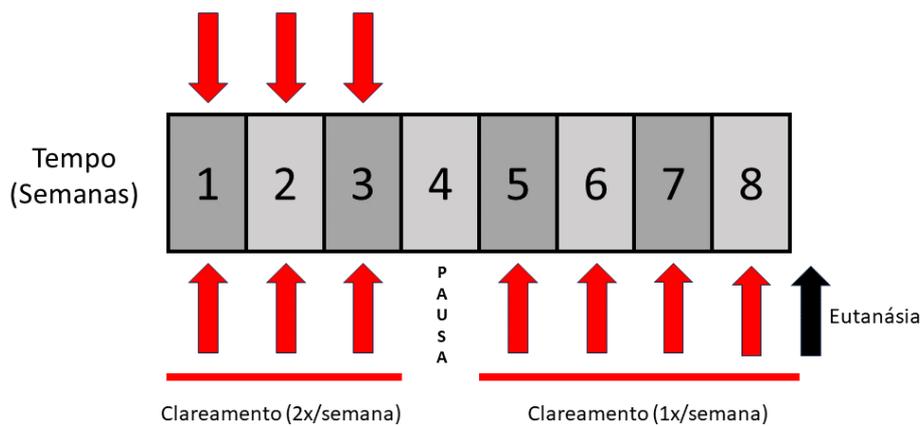
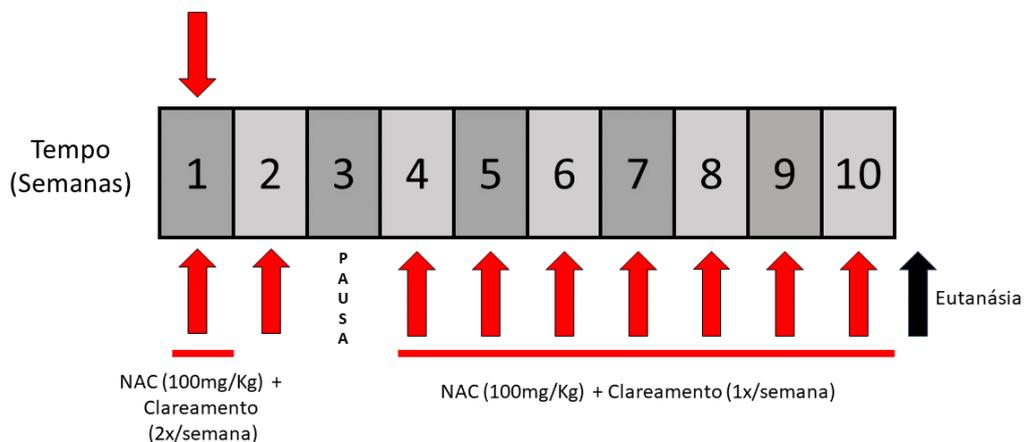


Figura 12 – Esquema de clareamento do protocolo final (grupos controle NAC, amônia e amônia NAC)



Após o período de intoxicação, os animais foram eutanasiados de modo semelhante ao protocolo piloto descrito anteriormente no item 4.1.2.1 Amostras do baço foram retiradas para análise de expressão gênica e os fêmures foram retirados para avaliação histopatológica e análise citogenética.

Figura 13 – Ferida apresentada no dorso dos animais do grupo amônia e amônia NAC



Fonte: Autor

4.1.3 Hemograma

Os animais do protocolo piloto tiveram as amostras de sangue coletadas por punção cardíaca com o auxílio de uma seringa de 1mL. O material foi colocado em tubos BD Microtainer® com EDTA e transportados em isopor com gelo até o Laboratório de Toxicologia e Exames Laboratoriais, no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC).

Foram avaliados os seguintes parâmetros: contagem de células vermelhas do sangue (RBC), contagem de células brancas do sangue (WBC) e plaquetas. Na análise dos índices hematológicos foi utilizado o aparelho automatizado SDH-3 VET (Labtest, Brasil).

4.1.4 Avaliação bioquímica

As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca com o auxílio de uma seringa de 1mL, foram colocadas em tubos BD Microtainer® com gel separador e transportados em um isopor com gelo até o laboratório de Citogenômica do Câncer, no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC).

As amostras dos camundongos C57BL/6 do protocolo piloto foram centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro. O soro foi coletado e armazenado em freezer -20°C até o momento das análises. As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

4.1.4.1 ALT/TGP

Os níveis de alanina aminotransferase foram determinados por analisador automático (Labmax pleno, Labtest, Brasil), utilizando o kit de diagnóstico de ALT/GPT Liquiform VET (Labtest®, Brasil).

4.1.4.2 AST/TGO

Os níveis de aspartato aminotransferase foram determinados por analisador automático (Labmax pleno, Labtest, Brasil), utilizando o kit de diagnóstico de AST/GOT Liquiform VET (Labtest®, Brasil).

4.1.4.3 Creatinina

Os níveis de creatinina foram determinados por analisador automático (Labmax pleno, Labtest, Brasil), utilizando o kit de diagnóstico de Creatinina K VET (Labtest®, Brasil).

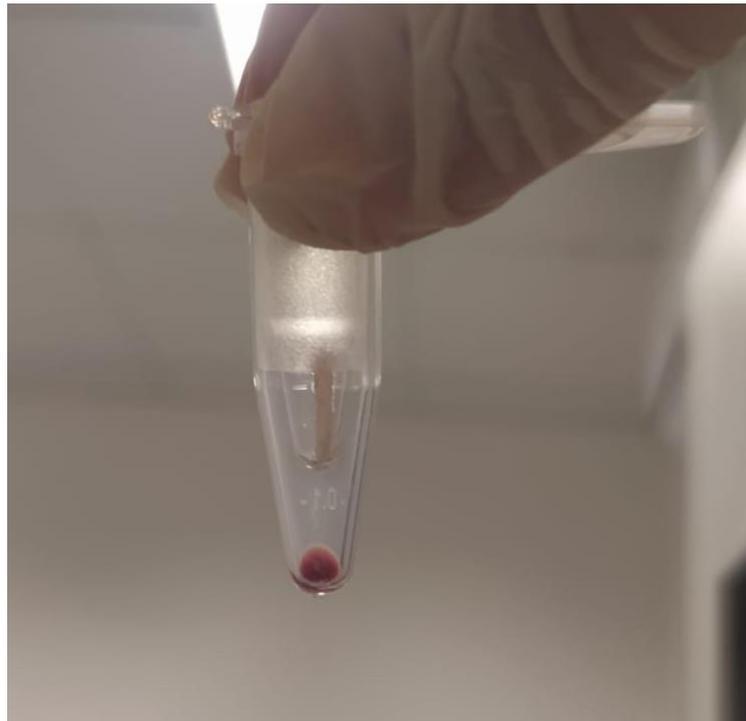
4.1.5 Cariótipo por banda-G

A metodologia para realização dos cariótipos foi desenvolvida pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer, com base no protocolo desenvolvido por Guerra e Souza (Guerra, 2002). Para a presente análise foram colhidas as medulas do fêmur dos camundongos e mantidas em PBS 1X com 1% de antibiótico, onde foram transportadas em um isopor com gelo até o fluxo do laboratório de Citogenômica do Câncer para a extração da medula.

Com o auxílio de uma tesoura ísis e uma pinça dente de rato, foi feito o corte das duas epífises do osso do fêmur. Para o flush da medula, seguiu-se o protocolo de Maridas, onde o fêmur foi colocado em um *ependorff* de 0,6mL com o fundo cortado e posto em outro *ependorff* de 1,5mL (Figura 14). Os tubos foram centrifugados a 13.400 rpm durante 30 segundos. Após o procedimento, a medula óssea encontrava-se no fundo do tubo de 1,5mL e

foi retirada com uma pipeta pasteur e colocada em tubo falcon contendo 4mL de meio (*Advanced RPMI 1640 Medium*, Gibco™) com 1% de colchicina (*Colcemid®*) e 1% de antibiótico (*Penicillin-Streptomycin*, Gibco™). Os tubos foram homogeneizados e postos para incubar durante 2 horas em estufa à 37°C.

Figura 14 – Flush da medula óssea utilizando *ependorf*



Fonte: Autor

Após o período, o material foi centrifugado e o sobrenadante desprezado. O material foi, então, ressuspensionado em KCl 0,075M, pré-aquecido a 37°C sob agitação em vórtex, em seguida o material foi levado para estufa à 37°C e permaneceu por 20 minutos. Ao completar o tempo, foi adicionado 0,5mL de solução de Carnoy (3:1 – Metanol:Ácido acético) para parar o choque hipotônico. O material foi centrifugado novamente e o sobrenadante descartado. A fixação foi feita por adição de Carnoy 3:1, sob agitação em vórtex até completar o volume de 10mL, em seguida o material foi centrifugado (passo repetido quatro vezes).

Para a confecção das lâminas, o material foi gotejado em lâminas utilizadas para microscopia óptica e secadas na placa aquecedora a 45°C. Estas lâminas são depois aquecidas por 10 minutos na placa aquecedora a 85°C. O bandeamento é realizado pela técnica de tripsina e as lâminas coradas com corante Wright® por 1 minuto e 30 segundos. As metáfases foram

analisadas e capturadas em sistema computadorizado com software para cariotipagem: CytoVision®.

4.1.6 Análises histopatológicas da medula óssea

Após a eutanásia, os fêmures foram retirados e foram acondicionado em frascos contendo solução de formol tamponado a 10% por um período de 24 horas. Em seguida, o órgão foi levado para um laboratório especializado em histotecnologia.

No laboratório, após fixação por 72 horas, o fêmur direito foi descalcificado em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 0,27M, pH 7,4) a 37 °C por 5 dias e posteriormente processado para inclusão em parafina. Um corte femoral de 4µm de espessura foi corado com hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscopia de luz com objetiva de 40x. Um resumo qualitativo foi elaborado pela leitura de dois avaliadores sem conhecimento dos grupos experimentais.

4.1.7 Análise da Expressão do mRNA por RT-qPCR

4.1.7.1 Extração do RNA total

As amostras foram obtidas a partir do baço de animais controles e intoxicados com descolorante. As amostras foram coletadas no Biotério setorial do NPDM e armazenadas em gelo para o transporte até o Laboratório de Citogenômica do Câncer. A lise celular foi feita com auxílio de um homogeneizador rotativo (Bio-Gen PRO200, PRO Scientific Inc., CT, EUA) e a extração de RNA foi realizada utilizando o mini kit de extração de RNA da Invitrogen™ (PureLink™ RNA Mini Kit), seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente foram realizadas leituras espectrofotométricas para verificação da relação de absorbância 260/280, com o objetivo de identificar uma possível contaminação do RNA.

4.1.7.2 Síntese de cDNA

O experimento seguiu as recomendações do fabricante do kit para Transcrição Reversa da Applied Biosystems® (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems®). Para cada reação, foram utilizados uma quantidade otimizada de RNA total para uma concentração final de 1000ng/mL. Para cada reação, utilizou-se de 2,0mL de buffer, 0,8mL

de DNTPs, 2,0mL de Random Primers, 1,0mL de Multiscribe Reverse Transcriptase™. As quantidades que foram citadas tiveram que ser multiplicadas pelo número total de amostras com RNA total para a produção de um “Mix” de reação. Em seguida, 5,8mL desse Mix foram adicionados em microtubos de 0,2mL apropriados para PCR com o volume calculado de RNA seguindo o protocolo (Quantificação de ácidos nucleicos em Nanodrop®). Os volumes de cada microtubo foram completados com água ultrapura até o volume final padrão de 20µL. Os tubos foram fechados e submetidos à agitação com spin por cerca de 10 segundos. As amostras foram submetidas ao termociclador, onde foram realizados os seguintes ciclos: Desnaturação a 25°C por 10 minutos; Anelamento a 37°C por 120 minutos; Extensão a 85°C por 5 minutos; e Finalização a 4°C. Por fim, as amostras de cDNA foram completadas até o volume de 100µL com água ultrapura e armazenadas em um freezer a uma temperatura de -20°C.

4.1.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

De acordo com o *International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice* a nomenclatura do símbolo de um gene para os camundongos segue a seguinte regra: a primeira letra deve ser maiúscula e o restante deve ser minúsculo, com todo o símbolo em itálico. Quando existe um ortólogo humano definitivo, os nomes dos genes também devem concordar com os nomes dos genes humanos (MGI).

A quantificação da expressão gênica dos genes avaliados neste estudo foi realizada a partir da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) realizado no aparelho 7500 Real-TimePCR System® (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). As reações foram preparadas utilizando o Kit TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) otimizado para reações com sonda TaqMan assay® (Tabela 3).

Tabela 3 – Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR para os camundongos C57BL/6

Símbolo	Nomenclatura	Ensaio TaqMan®
Alvos		
<i>Mb21d1</i>	cGAS	Mm01147496_m1
<i>Ddx41</i>	DEAD Box Helicase 41	Mm00513637_m1

<i>Tmem173</i>	Estimulador de genes do interferon – STING	Mm01158117_m1
<i>Tbk1</i>	Quinase de ligação TANK-1	Mm00451150_m1
<i>Tlr3</i>	Receptor Toll-like 3	Mm01207402_m1
<i>Tlr4</i>	Receptor Toll-like 4	Mm00445274_m1
Normalizadores		
<i>Actb</i>	B-actina	Mm00607939_s1
<i>Gapdh</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	Mm99999915_g1
<i>Hprt1</i>	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1	Mm00446968_m1

O preparo e armazenamento dos materiais foram realizados segundo as instruções do fabricante, exceto pelo volume final de cada reação que foi otimizado em 10mL. Para cada reação foram utilizados 5mL de TaqMan PCR MasterMix, 0,5mL de sonda TaqMan assay®, 2,0mL de água ultrapura e 2,5mL de cDNA. As reações foram realizadas utilizando-se placas de polipropileno para 96 reações (MicroAmp 96-well Plates, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) recobertas com adesivos para microplacas ópticas resistentes a álcool e a altas temperaturas (Optical Adhesive film, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). Após o preparo dos poços, as placas foram centrifugadas por 1 minuto a 4.500 rpm. As condições para a PCR foram: pré-aquecimento a 50°C por 2 minutos, ativação da polimerase a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação (15 segundos a 95°C) e anelamento e extensão (60 segundos a 60°C).

Para cada amostra, foi realizada uma duplicata sendo consideradas para análise somente amostras cujas diferenças de amplificação não excederam a 0,8 ciclos ($\Delta Cq \leq 0,8$) (Vandesompele *et al.*, 2002). Não foram consideradas as duplicatas das amostras que apresentaram diferenças maiores que um ciclo e meio, mesmo após repetição do experimento. Como controle de contaminantes da PCR, foram utilizados NTCs (*no-template controls*) adicionando-se em cada placa água purificada no lugar do cDNA.

Para validar a estabilidade dos níveis de expressão gênica, foram utilizados três genes de referência: β -actina (*Actb*), Hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (*Hprt1*) e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*). Para a escolha do par de genes de referência mais estáveis, foi calculado o desvio padrão de cada gene de referência com base em valores brutos (Cq – quantification cycle). Entende-se como gene endógeno mais estável, aquele ou aqueles

que obtiverem o menor valor de desvio padrão. Após a análise do desvio padrão, foi realizado um cálculo de coeficiente de correlação de Pearson para cada par de genes de referência candidatos. Em seguida, foi feita a média geométrica de todos os genes, conhecida como média de tendência central (INDEX), e feita correlação de Pearson de cada gene, separadamente, com o INDEX obtido. Os genes de referência que apresentaram menor valor de desvio padrão e maior correlação entre si e com o valor INDEX ($r > 0,7$) (Vandesompele *et al.*, 2002), foram considerados os mais estáveis.

Assim, para este estudo, os genes mais estáveis nas amostras de cDNA utilizadas foram *Actb* e *Gapdh*. Os resultados foram avaliados através do software *Sequence Detection System* v1.3 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) para obtenção dos valores de *quantitative cycle* (Cq). A partir do *threshold* estabelecido, os valores de Cq foram fornecidos pelo software do aparelho *7500Real-Time PCR System*® (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). Os valores de Cq obtidos foram usados para calcular os valores de $\Delta\Delta Cq$ e de $2^{-\Delta\Delta Cq}$. (LIVAK *et al.*, 2001). A nomenclatura utilizada para os experimentos da PCR quantitativa em tempo real foi padronizada e seguida conforme o MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (Bustin *et al.*, 2009).

4.2 Pacientes com SMD

Foi utilizada uma coorte de 73 pacientes com Neoplasia Mielodisplásica para avaliar a expressão gênica do gene *DDX41* e *STING/TMEM173*.

4.2.1 Aspectos Éticos

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará/PROPESQ-UFC (número de processo: 47730721.9.0000.5054) por meio do sistema da Plataforma Brasil, utilizando-se de Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentado na sessão anexo (Anexo B). A equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução n.º 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

4.2.2 Obtenção das amostras de medula óssea

Um total de 8 ml de medula óssea foi coletado de 73 pacientes portadores de SMD em tubos de vidro Vacutainer® contendo EDTA. São separados 5 ml para os procedimentos de extração de RNA total a fim de realizar os experimentos de expressão gênica e 3 ml para os procedimentos de Citogenética Clássica. Os 73 pacientes diagnosticados com SMD de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde revisado de 2016 (Vardiman *et al.*, 2019) tiveram 2 de seus genes analisados em amostras de medula óssea. Os pacientes foram atendidos em um hospital terciário de referência da Universidade Federal do Ceará no período de 2008 a 2022. A medula óssea dos pacientes e dos indivíduos saudáveis foi coletada após eles assinarem um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Após revisão de prontuários, os dados de expressão gênica foram correlacionados com os dados clínico-laboratoriais e os dados citogenéticos.

Para o processo de separação das células dos tubos que continham o material medular, realizou-se uma centrifugação a 1.811g por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, foi retirado o sobrenadante que continha o plasma e armazenado em microtubos para futuras pesquisas proteômicas. O material restante foi lavado com 1ml de solução de lise (25ml de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato de amônio 0,01M) e transferido para um tubo do tipo Falcon de 50mL que continha 24ml de solução de lise. É necessário deixar o tubo com o material em gelo por 15 minutos para que então ele seja homogeneizado e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Logo após, o sobrenadante é descartado e o pellet é novamente lavado com 5ml de solução de lise. O material é deixado descansando novamente em gelo por 10 minutos e, após esse tempo, é realizada uma nova centrifugação. Em seguida, foi desprezado o sobrenadante e acrescentado 250µL de PBS. Posteriormente, adicionou-se 750µL de Trizol LS Reagent® (Invitrogen, EUA) e o conteúdo foi homogeneizado com pipeta até a dissolução completa do pellet, sendo transferido para um eppendorf de 1,5mL. Ao final de todo o procedimento, o material foi armazenado no freezer a -80 °C.

4.2.3 Cariótipo por banda G

A técnica de citogenética foi realizada a partir dos protocolos estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceará, segundo a técnica

descrita por Chauffaille e adaptada por Pinheiro (Pinheiro *et al.*, 2009). A amostra de medula é colhida em tubos estéreis contendo heparina e são divididas em dois frascos contendo 8mL de meio RPMI 1640 (pH 7,0), 2 mL de soro fetal bovino e 100µL de streptomicina e penicilina. O material foi cultivado por 24 horas em estufa 37° C. Em seguida, adiciona-se 40µL de colchicina (Colcemid®) por 30 minutos. O material é então centrifugado e ressuspenso em solução hipotônica de KCl 0,075M por 20 minutos. Antes de centrifugar novamente, é adicionado 0,5mL de Carnoy (solução 3:1 de metanol e ácido acético) e homogeneizado. Após a centrifugação, o material foi lavado por 3 vezes em solução de Carnoy até completar o volume de 10mL, ressaltando que para cada lavagem foi necessário centrifugar a amostra. Por fim, retirou-se a solução de lavagem de cada tubo até um limite proporcional a quantidade de *pellet*, seguido de uma homogeneização até a dissolução do *pellet*. Para a confecção das lâminas, o material foi gotejado em lâminas utilizadas para microscopia óptica e secadas na placa aquecedora a 45° C. Estas lâminas são depois aquecidas por 10 minutos na placa aquecedora a 85° C. O bandeamento é realizado pela técnica de tripsina e as lâminas coradas com corante Wright. Para cada paciente, são analisadas 20 metáfases e todas capturadas em sistema computadorizado com software para cariotipagem: CytoVision®. Os resultados das análises citogenéticas de medula óssea foram confirmados segundo os critérios estabelecidos pelo Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (Mcgowan-Jordan, 2016).

4.2.4 Análise da Expressão do mRNA por RT-qPCR

4.2.4.1 Extração do RNA total

A extração de RNA das células da medula dos pacientes com SMD foi realizada a partir da utilização do Trizol LS Reagente® conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. Em cada 1mL de Trizol LS Reagente® deve-se encontrar 10⁶ células armazenadas, sendo assim, foram adicionados 200µL de clorofórmio para desproteinização e 10µL de glicogênio, em seguida, foram homogeneizados em vórtex e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado de cada amostra e transferido para novos tubos, seguidos de precipitação com 400µL de isopropanol e incubados por 60 minutos a -20°C. Após esse tempo, realizou-se outra centrifugação com as mesmas especificações, porém pelo dobro do tempo (30 minutos), o sobrenadante foi depois descartado por inversão e, após o *pellet* ter secado, ele foi diluído em água livre de RNase.

Ao final, para a quantificação das amostras, realizaram-se leituras espectrofotométricas em equipamento Nanodrop nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280nm, obtendo suas correlações e concentrações adquiridas. Amostras que apresentaram boas correlações (entre 1.8-2.2) foram selecionadas.

4.2.4.2 Síntese de cDNA

O experimento seguiu as recomendações do fabricante do kit para Transcrição Reversa da Applied Biosystems® (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems®). Para cada reação, foram utilizados uma quantidade otimizada de RNA total para uma concentração final de 1000ng/mL. Para cada reação, utilizou-se de 2,0mL de buffer, 0,8mL de DNTPs, 2,0mL de Random Primers, 1,0mL de Multiscribe Reverse Transcriptase™. As quantidades que foram citadas tiveram que ser multiplicadas pelo número total de amostras com RNA total para a produção de um “Mix” de reação. Em seguida, 5,8mL desse Mix foram adicionados em microtubos de 0,2mL apropriados para PCR com o volume calculado de RNA seguindo o protocolo (Quantificação de ácidos nucleicos em Nanodrop®). Os volumes de cada microtubo foram completados com água ultrapura até o volume final padrão de 20µL. Os tubos foram fechados e submetidos à agitação com spin por cerca de 10 segundos. As amostras foram submetidas ao termociclador, onde foram realizados os seguintes ciclos: Desnaturação a 25°C por 10 minutos; Anelamento a 37°C por 120 minutos; Extensão a 85°C por 5 minutos; e Finalização a 4°C. Por fim, as amostras de cDNA foram completadas até o volume de 100µL com água ultrapura e armazenadas em um freezer a uma temperatura de -20°C.

4.2.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

A quantificação da expressão gênica do gene avaliado neste estudo foi realizada a partir da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) realizado no aparelho 7500 Real-TimePCR System® (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). As reações foram preparadas utilizando o Kit TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) otimizado para reações com sonda TaqMan assay® (Tabela 4).

Tabela 4 – Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR para os pacientes com SMD

Símbolo	Nomenclatura	Ensaio TaqMan®
Alvo		
<i>DDX41</i>	DEAD Box Helicase 41	Hs00169602_m1
<i>TMEM173</i>	Estimulador de genes do interferon – STING	Hs00736955_g1
Normalizadores		
<i>B2M</i>	β 2-microglobulina	Hs00187842_m1
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	Hs03929097_g1
<i>UBC</i>	Ubiquitina C	Hs00 824723_m1

O preparo e armazenamento dos materiais foram realizados segundo as instruções do fabricante, exceto pelo volume final de cada reação que foi otimizado em 10mL. Para cada reação foram utilizados 5mL de TaqMan PCR MasterMix, 0,5mL de sonda TaqMan assay®, 2,0mL de água ultrapura e 2,5mL de cDNA. As reações foram realizadas utilizando-se placas de polipropileno para 96 reações (MicroAmp 96-well Plates, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) recobertas com adesivos para microplacas ópticas resistentes a álcool e a altas temperaturas (Optical Adhesive film, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). Após o preparo dos poços, as placas foram centrifugadas por 1 minuto a 4.500 rpm. As condições para a PCR foram: pré-aquecimento a 50°C por 2 minutos, ativação da polimerase a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação (15 segundos a 95°C) e anelamento e extensão (60segundos a 60°C). Em todas as etapas, as amostras estavam imersas no gelo.

Para cada amostra, foi realizada uma duplicata sendo consideradas para análise somente amostras cujas diferenças de amplificação não excederam a 0,8 ciclos ($\Delta Cq \leq 0,8$) (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Não foram consideradas as duplicatas das amostras que apresentaram diferenças maiores que um ciclo e meio, mesmo após repetição do experimento. Como controle de contaminantes da PCR, foram utilizados NTCs (*no-templante controls*) adicionando-se em cada placa água purificada no lugar do cDNA.

Para validar a estabilidade dos níveis de expressão gênica, foram utilizados três genes de referência: *β 2-microglobulina* (B2M), *Ubiquitina C* (UBC) e *Gliceraldeidofosfato*

desidrogenase (GAPDH). A escolha dos genes endógenos foi feita de modo semelhante ao descrito na sessão 4.1.7.3.

Assim, para este estudo, obtivemos que os genes mais estáveis nas amostras de cDNA utilizadas foram a *UBC* e o *B2M*. Os resultados foram avaliados através do software *Sequence Detection System v1.3* (*Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*) para obtenção dos valores de *quantitative cycle* (Cq). A partir do *threshold* estabelecido, os valores de Cq foram fornecidos pelo software do aparelho *7500Real-Time PCR System®* (*Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*). Para normalizar os valores de Cq, de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o Cq determinado para uma amostra foi subtraído da média geométrica dos Cq's dos genes endógenos utilizados (*UBC* e *B2M*) da mesma amostra, gerando assim os valores de ΔCq e $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK *et al.*, 2008). A nomenclatura utilizada para os experimentos da PCR quantitativa em tempo real foi padronizada e seguida conforme o MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (Bustin *et al.*, 2009).

4.3 Análises estatísticas

Para cada análise estatística, foi realizado primeiramente o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os valores de outliers foram retirados do estudo porque apresentavam valores contrastantes com os demais. A partir da normalização dos casos, foram realizados testes paramétricos através de testes T de *Student*, quando se comparavam médias entre dois grupos, e o teste de *one-way* ANOVA, quando se comparavam três ou mais grupos.

O pós-teste (post-hoc) para o ANOVA foi definido pela análise de homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Se a homogeneidade fosse confirmada ($p\text{-valor} \geq 0,05$), o pós-teste utilizado foi o teste de Tukey. Se não houvesse homogeneidade ($p\text{-valor} < 0,05$), o pós-teste foi o teste de Games-Howell. Foram apresentados resultados através de gráficos e tabelas, onde o valor de significância estatística utilizado para os testes foi de $p < 0,05$ e todas as análises foram efetuadas com ajuda dos softwares GraphPad Prism6 (GraphPad Prism software, La Jolla, CA, USA) e SPSS para Windows versão 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

O teste de correlação de Spearman foi utilizado para a obtenção dos valores de r e r -square (r^2) que demonstra a influência do nível de expressão de um dado gene sobre o outro na população avaliada, buscando demonstrar se tais genes são regulados pelo mesmo mecanismo molecular

5 RESULTADOS

5.1 Animais

5.1.1 Protocolo Piloto

5.1.1.1 Hemograma

A contagem total de hemácias, leucócitos e plaquetas dos dez camundongos C57BL/6 fêmeas do protocolo piloto estão apresentados na tabela 5. Observou-se uma leve tendência de redução nas plaquetas do grupo piloto e leve redução no número de leucócitos do grupo amônia, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 5 – Parâmetros hematológicos verificados em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 do protocolo piloto

Grupo	Parâmetro (unidade)	Média ± D.P. (IC 95%)
Controle	Hemácias ($10^{12}/L$)	8,7 ± 1,4 (6,4 – 11,0)
	Leucócitos ($10^9/L$)	6,5 ± 3,4 (0,9 – 12,0)
	Plaquetas ($10^9/L$)	359 ± 427 (-703 – 1422)
Peróxido	Hemácias ($10^{12}/L$)	8,9 ± 0,2 (8,3 – 9,6)
	Leucócitos ($10^9/L$)	6,2 ± 0,8 (4,2 – 8,2)
	Plaquetas ($10^9/L$)	657 ± 25 (428 – 885)
	Hemácias ($10^{12}/L$)	9,6 ± 0,2 (8,9 – 10,2)

Amônia	Leucócitos ($10^9/L$)	$4,3 \pm 1,0$ (1,7 – 6,8)
	Plaquetas ($10^9/L$)	$666 \pm 5,8$ (652 – 681)

D.P.: Desvio padrão; IC: intervalo de confiança.

5.1.1.2 Análise bioquímica

Os resultados das dosagens de ALT/TGP, AST/TGO e creatinina estão apresentados na tabela 6 e descritos de forma individual nos itens subsequentes. Os animais apresentaram dosagem geral de acordo com parâmetros estabelecidos em laboratórios de referência.

Tabela 6 – Parâmetros bioquímicos dosados em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 do protocolo piloto

Grupo	Parâmetro (unidade)	Média ± D.P. (IC 95%)	Média ±	Média ±	Média ±	Média ±
			D.P. (IC 95%) Ref. 1	D.P. (IC 95%) Ref. 2	D.P. (IC 95%) Ref. 3	D.P. (IC 95%) Ref. 4
Controle	ALT/TGP (UI/L)	$41,50 \pm 7,77$ (-28,38 – 111,40)	56 ± 14 ---	57 (27 – 195)	39 ± 26 ---	47 - 87 ---
	AST/TGO (UI/L)	$114,70 \pm 82,78$ (-90,97 – 320,30)	157 ± 59 ---	133 (43 – 397)	125 ± 57 ---	55 – 251 ---
	Creatinina (mg/dL)	$0,44 \pm 0,12$ (0,14 – 0,74)	$0,3 \pm 0,08$ ---	0,3 (0,2 – 0,5)	---	0,48 – 1,1 ---
	ALT/TGP (UI/L)	$47,50 \pm 19,09$ (-124,03 -219,02)				
Peróxido	AST/TGO (UI/L)	$88,50 \pm 19,09$ (-83,03 – 260,03)				
	Creatinina (mg/dL)	$0,63 \pm 0,04$ (0,19 – 1,08)				

Controle	2	41,50	7,77	-28,38	111,40	0,517	0,026
Peróxido	2	47,50	19,09	-124,03	219,02		
Amônia	3	56,33	11,85	26,91	85,76		

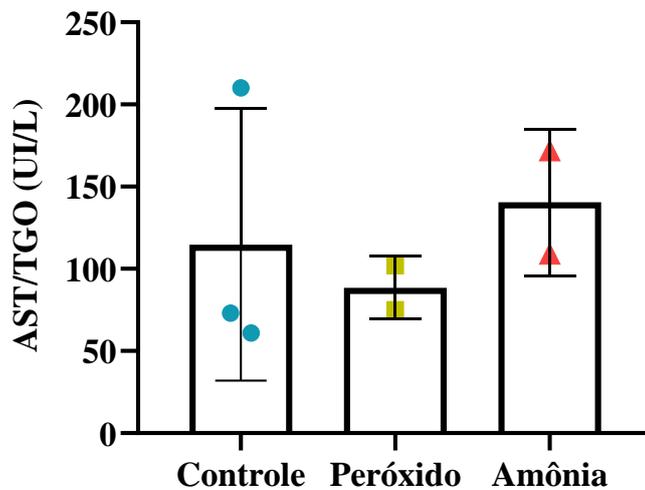
‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

5.1.1.2.2 AST/TGO

As fêmeas C57BL/6 que foram expostas ao peróxido de hidrogênio ($88,50 \pm 19,09$) e ao peróxido de hidrogênio + amônia ($140 \pm 44,55$) não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) nas dosagens de AST/TGO em relação ao grupo controle ($114,70 \pm 82,78$) (Figura 16).

Figura 16 - Efeito do clareamento sobre a dosagem de AST/TGO (UI/L) em camundongos do protocolo piloto



Variável		AST/TGO (UI/L)					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA‡	Teste de Levene
Controle	3	114,70	82,78	-90,97	320,30	0,483	0,054
Peróxido	2	88,50	19,09	-83,03	260,03		
Amônia	2	140,50	44,55	-259,70	540,70		

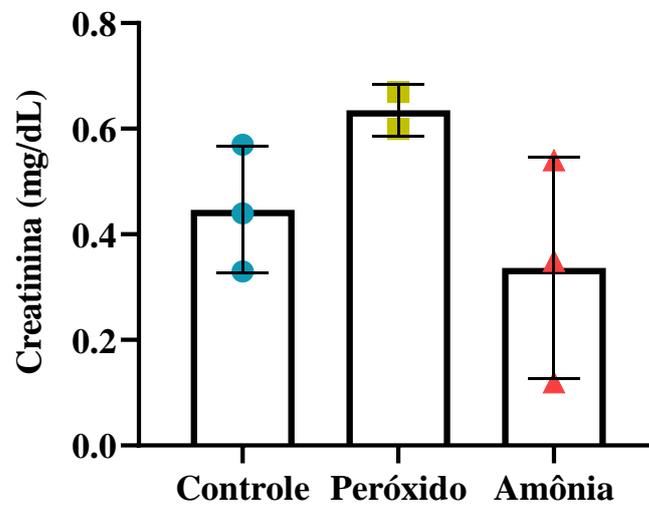
‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

5.1.1.2.3 Creatinina

Não foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) na dosagem de creatinina das fêmeas C57BL/6 que foram expostas ao peróxido de hidrogênio ($0,63 \pm 0,04$) e ao peróxido de hidrogênio + amônia ($0,33 \pm 0,21$) em relação ao grupo controle ($0,44 \pm 0,12$) (Figura 17).

Figura 17 - Efeito do clareamento sobre a concentração de creatinina (mg/dL) em camundongos do protocolo piloto



Variável		Creatinina (mg/dL)				ANOVA [†]	Teste de Levene
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior		
Controle	3	0,44	0,12	0,14	0,74	0,203	0,405
Peróxido	2	0,63	0,04	0,19	1,08		
Amônia	3	0,33	0,21	-0,18	0,85		

[†]ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

5.1.2 Protocolo Final

5.1.2.1 Análise citogenética

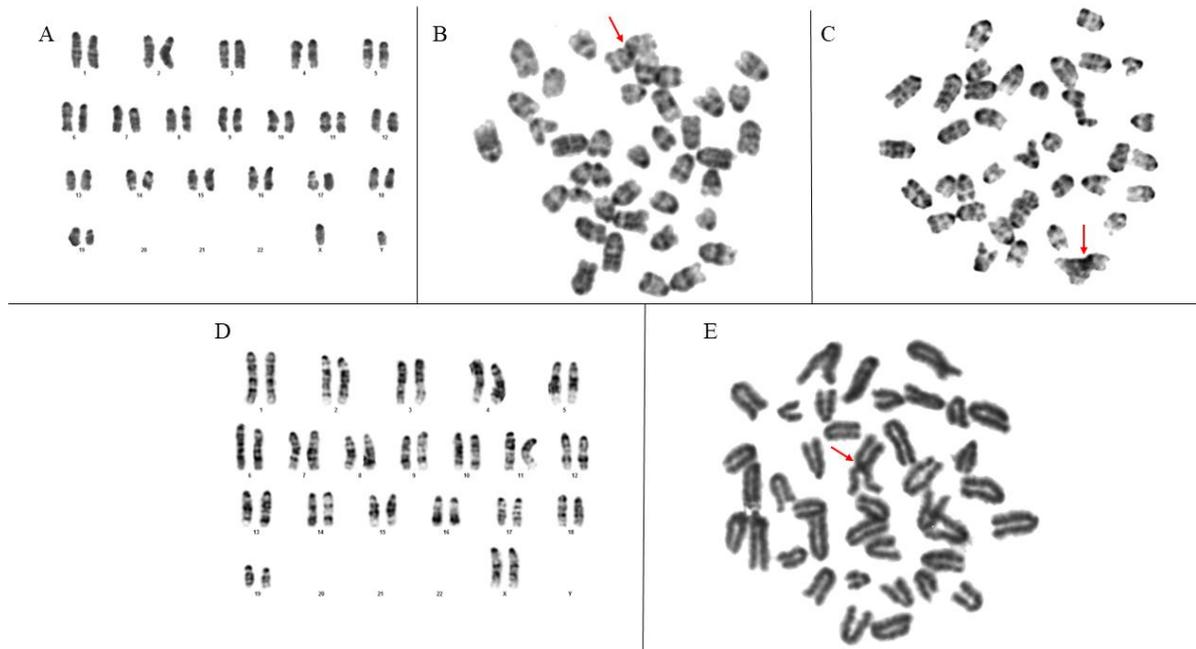
Análises citogenéticas foram realizadas em todos os animais C57BL/6. Ao todo, um total de 265 lâminas foram lidas e 389 metáfases foram capturadas. Translocações e hiperdiploidia foram encontradas em algumas metáfases (Figura 18). Os dados da quantidade de lâminas, metáfases e alterações (translocações/nº de metáfases) encontradas para cada grupo podem ser visualizados na tabela abaixo.

Tabela 7 – Resultados dos achados citogenéticos

Avaliação Citogenética				
Grupo	Nº de lâminas	Nº de metáfases	Translocações	Percentual de alterações (%)
Controle				
Machos	23	57	2	3,5
Fêmeas	20	53	6	11,3
Peróxido				
Machos	19	74	5	6,7
Fêmeas	27	35	5	14,2
Controle NAC				
Machos	15	42	0	0
Fêmeas	31	25	3	12,0
Amônia				
Machos	17	48	1	2,0
Fêmeas	19	47	3	6,3

Amônia NAC				
Machos	11	58	3	5,1
Fêmeas	22	47	5	10,6

Figura 18 - Representação dos resultados encontrados na citogenética por banda G



Legenda: A) Animal macho grupo controle, cariótipo normal; B) Animal macho grupo peróxido, translocação; C) Animal fêmea grupo controle NAC, translocação; D) Animal fêmea grupo peróxido, cariótipo normal e E) Animal fêmea grupo amônia, translocação. As setas vermelhas indicam a junção dos centrômeros

5.1.2.2 Análise histopatológica da medula óssea

Após a leitura individual de 5 campos distintos por dois observadores independentes em microscopia ótica utilizando a ampliação de 40x. Os achados de celularidade, linhagem predominante, número de megacariócitos, presença de megacariótipos agrupados e presença de ninhos são apresentados na tabela 8 abaixo e podem ser visualizados na figura 19.

Tabela 8 – Achados histopatológicos para os camundongos machos

Machos					
Grupos	Celularidade (Média ± D.P.)	Linhagem predominante	Número de megacariócitos (Média ± D.P.)	Presença de megacariócitos agrupados	Presença de ninhos eritróides
Controle	58,57 ± 14,64	Mielóide	5,29 ± 2,14	Não	Sim
Peróxido	61,43 ± 24,10	Mielóide	4,71 ± 1,25	Não	Sim
Controle NAC	57,14 ± 17,99	Mielóide	5,00 ± 1,29	Não	Sim
Amônia	74,29 ± 12,72	Mielóide	5,71 ± 1,60	Sim	Sim
Amônia NAC	58,57 ± 18,64	Mielóide	5,29 ± 1,11	Não	Sim

Legenda: D.P.: Desvio-padrão.

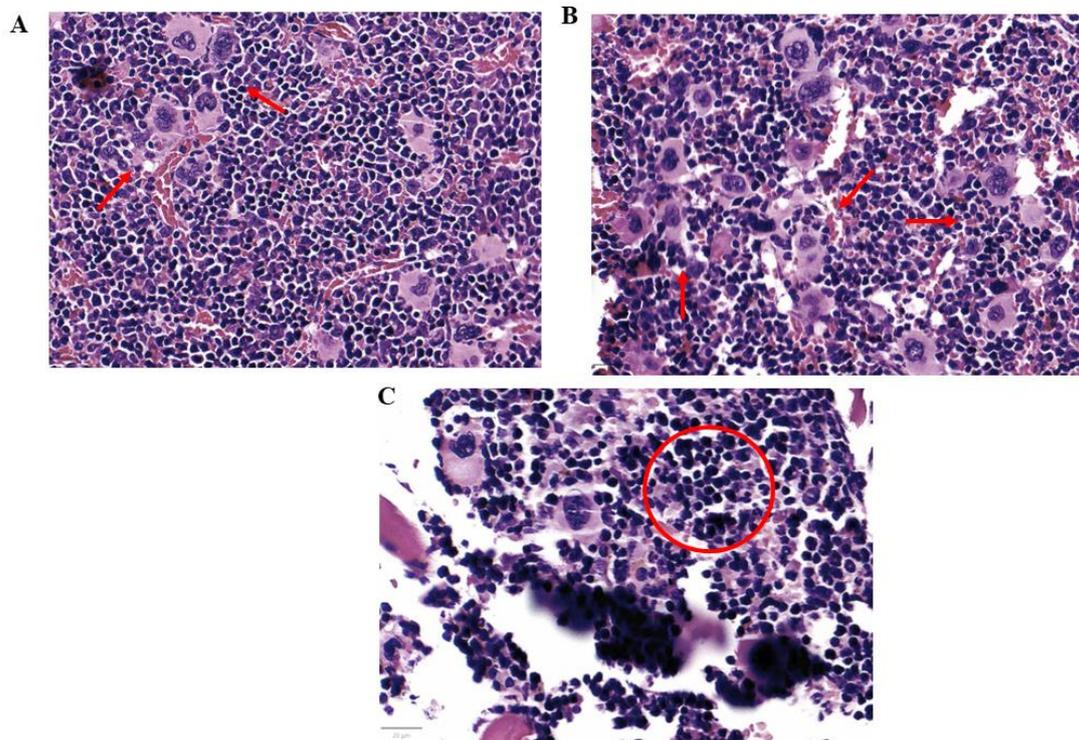
Tabela 9 – Achados histopatológicos para os camundongos fêmeas

Fêmeas					
Grupos	Celularidade (Média ± D.P.)	Linhagem predominante	Número de megacariócitos (Média ± D.P.)	Presença de megacariócitos agrupados	Presença de ninhos eritróides
Controle	65,71 ± 17,18	Mielóide	5,57 ± 2,23	Não	Sim
Peróxido	58,57 ± 12,15	Mielóide	5,14 ± 1,57	Sim	Sim
Controle NAC	51,43 ± 13,45	Mielóide	6,00 ± 1,83	Não	Sim
Amônia	51,43 ± 18,64	Mielóide	6,43 ± 2,23	Não	Sim

Amônia NAC	47,14 ± 14,96	Mielóide	4,57 ± 0,98	Não	Sim
------------	---------------	----------	-------------	-----	-----

Legenda: D.P.: Desvio-padrão.

Figura 19 – Achados histopatológicos



Legenda: Biópsias de medula óssea provenientes do fêmur. A) Megacariócitos agrupados em animal C57BL/6 fêmea do grupo peróxido; B) Megacariócitos agrupados em animal C57BL/6 macho do grupo amônia; C) Presença de ninhos eritróides em animal C57BL/6 macho do grupo controle. Imagens registradas em objetiva de 40x.

5.1.2.3 Análise da Expressão do mRNA por RT-qPCR

A seguir serão apresentadas as associações e correlações entre os níveis de expressão gênica dos genes da via STING e os grupos experimentais. Para melhor entendimento, os resultados serão apresentados separadamente por gene.

5.1.2.3.1 *Cgas*

Identificamos maior expressão do gene *Cgas* no grupo peróxido em comparação ao grupo controle nos camundongos C57BL/6 fêmeas, com um fold-change de 1,95X ($p = 0,04$). Para os camundongos machos observou-se essa mesma tendência de aumento na expressão no grupo peróxido, mas sem significância estatística ($p = 0,47$). Os dados foram resumidos na figura 20 e tabela 10.

Figura 20 – Níveis de expressão do gene *Cgas* nos grupos controle e peróxido

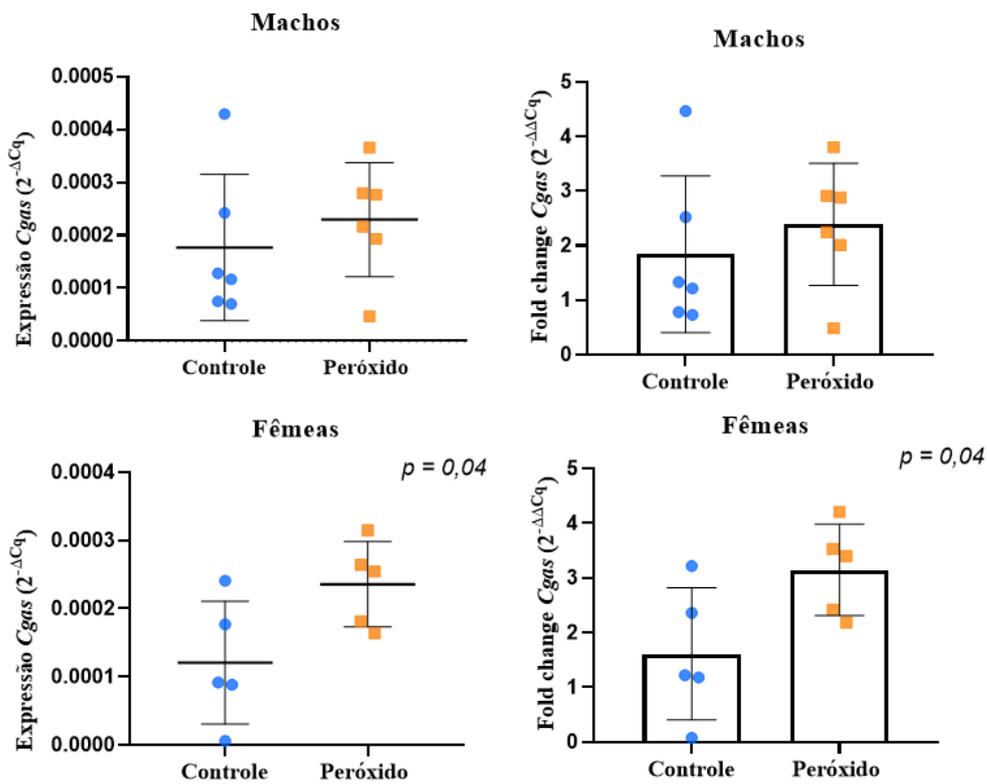


Tabela 10 – Descrição estatística para o gene *Cgas* nos grupos controle e peróxido

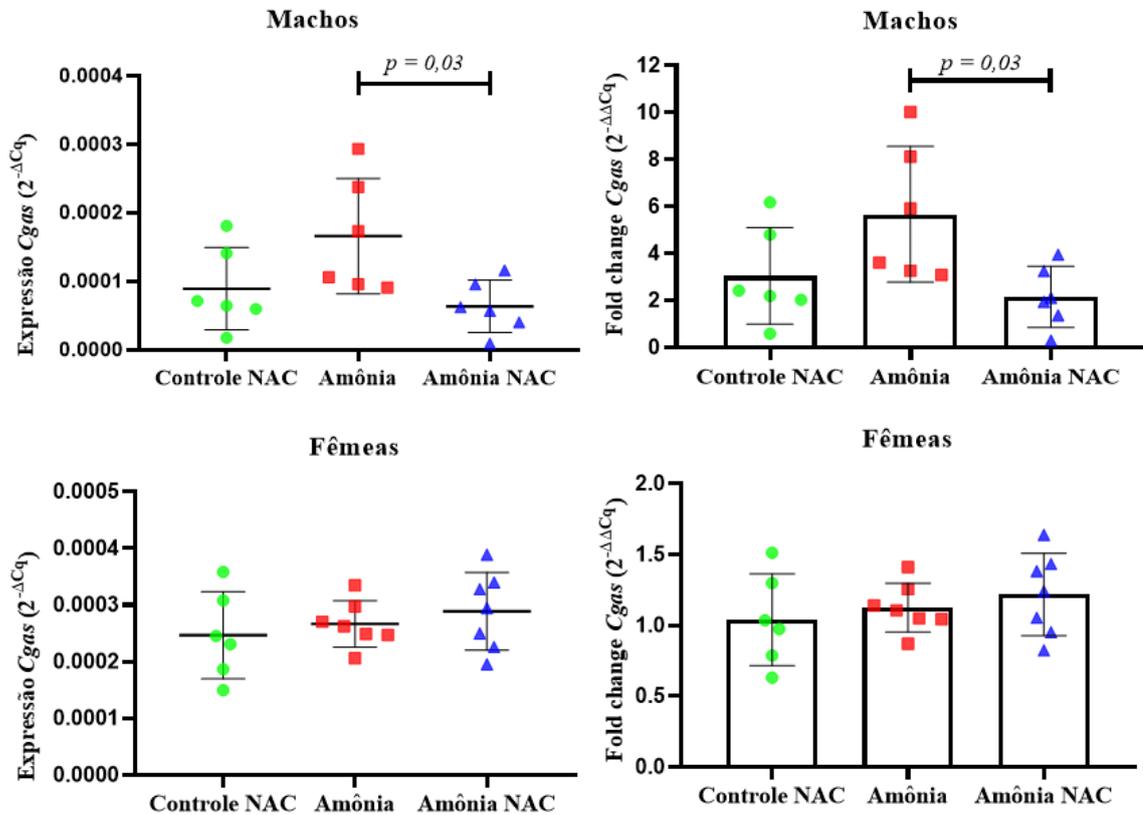
Gene <i>Cgas</i>		Machos					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	T de Student [‡]
Controle	6	,000176962	,0001383191	,000031805	,000322119	0,506	0,479
Peróxido	6	,000229610	,0001078138	,000116466	,000342754		

‡Teste *t* de Student. Teste de Levene e Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

Gene <i>Cgas</i>		Fêmeas					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	T de Student [‡]
Controle	5	,000120645	,0000903323	,000008482	,000232807	0,413	0,047
Peróxido	5	,000235671	,0000624252	,000158160	,000313182		

‡Teste *t* de Student. Teste de Levene e Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

Com relação aos grupos dos animais que sofreram clareamento com amônia, os camundongos C57BL/6 machos do grupo amônia apresentaram maior expressão de *Cgas* do que os animais do grupo amônia NAC, com um fold-change de 2,6X ($p = 0,03$). Com relação aos camundongos C57BL/6 fêmeas, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$). Os dados foram resumidos na figura 21 e tabela 11.

Figura 21 - Níveis de expressão do gene *Cgas* nos grupos controle NAC, amônia e amônia NACTabela 11 - Descrição estatística para o gene *Cgas* nos grupos controle NAC, amônia e amônia NAC

Gene <i>Cgas</i>		Machos						
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA [‡]	Teste de Levene	
								Tukey
Controle NAC	6	,000088995	,0000600052	,000026023	,000151967	0,035	0,107	-
Amônia	6	,000165890	,0000843939	,000077324	,000254456			0,035
Amônia NAC	6	,000063233	,0000382245	,000023119	,000103347			0,035

[‡]ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

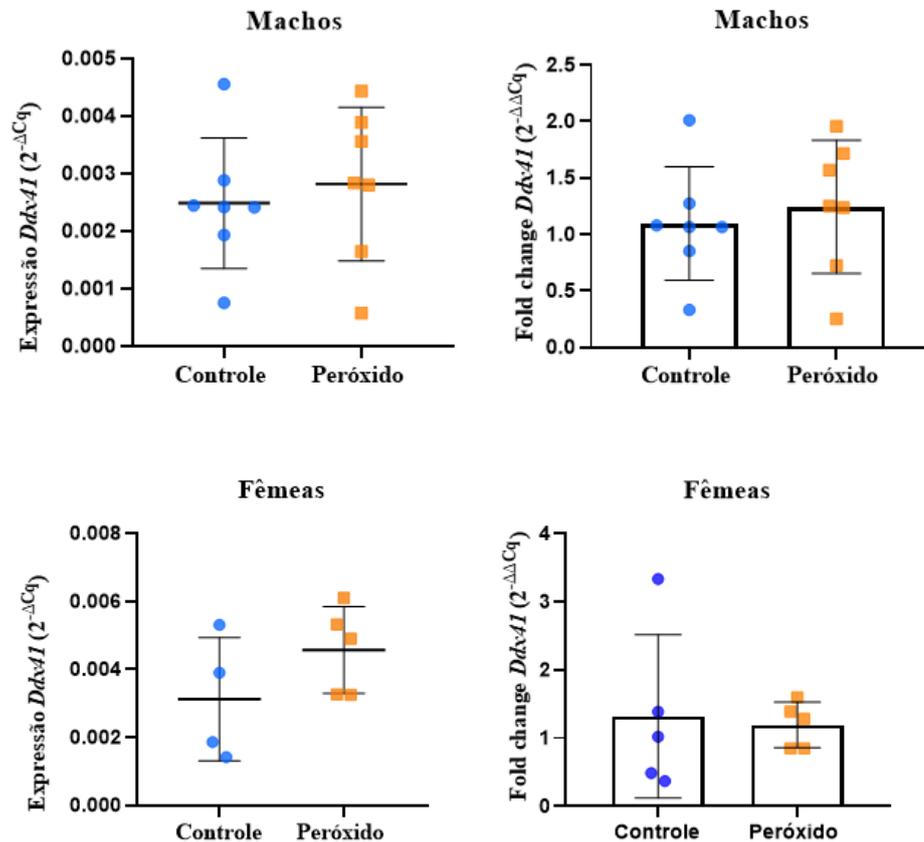
Gene <i>Cgas</i>		Fêmeas					ANOVA [‡]	Teste de Levene
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior			
Controle NAC	6	,000246757	,0000769159	,000166039	,000327475	0,498	0,258	
Amônia	7	,000266918	,0000407876	,000229196	,000304640			
Amônia NAC	7	,000289035	,0000688069	,000225399	,000352670			

IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

5.1.2.3.2 *Ddx41*

Observa-se uma leve tendência de aumento na expressão do gene *Ddx41* no grupo peróxido. Em ambos os sexos, todavia, não foram encontradas associações significantes entre o nível de expressão de *Ddx41* e os grupos experimentais ($p > 0,05$). Os dados foram resumidos na figura 22 e tabela 12.

Figura 22 - Níveis de expressão do gene *Ddx41* em todos os grupos experimentais



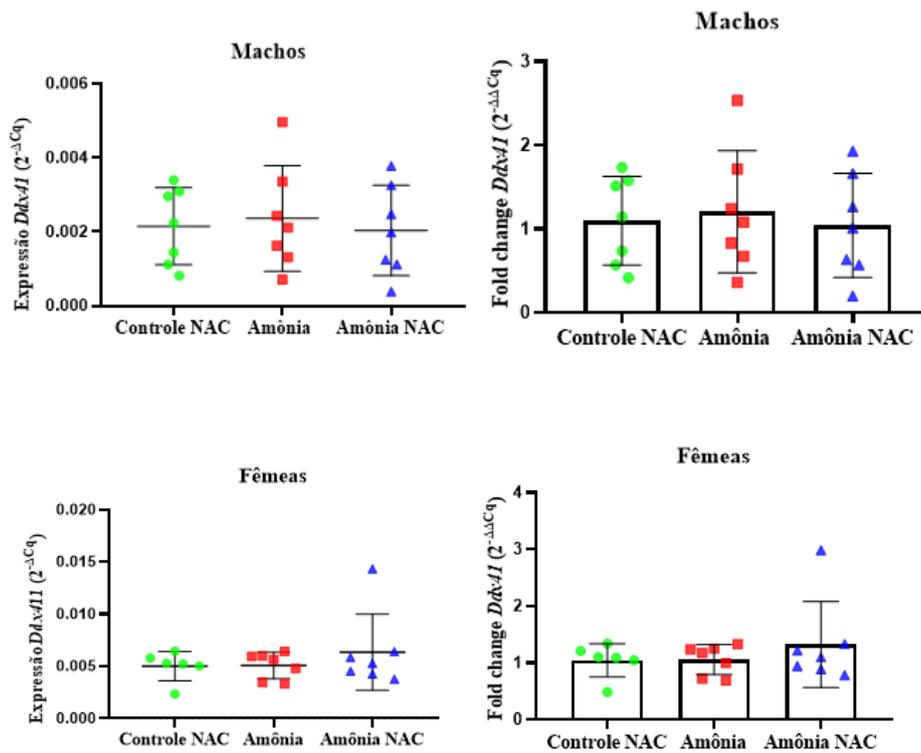


Tabela 12 - Descrição estatística para o gene *Ddx41* em todos os grupos experimentais

Gene <i>Ddx41</i>		Machos					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	T de Student [‡]
Controle	7	,002483869	,0011359282	,001433311	,003534428	0,543	0,624
Peróxido	7	,002817006	,0013353734	,001581991	,004052020		

[‡]Teste *t* de Student. Teste de Levene e Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

Gene <i>Ddx41</i>		Fêmeas					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	T de Student [‡]
Controle	5	,005050280	,0045809277	-,000637693	,010738253	0,273	0,202
Peróxido	5	,004568812	,0012718596	,004568812	,002989589		

[‡]Teste *t* de Student. Teste de Levene e Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

Gene <i>Ddx41</i>		Machos					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA [‡]	Teste de Levene
Controle NAC	7	,002152335	,0010379021	,001192436	,003112234	0,885	0,889
Amônia	7	,002361992	,0014284010	,001040941	,003683043		
Amônia NAC	7	,002038014	,0012192509	,000910395	,003165633		

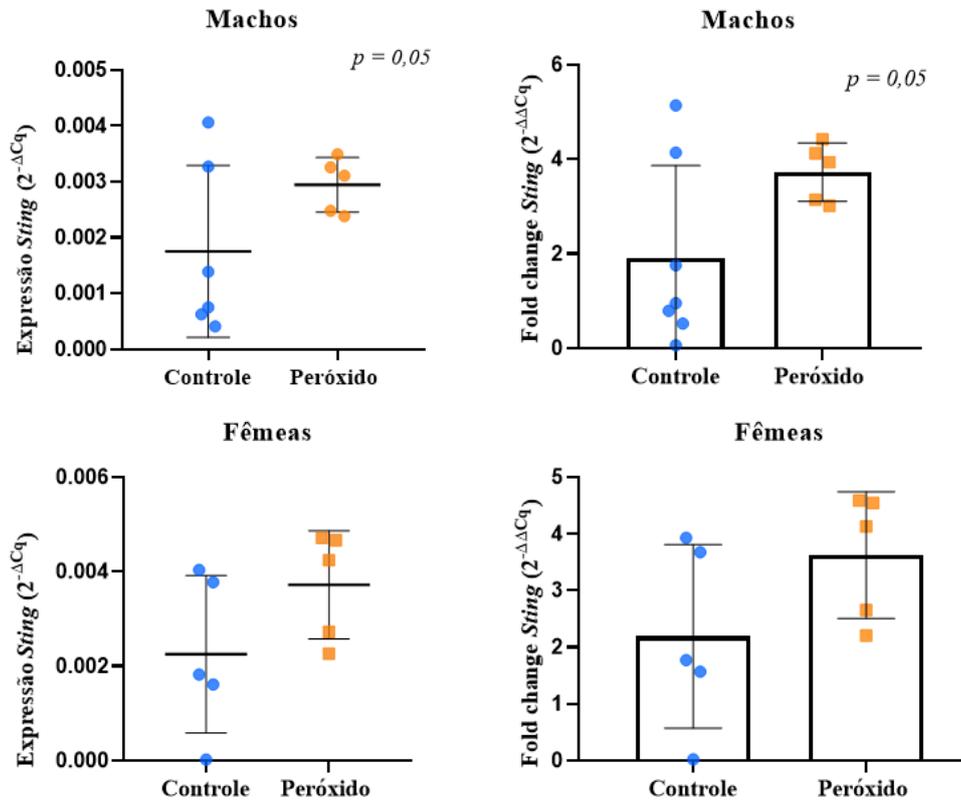
[‡]ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

Gene <i>Ddx41</i>		Fêmeas					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA [‡]	Teste de Levene
Controle NAC	6	,005554345	,0005688210	,004848060	,006260629	0,527	0,281
Amônia	7	,005077761	,0012629818	,003909697	,006245824		
Amônia NAC	7	,005023560	,0010034447	,003970510	,006076611		

[‡]ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

5.1.2.3.3 *Sting*

Observamos maior expressão do gene *Sting* em camundongos C57BL/6 machos do grupo peróxido em relação ao grupo controle ($p = 0,050$). Para os camundongos fêmeas, observou-se essa mesma tendência de aumento na expressão no grupo peróxido, mas sem significância estatística ($p = 0,143$). O resumo dos dados pode ser visualizado na figura 23 e tabela 13.

Figura 23 – Nível de expressão do gene *Sting* nos grupos controle e peróxidoTabela 13 - Descrição estatística para o gene *Sting* nos grupos controle e peróxido

Gene <i>Sting</i>		Machos					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	T de Student [†]
Controle	7	,001509241	,0015461797	,000079263	,002939219	0,046	0,050
Peróxido	5	,002947171	,0004888971	,002340125	,003554217		

[†]Teste t de Student. Teste de Levene e Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

Gene <i>Sting</i>		Fêmeas					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	T de Student [‡]
Controle	5	,002253471	,0016641654	,000187137	,004319805	0,387	0,143
Peróxido	5	,003722583	,0011466434	,002298837	,005146329		

‡Teste *t* de Student. Teste de Levene e Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

Nos grupos que tiveram intoxicação com amônia, os camundongos C57BL/6 machos do grupo amônia apresentaram maior expressão de *Sting* do que camundongos do grupo controle NAC ($p = 0,05$) e amônia NAC ($p = 0,05$). Não foi observada nenhuma associação significativa entre a expressão de *Sting* e os grupos experimentais com amônia para os camundongos C57BL/6 fêmeas ($p = 0,979$). Os dados foram resumidos na figura 24 e tabela 14.

Figura 24 – Nível de expressão do gene *Sting* nos grupos controle NAC, amônia e amônia NAC

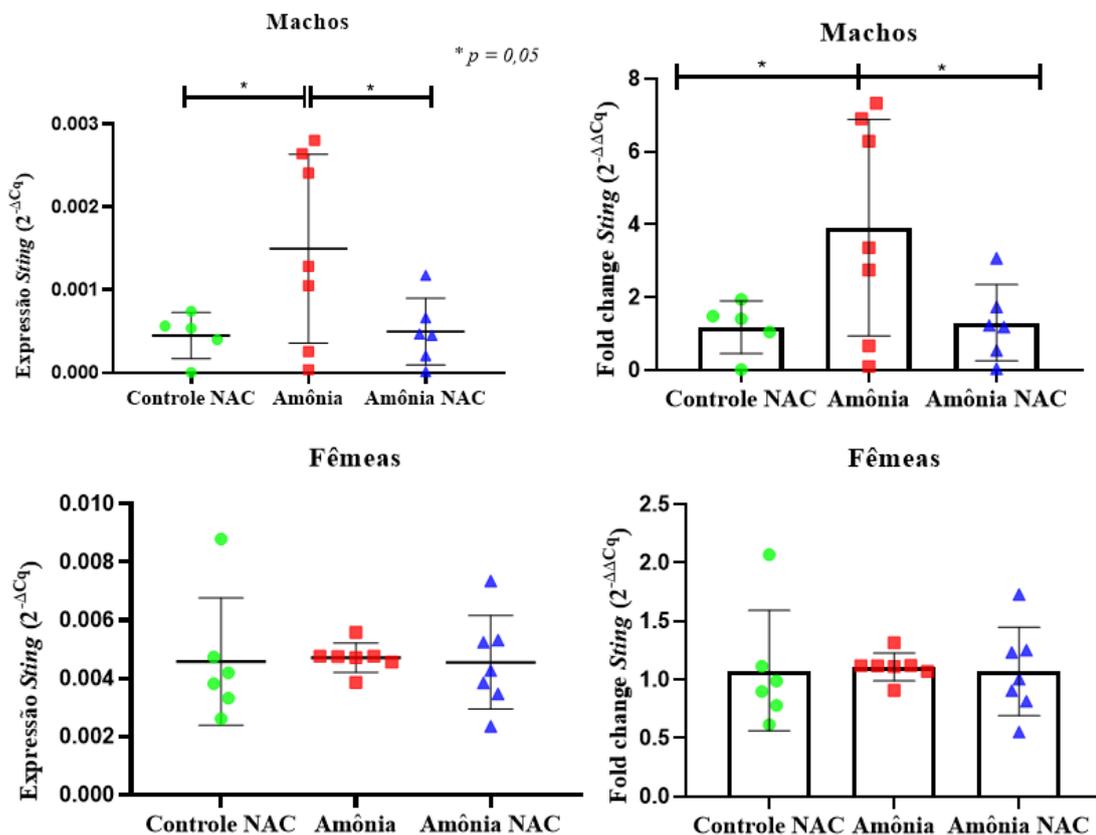


Tabela 14 - Descrição estatística para o gene *Sting* nos grupos controle NAC, amônia e amônia NAC

Gene <i>Sting</i>		Machos						
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA [‡]	Teste de Levene	Games-Howel
Controle NAC	5	,000451617	,0002770818	,000107575	,000795660	0,047	0,002	0,050
Amônia	7	,001499192	,0011377307	,000446967	,002551417			0,050
Amônia NAC	6	,000498939	,0004019100	,000077161	,000920718			0,050

‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Games-Howel: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

Gene <i>Sting</i>		Fêmeas						
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA [‡]	Teste de Levene	
Controle NAC	6	,004581102	,0021891178	,002283764	,006878440	0,979	0,110	
Amônia	7	,004715837	,0005029667	,004250670	,005181003			
Amônia NAC	7	,004553036	,0016090023	,003064957	,006041115			

‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

5.1.2.3.4 *Tbk1*

Para o gene *Tbk1*, identificamos aumento da expressão gênica em animais C57BL/6 no grupo peróxido. No entanto, nenhuma associação significativa foi encontrada entre os níveis de expressão de *Tbk1* e os grupos experimentais, independentemente do sexo ($p > 0,05$). Os dados estão resumidos na figura 25 e tabela 15.

Figura 25 - Níveis de expressão do gene *Tbk1* em todos os grupos experimentais

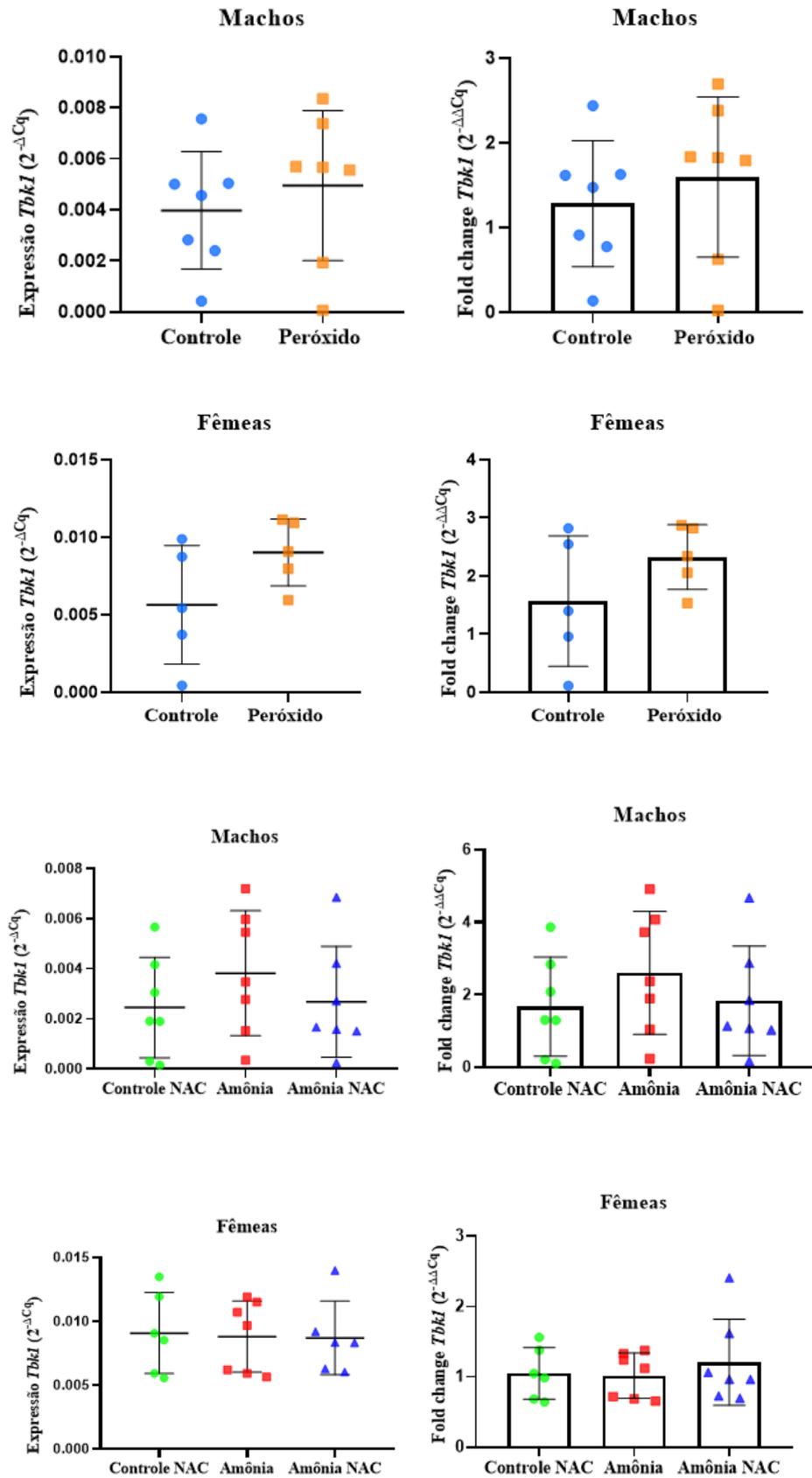


Tabela 15 - Descrição estatística para o gene *Tbk1* em todos os grupos experimentais

Gene <i>Tbk1</i>		Machos					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	T de Student [‡]
Controle	7	,003971802	,0023050414	,001839994	,006103610	0,566	0,503
Peróxido	7	,004947332	,0029399386	,002228342	,007666322		

‡Teste *t* de Student. Teste de Levene e Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

Gene <i>Tbk1</i>		Fêmeas					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	T de Student [‡]
Controle	5	,005639722	,0038233188	,000892444	,010386999	0,237	0,124
Peróxido	5	,009013336	,0021609249	,006330193	,011696478		

‡Teste *t* de Student. Teste de Levene e Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

Gene <i>Tbk1</i>		Machos					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA [‡]	Teste de Levene
Controle NAC	7	,002450242	,0020058420	,000595148	,004305336	0,488	0,727
Amônia	7	,003821223	,0024938717	,001514777	,006127670		
Amônia NAC	7	,002683886	,0022113630	,000638716	,004729056		

‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

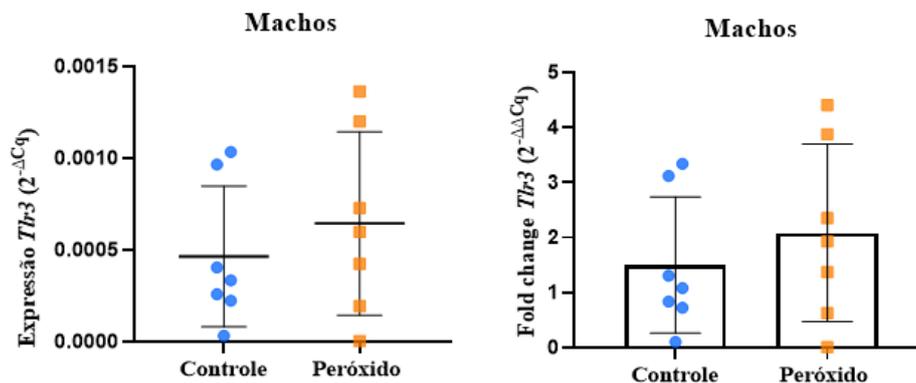
Gene <i>Tbk1</i>		Fêmeas					ANOVA [‡]	Teste de Levene
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior			
Controle NAC	6	,009086977	,0031647642	,005765760	,012408193	0,973	0,800	
Amônia	7	,008799809	,0027797012	,006229014	,011370604			
Amônia NAC	6	,008705027	,0028758420	,005687016	,011723038			

[‡]ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

5.1.2.3.5 *Tlr3*

Em ambos os sexos, não foram encontradas associações significantes entre o nível de expressão de *Tlr3* e os grupos experimentais ($p > 0,05$). Todavia, observa-se um aumento na expressão gênica dos animais do grupo peróxido. Os dados foram resumidos na figura 26 e tabela 16.

Figura 26 - Níveis de expressão do gene *Tlr3* em todos os grupos experimentais



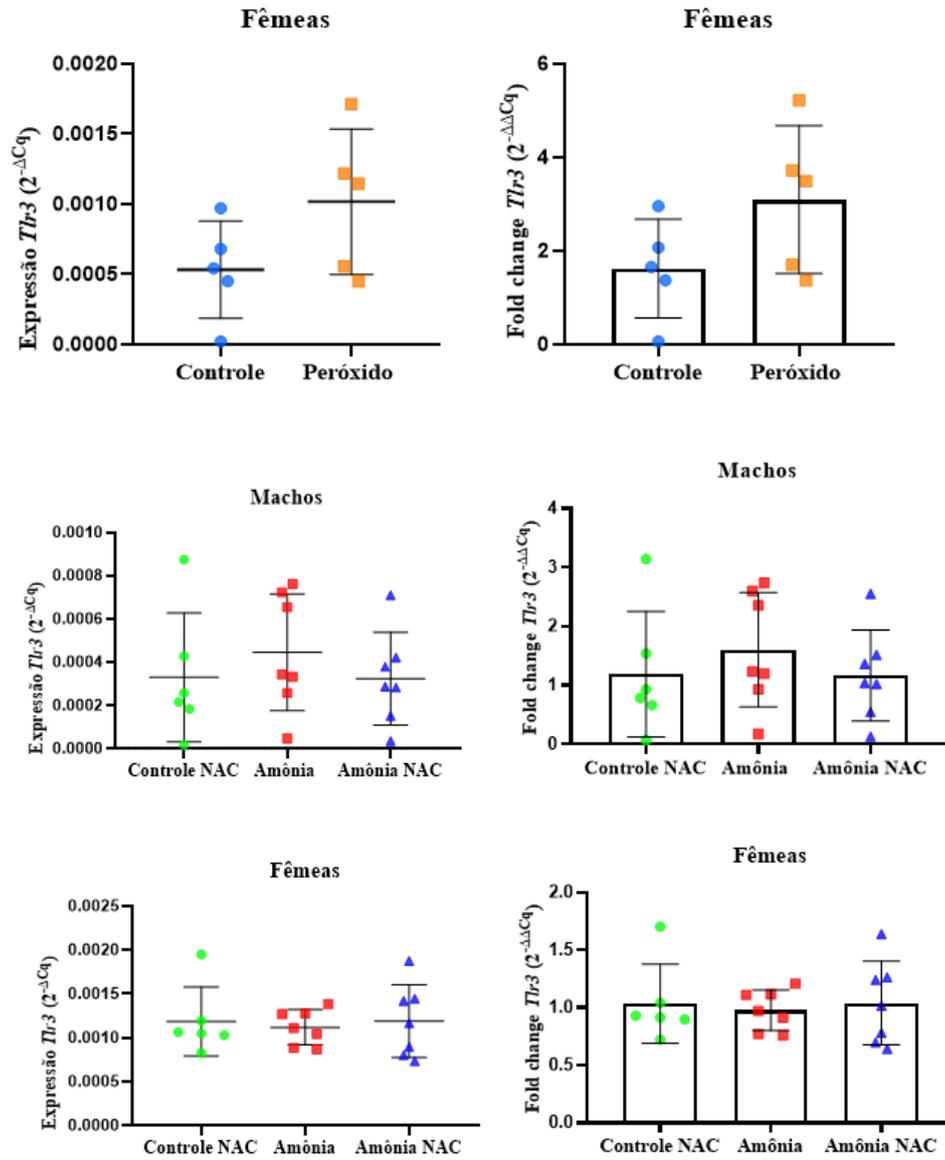


Tabela 16 - Descrição estatística para o gene *Thr3* em todos os grupos experimentais

Gene <i>Thr3</i>		Machos					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	T de Student [‡]
Controle	7	,000464322	,0003838245	,000109344	,000819301	0,528	0,464
Peróxido	7	,000644601	,0004998546	,000182312	,001106889		

[‡]Teste *t* de Student. Teste de Levene no Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo

para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

Gene <i>Tlr3</i>		Fêmeas					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	T de Student [‡]
Controle	5	,000533012	,0003475068	,000101525	,000964499	0,272	0,121
Peróxido	5	,001017225	,0005189205	,000372900	,001661550		

‡Teste t de Student. Teste de Levene e Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

Gene <i>Tlr3</i>		Machos					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA [‡]	Teste de Levene
Controle NAC	6	,000330411	,0002974039	,000018305	,000642518	0,630	0,596
Amônia	7	,000446236	,0002698570	,000196660	,000695812		
Amônia NAC	7	,000324468	,0002152388	,000125405	,000523531		

‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

Gene <i>Tlr3</i>		Fêmeas					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA [‡]	Teste de Levene
Controle NAC	6	,001184747	,0003928774	,000772447	,001597046	0,913	0,308
Amônia	7	,001118616	,0002008970	,000932817	,001304415		
Amônia NAC	7	,001191100	,0004149532	,000807332	,001574868		

‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

5.1.2.3.6 *Tlr4*

Para o gene *Tlr4*, observamos aumento da expressão gênica em animais C57BL/6 no grupo peróxido. Todavia nenhuma associação significativa foi encontrada entre os níveis de

expressão de *Tlr4* e os grupos experimentais de ambos os sexos ($p > 0,05$). No entanto, uma tendência de aumento semelhante de expressão gênica foi observada em animais do grupo peróxido. Os dados estão resumidos na figura 27 e tabela 17.

Figura 27 - Níveis de expressão do gene *Tlr4* em todos os grupos experimentais

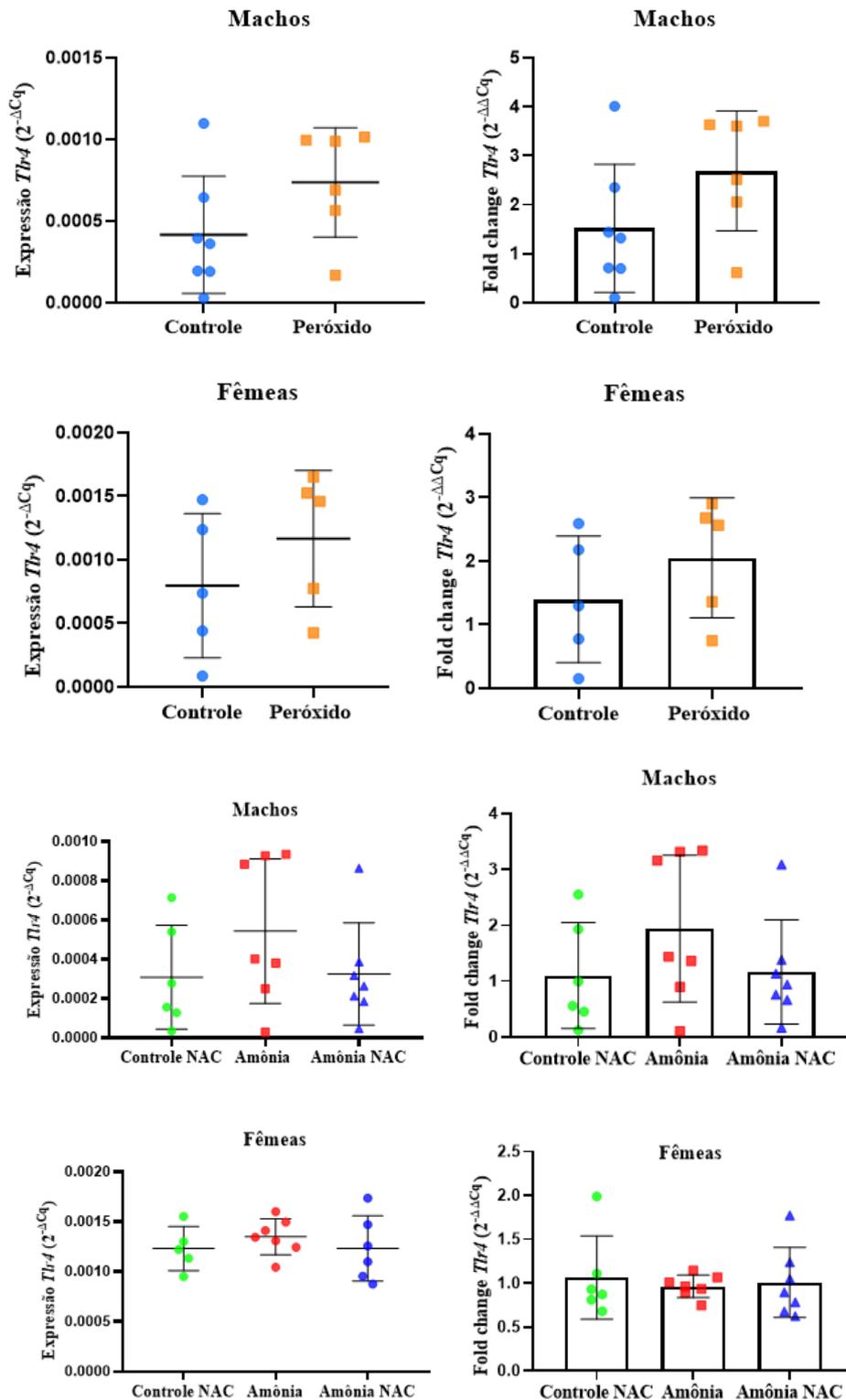


Tabela 17 - Descrição estatística para o gene *Tlr4* em todos os grupos experimentais

Gene <i>Tlr4</i>		Machos					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	T de Student [‡]
Controle	7	,000415677	,0003585449	,000084078	,000747275	0,983	0,126
Peróxido	6	,000736336	,0003354804	,000384271	,001088401		

‡Teste *t* de Student. Teste de Levene no Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

Gene <i>Tlr4</i>		Fêmeas					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	T de Student [‡]
Controle	5	,000795130	,0005673539	,000090667	,001499593	0,971	0,319
Peróxido	5	,001166457	,0005365762	,000500209	,001832704		

‡Teste *t* de Student. Teste de Levene no Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

Gene <i>Tlr4</i>		Machos					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA [‡]	Teste de Levene
Controle NAC	6	,000308507	,0002647146	,000030706	,000586308	0,308	0,202
Amônia	7	,000543998	,0003683238	,000203355	,000884641		
Amônia NAC	7	,000325593	,0002608292	,000084366	,000566819		

‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

Gene <i>Tlr4</i>		Fêmeas					
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA [‡]	Teste de Levene

Controle NAC	5	,001231739	,0002215435	,000956657	,001506822	0,273	0,628
Amônia	7	,001349428	,0001797919	,001183149	,001515708		
Amônia NAC	6	,001231945	,0003264823	,000889322	,001574567		

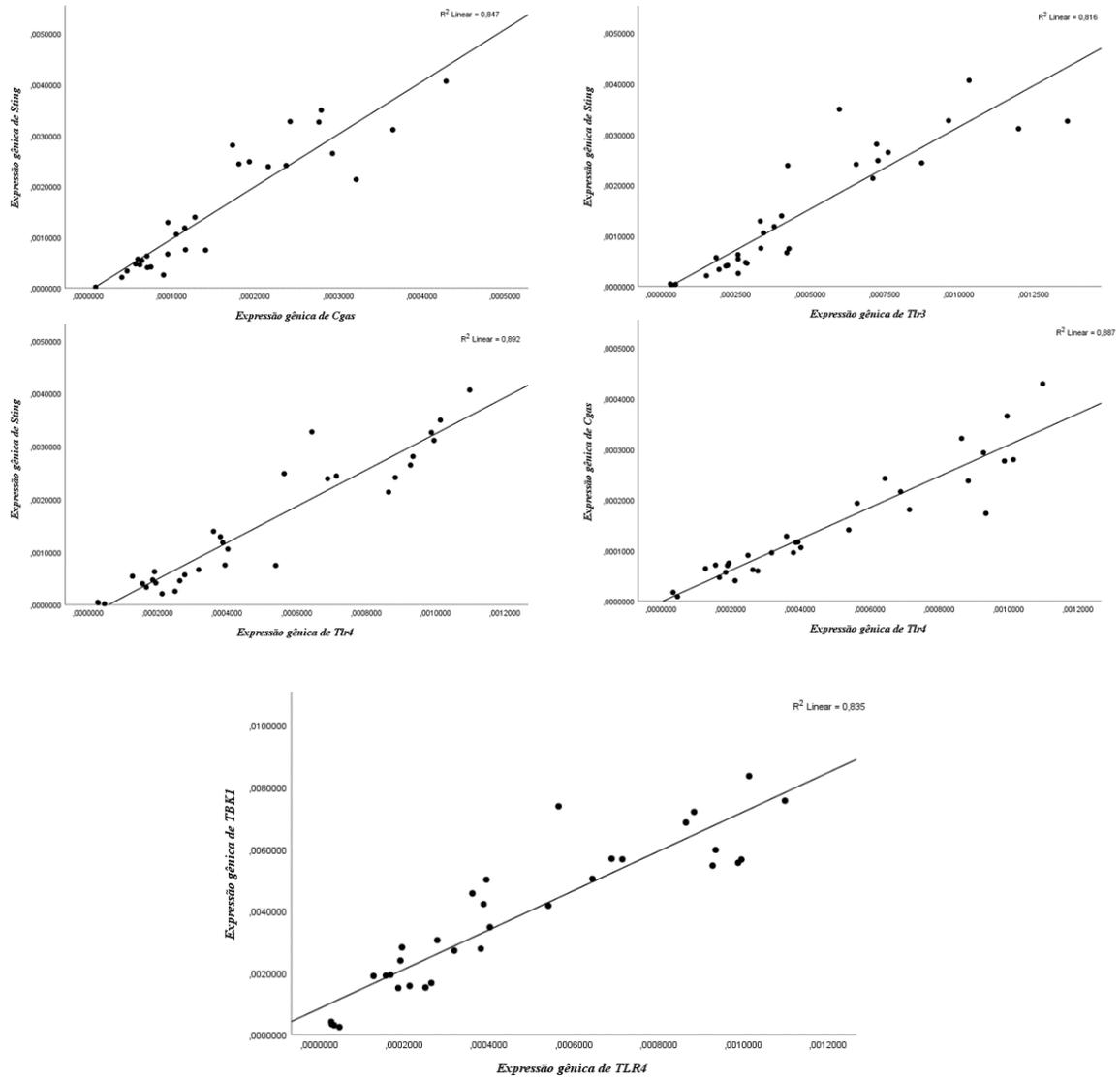
‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

5.1.2.4 Análise de correlação entre os níveis de expressão gênica

O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi realizado para se analisar a intensidade da associação linear existente entre os genes e o r^2 (r square) foi realizado para analisar a influência de um gene sobre outro.

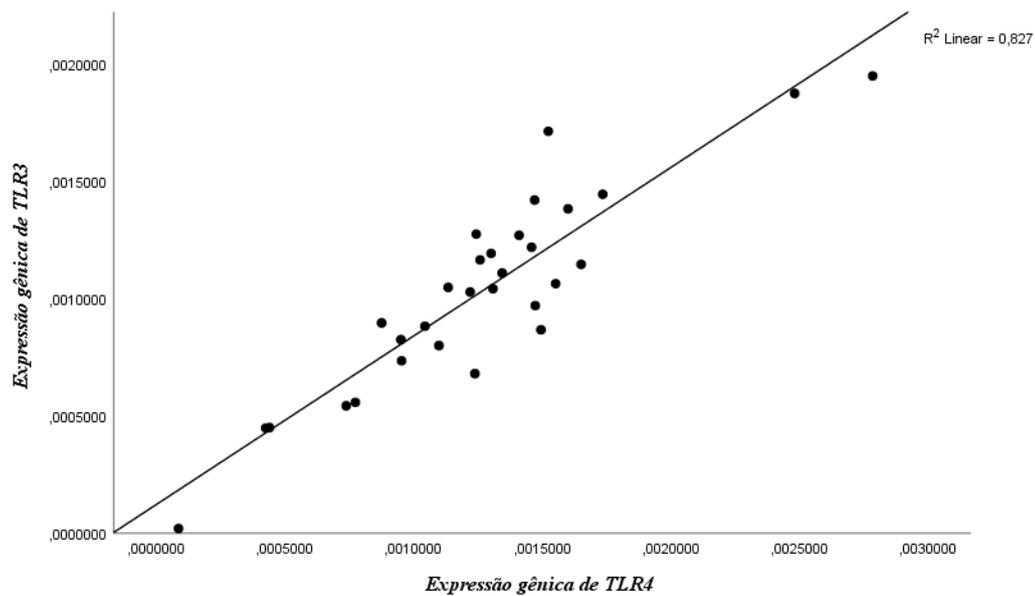
Para os camundongos machos, observou-se uma correlação muito forte entre os genes *Sting* e *Cgas* ($r = 0,920$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 84,7% ($r^2 = 0,847$) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro; *Sting* e *Tlr3* ($r = 0,904$; $p = 0,000$), apresentando uma influência de 81,6% ($r^2 = 0,816$) nos seus níveis de expressão gênica; *Sting* e *Tlr4* ($r = 0,944$; $p = 0,000$) que apresentaram uma influência de 89,2% ($r^2 = 0,892$) nos seus níveis de expressão; *Cgas* e *Tlr4* ($r = 0,942$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 88,7% ($r^2 = 0,887$) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro; e entre os genes *Tbk1* e *Tlr4* ($r = 0,914$; $p = 0,000$) que apresentaram uma influência de 83,5% ($r^2 = 0,835$) na variação dos seus níveis de expressão nos camundongos C57BL/6 machos. Os gráficos das correlações muito fortes entre os genes nos camundongos C57BL/6 machos podem ser visualizado na figura abaixo (Figura 28).

Figura 28 – Análise de correlações classificadas em muito forte entre os genes nos camundongos machos



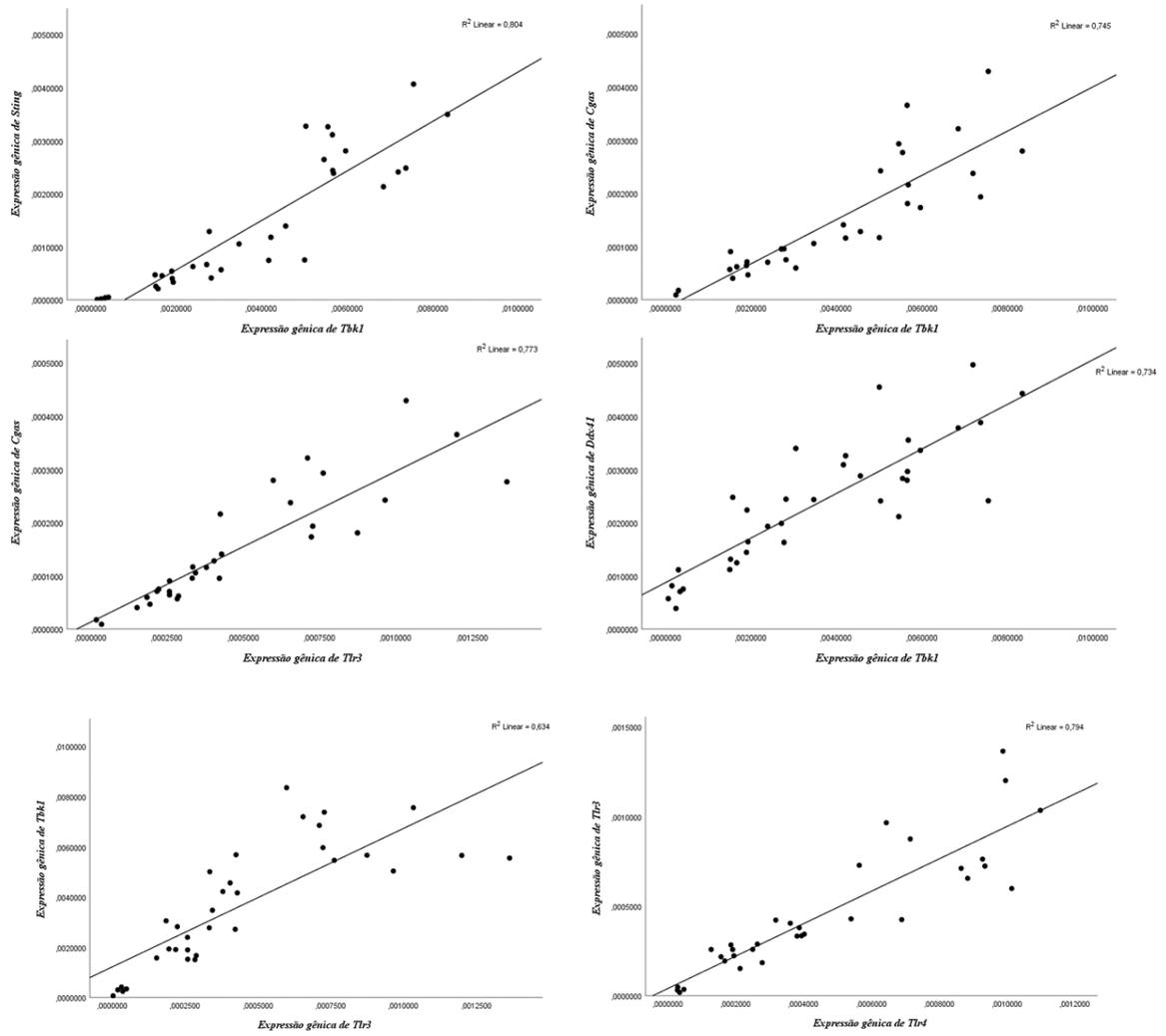
Para os camundongos fêmeas, observou-se uma correlação muito forte entre os genes *Tlr3* e *Tlr4* ($r = 0,909$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 82,7% ($r^2 = 0,827$) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro (Figura 29).

Figura 29 - Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *Tlr3* e *Tlr4* em camundongos C57BL/6 fêmeas



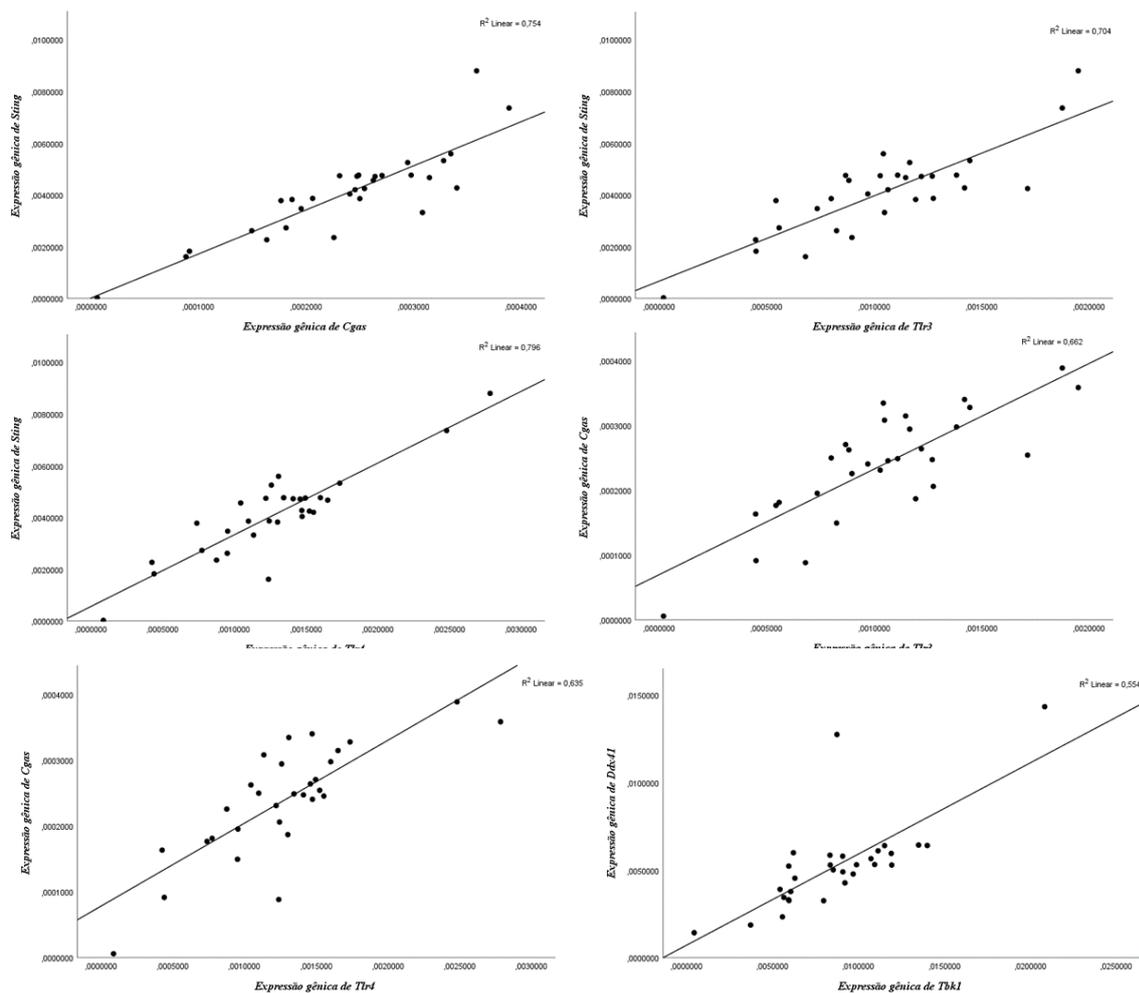
Identificamos uma correlação forte entre os genes *Sting* e *Tbk1* ($r = 0,897$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 80,4% ($r^2 = 0,804$); *Cgas* e *Tbk1* ($r = 0,863$; $p = 0,000$), apresentando uma influência de 74,5% ($r^2 = 0,745$) nos seus níveis de expressão gênica; *Cgas* e *Tlr3* ($r = 0,879$; $p = 0,000$) com uma influência de 77,3% ($r^2 = 0,773$) nos níveis de expressão; *Ddx41* e *Tbk1* ($r = 0,857$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 73,4% ($r^2 = 0,734$) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro; *Tbk1* e *Tlr3* ($r = 0,797$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 63,4% ($r^2 = 0,634$) na variação dos níveis de expressão; e entre os genes *Tlr3* e *Tlr4* ($r = 0,891$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 79,4% ($r^2 = 0,794$) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro nos animais camundongos C57BL/6 machos. Os gráficos podem ser observados na figura 30.

Figura 30 - Análise de correlações classificadas em forte entre os genes nos camundongos machos



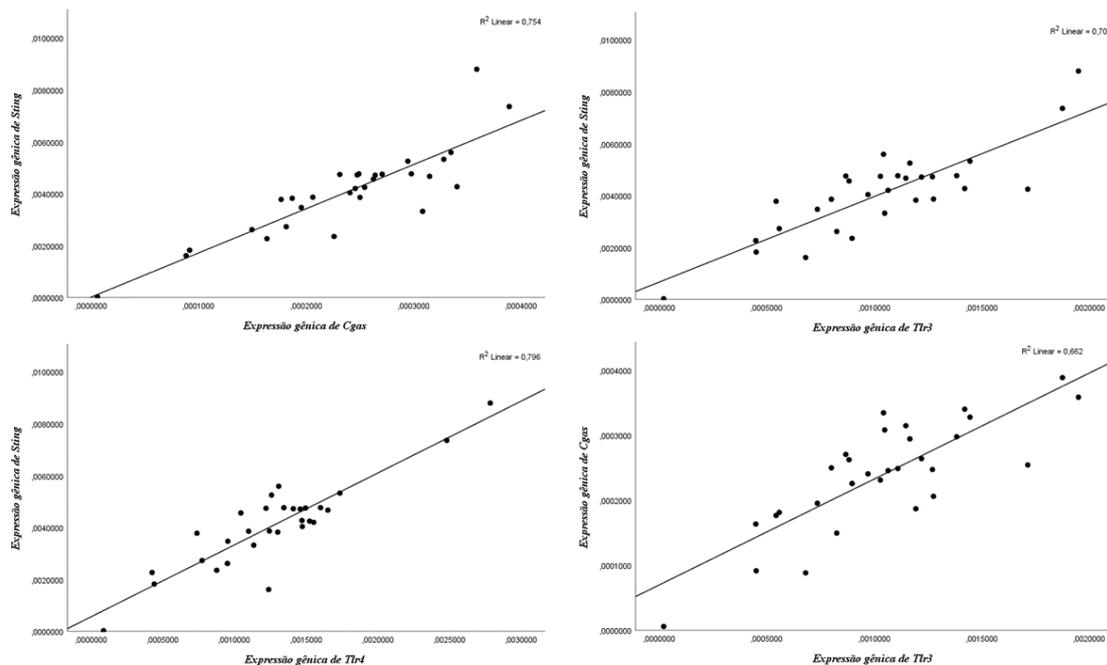
Nos camundongos C57BL/6 fêmeas, observamos uma correlação forte entre os genes *Sting* e *Cgas* ($r = 0,868$; $p = 0,000$), com uma influência de 75,4% ($r^2 = 0,754$) nos níveis de expressão de um gene sobre o outro; *Sting* e *Tlr3* ($r = 0,839$; $p = 0,000$), apresentando uma influência de 70,4% ($r^2 = 0,704$) nos seus níveis de expressão gênica; *Sting* e *Tlr4* ($r = 0,892$; $p = 0,000$) influenciando 79,6% ($r^2 = 0,796$) nos níveis de expressão de um gene sobre o outro; *Cgas* e *Tlr3* ($r = 0,814$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 66,2% ($r^2 = 0,662$) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro e entre os genes; *Cgas* e *Tlr4* ($r = 0,797$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 63,5% ($r^2 = 0,635$) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro; e entre os genes *Ddx41* e *Tbk1* ($r = 0,744$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 55,4% ($r^2 = 0,554$). Os gráficos das correlações fortes entre os genes nos camundongos C57BL/6 fêmeas podem ser visualizado na figura abaixo (Figura 31).

Figura 31 - Análise de correlações classificadas em forte entre os genes nos camundongos fêmeas



Com relação às correlações moderadas, os camundongos C57BL/6 machos apresentaram correlação moderada entre os genes *Sting* e *Ddx41* ($r = 0,573$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 32,8% ($r^2 = 0,328$) na interação dos genes; *Cgas* e *Ddx41* ($r = 0,501$; $p = 0,004$), demonstrando uma influência de 25,1% ($r^2 = 0,251$) nos níveis de expressão gênica entre os genes; e entre *Ddx41* e os receptores do tipo Toll: *Tlr3* ($r = 0,503$; $p = 0,002$), demonstrando uma influência de 25,3% ($r^2 = 0,253$) e *Tlr4* ($r = 0,650$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 44,2% ($r^2 = 0,442$) nos níveis de expressão de um gene sobre o outro. Os gráficos das correlações moderadas entre os genes nos camundongos C57BL/6 machos podem ser visualizado na figura abaixo (Figura 32).

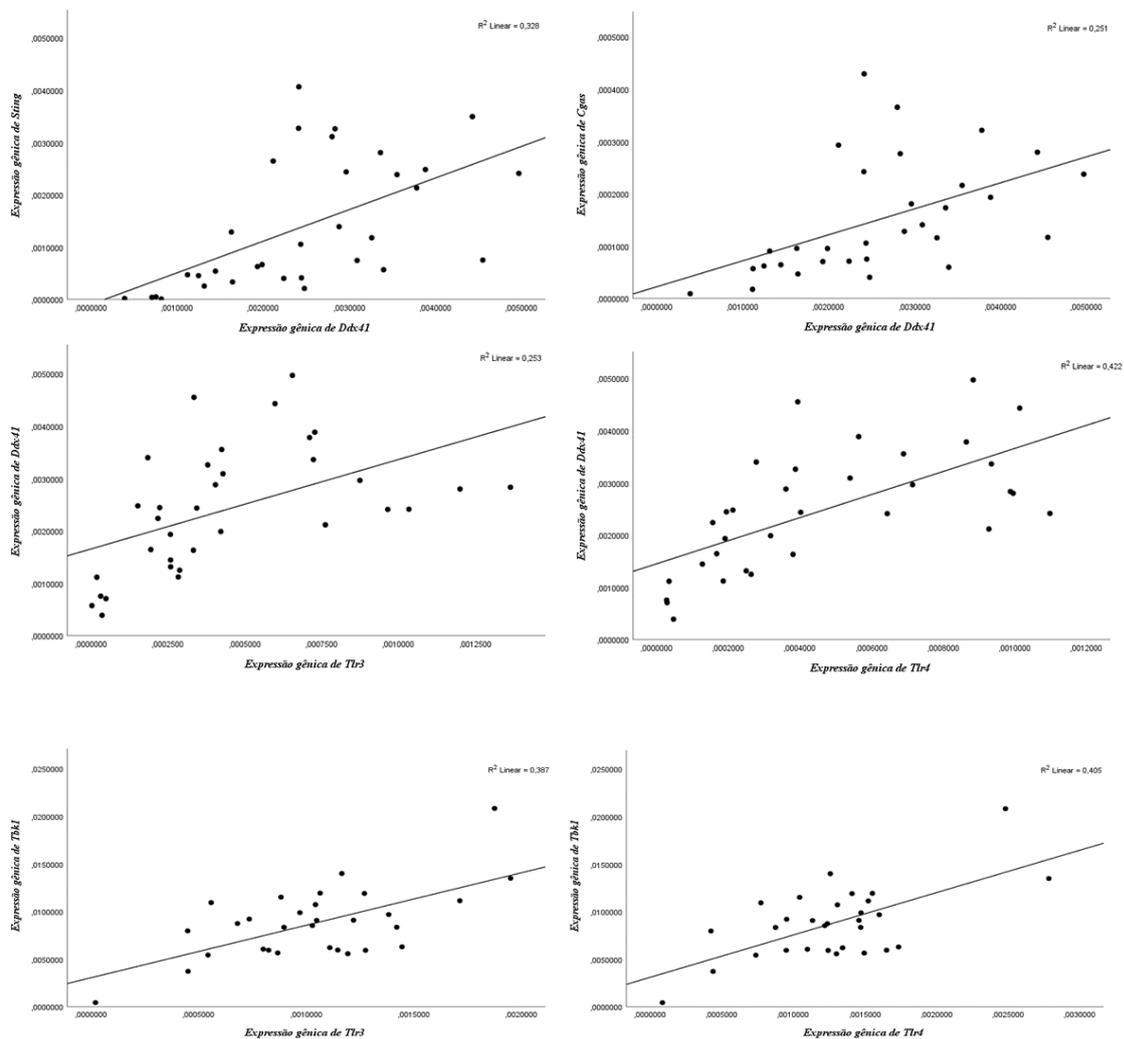
Figura 32 - Análise de correlações classificadas em moderada entre os genes nos camundongos machos



Para os camundongos C57BL/6 fêmeas foram observadas correlações moderadas entre os genes *Sting* e *Tbk1* ($r = 0,650$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 42,3% ($r^2 = 0,423$) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro; *Cgas* e *Tbk1* ($r = 0,624$; $p = 0,000$), apresentando uma influência de 39,0% ($r^2 = 0,390$) nos níveis de expressão gênica; *Ddx41* e *Tlr3* ($r = 0,423$; $p = 0,020$) que apresentaram uma influência de 17,9% ($r^2 = 0,179$); *Ddx41* e *Tlr4* ($r = 0,510$; $p = 0,004$), demonstrando uma influência de 26,1% ($r^2 = 0,261$) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro; *Tbk1* e *Tlr3* ($r = 0,622$; $p = 0,000$),

demonstrando uma influência de 38,7% ($r^2 = 0,387$) nos níveis de expressão gênica de um gene sobre o outro; e entre os genes *Tbk1* e *Tlr4* ($r = 0,636$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 40,5% ($r^2 = 0,405$) entre a expressão gênica dos genes. Os gráficos das correlações moderadas entre os genes nos camundongos C57BL/6 fêmeas podem ser visualizado na figura abaixo (Figura 33).

Figura 33 - Análise de correlações classificadas em moderada entre os genes nos camundongos fêmeas



O resumo das análises pode ser observado nas tabelas e nas figuras abaixo.

Tabela 18 – Descrição estatística para as correlações entre os genes nos camundongos C57BL/6 machos

Machos		<i>Sting</i>	<i>Cgas</i>	<i>Ddx41</i>	<i>Tbk1</i>	<i>Tlr3</i>	<i>Tlr4</i>
<i>Sting</i>	Correlação de Pearson	1	,920	,573	,897	,904	,944
	Sig.		,000	,000	,000	,000	,000
	N	33	30	33	33	32	32
<i>Cgas</i>	Correlação de Pearson	,920	1	,501	,863	,879	,942
	Sig.	,000		,004	,000	,000	,000
	N	30	31	31	31	31	31
<i>Ddx41</i>	Correlação de Pearson	,573	,501	1	,857	,503	,650
	Sig.	,000	,004		,000	,002	,000
	N	33	31	35	35	34	33
<i>Tbk1</i>	Correlação de Pearson	,897	,863	,857	1	,797	,914
	Sig.	,000	,000	,000		,000	,000
	N	33	31	35	35	34	33
<i>Tlr3</i>	Correlação de Pearson	,904	,879	,503	,797	1	,891
	Sig.	,000	,000	,002	,000		,000
	N	32	31	34	34	34	33
<i>Tlr4</i>	Correlação de Pearson	,944	,942	,650	,914	,891	1
	Sig.	,000	,000	,000	,000	,000	
	N	32	31	33	33	33	33

Figura 34 – Matriz de correlação de Pearson entre os genes nos camundongos C57BL/6 machos

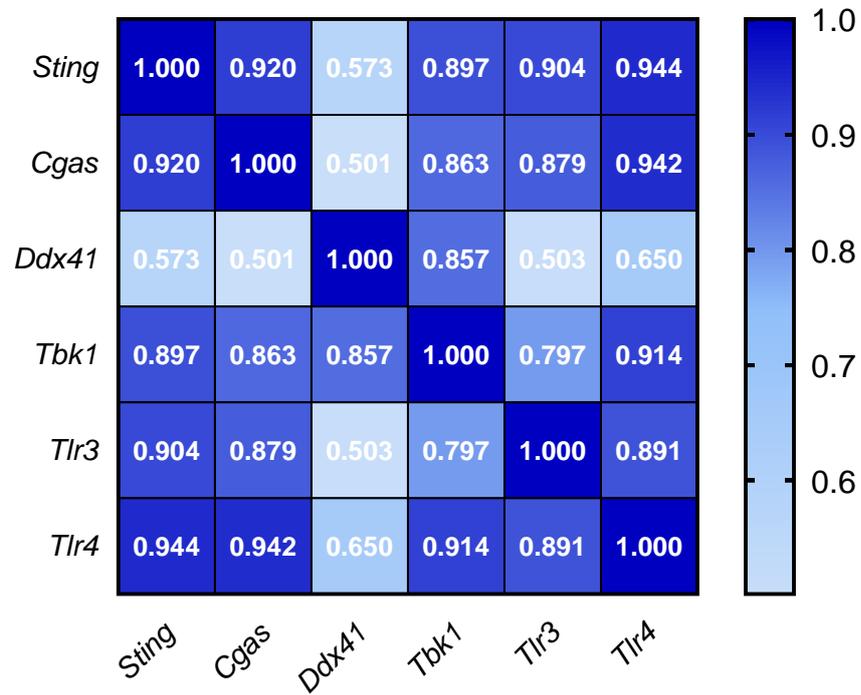
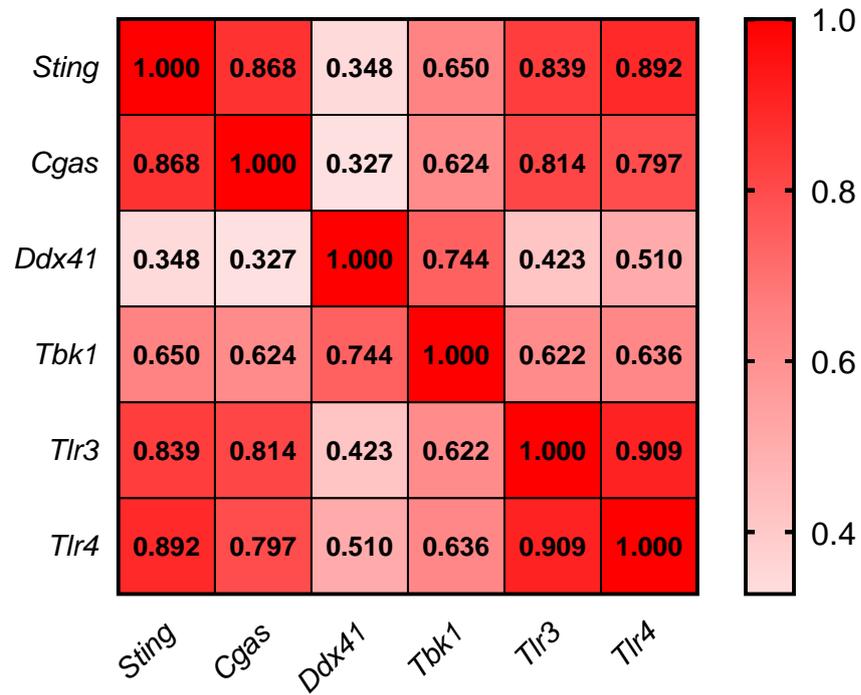


Tabela 19 – Descrição estatística para as correlações entre os genes nos camundongos C57BL/6 fêmeas

Fêmeas		<i>Sting</i>	<i>Cgas</i>	<i>Ddx41</i>	<i>Tbk1</i>	<i>Tlr3</i>	<i>Tlr4</i>
<i>Sting</i>	Correlação de Pearson	1	,868	,348	,650	,839	,892
	Sig.		,000	,059	,000	,000	,000
	N	30	30	30	30	30	30
<i>Cgas</i>	Correlação de Pearson	,868	1	,327	,624	,814	,797
	Sig.	,000		,077	,000	,000	,000
	N	30	30	30	30	30	30
<i>Ddx41</i>	Correlação de Pearson	,348	,327	1	,744	,423	,510
	Sig.	,059	,077		,000	,020	,004
	N	30	30	30	30	30	30
<i>Tbk1</i>	Correlação de Pearson	,650	,624	,744	1	,622	,636
	Sig.	,000	,000	,000		,000	,000
	N	30	30	30	30	30	30
<i>Tlr3</i>	Correlação de Pearson	,839	,814	,423	,622	1	,909
	Sig.	,000	,000	,020	,000		,000
	N	30	30	30	30	30	30
<i>Tlr4</i>	Correlação de Pearson	,892	,797	,510	,636	,909	1
	Sig.	,000	,000	,004	,000	,000	
	N	30	30	30	30	30	30

Figura 35 – Matriz de correlação de Pearson entre os genes nos camundongos C57BL/6 fêmeas



5.2 Pacientes com SMD

5.2.1 Caracterização dos pacientes

Nesse estudo, o número amostral foi de 73 pacientes com SMD. Dos 73 pacientes incluídos neste estudo, 33 indivíduos (45,2%) eram do sexo feminino e 40 indivíduos (54,8%) do sexo masculino. Com relação à idade dos pacientes, a média foi de 66,6 anos e a mediana 69 anos (mínimo de 19 anos e máximo de 91 anos).

A citogenética por banda G foi realizada para todos os indivíduos do estudo, entretanto só obtivemos dados de 71 pacientes. Destes, 18 apresentavam ausência de metáfase (25,4%) e 53 (74,6%) apresentaram metáfases para análise. Dentre os 53 que apresentaram metáfases, 29 deles apresentavam cariótipo normal (54,7%) e 24 apresentavam cariótipo alterado (45,3%) (Tabela 20).

Tabela 20 - Descrição clínica dos pacientes com Neoplasia Mielodisplásica incluídos no estudo

Paciente	Sexo	Idade	Cariótipo	OMS	IPSS-R
1	F	28	46,XX[20]	SMD-SA	Baixo risco
2	F	78	46,XX,del(5)(q12q33)[18]/46,XX[2]	SMD-DM	Risco muito baixo
3	F	45	46,XX[7]	SMD-DM	Risco muito baixo
4	F	77	46,XX[20]	SMD-DM	Baixo risco
5	M	85	46,XY[15]	SMD-SA	Baixo risco
6	M	89	46,XY,t(5;19)(q13.2;q13.4)[3]/46,XY,t(5;9)(q13.2;q13.4), t(8;21)(q21.3;q22.12)[3]/46,Y,del(X)(q21),t(5;19)(q13.2;q13.4), t(8;21)(q21.3;q22.12)[5]/46,XY[9]	SMD-EB2	Risco muito alto
7	M	31	46,XY[24]	SMD-DM	Baixo risco
8	M	73	80~90<3n>XXYY,...[3]/46,XY,del(5)(q32),del(11)(q32),del(17)(p11.2)[7]/ 46,XX[11]	SMD-EB1	Alto risco
9	M	55	46,XY[15]	SMD-DM	Risco muito baixo
10	M	52	46,XY[20]	SMD-DM	Baixo risco
11	M	74	46,XY,del(11)(q23)[7]/46,XY[13]	SMD-DU	Risco muito baixo
12	M	56	46,XY,del(5)(q32)[3]/46,XY,del(5)(q32),del(7)(q36)[3]/ 46,XY,-5,+mar[9]/46,XY[7]	SMD-EB1	Risco muito alto

13	F	71	Ausência de metáfases	-	-
14	F	65	46,XX[20]	SMD-DM	Risco intermediário
15	M	66	46,XY[17]	-	Baixo risco
16	M	91	46,X-Y[4]/46,XY[16]	SMD-SA	Risco muito baixo
17	M	62	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2]	SMD-EB2	Alto risco
18	M	85	46,XY[20]	SMD-EB1	Risco intermediário
19	F	65	46,XY[9]	-	Baixo risco
20	F	84	46,XX,del(20)(q13.1)[7]/46,XX[16]	SMD-DU	Baixo risco
21	F	72	46,XX[6]	SMD-DU	Risco muito baixo
22	F	51	46,XX[11]	SMD-SA	Baixo risco
23	F	77	Ausência de metáfases	SMD-EB1	-
24	M	79	Ausência de metáfases	SMD-EB2	-
25	M	62	47,XY,+15[10]/46,XY[10]	SMD-SA	Risco intermediário
26	M	19	46,XY[22]	SMD-DU	Baixo risco
27	M	84	46,XY[20]	SMD-EB1	Alto risco
28	M	82	46,XY,del(5)(?q22q33)[3]/45,XY,del(5)(?q22q33),-18[3]/46,XY[14]	SMD-SA	Baixo risco
29	M	85	47,XY,+8[12]/46,XY[8]	SMD-EB1	Risco intermediário
30	M	79	46,XY,del(5)(q34),del(11)(q23)[7]/46,XY[5]	SMD-DM	Risco intermediário
31	M	76	Ausência de metáfases	SMD-DM	-
32	M	84	Ausência de metáfases	SMD-EB1	-
33	M	74	46,XY[3]	SMD-DM	Risco muito

						baixo
34	M	82	Ausência de metáfases	SMD-DM	-	
35	M	75	92,XXYY[4]/46,XY[8]	SMD-EB1		Alto risco
36	M	62	Ausência de metáfases	SMD-DM	-	
37	M	40	-	-	-	
38	M	77	46,XY,add(13)(p11)[12]/46,XY,del(7)(q32),add(13)(p11)[4]/ 48,XY,add(13)(p11),+22,+mar[9]/48,XY,del(7)(q32),add(13)(p11),+22,+mar[3]/ 46,XY[2]	SMD-DM		Risco muito alto
39	M	49	47,XY,+mar[6]/48,XY,+8,del(16)(?q22),+mar[4]/ 47~50,XY,del(4)(?q35),+8,+10,+11,del(16)(?q22),+21,+mar[8]	SMD-DM		Risco muito alto
40	M	69	49,XY,+13,+14,+mar[9]/46,XY[14]	-	-	
41	M	87	46,XY[6]	SMD-DU		Baixo risco
42	M	59	Ausência de metáfases	SMD-DM	-	
43	M	64	37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/46,XY,del(5)(q15q33)[5]/46,XY[6]	SMD-EB2		Risco muito alto
44	F	47		SMD-DU		Baixo risco
45	F	73	Ausência de metáfases	-	-	
46	F	59	Ausência de metáfases	SMD-DM	-	
47	F	66	46,XX[10]	SMD-SA		Risco intermediário
48	F	41	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(?q25)[7]/46,XX[4]	SMD-DM		Baixo risco
49	F	57	46,XX[8]	SMD-DM		Baixo risco
50	F	57	46,XX[21]	-	-	
51	F	65	46,XX[15]	-		Risco intermediário

52	F	72	-	SMD-EB2	-
53	F	65	Ausência de metáfases	SMD-DM	-
54	F	45	Ausência de metáfases	-	-
55	F	75	Ausência de metáfases	-	-
56	F	57	46,XX del(11)(q23)[11]/46,XX	-	Risco muito baixo
57	F	77	46,XX,del(7)(q32)[2]/46,XX[26]	SMD-DU	Alto risco
58	F	87	Ausência de metáfases	SMD-SA	-
59	F	87	Ausência de metáfases	SMD-SA	-
60	F	73	47,XX,+mar[4]/46,XX[14]	-	Risco intermediário
61	F	60	46,XX[10]	SMD-DM	Risco muito baixo
62	F	44	46,XX[20]	SMD-EB2	Alto risco
63	F	82	46,XX[5]	SMD-SA	Baixo risco
64	F	76	46,XX[15]	SMD-SA	Baixo risco
65	M	69	46,XY[10]	-	Risco muito baixo
66	M	58	46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12]	SMD-SA	Baixo risco
67	M	55	45,X,-Y[15]/45,X,-Y,del(5)(q32)[3]/46,XY[2]	SMD-EB2	Risco intermediário
68	F	40	Ausência de metáfases	SMD-DM	-
69	M	79	46,XY[7]	SMD-DM	Baixo risco
70	M	68	46,XY,add(12)(q24.33)[2]/46,XY,del(17)(q23)[3]/46,XY[10]	SMD-DM	Risco intermediário
71	M	74	46,XY[6]	SMD-SA	Baixo risco

72	M	73	Ausência de metáfases	SMD-EB2	-
73	M	66	Ausência de metáfases	SMD-EB1	-

5.2.2 Análise da Expressão do mRNA por RT-qPCR

A seguir serão apresentadas as associações entre os níveis de expressão gênica dos genes *DDX41* e *TMEM173* e as variáveis: contagem de blastos categorizada pelo IPSS-R e classificação nos subtipos da OMS 2022.

5.2.2.1 Cariótipo por banda-G

Observamos maior expressão gênica de *STING* em pacientes que apresentavam cariótipo alterado ($p=0,002$) do que em pacientes com cariótipo normal (Figura 36). *DDX41* não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) (Tabela 21).

Figura 36 - Níveis de expressão de *DDX41* e *STING* em pacientes com SMD de acordo com o resultado do exame de cariótipo

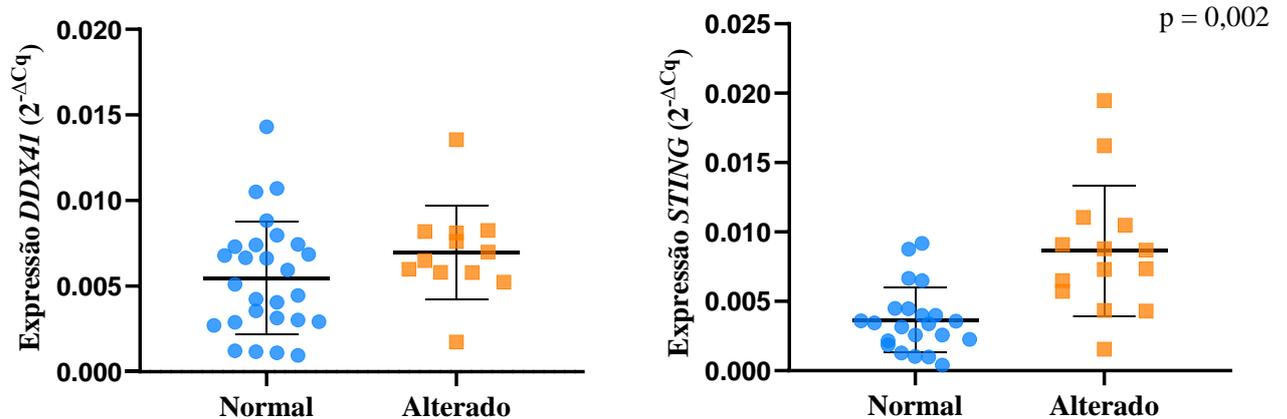


Tabela 21 - Níveis de expressão de *DDX41* e *STING* em pacientes com SMD de acordo com o resultado do exame citogenético

Gene <i>DDX41</i>							
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	T de Student [#]
Controle	27	,005479763	,0032983271	,004174988	,006784538	0,192	0,117
Peróxido	12	,006981642	,0027383925	,005241750	,008721533		

‡Teste *t* de Student. Teste de Leve ne Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

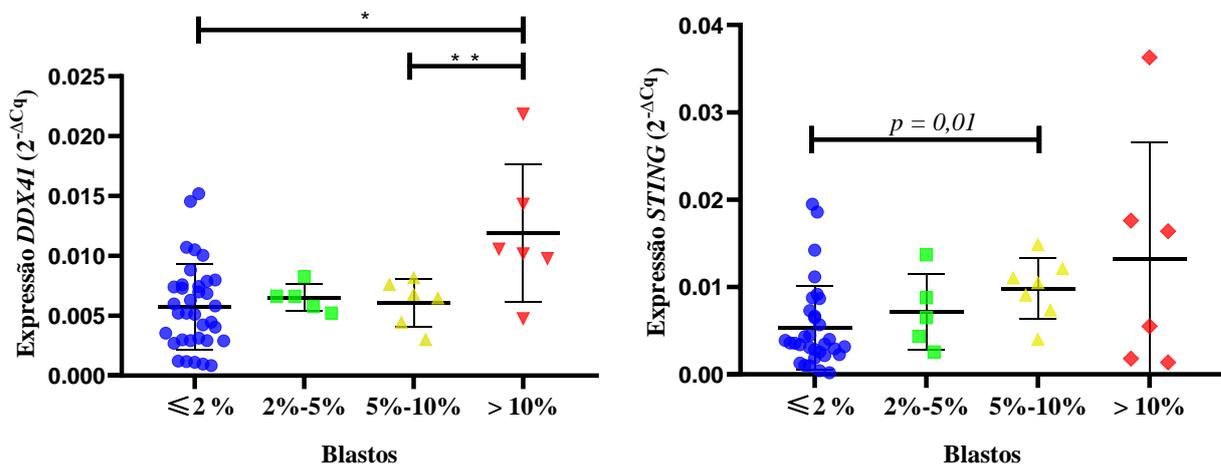
Gene <i>STING</i>							
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	T de Student [‡]
Controle	22	,003651291	,0023445769	,002611764	,004690818	0,048	0,002
Peróxido	14	,008630164	,0047087158	,005911433	,011348896		

‡Teste *t* de Student. Teste de Leve ne Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de animais.

5.2.2.2 Porcentagem de blastos na medula óssea

Em relação aos achados medulares, quando avaliado a porcentagem de blastos na medula óssea categorizado segundo IPSS-R, os pacientes com valores $>10\%$ de blastos na medula óssea apresentaram maior nível de expressão de *DDX41* do que pacientes com valores de blastos entre $5\%-10\%$ e pacientes com valores de blastos $\leq 2\%$ ($p=0,037$ e $p=0,002$, respectivamente) (Figura 37). Para o gene *STING*, quando analisada a variável porcentagem de blastos categorizado pelo IPSS-R, pacientes com valores entre $5\%-10\%$ de blastos apresentaram maiores valores de expressão de *STING* do que pacientes com $\leq 2\%$ de blastos ($p=0,016$) (Figura 37) (Tabela 22).

Figura 37 - Níveis de expressão de *DDX41* e *STING* em pacientes com SMD de acordo com a



porcentagem de blastos segundo IPSS-R

Tabela 22 – Descrição estatística de *DDX41* e *STING* em pacientes com SMD frente a variável percentual de blastos de acordo com IPSS-R

Gene <i>DDX41</i>								
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA [‡]	Teste de Levene	Tukey
≤ 2%	35	,005776160	,0035829936	,004545359	,007006961	0,004	0,060	0,002
> 2 % 5	5	,006514980	,0011381185	,005101819	,007928141			-
> 5% 10%	6	,006089450	,0019757242	,004016055	,008162845			0,037
> 10%	6	,011908917	,0057473714	,005877420	,017940413			0,002/0,037

[‡]ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$.

Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

Gene <i>STING</i>								
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA [‡]	Teste de Levene	Games-Howell
≤ 2%	35	,005776160	,0035829936	,004545359	,007006961	0,002	0,000	0,016
> 2 % 5	5	,006514980	,0011381185	,005101819	,007928141			-
> 5% 10%	7	,006089450	,0019757242	,004016055	,008162845			0,016
> 10%	6	,011908917	,0057473714	,005877420	,017940413			-

[‡]ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$.

Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

5.2.2.3 Classificação OMS 2016

Em relação à classificação dos pacientes de acordo com os subtipos estabelecidos pela OMS (Swerdlow *et al.*, 2016), verificamos maior expressão dos genes *DDX41* e *STING* em subtipos mais agressivos da doença. Constatamos que pacientes classificados como SMD-EB2 (SMD com excesso de blasto II a presentaram maior expressão do gene *DDX41* em relação aos pacientes diagnosticados como SMD-DM (SMD com displasia Multilinhagem) ($p=0,004$) (Figura 38). Além disso, verificamos também uma maior expressão de *STING* nos pacientes

classificados com SMD-EB1 (SMD com excesso de blasto I) frente aos pacientes classificados com SMD SA (SMD com Sideroblastos em anel) ($p=0,013$) (Figura 38) (Tabela 23).

Figura 38 - Níveis de expressão de *DDX41* e *STING* em pacientes com SMD de acordo com a classificação da OMS 2016

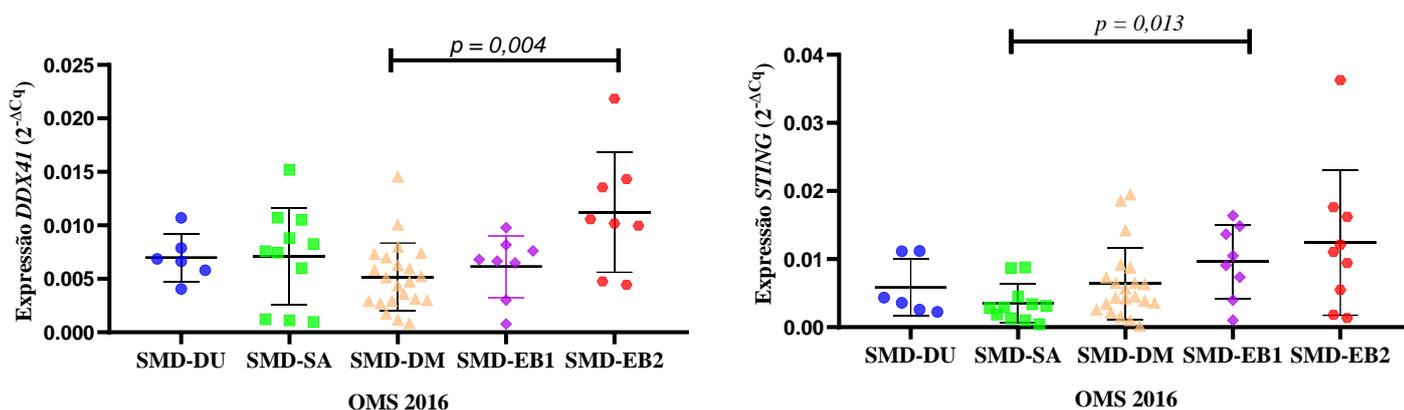


Tabela 23 – Descrição estatística de *DDX41* e *STING* em pacientes com SMD frente a classificação da OMS 2016

Gene <i>DDX41</i>								
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA [†]	Teste de Levene	Tukey
SMD-DU	6	,008208871	,0038227017	,004673462	,011744281	0,009	0,216	-
SMD-SA	11	,007072909	,0045199474	,004036367	,010109451			-
SMD-DM	22	,005173705	,0031619742	,003771764	,006575645			0,004
SMD-EB1	8	,006933014	,0020697617	,005018804	,008847225			-
SMD-EB2	8	,011205463	,0055927120	,006529838	,015881087			0,004

[†]ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

Gene <i>DDX41</i>								
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	ANOVA [‡]	Teste de Levene	Games-Howell
SMD-DU	6	,005852783	,0041821390	,001463898	,010241669	0,002	0,000	-
SMD-SA	9	,002372889	,0013124230	,001364071	,003381707			0,013
SMD-DM	18	,004532939	,0025635249	,003258128	,005807750			-
SMD-EB1	8	,009884556	,0050849354	,005975928	,013793183			0,013
SMD-EB2	9	,012405263	,0113687641	,002900738	,021909787			-

[‡]ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

5.2.3 Análise de correlação entre os níveis de expressão gênica

Utilizamos o coeficiente de correlação de Pearson (r) para analisar a intensidade da associação linear existente entre os genes e o r^2 (r square) foi utilizado para analisar a influência de um gene sobre outro.

Na nossa coorte de SMD, identificamos uma correlação fraca entre os genes *STING* e *DDX41* ($r = 0,374$; $p = 0,002$), demonstrando uma influência de 14,0% ($r^2 = 0,140$) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro. Os dados podem ser visualizados na figura 39 e tabela 24 abaixo.

Figura 39 - Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *TMEM173* e *DDX41* nos pacientes com SMD

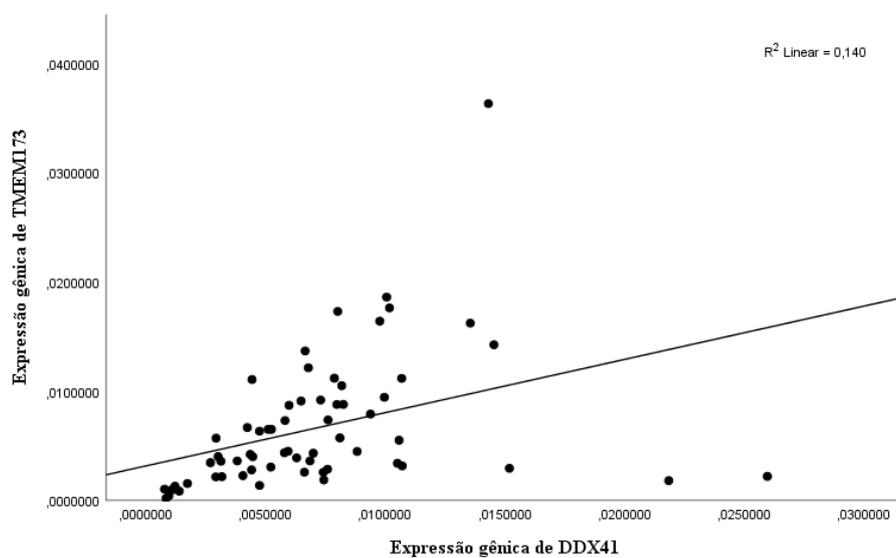


Tabela 24 – Descrição estatística para a correlação entre os genes *DDX41* e *STING* nos pacientes com SMD

		<i>STING</i>	<i>DDX41</i>
<i>STING</i>	Correlação de Pearson	1	,374
	Sig.		,002
	N	66	64
<i>DDX41</i>	Correlação de Pearson	,374	1
	Sig.	,002	
	N	64	73

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados os níveis de expressão gênica de *Cgas*, *Ddx41*, *Sting*, *Tbk1*, *Tlr3* e *Tlr4* em camundongos submetidos ao processo conhecido como “banho de lua”. Além disso, as expressões gênicas de *DDX41* e *STING* também foram quantificadas em pacientes com neoplasia mielodisplásica e associadas a resultado citogenético, porcentagem de blastos na medula dos pacientes e ao subtipo da doença.

6.1 Animais C57BL/6

Os métodos de pesquisa avançaram muito nos últimos anos e as análises realizadas *in vitro* e *in silico* trouxeram benefícios e respostas para diversos questionamentos. Entretanto, esse tipo de análise ainda carece de uma similaridade maior com as respostas que de fato acontecem nos seres humanos e o uso de animais na pesquisa translacional ainda é bastante comum (De Jong & Maina, 2010; Denayer *et al.*, 2014). Um desafio ao utilizar modelos animais na pesquisa científica é a possibilidade de os modelos distorcerem as direções da investigação, omitir aspectos essenciais da doença humana, omitir contextos importantes e/ou alterar os objetivos da investigação. Uma forma de diminuir esses desafios é empregar uma gama mais ampla de modelos, incorporar condições ambientais mais realistas e alinhar melhor os estudos entre animais e pacientes (Bolker, 2017). No presente estudo, buscamos reproduzir o banho de lua em camundongos C57BL/6 do modo em que ele é utilizado normalmente nos seres humanos (água oxigenada + solução a base de amônia).

Primeiramente, para avaliar a viabilidade do uso das substâncias em doses humanas nos camundongos e a hepatotoxicidade, realizamos um piloto com 10 animais fêmeas C57BL/6. A primeira avaliação foi a mortalidade dos animais durante o experimento, pois esse parâmetro possui importância crucial para a continuidade do experimento. Como resultado, nenhum animal morreu durante o protocolo piloto. Além disso, dosamos alanina aminotransferase (ALT/TGP), aspartato amino transferase (AST/TGO) e creatinina.

A indução da toxicidade em órgãos é um dos principais parâmetros utilizados pelas agências reguladoras para permitir a liberação de um produto no mercado. O fígado é um dos órgãos que desempenha a metabolização de substâncias e, devido a esse fato, é um órgão que está diretamente suscetível a toxicidade dos compostos (Blondet *et al.*, 2018). Na indústria de medicamentos, cerca de 50% das drogas candidatas ao mercado são descartadas devido a toxicidade induzida no fígado (Ozer, 2008). Além do fígado, os danos aos rins são muito

estudado nos modelos *in vivo* e a dosagem de creatinina atua como um marcador indireto da lesão renal (Dunn *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2002).

Em nosso estudo, não encontramos diferenças significantes nas dosagens de ALT/TGP, AST/TGO e creatinina entre os grupos do protocolo piloto. Além disso, quando comparado com as dosagens de laboratórios de referência (Jackson, Charles River e Taconic) percebemos que os valores encontrados por nós estão dentro da normalidade. Em nossa coorte, a ausência de alteração nos marcadores de lesão hepática permitiu com que o protocolo de intoxicação por “banho de lua” fosse realizado utilizando os produtos em concentração idêntica ao utilizado pelos seres humanos.

Com relação ao hemograma no protocolo piloto, observamos uma leve leucopenia nos camundongos do grupo amônia, que foram intoxicados com formulações comerciais de água oxigenada e amônia. Um estudo de Garcia de la Asuncion e colaboradores investigou a contagem de leucócitos totais em camundongos OF1 intoxicados com 3'-azido-2',3'-didesoxitimidina (AZT), um medicamento comum no tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). O AZT aumenta a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio e causa danos oxidativos ao mtDNA. Como resultado, o AZT causou leucopenia nos camundongos, com uma diminuição significativa (mais de 35%) na contagem de leucócitos no sangue periférico (Garcia-De-La-Asuncion *et al.*, 2007).

Outro estudo, dessa vez utilizando o quimioterápico Irinotecano, indutor de EROs, observou a presença de leucopenia nos camundongos C57BL/6 intoxicados com o medicamento (Arifa *et al.*, 2016). Juntos, esses estudos estabelecem uma possível relação entre o estresse oxidativo e a presença de leucopenia. Em nosso estudo, a amônia seria o agente indutor de estresse oxidativo, uma vez que os animais do grupo peróxido não sofreram alteração na contagem de leucócitos. Um N amostral mais significativo é necessário para estabelecer de fato essa associação.

Após as análises de viabilidade do estudo realizadas no protocolo piloto, seguiu-se com o protocolo experimental final e análises de: citogenética convencional por banda-G, histopatologia da medula óssea e expressão gênica em tempo real. As análises de hemograma foram descontinuadas pela indisponibilidade de equipamento.

Com relação a citogenética, os camundongos (*Mus musculus*) possuem 20 pares de cromossomos, sendo 19 autossômicos e 1 par de cromossomos sexuais. Uma característica bem distinta do cariótipo dos camundongos é que todos os cromossomos, com exceção do cromossomo Y, são telocêntricos. Tal fato dificulta a classificação pois impede que os cromossomos sejam inicialmente ordenados em grupos distintos com base na posição

centromérica (Cowell, 1984). Encontramos um percentual geral de 6,8% de translocações (33 translocações em 486 metáfases). A presença de algumas translocações cromossômicas não é incomum em camundongos (Coghlan *et al.*, 2005; De Villena e Sapienza, 2001; Kalitsis; Griffiths; Choo, 2006). Desde a década de 80, algumas populações são descritas com a presença de translocações (Adolph e Klein, 1981; Bauchau *et al.*, 1990; Nash; Brooker; Davis, 1983).

Um estudo anterior do nosso grupo identificou o aumento significativo de translocações cromossômicas em camundongos C57BL/6 intoxicados com metilmercúrio (MeHg). A intoxicação desses animais ocorreu por via oral com a introdução do MeHg na água disponibilizada aos animais (Roque *et al.*, 2021). Possivelmente a exposição tópica aos animais ao peróxido de hidrogênio e amônia não gerou uma instabilidade genética a nível de detecção cromossômica. Mais estudos precisam ser reproduzidos para estabelecer se de fato esse tipo de intoxicação não desencadeia instabilidade cromossômica.

Como a Neoplasia mielodisplásica é um câncer da medula que está fortemente associado à exposição ocupacional aos agentes tóxicos, realizamos o estudo histopatológico da medula óssea proveniente do fêmur dos camundongos C57BL/6 do protocolo final. Como resultado, encontramos o predomínio do setor mielóide em todos os grupos e para ambos os sexos. Morfologicamente esse achado está condizente com o estudo de Everds, onde uma razão mielóide:eritróide média de 1,5:1 foi relatada (Everds, 2007; O'Connel *et al.*, 2015). Apesar desse achado, observamos que, de modo geral, pelo menos um animal em cada grupo de cada sexo apresentou predominância do setor eritróide com a presença de ninhos eritróides.

Encontramos em camundongos expostos à amônia casos de hiperplasia megacariocítica com megas agrupados, achados típicos de doença mieloproliferativa crônica. A organização mundial e Saúde (OMS) descreve o achado de megacariócitos agregados em pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC), trombocitemia essencial (TE) e Policitemia vera (PV), típicas doenças definidas como mieloproliferativa crônica da medula óssea (Khoury *et al.*, 2022). Esses achados, de alterações histológicas, reforçam os relatos como o de Couto e colaboradores que demonstram a associação à exposição de mulheres grávidas as tinturas de cabelo e cosméticos para alisamento com a etiologia da leucemia em crianças menores de 2 anos de idade (Couto *et al.*, 2013).

A análise da expressão gênica da via STING e de receptores do tipo Toll em camundongos expostos ao banho de lua parte de uma hipótese de que a exposição recorrente aos componentes oxidantes utilizados de forma rotineira no clareamento de pelos e cabelos,

peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e amônia (NH_3), pode induzir um estresse oxidativo patológico. O avanço no setor industrial nos séculos XVIII e XIX permitiu uma mudança nos padrões de produção de produtos de modo que o acesso químico aos compostos químicos se tornou de fácil acesso e aumentou, conseqüentemente, a exposição ocupacional dos indivíduos (Brady *et al.*, 2017). A exposição a novos compostos tóxicos desencadeou moléculas imunoestimulantes que não estão associadas aos patógenos ou a danos. Zindel e Kubes propuseram chamar tais moléculas de *Lifestyle-Associated Molecular Patterns* (LAMPs), imunoestimulantes que foram identificados como causadores de um processo associado ao estilo de vida causado pela inflamação que potencialmente progride para a doença. Estudos que possam detectar quais componentes podem desencadear uma resposta inflamatória patológica são de extrema importância pois, uma vez que o produto se torna reconhecidamente tóxico, abre-se uma janela de oportunidade para alertar sobre os malefícios da exposição ocupacional.

Nesse sentido, avaliamos a expressão gênica de moléculas chave na resposta imune inata, como a via cGAS-STING e os receptores do tipo Toll em camundongos submetidos à prática do banho de lua com H_2O_2 e NH_3 .

Para os camundongos C57BL/6 machos, observamos que a expressão gênica de *Cgas* aumentou nos camundongos do grupo amônia em relação aos camundongos do grupo amônia NAC ($p=0,03$). Além disso, identificamos que os camundongos do grupo peróxido apresentaram maior expressão gênica de *Sting* do que os animais do grupo controle ($p=0,05$). A maior expressão gênica de *Sting* também foi observada nos camundongos machos do grupo amônia quando comparados aos grupos controle NAC e amônia NAC ($p=0,05$ em ambas as análises). Por fim, vale ressaltar duas tendências identificadas nos níveis de expressão dos camundongos C57BL/6 machos: para todos os genes analisados - *Cgas*, *Ddx41*, *Sting*, *Tbk1*, *Tlr3* e *Tlr4* – os camundongos do grupo peróxido (intoxicados apenas com água oxigenada) apresentaram maior nível de expressão do que os camundongos controles (PBS) e; o nível de expressão do grupo amônia (água oxigenada + amônia) estava mais elevado quando comparado aos animais do grupo controle NAC (PBS + salina) e amônia NAC (água oxigenada + amônia + NAC), de modo que os níveis de expressão do grupo amônia NAC se assemelham ao nível de expressão observado no grupo controle NAC.

Para os camundongos C57BL/6 fêmeas, observamos maior expressão do gene *Cgas* nos animais do grupo peróxido em relação aos animais do grupo controle ($p=0,04$). Semelhante ao que se observou nos camundongos machos, foi observado maior expressão gênica em camundongos do grupo peróxido quando comparado aos animais do grupo controle para todos

os genes estudados. Para os grupos que incluíam o uso de amônia e *N*-acetilcisteína (controle NAC, amônia e amônia NAC), os níveis de expressão ficaram muito similares, independente do tratamento experimental.

A capacidade do DNA citosólico, exógeno ou não, estimular o sistema imune já é conhecida há muito tempo, porém, apenas na última década as pesquisas começaram a descrever a base molecular dessa detecção pelo sistema imune inato. Diversos receptores citosólicos foram descritos até então, mas STING tem mostrado um papel chave para a maioria das vias de detecção pois o seu ligante a montante, cGAS, destaca-se como um dos principais receptores de reconhecimento de padrões (RPPs) para o DNA de dupla fita (dsDNA) (Paludan e Bowie, 2013). Ao contrário da descoberta relativamente recente da via cGAS-STING, a descoberta dos receptores do tipo Toll remonta desde 1988, iniciando com a clonagem do gene IL-1R1 que codifica uma citocina pró-inflamatória (Lind *et al.*, 2022; O'Neill e Golenbock, 2013).

Um estudo de Tian e colaboradores observou que o tratamento com H₂O₂ resultou em um aumento notável nos níveis de proteína de cGAS, STING e NLRP3 nas células do núcleo pulposo (NPCs) no disco intervertebral (DIV) (Tian *et al.*, 2020). Na psoríase, uma doença inflamatória da pele de origem autoimune, camundongos deficientes em *Tmem173*st tratados com Imiquimod (IMQ), um quimioterápico dermatológico, tiveram inflamação na pele reduzida em comparação aos camundongos *Tmem173* selvagens. No mesmo estudo, foram observados maiores níveis de DNA livre de células (cf-DNA) no plasma dos camundongos tratados com IMQ (Yu *et al.*, 2020). No nosso estudo, possivelmente o peróxido de hidrogênio e a amônia desencadeiam danos ao DNA mediados por estresse oxidativo e ativam a sinalização da via cGAS-STING.

Os níveis dos receptores Toll 3 e 4 apresentavam uma tendência de aumento em todos os animais intoxicados com peróxido de hidrogênio. Apesar dos ligantes para esses receptores serem distintos, RNA de dupla fita para o TLR3 e lipopolissacarídeos (LPS) para TLR4, esses receptores compartilham um transdutor de sinal em comum, a quinase de ligação TANK1 (TBK1) (Abe *et al.*, 2020). Desse modo, como também verificamos a tendência de aumento de *Tbkl* nos animais intoxicados com peróxido, pode estar ocorrendo uma transdução do sinal que acione TLR3 e TLR4.

Ademais, a via dos receptores do tipo Toll está totalmente relacionada com a ativação dos fatores reguladores de interferons (IRFs) (Duan *et al.*, 2022; Honda e Taniguchi,

2006). A via dos IRFs já foi estudada pelo nosso grupo de pesquisa no contexto das neoplasias de medula óssea. Em 2009, observou-se que níveis elevados de *IRF-1* nas células mieloides são um fator prognóstico favorável para a sobrevida global de pacientes com SMD, embora aumentem a probabilidade de manifestação de fenômenos autoimunes, com diminuição da qualidade de vida (Pinheiro *et al.*, 2009).

Além disso, em 2019, verificou-se o aumento de *IRF3* e *IRF7* em pacientes com SMD avançada e com anormalidades citogenéticas, características de pior prognóstico para doença (De Sousa *et al.*, 2019). Esses achados foram observados novamente em outra coorte de SMD, em 2021, na qual foi observado que a maior expressão de *IRF3* estava associada a maior contagem de blastos na medula óssea, menor contagem de plaquetas e maior dependência transfusional; já *IRF7* apresentou maior expressão em pacientes com SMD que apresentavam menor valor de hemoglobina, menor contagem de plaquetas, cariótipo anormal e contagem maior de blastos na medula óssea. Por fim, nessa mesma coorte de 2021, verificou-se o aumento de expressão do gene *TLR3* em pacientes com displasia na linhagem eritróide (De Oliveira *et al.*, 2021). Todos esses achados predizem um pior prognóstico na SMD e estão associados a formas mais avançadas da doença, onde a instabilidade genética é uma marca registrada.

Com relação os camundongos C57BL/6 fêmeas, enquanto os animais intoxicados somente com água oxigenada apresentavam aumento de expressão dos genes estudados, os animais dos grupos controle NAC, amônia e amônia NAC apresentaram valores similares nos níveis de expressão gênica. O metabolismo da amônia desempenha um papel importante na homeostase ácido-base e em outras funções celulares. Os rins desempenham um papel importante na formação de bicarbonato durante a eliminação líquida de ácido e o metabolismo da amônia é quantitativamente o maior componente da excreção ácida em condições basais e em resposta a perturbações ácido-base (Weiner e Verlander, 2019). Esse achado pode ser explicado pelo fato de que a excreção de amônia em camundongos fêmeas chega a ser duas vezes maior do que a excreção em camundongos machos (Harris *et al.*, 2021). Os rins masculinos e femininos diferem na formação, transporte e estrutura de amônia em condições basais, e as prioridades dos mecanismos em resposta à carga ácida também diferem. Essas alterações ocorrem no túbulo proximal, TAL, e ducto coletor. A testosterona parece mediar a maioria desses dimorfismos e estar envolvida na ativação do receptor androgênico (AR) no túbulo proximal (Harris e Weiner, 2021; Layton e Sullivan, 2019; Macdonough *et al.*, 2023).

Para os camundongos C57BL/6 machos, observamos uma correlação de Pearson muito forte foi entre os genes *Sting* e *Cgas* ($r = 0,920$; $p = 0,000$), *Sting* e *Tlr3* ($r = 0,904$; $p =$

0,000), *Sting* e *Tlr4* ($r = 0,944$; $p = 0,000$), *Cgas* e *Tlr4* ($r = 0,942$; $p = 0,000$) e entre os genes *Tbk1* e *Tlr4* ($r = 0,914$; $p = 0,000$). Identificamos uma correlação forte entre os genes *Sting* e *Tbk1* ($r = 0,897$; $p = 0,000$), *Cgas* e *Tbk1* ($r = 0,863$; $p = 0,000$), *Cgas* e *Tlr3* ($r = 0,879$; $p = 0,000$), *Ddx41* e *Tbk1* ($r = 0,857$; $p = 0,000$), *Tbk1* e *Tlr3* ($r = 0,797$; $p = 0,000$) e entre os genes *Tlr3* e *Tlr4* ($r = 0,891$; $p = 0,000$). Por fim, os camundongos C57BL/6 machos apresentaram correlação moderada entre os genes *Sting* e *Ddx41* ($r = 0,573$; $p = 0,000$), *Cgas* e *Ddx41* ($r = 0,501$; $p = 0,004$) e entre *Ddx41* e os receptores do tipo Toll: *Tlr3* ($r = 0,503$; $p = 0,002$) e *Tlr4* ($r = 0,650$; $p = 0,000$). Os genes estudados compartilham uma mesma cascata de sinalização, e, em alguns casos, as mesmas moléculas adaptadoras, o que é refletido no grande número de correlações. Apesar disto, o sistema imune é uma rede complexa de interações e outros mediadores que não foram estudados são essenciais para essa regulação entre os genes.

Para os camundongos C57BL/6 fêmeas, observou-se uma correlação de Pearson muito forte entre os genes *Tlr3* e *Tlr4* ($r = 0,909$; $p = 0,000$). Uma correlação forte entre os genes *Sting* e *Cgas* ($r = 0,868$; $p = 0,000$), *Sting* e *Tlr3* ($r = 0,839$; $p = 0,000$), *Sting* e *Tlr4* ($r = 0,892$; $p = 0,000$) *Cgas* e *Tlr3* ($r = 0,814$; $p = 0,000$), *Cgas* e *Tlr4* ($r = 0,797$; $p = 0,000$) e entre os genes *Ddx41* e *Tbk1* ($r = 0,744$; $p = 0,000$). Por fim, correlações moderadas entre os genes *Sting* e *Tbk1* ($r = 0,650$; $p = 0,000$), *Cgas* e *Tbk1* ($r = 0,624$; $p = 0,000$), *Ddx41* e *Tlr3* ($r = 0,423$; $p = 0,020$), *Ddx41* e *Tlr4* ($r = 0,510$; $p = 0,004$), *Tbk1* e *Tlr3* ($r = 0,622$; $p = 0,000$), e entre os genes *Tbk1* e *Tlr4* ($r = 0,636$; $p = 0,000$) foi observada nas fêmeas. Esses achados nos levam a acreditar que a regulação das vias imunes pode sofrer alterações de acordo com o sexo, através de modulações hormonais diferenciadas.

Em resumo, nossos achados do banho de lua com peróxido de hidrogênio e amônia nos camundongos C57BL/6 demonstram um possível aumento de EROs devido à exposição da pele a tais componentes, com consequente dano ao DNA que irá desencadear possível displasia megacariocítica e ativação vias de resposta imune inata. Uma limitação de nosso estudo foi a falta de avaliação nos parâmetros de estresse oxidativo, como o marcador malondialdeído. Além disso, a dosagem de EROs e das enzimas reguladoras catalase e peróxido dismutase poderiam ampliar nossa compreensão no mecanismo de exposição ao banho de lua. Mais estudos são necessário para classificar o potencial danoso do banho de lua, mas nosso estudo realça a necessidade de atenção quanto à exposição a esses compostos.

6.2 Pacientes com Neoplasia Mielodisplásica

Neste estudo também foram avaliados os níveis de expressão gênica de *DDX41* e *STING* em pacientes com Neoplasia mielodisplásica (SMD). A sinalização imune inata crônica em células hematopoiéticas é bastante descrita em SMD e a superexpressão de genes relacionados ao sistema imunológico em células-tronco hematopoéticas é relatada em 50% dos pacientes. Dessa forma, percebe-se que a ativação do sistema imune inato, predominantemente por meio de receptores de reconhecimento de padrão, aumenta o risco de desenvolver SMD (Barreyro *et al.*, 2018; Pellagatti *et al.*, 2010).

Quando analisamos a expressão de *DDX41* e *STING* em relação aos subtipos da doença segundo a OMS 2016, observamos resultados que indicam uma maior expressão desses genes em pacientes com características mais agressivas da SMD. Para *DDX41*, pacientes classificados com SMD-EB2 (SMD com excesso de blastos II) apresentaram níveis de expressão mais altos do que pacientes com SMD-DM (SMD com displasia Multilinhagem) ($p=0,004$). Já para *STING*, pacientes com SMD-EB1 (SMD com excesso de blasto I) apresentaram maiores níveis de expressão do que pacientes com SMD-SA (SMD com Sideroblastos em anel) ($p=0,013$). Corroborando com esse resultado, os pacientes que possuíam contagem de blastos na medula óssea maior do que 10% apresentaram maior expressão de *DDX41* quando comparados aos pacientes que possuíam contagem de blastos $\leq 2\%$ ou de 5%-10% ($p=0,002$ e $p=0,037$, respectivamente). Já *STING* teve expressão aumentada em pacientes que tinham de 5%-10% de blastos na medula em comparação a pacientes com contagem de blastos $\leq 2\%$ ($p=0,016$).

Os subtipos mais iniciais da SMD são caracterizados por um aumento da apoptose e hematopoese ineficiente, ocasionadas por alterações no microambiente medular, na secreção de citocinas e no sistema imune inato. Essas mudanças promovem a supressão das células saudáveis, provocando a presença de citopenias periféricas. Em contrapartida, na SMD avançada há o aumento progressivo de blastos na medula óssea, ocorrem falhas nos mecanismos de reparo, mutações adicionais na células-tronco hematopoiéticas e, além disso, o clone displásico adquire resistência à apoptose e vantagem proliferativa, o que traz risco aumentado de transformação para LMA (Ghobrial *et al.*, 2018). A via estabelecida por *DDX41* e *STING* culmina com a ativação de fatores de transcrição como IRF3 e NF- κ B (Abe e Barber, 2014; Zhang *et al.*, 2011).

A via de NF- κ B pode ser acionada por danos ao DNA e sua ativação desencadeia fatores anti-apoptóticos. Somado a isso, estudos sugerem que esse fator de transcrição controla atividades de proliferação, auto renovação e diferenciação das células-tronco hematopoiéticas. Em SMD, observou-se que uma maior expressão de NF- κ B está relacionada a expressão de citocinas inflamatórias e fatores pró-sobrevivência, resultando em hematopoiese desregulada (Braun *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2018). Dessa forma, a maior expressão dos genes estudados em pacientes com SMD avançada pode estar resultando no aumento de NF- κ B, o que contribui com fenótipo de maior resistência à apoptose observado nesses pacientes.

Nosso estudo também observou que outros marcadores de prognóstico desfavorável em SMD, como cariótipo alterado apresentaram expressão alterada de *STING*. Pacientes com cariótipo alterado apresentaram maior expressão de *STING* ($p=0,002$). O cariótipo possui um papel importante no cálculo do IPSS-R e, junto com a contagem de blastos e a presença de citopenias, determinam o tempo de sobrevida e o risco de transformação para LMA que o paciente possui naquele determinado momento. Um estudo de Sousa e colaboradores do nosso laboratório já havia observado maior expressão do gene *IRF3*, um dos genes finais da via *STING*, em pacientes com anormalidades citogenéticas em pacientes com SMD (De Sousa *et al.*, 2019).

Com relação aos achados de correlação de Pearson, identificamos uma correlação fraca entre os genes *STING* e *DDX41* ($r = 0,374$; $p = 0,002$), demonstrando uma influência de 14,0% ($r^2 = 0,140$) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro. *DDX41* promove uma ativação de *STING* através de uma via não canônica (Andreou, 2021), que pode ter resultado na baixa correlação entre os genes.

Neste contexto, conclui-se que a expressão dos genes *DDX41* e *STING* é importante para a compreensão da fisiopatologia da SMD, especialmente quando estes apresentam maior expressão em variáveis de prognóstico desfavorável, podendo relacioná-los com a progressão da doença. Estudos futuros e complementares são necessários para confirmar esta hipótese e entender melhor o mecanismo dessa ativação na SMD, haja vista que o sistema imune inato é modulado por diversos componentes intrínsecos e extrínsecos.

7 CONCLUSÃO

De modo geral, acreditamos que a exposição ao banho de lua levou ao aumento de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente, a instabilidade genética, o que desencadeou a ativação de receptores de reconhecimento de padrões. Esse achado questiona o potencial patogênico da exposição ocupacional ao banho de lua. Nos pacientes com SMD, acreditamos que a via STING desencadeia uma desregulação imune que está envolvida na patogênese da doença. Alterações induzidas pela amônia em camundongos são encontradas em pacientes com SMD como aqui demonstrado, sugerindo um *link* etiológico entre o uso de banho de lua e o desenvolvimento de neoplasia da medula óssea.

REFERÊNCIAS

ABDELSHAFY, Asem Mahmoud et al. Hydrogen Peroxide from Traditional Sanitizer to Promising Disinfection Agent in Food Industry. **Food Reviews International**, p. 1-33, 2023.

ABDEL-WAHAB, Wessam M.; MOUSSA, Farouzia I. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. **Drug design, development and therapy**, p. 1155-1162, 2019.

ABDOLLAHI, M.; HOSSEINI, A. Hydrogen peroxide. **Encyclopedia of toxicology**, v. 3, p. 967-970, 2014.

ABE, Hiroto et al. Priming Phosphorylation of TANK-Binding Kinase 1 by I κ B Kinase β Is Essential in Toll-Like Receptor 3/4 Signaling. **Molecular and Cellular Biology**, v. 40, n. 5, p. e00509-19, 2020.

ABE, Takayuki; BARBER, Glen N. Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF- κ B activation through TBK1. **Journal of virology**, v. 88, n. 10, p. 5328-5341, 2014.

ADÈS, Lionel; ITZYKSON, Raphael; FENAUX, Pierre. Myelodysplastic syndromes. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2239-2252, 2014.

ADOLPH, Sabine; KLEIN, Jan. Robertsonian variation in *Mus musculus* from central Europe, Spain, and Scotland. **Journal of Heredity**, v. 72, n. 3, p. 219-221, 1981.

ALDINI, Giancarlo et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. **Free radical research**, v. 52, n. 7, p. 751-762, 2018.

ALESSANDRINI, Aurora; PIRACCINI, Bianca Maria. Essential of hair care cosmetics. **Cosmetics**, v. 3, n. 4, p. 34, 2016.

ALURI, Jahnavi; COOPER, Megan A.; SCHUETTPELZ, Laura G. Toll-like receptor signaling in the establishment and function of the immune system. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1374, 2021.

American Conference of Governmental Industrial Hygienists. (2014). 2014 guide to

occupational exposure values. 256.

ANDERSEN, Mads Hald. The balance players of the adaptive immune system. **Cancer Research**, v. 78, n. 6, p. 1379-1382, 2018.

ANDRADE, Bárbara et al. The relationship between reactive oxygen species and the cGAS/STING signaling pathway in the inflammaging process. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 15182, 2022.

ANDREOU, Alexandra Z. DDX41: a multifunctional DEAD-box protein involved in pre-mRNA splicing and innate immunity. **Biological Chemistry**, v. 402, n. 5, p. 645-651, 2021.

ANWAR, Muhammad Ayaz et al. Recent clinical trends in Toll-like receptor targeting therapeutics. **Medicinal research reviews**, v. 39, n. 3, p. 1053-1090, 2019.

ARIFA, Raquel Duque Nascimento et al. The reduction of oxidative stress by nanocomposite Fullerol decreases mucositis severity and reverts leukopenia induced by Irinotecan. **Pharmacological research**, v. 107, p. 102-110, 2016.

BADAR, Talha; CHLON, Timothy. Germline and somatic defects in DDX41 and its impact on myeloid neoplasms. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 17, n. 5, p. 113-120, 2022.

BAKHOU, Samuel F. et al. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. **Nature**, v. 553, n. 7689, p. 467-472, 2018.

BARBER, Glen N. STING: infection, inflammation and cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 12, p. 760-770, 2015.

BARREYRO, Laura; CHLON, Timothy M.; STARCZYNOWSKI, Daniel T. Chronic immune response dysregulation in MDS pathogenesis. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 132, n. 15, p. 1553-1560, 2018.

BAUCHAU, V. et al. Robertsonian translocations in free-living populations of the house mouse in Belgium. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 41, n. 1-3, p. 193-201, 1990.

BAUER, Moisés Evandro; DE LA FUENTE, Mónica. The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. **Mechanisms of ageing and development**, v. 158, p. 27-37, 2016.

BAXTER, Aaron; MITTLER, Ron; SUZUKI, Nobuhiro. ROS as key players in plant stress signalling. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 5, p. 1229-1240, 2014.

BEJAR, Rafael. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 99, n. 6, p. 956, 2014.

BEJAR, Rafael et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2496-2506, 2011.

BERNARD, Elsa et al. Molecular international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **NEJM evidence**, v. 1, n. 7, p. EVIDoA2200008, 2022.

BITO, Toshinori; NISHIGORI, Chikako. Impact of reactive oxygen species on keratinocyte signaling pathways. **Journal of Dermatological Science**, v. 68, n. 1, p. 3-8, 2012.

BLANUSA, Maja et al. Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 23, p. 2771-2794, 2005.

BLEST, Henry TW; CHAUVEAU, Lise. cGAMP the travelling messenger. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1150705, 2023.

BLONDET, Niviann M. et al. Mecanismos de desintoxicação de hepatócitos. In: **Fisiologia do Trato Gastrointestinal**. Imprensa Acadêmica, 2018. p. 981-1001.

BOFFETTA, Paolo; NYBERG, Fredrik. Contribution of environmental factors to cancer risk. **British medical bulletin**, v. 68, n. 1, p. 71-94, 2003.

BOLKER, Jessica A. Animal models in translational research: Rosetta stone or stumbling block?. **Bioessays**, v. 39, n. 12, p. 1700089, 2017.

BRADY, Steven P. et al. Evolutionary toxicology: Toward a unified understanding of life's response to toxic chemicals. **Evolutionary applications**, v. 10, n. 8, p. 745, 2017. x

BRAIT, Mariana; SIDRANSKY, David. Cancer epigenetics: above and beyond. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 21, n. 4, p. 275-288, 2011.

BRAUN, Thorsten et al. NF- κ B constitutes a potential therapeutic target in high-risk myelodysplastic syndrome. **Blood**, v. 107, n. 3, p. 1156-1165, 2006.

BROWN, Guy C.; BORUTAITE, Vilmante. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. **Mitochondrion**, v. 12, n. 1, p. 1-4, 2012.

BROWN, J. R., & THORNTON, J. L. (1957). Percivall Pott (1714-1788) and Chimney Sweepers' Cancer of the Scrotum. **British Journal of Industrial Medicine**, 14(1), 68. <https://doi.org/10.1136/OEM.14.1.68>

BUCCINI, Danieli F. et al. Antimicrobial peptides could antagonize uncontrolled inflammation via Toll-like 4 receptor. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 1037147, 2022.

BUONOCORE, Giuseppe; PERRONE, Serafina; TATARANNO, Maria Luisa. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. In: **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**. WB Saunders, 2010. p. 186-190.

SA, BUSTIN. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 4611-622, 2009.

DE CAMPOS, Eloísa Bueno Pires; YOSHIDA, Winston Bonetti. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 4, p. 357-366, 2019.

CAVALCANTE, Gabrielle Melo et al. Tissue methylation and demethylation influence translesion synthesis DNA polymerases (TLS) contributing to the genesis of chromosomal abnormalities in myelodysplastic syndrome. **Journal of Clinical Pathology**, v. 75, n. 2, p. 85-93, 2022.

CHAMBERS, Emma S.; VUKMANOVIC-STEJIC, Milica. Skin barrier immunity and ageing. **Immunology**, v. 160, n. 2, p. 116-125, 2020.

CHAMSEDDINE, Ali N. et al. Unraveling myelodysplastic syndromes: current knowledge and future directions. **Current oncology reports**, v. 18, p. 1-11, 2016.

CHANG, Mikyoung; JIN, Wei; SUN, Shao-Cong. Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production. **Nature immunology**, v. 10, n. 10, p. 1089-1095, 2009.

CHATURVEDI, Akanksha; PIERCE, Susan K. How location governs Toll-like receptor signaling. **Traffic**, v. 10, n. 6, p. 621-628, 2009.

CHEN, Qi; SUN, Lijun; CHEN, Zhijian J. Regulation and function of the cGAS–STING pathway of cytosolic DNA sensing. **Nature immunology**, v. 17, n. 10, p. 1142-1149, 2016.

CHEN, Weiqing et al. Characterizing N-acetylcysteine (NAC) and N-acetylcysteine amide (NACA) binding for lead poisoning treatment. **Journal of colloid and interface science**, v. 371, n. 1, p. 144-149, 2012.

YUJUAN, C. H. E. N. et al. Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 22, n. 8, p. 609, 2021.

CHENG, Zhangliang et al. The interactions between cGAS-STING pathway and pathogens. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 91, 2020.

CIRIMINNA, Rosaria et al. Hydrogen peroxide: a key chemical for today's sustainable development. **ChemSusChem**, v. 9, n. 24, p. 3374-3381, 2016.

COGHLAN, Avril et al. Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. **TRENDS in Genetics**, v. 21, n. 12, p. 673-682, 2005.

COMPTON, Carolyn; COMPTON, Carolyn. **Cancer initiation, promotion, and progression and the acquisition of key behavioral traits**. Springer International Publishing, 2020.

CORRALES, Leticia et al. Direct activation of STING in the tumor microenvironment leads to potent and systemic tumor regression and immunity. **Cell reports**, v. 11, n. 7, p. 1018-1030, 2015.

COSTA, Marilia Braga et al. Chromosomal abnormalities and dysregulated DNA repair gene expression in farmers exposed to pesticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 103564, 2021.

COUTO, Arnaldo C. et al. Pregnancy, maternal exposure to hair dyes and hair straightening cosmetics, and early age leukemia. **Chemico-biological interactions**, v. 205, n. 1, p. 46-52, 2013.

COWELL, John K. A photographic representation of the variability in the G-banded structure of the chromosomes in the mouse karyotype: a guide to the identification of the individual chromosomes. **Chromosoma**, v. 89, n. 4, p. 294-320, 1984.

DA FRANÇA, Simone Aparecida et al. Types of hair dye and their mechanisms of action. **Cosmetics**, v. 2, n. 2, p. 110-126, 2015.

DANCEY, Janet E. et al. The genetic basis for cancer treatment decisions. **Cell**, v. 148, n. 3, p. 409-420, 2012.

DE JAGER, T. L.; COCKRELL, A. E.; DU PLESSIS, S. S. Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species. **Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment**, p. 15-23, 2017.

DE JONG, Marion; MAINA, Theodosia. Of mice and humans: are they the same?— Implications in cancer translational research. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 4, p. 501-504, 2010.

DE LUCCA CAMARGO, Livia; TOUYZ, Rhian M. Reactive oxygen species. **Textbook of vascular medicine**, p. 127-136, 2019.

DE OLIVEIRA MANN, Carina C.; HORNING, Veit. Molecular mechanisms of nonself nucleic acid recognition by the innate immune system. **European Journal of Immunology**, v. 51, n. 8, p. 1897-1910, 2021.

DE OLIVEIRA, Roberta Taiane Germano et al. ERVs-TLR3-IRF axis is linked to myelodysplastic syndrome pathogenesis. **Medical Oncology**, v. 38, p. 1-12, 2021.

DE SOUSA, Juliana Cordeiro et al. Dysregulation of interferon regulatory genes reinforces the concept of chronic immune response in myelodysplastic syndrome pathogenesis. **Hematological oncology**, v. 37, n. 4, p. 523-526, 2019.

DE VILLENA, Fernando Pardo-Manuel; SAPIENZA, Carmen. Female meiosis drives karyotypic evolution in mammals. **Genetics**, v. 159, n. 3, p. 1179-1189, 2001.

DE OLIVEIRA SANTOS, Marcell et al. Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 2023.

DENAYER, Tinneke; STÖHR, Thomas; VAN ROY, Maarten. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. **New Horizons in Translational Medicine**, v. 2, n. 1, p. 5-11, 2014.

DENG, Liufu et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing promotes radiation-induced type I interferon-dependent antitumor immunity in immunogenic tumors. **Immunity**, v. 41, n. 5, p. 843-852, 2014.

DÖHNER, Hartmut; WEISDORF, Daniel J.; BLOOMFIELD, Clara D. Acute myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 12, p. 1136-1152, 2015.

DUAN, Tianhao et al. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 812774, 2022.

DUNN, Stephen R. et al. Utility of endogenous creatinine clearance as a measure of renal function in mice. **Kidney international**, v. 65, n. 5, p. 1959-1967, 2004.

ESPLIN, Brandt L. et al. Chronic exposure to a TLR ligand injures hematopoietic stem cells. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 9, p. 5367-5375, 2011.

EVERDS, N. The Mouse in Biomedical Research. 2. Vol. 3. 2007.

FENTON, Henry John Horstman. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 65, p. 899-910, 1894.

FITZGERALD, Katherine A.; KAGAN, Jonathan C. Toll-like receptors and the control of immunity. **Cell**, v. 180, n. 6, p. 1044-1066, 2020.

FRANCESCHI, Claudio; CAMPISI, Judith. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 69, n. Suppl_1, p. S4-S9, 2014.

FRANCESCHI, Claudio et al. Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. **Annals of the new York Academy of Sciences**, v. 908, n. 1, p. 244-254, 2000.

FRYE, Richard Eugene et al. (Ed.). **The therapeutic use of N-acetylcysteine (NAC) in medicine**. Singapore: Adis, 2019.

GANGAT, Naseema; PATNAIK, Mrinal M.; TEFFERI, Ayalew. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. **American journal of hematology**, v. 91, n. 1, p. 76-89, 2016.

GAO, Menghui et al. cGAS/STING: novel perspectives of the classic pathway. **Molecular Biomedicine**, v. 1, p. 1-16, 2020.

GARCIA-DE-LA-ASUNCION, J. et al. Vitamins C and E prevent AZT-induced leukopenia and loss of cellularity in bone marrow. Studies in mice. **Free radical research**, v. 41, n. 3, p. 330-334, 2007.

GARCIA-MANERO, Guillermo. Myelodysplastic syndromes: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. **American journal of hematology**, v. 90, n. 9, p. 831-841, 2015.

GAWARAMMANA, Indika B.; BUCKLEY, Nicholas A. Medical management of paraquat ingestion. **British journal of clinical pharmacology**, v. 72, n. 5, p. 745-757, 2011.

GAY, Nicholas J. et al. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 8, p. 546-558, 2014.

GHOBRIAL, Irene M. et al. The bone-marrow niche in MDS and MGUS: implications for AML and MM. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 15, n. 4, p. 219-233, 2018.

GREENBERG, Peter L. et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 120, n. 12, p. 2454-2465, 2012.

GREENBERG, Peter et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 89, n. 6, p. 2079-2088, 1997.

GUERRA-TAPIA, A.; GONZALEZ-GUERRA, E. Hair cosmetics: dyes. **Actas Dermosifiliográficas (English Edition)**, v. 105, n. 9, p. 833-839, 2014.

HABER, Fritz; WEISS, Joseph. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A-Mathematical and Physical Sciences**, v. 147, n. 861, p. 332-351, 1934.

HAFERLACH, T. et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 28, n. 2, p. 241-247, 2014.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARMAN, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, 11(3), 298–300. <https://doi.org/10.1093/GERONJ/11.3.298>

HARRIS, Autumn et al. The Role of the Androgen Receptor in Sexual Dimorphisms of Renal Ammonia Metabolism. **The FASEB Journal**, v. 35, 2021.

HARRIS, Autumn N.; WEINER, I. David. Sex differences in renal ammonia metabolism. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 320, n. 1, p. F55-F60, 2021.

HE, Liangmei et al. STING signaling in tumorigenesis and cancer therapy: A friend or foe?. **Cancer Letters**, v. 402, p. 203-212, 2017.

HELASKOSKI, Eva et al. Occupational asthma, rhinitis, and contact urticaria caused by oxidative hair dyes in hairdressers. **Annals of allergy, asthma & immunology**, v. 112, n. 1, p. 46-52, 2014.

HERTZOG, Jonny; REHWINKEL, Jan. Regulation and inhibition of the DNA sensor cGAS. **EMBO reports**, v. 21, n. 12, p. e51345, 2020.

HONDA, Kenya; TANIGUCHI, Tadatsugu. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 9, p. 644-658, 2006.

HOPFNER, Karl-Peter; HORNING, Veit. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 9, p. 501-521, 2020.

HOPKINS, Barbara L.; NEUMANN, Carola A. Redoxins as gatekeepers of the transcriptional oxidative stress response. **Redox Biology**, v. 21, p. 101104, 2019.

HOPKINS, Robert Z. Hydrogen peroxide in biology and medicine: an overview. **Reactive Oxygen Species**, v. 3, n. 7, p. 26-37, 2017.

HSUEH, Yi-Jen et al. The pathomechanism, antioxidant biomarkers, and treatment of oxidative stress-related eye diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1255, 2022.

HUMANS, I. W. G. on the E. of C. R. to. (1999). Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 71 Pt 1, 1–315. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK498701/>

ILANGO, Suganya et al. Epigenetic alterations in cancer. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 25, n. 6, p. 1058-1109, 2020.

ISHIKAWA, Hiroki; BARBER, Glen N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. **Nature**, v. 455, n. 7213, p. 674-678, 2008.

ISHIKAWA, Hiroki; MA, Zhe; BARBER, Glen N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 788-792, 2009.

IWASAKI, Akiko; MEDZHITOV, Ruslan. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature immunology**, v. 16, n. 4, p. 343-353, 2015.

JACOB, Saya L. et al. Cosmetics and cancer: adverse event reports submitted to the food and drug administration. **JNCI cancer spectrum**, v. 2, n. 2, p. pky012, 2018.

JANKOWSKY, Eckhard. RNA helicases at work: binding and rearranging. **Trends in biochemical sciences**, v. 36, n. 1, p. 19-29, 2011.

JIANG, Hui et al. The innate immune DNA sensor cGAS is a negative regulator of DNA repair hence promotes genome instability and cell death. **Biorxiv**, p. 465401, 2018.

JIANG, Manli; BENNANI, N. Nora; FELDMAN, Andrew L. Lymphoma classification update:

T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. **Expert review of hematology**, v. 10, n. 3, p. 239-249, 2017.

JIANG, Yan et al. The emerging roles of the DDX41 protein in immunity and diseases. **Protein & cell**, v. 8, n. 2, p. 83-89, 2017.

JIANG, Zhengfan et al. Poly (dI· dC)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFκB and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 19, p. 16713-16719, 2003.

KALITSIS, Paul; GRIFFITHS, Belinda; CHOO, KH Andy. Mouse telocentric sequences reveal a high rate of homogenization and possible role in Robertsonian translocation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 23, p. 8786-8791, 2006.

KAUR, B. P., & Secord, E. (2019). Innate Immunity. *Pediatric Clinics of North America*, 66(5), 905–911. <https://doi.org/10.1016/J.PCL.2019.06.011>

KAWASAKI, Takumi; KAWAI, Taro. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 461, 2014.

KHOURY, Joseph D. et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. **Leukemia**, v. 36, n. 7, p. 1703-1719, 2022.

KOARAI, Akira et al. Oxidative stress enhances toll-like receptor 3 response to double-stranded RNA in airway epithelial cells. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 42, n. 6, p. 651-660, 2010.

KUMAR, Himanshu; KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. Pathogen recognition by the innate immune system. **International reviews of immunology**, v. 30, n. 1, p. 16-34, 2011.

KUTIKHIN, Anton G.; YUZHALLIN, Arseniy E.; BRUSINA, Elena B. **Infectious agents and cancer**. Springer Science & Business Media, 2012.

LAYTON, Anita T.; SULLIVAN, Jennifer C. Recent advances in sex differences in kidney function. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 316, n. 2, p. F328-F331, 2019.

- LEE, Eun-Ju et al. The evolving field of prognostication and risk stratification in MDS: Recent developments and future directions. **Blood Reviews**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 2016.
- LENNICKE, Claudia; COCHEMÉ, Helena M. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. **Molecular Cell**, v. 81, n. 18, p. 3691-3707, 2021.
- LI, Anping et al. Activating cGAS-STING pathway for the optimal effect of cancer immunotherapy. **Journal of hematology & oncology**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2019.
- LI, Danyang; WU, Minghua. Pattern recognition receptors in health and diseases. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 291, 2021.
- LI, Tuo; CHEN, Zhijian J. The cGAS–cGAMP–STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 5, p. 1287-1299, 2018.
- LIM, Jung-Eun et al. Hair dye use and prostate cancer risk: A prospective analysis in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study cohort. **Cancer**, v. 128, n. 6, p. 1260-1266, 2022.
- LIND, Nicholas A. et al. Regulation of the nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *Nature Reviews Immunology*, v. 22, n. 4, p. 224-235, 2022.
- LIU, Haipeng et al. Nuclear cGAS suppresses DNA repair and promotes tumorigenesis. **Nature**, v. 563, n. 7729, p. 131-136, 2018.
- MAKISHIMA, Hideki; BOWMAN, Teresa V.; GODLEY, Lucy A. DDX41-associated susceptibility to myeloid neoplasms. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 141, n. 13, p. 1544-1552, 2023.
- MARQUES, Fabiana Kalina; DE PAULA SABINO, Adriano. Myelodysplastic neoplasms: An overview on diagnosis, risk-stratification, molecular pathogenesis, and treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 156, p. 113905, 2022.
- MASROUR-ROUDSARI, Jila; EBRAHIMPOUR, Soheil. Causal role of infectious agents in cancer: an overview. **Caspian journal of internal medicine**, v. 8, n. 3, p. 153, 2017.
- DE MATOS, Anacélia Gomes et al. Interleukin-8 and nuclear factor kappa B are increased and

positively correlated in myelodysplastic syndrome. **Medical Oncology**, v. 34, p. 1-7, 2017.

MCCARTHY, Cameron G. et al. Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 306, n. 2, p. H184-H196, 2014.

MCDONOUGH, Alicia A. et al. Sex differences in renal transporters: Assessment and functional consequences. **Nature Reviews Nephrology**, p. 1-16, 2023.

MCGOWAN-JORDAN, Jean; SIMONS, Annet; SCHMID, Michael (Ed.). **Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature Including New Sequence-based Cytogenomic Nomenclature**. Karger, 2016.

MILIGI, Lucia et al. Personal use of hair dyes and hematolymphopoietic malignancies. **Archives of Environmental & Occupational Health**, v. 60, n. 5, p. 249-256, 2005.

MIQUEL, Jaime et al. Mitochondrial role in cell aging. **Experimental gerontology**, v. 15, n. 6, p. 575-591, 1980.

MIYAKE, Kensuke. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4–MD-2. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 4, p. 186-192, 2004.

MOKHTARI, Vida et al. A review on various uses of N-acetyl cysteine. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 19, n. 1, p. 11, 2017.

MUGHAL, Zunairah et al. Megakaryocytic clustering in chronic myeloid leukemia: can it be a predictor of clinical outcome?. **Age (years)**, v. 47, n. 9.3, p. 9.3, 2021.

MURDOCH, L. E. et al. Evaluating different concentrations of hydrogen peroxide in an automated room disinfection system. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 178-182, 2016.

NAKAGAWA, Hidewaki; FUJITA, Masashi. Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine. **Cancer science**, v. 109, n. 3, p. 513-522, 2018.

NASH, H. R.; BROOKER, P. C.; DAVIS, S. J. M. The Robertsonian translocation house-mouse populations of North East Scotland: a study of their origin and evolution. **Heredity**, v. 50, n. 3,

p. 303-310, 1983.

NASSOUR, Joe et al. Autophagic cell death restricts chromosomal instability during replicative crisis. **Nature**, v. 565, n. 7741, p. 659-663, 2019.

NAZIK, Hülya et al. Evaluation of the effects of hair colouring products on the oxidative status in rats. **Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 37, n. 5, p. 766-770, 2020.

NEUSER, F., & SCHLATTER, H. (2010). Hair Dyes. *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*, 227–235. <https://doi.org/10.1002/9781444317657.CH30>

NEWMAN, Michael J. Development and pre-clinical efficacy characterization of a systemically administered multiple Toll-like receptor (TLR) agonist for anti-tumor immunotherapy. In: **CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH**. 615 CHESTNUT ST, 17TH FLOOR, PHILADELPHIA, PA 19106-4404 USA: AMER ASSOC CANCER RESEARCH, 2019.

O'DONNELL, Michael P. et al. Utility and limitations of serum creatinine as a measure of renal function in experimental renal ischemia-reperfusion injury^{1, 2}. **Transplantation**, v. 73, n. 11, p. 1841-1844, 2002.

O'NEILL, Luke AJ; BOWIE, Andrew G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 5, p. 353-364, 2007.

O'CONNELL, Karyn E. et al. Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. **Comparative medicine**, v. 65, n. 2, p. 96-113, 2015.

OKA, Shin-ichi et al. N-Acetylcysteine suppresses TNF-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B kinases. **FEBS letters**, v. 472, n. 2-3, p. 196-202, 2000.

OMURA, Hiroki et al. Structural and Functional Analysis of DDX41: a bispecific immune receptor for DNA and cyclic dinucleotide. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34756, 2016.

O'NEILL, Luke AJ; GOLENBOCK, Douglas; BOWIE, Andrew G. The history of Toll-like receptors—redefining innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 453-460, 2013.

OZER, Josef et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194-205, 2008.

PALACIO, J. R.; MARKERT, U. R.; MARTÍNEZ, P. Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. **Inflammation research**, v. 60, p. 695-704, 2011.

PALUDAN, Søren R.; BOWIE, Andrew G. Immune sensing of DNA. **Immunity**, v. 38, n. 5, p. 870-880, 2013.

PAPAEMMANUIL, Elli et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 122, n. 22, p. 3616-3627, 2013.

PARVATIYAR, Kislay et al. DDX41 recognizes bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. In: **JOURNAL OF IMMUNOLOGY**. 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814 USA: AMER ASSOC IMMUNOLOGISTS, 2013.

PAWELEC, Graham. Age and immunity: what is “immunosenescence”? **Experimental gerontology**, v. 105, p. 4-9, 2018.

PEI, Yanping et al. Biological activities and potential oral applications of N-acetylcysteine: progress and prospects. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

PELLAGATTI, A. et al. Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. **Leukemia**, v. 24, n. 4, p. 756-764, 2010.

PERALES-LINARES, Renzo; NAVAS-MARTIN, Sonia. Toll-like receptor 3 in viral pathogenesis: friend or foe?. **Immunology**, v. 140, n. 2, p. 153-167, 2013.

PHANIENDRA, Alugoju; JESTADI, Dinesh Babu; PERIYASAMY, Latha. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian journal of clinical biochemistry**, v. 30, p. 11-26, 2015.

PINHEIRO, Ronald Feitosa et al. The ambiguous role of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) immunoexpression in myelodysplastic syndrome. **Leukemia research**, v. 33, n. 10, p. 1308-1312, 2009.

POLPRASERT, Chantana et al. Inherited and somatic defects in DDX41 in myeloid neoplasms. **Cancer cell**, v. 27, n. 5, p. 658-670, 2015.

QIAN, Cheng; CAO, Xuetao. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1283, n. 1, p. 67-74, 2013.

RAGU, Sandrine; MATOS-RODRIGUES, Gabriel; LOPEZ, Bernard S. Replication stress, DNA damage, inflammatory cytokines and innate immune response. **Genes**, v. 11, n. 4, p. 409, 2020.

RAMPON, Christine et al. Hydrogen peroxide and redox regulation of developments. **Antioxidants**, v. 7, n. 11, p. 159, 2018.

RANI, Vibha et al. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Free Radicals in Human Health and Disease**, p. 105-116, 2015.

RAY, Paul D.; HUANG, Bo-Wen; TSUJI, Yoshiaki. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular signalling**, v. 24, n. 5, p. 981-990, 2012.

ROQUE, Cássia R. et al. Methylmercury chronic exposure affects the expression of DNA single-strand break repair genes, induces oxidative stress, and chromosomal abnormalities in young dyslipidemic APOE knockout mice. **Toxicology**, v. 464, p. 152992, 2021.

ROY, Anjali et al. Potential therapeutic targets for inflammation in toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated signaling pathways. **International immunopharmacology**, v. 40, p. 79-89, 2016.

RUBIN, Harry. Microenvironmental regulation of the initiated cell. **Advances in cancer research**, v. 90, p. 2-62, 2003.

RUST, R. C., & SCHLATTER, H. (2015). Hair Dyes. *Cosmetic Dermatology*, 239–250. <https://doi.org/10.1002/9781118655566.CH28>

SADIK, Nermin Abdel Hamid et al. Single-nucleotide polymorphism of Toll-like receptor 4 and interleukin-10 in response to interferon-based therapy in Egyptian chronic hepatitis C patients. **Archives of virology**, v. 160, p. 2181-2195, 2015.

SAMPAIO, Leticia Rodrigues et al. High PD-L1 expression is associated with unfavorable clinical features in myelodysplastic neoplasms. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, 2023.

SAMUNI, Yuval et al. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 8, p. 4117-4129, 2013.

SANTA, Pauline et al. The role of nucleases and nucleic acid editing enzymes in the regulation of self-nucleic acid sensing. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 629922, 2021.

SCHOGGINS, John W. et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 481-485, 2011.

SEO, Jung-A. et al. Hydrogen peroxide and monoethanolamine are the key causative ingredients for hair dye-induced dermatitis and hair loss. **Journal of dermatological science**, v. 66, n. 1, p. 12-19, 2012.

SHU, Chang; LI, Xin; LI, Pingwei. The mechanism of double-stranded DNA sensing through the cGAS-STING pathway. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 25, n. 6, p. 641-648, 2014.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2018. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018. Spiering, M. J. (2015). Primer on the Immune System. *Alcohol Research : Current Reviews*, 37(2), 171. /pmc/articles/PMC4590614/

STAVROU, Spyridon et al. DDX41 recognizes RNA/DNA retroviral reverse transcripts and is critical for in vivo control of murine leukemia virus infection. **MBio**, v. 9, n. 3, p. 10.1128/mbio.00923-18, 2018.

SU, Ting et al. STING activation in cancer immunotherapy. **Theranostics**, v. 9, n. 25, p. 7759, 2019.

SUN, Lijun et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 786-791, 2013.

SWERDLOW, Steven H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 127, n. 20, p. 2375-2390, 2016.

SWERDLOW, Steven H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 127, n. 20, p. 2375-2390, 2016.

TAFFONI, Clara et al. Nucleic acid immunity and DNA damage response: new friends and old foes. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 660560, 2021.

Takeda, K., & Akira, S. (2015). Toll-Like receptors. *Current Protocols in Immunology*, 2015, 14.12.1-14.12.10. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1412s109>

TENÓRIO, Micaely Cristina dos Santos et al. N-acetylcysteine (NAC): impacts on human health. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, p. 967, 2021.

THAKUR, Chitra; CHEN, Fei. Connections between metabolism and epigenetics in cancers. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2019. p. 52-58.

TIAN, Yixing et al. Epigallocatechin-3-gallate protects H₂O₂-induced nucleus pulposus cell apoptosis and inflammation by inhibiting cGAS/Sting/NLRP3 activation. **Drug design, development and therapy**, p. 2113-2122, 2020.

TRETTER, Verena. Cellular Oxygen Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4505, 2022.

VALLE, Adamo; OLIVER, Jordi; ROCA, Pilar. Role of uncoupling proteins in cancer. **Cancers**, v. 2, n. 2, p. 567-591, 2010.

VANDESOMPELE, Jo et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2002.

VARDIMAN, James W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 114, n. 5, p. 937-951, 2009.

VENTURA, M.; YUAN, S. Commercial production and use of hydrogen peroxide. In: **36th AIAA/ASME/SAE/ASEE Joint Propulsion Conference and Exhibit**. 2000. p. 3556.

VIDYA, Mallenahally Kusha et al. Toll-like receptors: significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. **International reviews of immunology**, v. 37, n. 1, p. 20-36, 2018.

WALSH, Michael F. et al. Genetic factors: hereditary cancer predisposition syndromes. **Abeloff's clinical oncology**, p. 180-208. e11, 2020.

WANG, Cong et al. Immune dysregulation in myelodysplastic syndrome: Clinical features, pathogenesis and therapeutic strategies. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 122, p. 123-132, 2018.

WANG, Jean YJ. Focus: death: cell death response to DNA damage. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 92, n. 4, p. 771, 2019.

WANG, Yu et al. Toll-like receptors mediating vascular malfunction: Lessons from receptor subtypes. **Pharmacology & therapeutics**, v. 158, p. 91-100, 2016.

WEINBERG, Olga K.; HASSERJIAN, Robert P. The current approach to the diagnosis of myelodysplastic syndromes☆. In: **Seminars in hematology**. WB Saunders, 2019. p. 15-21.

WEINER, I. David; VERLANDER, Jill W. Emerging features of ammonia metabolism and transport in acid-base balance. In: **Seminars in nephrology**. WB Saunders, 2019. p. 394-405.

WU, Jun-Jun et al. Agonists and inhibitors of the STING pathway: Potential agents for immunotherapy. **Medicinal research reviews**, v. 40, n. 3, p. 1117-1141, 2020.

WU, Ruyan; LI, Jun-Xu. Toll-like receptor 4 signaling and drug addiction. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 603445, 2020.

YU, Le; LIU, Pengda. Cytosolic DNA sensing by cGAS: regulation, function, and human diseases. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 170, 2021.

YU, Yang et al. Occurrence, biological consequences, and human health relevance of oxidative stress-induced DNA damage. **Chemical research in toxicology**, v. 29, n. 12, p. 2008-2039, 2016.

YU, Yongsheng et al. Cytosolic DNA–Mediated STING-Dependent Inflammation Contributes to the Progression of Psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 142, n. 3, p. 898-906. e4, 2022.

YUM, Seoyun et al. Roles of the cGAS-STING pathway in cancer immunosurveillance and immunotherapy. **Annual review of cancer biology**, v. 3, p. 323-344, 2019.

ZANONI, Thalita B. et al. The oxidation of p-phenylenediamine, an ingredient used for permanent hair dyeing purposes, leads to the formation of hydroxyl radicals: Oxidative stress and DNA damage in human immortalized keratinocytes. **Toxicology letters**, v. 239, n. 3, p. 194-204, 2015.

ZHANG, Ruoxi; KANG, Rui; TANG, Daolin. STING1 in different organelles: location dictates function. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 842489, 2022.

ZHANG, Yue; LIANG, Chunli. Innate recognition of microbial-derived signals in immunity and inflammation. **Science China Life Sciences**, v. 59, p. 1210-1217, 2016.

ZHANG, Zhiqiang et al. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. **Nature immunology**, v. 12, n. 10, p. 959-965, 2011.

ZHAO, Jiayuan; HOPKE, Philip K. Concentration of reactive oxygen species (ROS) in mainstream and sidestream cigarette smoke. **Aerosol Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 191-197, 2012.

ZHAO, Ru-Zhou et al. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. **International journal of molecular medicine**, v. 44, n. 1, p. 3-15, 2019.

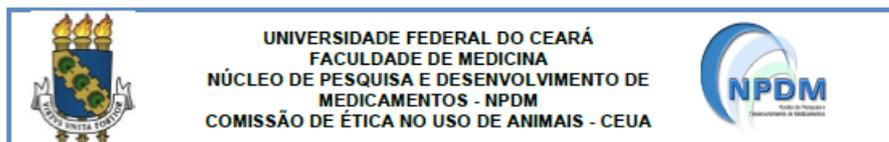
ZHENG, Xin; LI, Song; YANG, Hui. Roles of toll-like receptor 3 in human tumors. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 667454, 2021.

ZHONG, Bo et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. **Immunity**, v. 29, n. 4, p. 538-550, 2008.

ZINDEL, Joel; KUBES, Paul. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in immunity and sterile inflammation. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 15, p. 493-518, 2020.

ZINI, Gina; VISCOVO, Marcello. Cytomorphology of normal, reactive, dysmorphic, and dysplastic megakaryocytes in bone marrow aspirates. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 43, p. 23-28, 2021.

ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL (CEUA-NPDM)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "UM NOVO MODELO EXPERIMENTAL DE INTOXICAÇÃO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂) EM CAMUNDONGOS C57BL/6: PAPEL DA VIA REGULADA POR STING." registrada com o protocolo 24310522-0, sob a responsabilidade **Ronald Feitosa Pinheiro e Leticia Rodrigues Sampaio** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 18 / 08 / 2022.

We hereby certify that the project entitled "**A NEW EXPERIMENTAL MODEL OF HYDROGEN PEROXIDE (H₂O₂) POISONING IN C57BL/6 MICE: ROLE OF THE STING PATHWAY.**" identified by the protocol number 24310522-0, and conducted by **Ronald Feitosa Pinheiro and Leticia Rodrigues Sampaio** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of 08 / 18 / 2022.

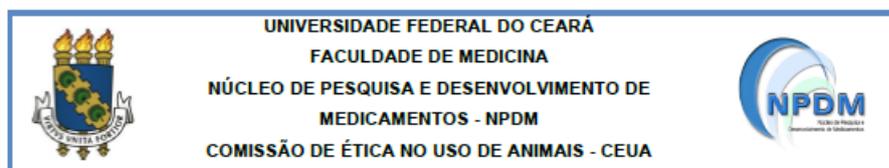
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: AGOSTO/2022 Fim: DEZEMBRO/2023
Espécie	Camundongo isogênico
Linhagem	C57BL/6
Nº de animais autorizados	72
Peso	20 a 25 gramas
Idade	2 a 4 meses
Sexo	36 Machos e 36 Fêmeas
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 19 de agosto de 2022

Documento assinado digitalmente:
LAIS LACERDA BRASIL DE OLIVEIRA
Data: 19/08/2022 18:50:46-0100
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
Universidade Federal do Ceará

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo - Fortaleza/CE - CEP 60430-275 - Tel: 55 (85) 3366-8338
Horário de atendimento: Segunda a Sexta, das 9h às 12h e das 13h30 às 18h. E-mail: ceua-npdm@ufc.br



PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ADENDO DO PROJETO DE PESQUISA APROVADO PELA CEUA-NPDM SOB Nº: 24310522-0 (Versão 05082022)

I. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO:

1. **Título:** UM NOVO MODELO EXPERIMENTAL DE INTOXICAÇÃO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂) EM CAMUNDONGOS C57BL/6: PAPEL DA VIA REGULADA POR STING.
2. **Pesquisador Responsável:** Ronald Feitosa Pinheiro
3. **Colaborador Principal:** Leticia Rodrigues Sampaio

II. OBJETO DO ADENDO: Acréscimo de 10 camundongos C57BL/6 fêmeas para realização de um protocolo piloto do projeto.

III. BREVE DESCRIÇÃO DO ADENDO: A aluna realizaria um processo de treinamento direcionado às metodologias que serão utilizadas no projeto aprovado. Por causa do cancelamento do treinamento devido a falta de insumos para sua realização em laboratório parceiro, solicita-se o acréscimo de 10 camundongos C57BL/6 fêmeas para realização de um protocolo piloto do projeto. O objetivo do piloto é para que se obtenha a adequabilidade de treinamento dos animais para a posterior realização do projeto. Através do piloto, será possível observar a melhor forma de executar o projeto previamente aprovado visando o bem estar animal, a confiabilidade na pesquisa e o cumprimento dos 3R's.

IV. PARECER DA CEUA: A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do NPDM da Universidade Federal do Ceará **APROVOU** O adendo referente ao projeto de pesquisa supracitado em reunião ordinária realizada em 29 de setembro de 2022.

Reiteramos que esse Parecer Substantiado só terá validade se apresentado juntamente com o Certificado de Aprovação do Projeto de Pesquisa objeto do adendo.

Fortaleza, 29 de setembro de 2022.

Documento assinado digitalmente
 LAIS LACERDA BRASIL DE OLIVEIRA
 Data: 29/09/2022 20:22:59 -0300
 Verifique em <https://verificador.jti.br>

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo - Fortaleza/CE - CEP 60430-275 - Tel: 55 (85) 3366-8338
 E-mail: ceua-npdm@ufc.br

ANEXO B - TERMO DE CONSECIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES *DDX41* E *STING* EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA.

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar.

O abaixo assinado, _____, _____ anos, RG nº _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro. O abaixo assinado está ciente de que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é estudar o material genético de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica gerando dados que favoreçam a uma melhor compreensão do surgimento e evolução clínica desta doença.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

A amostra biológica utilizada na presente pesquisa corresponde a medula óssea do indivíduo, que corresponde a um tecido líquido-gelatinoso que ocupa o interior dos ossos, sendo conhecida popularmente por 'tutano'. Na medula óssea são produzidos os componentes do sangue: as hemácias (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulosbrancos) e as plaquetas.

A coleta da medula óssea será realizada por médico hematologista experiente com agulha de mielograma mediante punção esternal. O osso do esterno é um osso chato, plano e ímpar localizado no centro do tórax. O osso do esterno é um importante osso hematopoético, ou seja, de produção das células sanguíneas. É neste osso que é realizada a punção da medula óssea.

Serão coletadas somente 8 mL de amostra de medula óssea com o uso de uma agulha específica para aspiração da medula óssea. Todo o procedimento de coleta da medula óssea é realizado mediante administração de anestésico local com duração máxima de 15 minutos. Após o procedimento, serão coletados dados pessoais de sexo e idade. É de sua responsabilidade: comparecer nas datas e horários informados e submeter-se aos procedimentos de rotina do serviço.

A coleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise

RISCOS DO PROCEDIMENTO

Durante o procedimento de coleta esternal da medula óssea, pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxeadada) ao redor do local de onde foi retirado a medula óssea, desaparecendo em poucos dias, e poderá ocorrer dor discreta e de fácil alívio, podendo ser, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local. Raramente, pode ocorrer infecção local. Para pacientes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral.

Em caso de dores mais fortes, entrar em contato com os responsáveis pela pesquisa pelo telefone (85) 981881972.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária, não havendo pagamento de nenhuma forma para os participantes e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento em que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador responsável ou a qualquer um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento nesta instituição.

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo, do não cumprimento das normas estabelecidas, de qualquer outro motivo que, a critério da pesquisadora, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes e, por fim, da suspensão do estudo como um todo. O Laboratório de Citogenômica do Câncer o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

BENEFÍCIOS DA PESQUISA

A presente pesquisa traz como benefício o fato de que estudos que avaliem o perfil de expressão gênica, proteica, metilação, cultura de células, análise do efeito do estresse oxidativo com o objetivo principal de desenvolvimento de novos fármacos para essa doença.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. Você não será identificado por ocasião da publicação dos resultados obtidos.

Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, ou autoridades do(s) órgãos(s) regulamentar(es) envolvido(s) terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, como o propósito de verificar os procedimentos e dados do estudo, sem, no entanto, violar a condição de que tais informações são confidenciais.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja algum imprevisto ou dúvidas, você deverá entrar em contato solicitar contato direto com o pesquisador responsável pelo estudo: Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (85- 981881972) ou com a aluna de graduação Letícia Rodrigues Sampaio (85-996956997)

Poderá contatar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará - UFC ou no local (Rua Coronel Nunes de Melo, 1000) ou pelo telefone 3366-8344, para apresentar recursos ou reclamações em relação ao estudo.

Somente assine este termo se você tiver a certeza de que recebeu todos os esclarecimentos e informações para decidir conscientemente sobre a sua participação neste estudo.

ASSINATURAS

Autorizo o acesso às minhas informações de saúde aos membros da equipe de pesquisadores, nas condições estabelecidas descritas nos itens acima.

Não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

Eu, por fim, declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após a assinatura, tive oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo e também sobre o referido estudo, recebendo explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmando estar livre e espontaneamente decidido a participar do estudo, ficando munido de uma via do documento assinado pelo pesquisador responsável.

____/____/____

Data

Assinatura do participante da pesquisa

____/____/____

Data

Assinatura do Pesquisador Responsável

____/____/____

Data

Assinatura do Responsável pela aplicação do TCLE