



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

HOWARD LOPES RIBEIRO JUNIOR

**ESTUDO DOS GENES RELACIONADOS A MECANISMOS DE REPARO EM
DANOS DE DNA EM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

FORTALEZA

2013

HOWARD LOPES RIBEIRO JUNIOR

**ESTUDO DOS GENES RELACIONADOS A MECANISMOS DE REPARO EM
DANOS DE DNA EM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, na Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- R369e Ribeiro Junior, Howard Lopes
 Estudo dos genes relacionados a mecanismos de reparo em danos de DNA em síndrome mielodisplásica/ Howard Lopes Ribeiro Junior. – 2013.
 112 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2013.
 Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

1. Síndromes Mielodisplásicas 2. Dano ao DNA 3. Polimorfismo Genético I.Título.
CDD 616.042

HOWARD LOPES RIBEIRO JUNIOR

**ESTUDO DOS GENES RELACIONADOS A MECANISMOS DE REPARO EM
DANOS DE DNA EM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, na Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Defesa em: 11 / 03 / 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro
Membro da Banca Avaliadora
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Silva Maria Meira Magalhães
Membro da Banca Avaliadora
Universidade Federal do Ceará

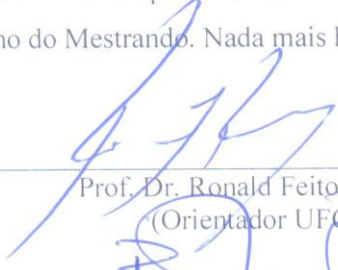
Dra. Paola Frassinetti Torres Ferreira da Costa
Membro da Banca Avaliadora
Universidade de Fortaleza



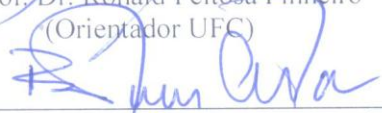
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **HOWARD LOPES RIBEIRO JÚNIOR**, REALIZADA NO DIA **ONZE DE MARÇO DE DOIS MIL E TREZE**.

1 Às **nove horas do dia onze de março do ano de dois mil e treze**, no Auditório Paulo Marcelo, da
2 Universidade Federal do Ceará, realizou-se a 28ª. Sessão de Defesa da Dissertação de Mestrado de autoria
3 de **HOWARD LOPES RIBEIRO JÚNIOR**. O trabalho tinha como título: **“ESTUDO DOS GENES**
4 **RELACIONADOS A MECANISMOS DE REPARO EM DANOS DE DNA EM SÍNDROME**
5 **MIELODISPLÁSICA”** Compunham a Banca Examinadora os professores doutores **RONALD FEITOSA**
6 **PINHEIRO** (orientador), **PAOLA FRASSINETTI TORRES FERREIRA DA COSTA**, **RONALDO**
7 **DE ALBUQUERQUE RIBEIRO E SILVIA MARIA MEIRA MAGALHÃES**. A sessão foi aberta pela
8 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas professora doutora **GEANNE**
9 **MATOS DE ANDRADE**, que apresentou a Banca Examinadora e passou a palavra ao orientador a fim de
10 que apresentasse o candidato. Após a exposição, seguiu-se o processo de arguição do Mestrando. O
11 primeiro examinador foi a professora doutora **Paola Frassinetti Torres Ferreira da Costa**. Logo após,
12 procederam à arguição os professores doutores **Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, Silvia Maria Meira**
13 **Magalhães e Ronald Feitosa Pinheiro**. Em seguida, a Banca Examinadora se reuniu reservadamente, a fim
14 de avaliar o desempenho do candidato. Por unanimidade, a Banca Examinadora considerou **APROVADO** o
15 trabalho do Mestrando. Nada mais havendo a relatar, a sessão foi encerrada às doze horas.



Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro
(Orientador UFC)



Profa. Dra. Paola Frassinetti Torres da Costa
(UNIFOR)



Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
(UFC)



Profa. Dra. Silvia Maria Meira Magalhães
(UFC)

*Aos meus pais, irmãos e noiva.
Ao Xeryck (in memoriam).
À minha amada avó (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me ensinar a cada dia a arte de viver com fé.

Aos meus pais **Howard Lopes Ribeiro** e **Edna Maria Gomes Tavares** e aos meus irmãos **Edgar Tavares de Assis Neto**, **Roberto Erick Tavares dos Santos** e **Guilherme Ribeiro Sampaio**, todos os **Familiares** e **Amigos** pela compreensão da minha ausência neste período de minha formação acadêmica, como também eterno amor e afeto. Também não iria faltar meu fiel amigo **Xeryck** que mesmo com seus 14 anos de existência nunca deixou um só dia de me esperar mesmo tarde da noite.

A minha amada noiva **Anne Jéssica Carvalho Rogério** pela paciência, carinho e amor em todos os momentos destes nossos mais de 6 anos de companheirismo.

A **Dra. Rossana Cordeiro de Aguiar** que com profissionalismo e sensibilidade encaminhou-me ao **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro**, meu orientador que, com todo respeito, agradeço por ter aceitado minha orientação, por todo empenho, sabedoria, compreensão, exigência e grande pesquisador que o é. Deus o abençoe sempre. Muito obrigado.

À **Profa. Dra. Silvia Maria Meira Magalhães**, que mesmo não a conhecendo o suficiente a admiro como uma brilhante profissional e pesquisadora na área de onco-hematologia.

Ao **Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas**, por aceitar participar da banca de qualificação desta dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro**, por prontamente aceitar participar da banca de defesa desta dissertação, apresentando, com sua grandiosa vivência científica, um novo e rico olhar sobre meus resultados.

À **Profa. Dra. Paola Frassinetti Torres Ferreira da Costa**, por suas substanciais contribuições em minha banca de defesa de dissertação, enriquecendo ainda mais os resultados obtidos neste trabalho.

A todos do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas**, em especial a **Ivone**, a **Rita** e a **Profa. Geane Matos de Andrade**, por seus excelentes trabalhos e auxílios essenciais neste trajeto e por manter a qualidade formativa deste programa. Meus sinceros agradecimentos.

Destaco meus sinceros agradecimentos a cada um que compõe o **Laboratório de Citogenômica do Câncer**:

À **Juliana Cordeiro de Sousa**, “doutorinha”, pela amizade, profissionalismo e todas as brincadeiras que tornaram os difíceis momentos de trabalho de pesquisa em alegres e inesquecíveis diversões. Muito obrigado medula óssea!

Ao **Allan Rodrigo Soares Maia, meu amigo!** por sua amizade deste os tempos de UECE, profissionalismo científico e mais que fundamental colaboração no meu projeto. Muito obrigado meu amigo!

Ao **Luiz Ivando Pires Ferreira Filho, “doutorzinho”,** pela competição? Poison X DNA Damage? Não. Sim, pela fantástica e maravilhosa amizade. Desejo sempre seu sucesso. Muito obrigado meu amigo.

À **Fabiola Fernandes Heredia,** meus sinceros agradecimentos por tua amizade, aceite em participar da banca de qualificação e disponibilidade em sempre ajudar-me com as amostras, análises de resultados e compreender ainda mais o complicado universo da Síndrome Mielodisplásica. Meu muito obrigado!

À **Geane Felix de Sousa,** companheira e amiga de luta na saga da pós-graduação, meu muito obrigado pelo apoio, confiança e contribuições!

A todas (o) estudantes de iniciação científica, **Raphael Gadelha Cavalcante, Julia Maria Saraiva Duarte, Izabelle Rocha Farias e Marília Braga Costa,** pela sincera amizade, trabalho árduo na realização dos exames citogenéticos e companheirismo em todos os momentos do mestrado. Meus sinceros agradecimentos!

Em especial, meu eterno agradecimento a minha amiga **Roberta Taiane Germano de Oliveira,** que me acompanha desde o início de sua graduação e que a cada dia me realizo em vê-la crescendo como pesquisadora. Meus sinceros agradecimentos.

À **Profa. Dra. Jacqueline Cunha da Serra Freire,** a **Profa. Dra. Andrea Gomes Linard,** a **Profa. Dra. Emília Soares Chaves,** e à todos meus amigos da **UNILAB** pela amizade, apoio, compreensão e profissionalismo. Meus sinceros agradecimentos!

Em especial, destaco meus agradecimentos ao meu novo e, se Deus quiser, eterno amigo, **Prof. Dr. Washington Araújo Barros Nepomuceno,** por sua amizade e conselhos. Cara, muito obrigado mesmo!

Meus sinceros agradecimentos ao meu grande amigo **Carlos Victor Montefusco Pereira,** que mesmo com a distância (ou Europa ou Manaus) sempre está presente com seus conselhos, apoio e grandiosa amizade.

Ao **CNPq,** pelo auxílio financeiro por boa parte de minha vida Acadêmico-Científica.

A todos os **Pacientes,** participantes desta pesquisa, fundamentais neste novo passo na minha formação como pesquisador. Deus abençoe cada um de vocês.

A **Vida,** por me ensinar que o ontem eu devo esquecer, que o hoje eu devo existir e que para o amanhã eu nunca devo deixar de sonhar.

“O Homem que deseja ser Cientista e à Ciência dedicar seu tempo e amor tem ao menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como pouca gente).

(Prof. Newton Freire, Departamento de Genética, UFPR)

“Totus Tuus”

(Santíssimo Papa João Paulo II)

RESUMO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é um grupo de doenças clonais das células progenitoras hematopoéticas, caracterizadas por citopenia(s) periférica(s), displasia de uma ou mais linhagens celulares mielóides e aumento do risco de desenvolvimento de leucemia mielóide aguda. A SMD é considerada uma doença de pessoas idosas, pois aproximadamente 80% dos pacientes possuem mais de 60 anos ao diagnóstico. São raras na infância, sendo observadas em menos de 5% das neoplasias hematológicas que acometem pacientes com menos de 14 anos de idade. A patogênese da SMD envolve danos no DNA nas células tronco hematopoéticas acometido provavelmente pelos danos de fita dupla (DSB) no DNA tendo o processo de junções por extremidades não-homólogas (JENH) e recombinação homóloga como principais mecanismos de reparo necessários para garantir a estabilidade genômica das células-tronco. Este estudo de coorte propôs avaliar a associação dos polimorfismos *BRCA1* rs4793191, *BRCA2* rs9567623 e *RAD51* rs1801320, atuantes no mecanismo de Recombinação Homóloga; o *XRCC5* rs3835, *XRCC6* rs2267437 e *LIG4* rs1805388 relacionados ao mecanismo de Junções por Extremidades não-Homólogas e, por fim, o *ATM* rs228593, um sensor molecular ao dano em DSB. Esta análise de genotipagem baseou-se na metodologia de PCR-RFLP, entre amostras de medula óssea de 60 pacientes com SMD, oriundos do Hospital Universitário Walter Cantídio, e 82 amostras de sangue periférico de idosos voluntários sadios. Os pacientes com SMD foram diagnosticados de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde. Os genótipos dos polimorfismos estudados encontravam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$), exceto o polimorfismo rs1805388 para o gene *LIG4*. Nossos resultados apresentaram para o polimorfismo rs228593 do gene *ATM* uma associação do genótipo heterozigoto A/G ($p = 0,008$, OR 0,225, IC 0,075-0,680) com diminuição de risco para SMD adicionada com associação do genótipo A/G com as variáveis clínicas de citopenia ($p = 0,032$, OR 5,250, IC 1,151-23,937), na faixa de 0-1 citopenias no sangue periférico, e com prognóstico favorável para o índice prognóstico do IPSS ($p < 0,001$, OR 21,95, IC 29,791-16,185). Para o polimorfismo rs2267437 para o gene *XRCC6* relacionamos o genótipo mutante C/G e C/G+G/G com a variável celularidade na medula óssea na faixa de normocelular + hipercelular ($p = 0,023$, OR 5,556, IC 1,270-24,239). Para o polimorfismo rs3835 do gene *XRCC5* identificamos que o genótipo A/G está altamente associado com a diminuição de risco para SMD ($p < 0,001$, OR 0,100, IC 0,035-0,289). Para o polimorfismo rs1801320 do gene *RAD51*, associamos o genótipo heterozigoto mutante G/C com diminuição de risco para SMD ($p = 0,053$, OR 0,453, IC 0,203-1,009). Adicionalmente, associamos o genótipo selvagem G/G com a variável idade ($p < 0,001$, OR 24,521, IC 64,033-93,907), na faixa de maior que 60 anos de idade, e com a variável citopenia (0-1 citopenias) ($p < 0,001$, OR 16,099, IC 31,299-82,808). Não obtivemos associação significativa entre os polimorfismos rs 4793191, rs9567623 e rs1805388 para os genes *BRCA1*, *BRCA2* e *LIG4*, respectivamente, e as variáveis clínicas para os pacientes com SMD. Neste estudo demonstramos que os genes relacionados a DSB são também relacionados à patogênese da SMD. Estes resultados suportam a importância dos polimorfismos rs228593, rs3835, rs2267437 e rs1801320 para os genes *ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* e o *RAD51*, respectivamente, na manutenção da estabilidade genômica promovendo um melhor entendimento da gênese e etiologia da Síndrome Mielodisplásica.

Palavras – chave: Síndrome Mielodisplásica. Lesões no DNA. Fita Dupla. Mecanismos de Reparo. Polimorfismo.

ABSTRACT

Myelodysplastic Syndrome (MDS) is a group of diseases of clonal hematopoietic progenitor cells, characterized by cytopenia (s) peripheral (s), dysplasia of one or more myeloid cell lineages and increased risk for development of acute myeloid leukemia. MDS is considered a disease of older people, because approximately 80% of patients have more than 60 years at diagnosis. Are rare in children, being observed in less than 5% of hematologic malignancies that affect patients under 14 years of age. The pathogenesis of MDS involves DNA damage in hematopoietic stem cells probably affected by Double-Strand Break (DSB) in the process of Non-homologous end join (NHEJ) and homologous recombination (HR) repair mechanisms as key for ensuring genomic stability of cells trunk. This cohort study proposed evaluate the association between rs4793191, rs9567623 and rs1801320 polymorphisms of the *BRCA1*, *BRCA2* and *RAD5* genes, acting on the HR mechanism; the rs3835, rs2267437 and rs1805388 of the *XRCC5*, *XRCC6* and *LIG4*, related with NHEJ mechanism and, finally, *ATM* rs228593 as molecular sensor damage in DSBs. This genotyping analysis was based on the methodology of PCR-RFLP, between bone marrow samples of 60 patients with MDS, from the University Hospital Walter Cantidio, and 82 peripheral blood samples of elderly healthy volunteers with approval in the CEP / HUWC under protocol No. 027.04.12. The MDS patients were diagnosed by examination of bone marrow and bone marrow cytogenetic analysis technique by G band. The genotypes studied polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$), except for the rs1805388 polymorphism in *LIG4* gene. Our results showed for the rs228593 polymorphism of the *ATM* gene association with low-risk MDS for genotype A / G ($p = 0.008$, OR 0.225, CI 0.075 to 0.680) with added association of genotype A/G with the clinical variables of cytopenia ($p = 0.032$, OR 5.250, CI 1.151 to 23.937), in the range of 0-1 in peripheral blood cytopenias, and with favorable prognosis in IPSS ($p < 0.001$, OR 21.95, CI 29.791 to 16.185). For the rs2267437 polymorphism in the gene *XRCC6* relate the mutant genotype C / C and G / G + G / G with variable marrow cellularity in the range of normocellular + hypercellular ($p = 0.023$, OR 5.556 CI 1.270 to 24.239). For the genotypes of rs3835 polymorphism of the *XRCC5* gene identify the genotype A / G is highly associated with low-risk MDS ($p < 0.001$, OR 0.100, CI 0.035 to 0.289). Additionally, for the rs1801320 polymorphism of the gene *RAD51*, we associate the mutant heterozygous genotype G/C with low-risk MDS ($p = 0.053$, OR 0.453, CI 0.203 to 1.009). For the same polymorphism, we associate the wild genotype G / G with variable age ($p < 0.001$, OR 24.521, CI 64.033 to 93.907), in the range of greater than 60 years old, and with the variable cytopenia (0-1 cytopenias) ($p < 0.001$, OR 16.099, CI 31.299 to 82.808). We did not obtain significant association between polymorphisms rs 4793191, rs9567623 and rs1805388 for the genes *BRCA1*, *BRCA2* and *LIG4*, respectively, and clinical variables for patients with MDS. In this study we demonstrate that genes related to DSB are also related to the pathogenesis of MDS. These results support the importance of polymorphisms rs228592, rs3835, rs2267437 and rs1801320 in the *ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* and *RAD51* genes, respectively, in the maintenance of genomic stability by promoting a better understanding of the genesis and etiology of myelodysplastic syndrome.

Key-Words: Myelodysplastic Syndrome. Lesions in DNA. Double strand. Repair Mechanisms. Polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Apresentação esquemática dos tipos de mecanismos de reparo em danos de fita simples (SSB). **32**
- Figura 2:** Apresentação esquemática dos mecanismos de reparo de junções por extremidades não homólogas (NHEJ) e recombinação homóloga (HR) em danos de fita dupla no DNA (DSBs). **36**
- Figura 3:** Apresentação esquemática do mecanismo de reparo por recombinação homóloga (HR) apresentando os principais genes atuantes e os respectivos polimorfismos analisados no presente estudo. **40**
- Figura 4:** Apresentação esquemática do mecanismo de reparo por junções por extremidades não homólogas (NHEJ) apresentando os principais genes atuantes e os respectivos polimorfismos analisados no presente estudo. **41**
- Figura 5:** Organograma resumo das metodologias utilizadas neste estudo. **48**
- Figura 6:** Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo normal 46,XY[6] de prognóstico favorável de acordo com a classificação do IPSS (GREENBERG et al., 1997). **53**
- Figura 7:** Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo alterado 46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17] de prognóstico favorável de acordo com a classificação do IPSS (GREENBERG et al., 1997). **54**
- Figura 8:** Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo alterado 47,XY,+8[4]/46,XY[5] de prognóstico intermediário de acordo com a classificação do IPSS (GREENBERG et al., 1997). **55**
- Figura 9:** Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo alterado 47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2] de prognóstico desfavorável de acordo com a classificação do IPSS (GREENBERG et al., 1997). **56**
- Figura 10:** Representação do cromossomo 11 e a indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs228593 do gene *ATM*. Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ATM>. **58**
- Figura 11:** **A)** Gel de eletroforese 1,5% de agarose em tampão TAE 1X. Representação dos *spots* de PCR resultantes da amplificação de uma região de 264pb do gene *ATM*. **B)** Gel de Eletroforese 3,0% de agarose em tampão TAE 1X. Detecção dos genótipos na análise do SNP rs228593 do gene *ATM*. O produto de PCR foi digerido a partir da enzima de restrição *Bcl I* por 3 horas a 60°C. As linhas 2, 5, 6, 7, 8, 12, 13 e 15 apresentam o perfil homozigótico selvagem (GG); as linhas 3, 4, 9, 14 e 15 apresentam o perfil heterozigótico (GA) e as linhas 10 e 11 apresentam o perfil homozigótico mutante (AA). A linha M consiste no marcador **59**

de peso molecular de 100pb.

Figura 12: Representação do cromossomo 22 e indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs2267437 do gene *XRCC6*. Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/> **62**

Figura 13: **A)** Gel de eletroforese 1,5% de agarose em tampão TAE 1X. Representação dos *spots* de PCR resultantes da amplificação de uma região de 320pb do gene *XRCC6*. **B)** Gel de eletroforese 3,0% de agarose em tampão TAE 1X. Detecção dos genótipos na análise do SNP rs2267437 do gene *XRCC6*. O produto de PCR foi digerido a partir da enzima de restrição *Ban I* por 3 horas a 63°C. As linhas 2, 3, 5, 7 e 10 apresentam o perfil homocigótico selvagem (CC); as linhas 4, 8 e 9 apresentam o perfil heterocigótico (CG) e as linhas 6 e 11 apresentam o perfil homocigótico mutante (GG). A linha M consiste no marcador de peso molecular de 100pb. **64**

Figura 14: Representação do cromossomo 2 e indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs3835 do gene *XRCC5*. Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ATM>. **67**

Figura 15: **A)** Gel de eletroforese 1,5% de agarose em tampão TAE 1X. Representação dos *spots* de PCR resultantes da amplificação de uma região de 151pb do gene *XRCC5*. **B)** Gel de Eletroforese 3,0% de agarose em tampão TAE 1X. Detecção dos genótipos na análise do SNP rs3835 do gene *XRCC5*. O produto de PCR foi digerido a partir da enzima de restrição *Alu I* por 3 horas a 52°C. A linha 13 apresenta o perfil homocigótico selvagem (AA); as linhas 2-10, 12, 14 e 15 apresentam o perfil heterocigótico (AG) e a linha 11 apresenta o perfil homocigótico mutante (GG). A linha M consiste no marcador de peso molecular de 100pb. **68**

Figura 16: Representação do cromossomo 13 e indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs1805388 do gene *LIG4*. Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/LIG4> **71**

Figura 17: **A)** Gel de eletroforese 1,5% de agarose em tampão TAE 1X. Representação dos *spots* de PCR resultantes da amplificação de uma região de 121pb do gene *LIG4*. **B)** Gel de eletroforese 3,0% de agarose em tampão TAE 1X. Detecção dos genótipos na análise do SNP rs1805338 do gene *LIG4*. O produto de PCR foi digerido a partir da enzima de restrição *HpyCH4III* por 3 horas a 52°C. As linhas 2, 4-7, 9 e 12 apresenta o perfil homocigótico selvagem (TT) e as linhas 3, 8, 10, 11 E 13 apresentam o perfil heterocigótico (TC). Não houve frequência do perfil homocigótico mutante (CC) nas amostras analisadas. A linha M consiste no marcador de peso molecular de 100pb. **72**

Figura 18: Representação do cromossomo 15 e indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs1801320 do gene *RAD51*. Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/RAD51>. **74**

Figura 19: A) Gel de eletroforese 1,5% de agarose em tampão TAE 1X. Representação dos *spots* de PCR resultantes da amplificação de uma região de 157pb do gene *RAD51*. B) Gel de eletroforese 3,0% de agarose em tampão TAE 1X. Detecção dos genótipos na análise do SNP rs1801320 do gene *RAD51*. O produto de PCR foi digerido a partir da enzima de restrição *BstN I* por 10 horas a 60°C. As linhas 2, 3, 5, 6, 8, 10-12, 14 e 15 apresenta o perfil homozigótico selvagem (GG); as linhas 7, 9, 13 e 14 apresentam o perfil heterozigótico (GC) e a linha 4 apresentam o perfil homozigótico mutante (CC). A linha M consiste no marcador de peso molecular de 100pb. **76**

Figura 20: Representação do cromossomo 17 e indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs4793191 do gene *BRCA1*. Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA1>. **79**

Figura 21: A) Gel de eletroforese 1,5% de agarose em tampão TAE 1X. Representação dos *spots* de PCR resultantes da amplificação de uma região de 401pb do gene *BRCA1*. B) Gel de eletroforese 3,0% de agarose em tampão TAE 1X. Detecção dos genótipos na análise do SNP rs4793191 do gene *BRCA1*. O produto de PCR foi digerido a partir da enzima de restrição *PstI* por 3 horas a 37°C. A linha 15 apresenta o perfil homozigótico Selvagem; as linhas 10, 12 e 14 apresentam perfil heterozigótico (GC) e as linhas 2-9, 11, 13 e 16 apresentam o perfil homozigótico mutante (GG). A linha M consiste no marcador de peso molecular de 100pb. **80**

Figura 22: Representação do cromossomo 13 e indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs9567623 do gene *BRCA2*. Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA2>. **82**

Figura 23: A) Gel de eletroforese 1,5% de agarose em tampão TAE 1X. Representação dos *spots* de PCR resultantes da amplificação de uma região de 265pb do gene *BRCA2*. B) Gel de eletroforese 3,0% de agarose em tampão TAE 1X. Detecção dos genótipos na análise do SNP rs9567623 do gene *BRCA2*. O produto de PCR foi digerido a partir da enzima de restrição *HhaI* por 3 horas a 37°C. A linha 2, 3, 6-9 e 11-14 apresenta o perfil homozigótico Selvagem (CC); as linhas 4-5, 10 apresentam perfil heterozigótico (CT) e as linhas 15 apresentam o perfil homozigótico mutante (TT). A linha M consiste no marcador de peso molecular de 100pb. **83**

Figura 24: Representação esquemática dos resultados obtidos neste estudo. **93**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Taxa de incidência de Síndrome Mielodisplásica nos EUA por idade ao diagnóstico, no período de 2004-2008. **22**
- Tabela 2:** Evolução na classificação da Síndrome Mielodisplásica. **25**
- Tabela 3:** Descrição dos primers de cada polimorfismo, temperaturas de anelamento, tamanho do produto de PCR, respectiva enzima e referência para cada polimorfismo analisado. **47**
- Tabela 4:** Citogenética, IPSS (1997) e classificação OMS (2008) ao diagnóstico dos pacientes com SMD. **51**
- Tabela 5:** Genótipos, distribuição alélica e equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles para o SNP *rs228593* do gene *ATM*. **58**
- Tabela 6:** Regressão logística multinominal para associar os genótipos do SNP *rs228593* do gene *ATM* entre o grupo controle e o de pacientes com SMD. **59**
- Tabela 7:** Associação da frequência gênica do SNP *rs228593* do gene *ATM* entre os aspectos clínico-demográficos nos pacientes com SMD. **61**
- Tabela 8:** Regressão logística multinominal para correlacionar o genótipo do SNP *rs228593* do gene *ATM* com os padrões de citopenias no grupo de pacientes com SMD. **60**
- Tabela 9:** Regressão logística multinominal para correlacionar o genótipo do SNP *rs228593* do gene *ATM* com os grupos de risco do IPSS (1997) no grupo de pacientes com SMD. **60**
- Tabela 10:** Genótipos, distribuição alélica e equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles para o SNP *rs2267437* do *XRCC6*. **63**
- Tabela 11:** Associação da frequência gênica do SNP *rs2267437* do gene *XRCC6* entre os aspectos clínico-demográficos nos pacientes com SMD. **65**
- Tabela 12:** Regressão logística multinominal para correlacionar o genótipo do SNP *rs2267437* do gene *XRCC6* com as classificações obtidas na análise citogenética no grupo de pacientes com SMD. **66**
- Tabela 13:** Regressão logística multinominal para correlacionar o genótipo do SNP *rs2267437* do gene *XRCC6* com as classificações obtidas na análise da celularidade da medula óssea no grupo de pacientes com SMD. **66**

Tabela 14: Genótipos, distribuição alélica e equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles para o SNP <i>rs3835</i> do gene <i>XRCC5</i> .	68
Tabela 15: Regressão logística multinominal para associar os genótipos do SNP <i>rs3835</i> do gene <i>XRCC5</i> entre o grupo controle e o de pacientes com SMD.	69
Tabela 16: Associação da frequência gênica do SNP <i>rs3835</i> do gene <i>XRCC5</i> entre os aspectos clínico-demográficos nos pacientes com SMD.	70
Tabela 17: Genótipos, distribuição alélica e equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles para o SNP <i>rs1805388</i> do gene <i>LIG4</i> .	72
Tabela 18: Associação da frequência gênica do SNP <i>rs1805388</i> do gene <i>LIG4</i> entre os aspectos clínico-demográficos nos pacientes com SMD.	73
Tabela 19: Genótipos, distribuição alélica e equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles para o SNP <i>rs1801320</i> do gene <i>RAD51</i> .	75
Tabela 20: Regressão logística multinominal para associar os genótipos do SNP <i>rs1801320</i> do gene <i>RAD51</i> entre o grupo controle e o de pacientes com SMD.	75
Tabela 21: Associação da frequência gênica do SNP <i>rs1801320</i> do gene <i>RAD51</i> entre os aspectos clínico-demográficos nos pacientes com SMD.	77
Tabela 22: Regressão logística multinominal para correlacionar o genótipo do SNP <i>rs1801320</i> do gene <i>RAD51</i> com as variáveis de idade no grupo de pacientes com SMD.	78
Tabela 23: Regressão logística multinominal para correlacionar o genótipo do SNP <i>rs1801320</i> do gene <i>RAD51</i> com os padrões de citopenias no grupo de pacientes com SMD.	78
Tabela 24: Genótipos, distribuição alélica e equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles para o SNP <i>rs4793191</i> do gene <i>BRCA1</i> .	80
Tabela 25: Associação da frequência gênica do SNP <i>rs4793191</i> do gene <i>BRCA1</i> entre os aspectos clínico-demográficos nos pacientes com SMD.	81
Tabela 26: Genótipos, distribuição alélica e equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles para o SNP <i>rs9567623</i> do gene <i>BRCA2</i> .	83
Tabela 27: Associação da frequência gênica do SNP <i>rs9567623</i> do gene <i>BRCA2</i> entre os aspectos clínico-demográficos nos pacientes com SMD.	84

LISTA DE ABREVIATURAS

SMD	<i>Síndrome Mielodisplásica</i>
MO	<i>Medula Óssea</i>
DNA	<i>Ácido desoxrrribonucléico</i>
cDNA	<i>DNA Complementar</i>
RNA	<i>Ácido ribonucléico</i>
C	<i>Citosina</i>
G	<i>Guanina</i>
T	<i>Timina</i>
A	<i>Adenina</i>
SEERS	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
LMA	<i>Leucemia Mielóide Aguda</i>
LMC	<i>Leucemia Mielóide Crônica</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
DNA PKs	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
Braço q	<i>Braço longo de um cromossomo</i>
Braço p	<i>Braço curto de um cromossomo</i>
FAB	<i>Grupo Fracês-Americano-Britânico</i>
OMS	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
IPSS	<i>International Prognostic Score Systems</i>
5q-	<i>Síndrome de deleção do braço longo do cromossomo 5</i>
AREB I	<i>Anemia Refratária com Excesso de Blastos tipo I</i>
AREB II	<i>Anemia Refratária com Excesso de Blastos tipo II</i>
CRDM	<i>Citopenia refratária com displasia multilinear</i>
AR	<i>Anemia Refratária</i>
ARSA	<i>Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSB	<i>Single Strand Break</i>
DSB	<i>Double Strand-Break</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End-Join</i>
HR	<i>Homologous Recombination</i>
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>

BER	<i>Base Excision Repair</i>
MMR	<i>Mismatch Repair</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
PIK3	<i>Fosfatidilinositol 3-quinases</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutada</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia Mutada dependente de RAD</i>
BRCA1	<i>Breast cancer Type I</i>
BRCA2	<i>Breast cancer Type II</i>
RAD51	<i>Radiation-Sensitive Yeast Mutations</i>
XRCC5	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5</i>
XRCC6	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6</i>
DNA LIG4	<i>DNA Ligase tipo IV</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
MRE11	<i>Meiotic Recombination 11</i>
NBS1	<i>Nijmegen Breakage Syndrome type 1</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
NaOH	<i>Hídrexido de sódio</i>
KCl	<i>Cloreto de Potássio</i>
MgCl	<i>Cloreto de Magnésio</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
UV	<i>Luz Ultravioleta</i>
UV-A	<i>Luz Ultravioleta Tipo A</i>
UV-B	<i>Luz Ultravioleta Tipo B</i>
UV-C	<i>Luz Ultravioleta Tipo C</i>
RI	<i>Radiação Infravermelho</i>
RPM	<i>Rotações por minuto</i>
M	<i>Molar</i>
OR	<i>Odds-Ratio</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Aspectos gerais a cerca das Síndromes Mielodisplásicas (SMDs)	21
1.1.1	Incidência das SMDs	21
1.1.2	Etiologia das SMDs	23
1.1.3	Classificação das SMDs	23
1.1.4	Patogênese das Síndrome Mielodisplásicas	26
1.1.5	Citogenética e as Síndrome Mielodisplásicas	27
1.2	Lesões no DNA	29
1.3	Mecanismo de reparo ao dano no DNA	30
1.3.1	Lesões de Fita Dupla no DNA (<i>Double-Strand Breacks</i>)	32
1.3.1.1	Junção por Extremidades Não Homólogas (NEHJ)	33
1.3.1.2	Recombinação Homóloga (HR)	34
1.4	Genes de Reparação de DNA e seus Polimorfismos	37
2	OBJETIVOS	42
2.1	Objetivo geral	42
2.2	Objetivos específicos	42
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1	Aspectos éticos	43
3.2	Obtenção de amostras de origem clínica	43
3.3	Cariótipo por Banda G	43
3.4	Genotipagem por PCR-RFLP	44
3.4.1	Extração de DNA Genômico	44
3.4.2	PCR-RFLP	45

3.5	Variáveis analisadas e Análises estatísticas	45
3.6	Fontes de financiamento	46
4	RESULTADOS	49
4.1	Caracterização dos pacientes	49
4.2	Análise dos polimorfismos por PCR-RFLP	57
4.2.1	Análise do polimorfismo rs228593 do gene <i>ATM</i>	57
4.2.2	Análise do polimorfismo rs2267437 para o gene <i>XRCC6</i>	62
4.2.3	Análise do polimorfismo rs3835 para o gene <i>XRCC5</i>	67
4.2.4	Análise do polimorfismo rs1805388 para o gene <i>LIG4</i>	71
4.2.5	Análise do polimorfismo rs1801320 para o gene <i>RAD51</i>	74
4.2.6	Análise do polimorfismo rs4793191 para o gene <i>BRCA1</i>	78
4.2.7	Análise do polimorfismo rs9567623 para o gene <i>BRCA2</i>	82
5	DISCUSSÃO	85
6	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS	94
	APÊNDICE A	106
	APÊNDICE B	109
	APÊNDICE C	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais das Síndromes Mielodisplásicas (SMDs)

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é um grupo de doenças clonais das células progenitoras hematopoéticas caracterizadas por citopenia(s), displasia de uma ou mais linhagens celulares e aumento do risco de desenvolvimento de leucemia mieloide aguda (LMA) (BRUNNING et al., 2008). A SMD consiste na neoplasia primária de medula óssea mais comum no mundo ocidental em indivíduos com idade superior a 60 anos (MUFTI et al., 2008).

Alterações na proliferação, maturação e apoptose das células tronco hematopoéticas provocam hematopoese ineficaz, uma condição na qual a medula óssea (MO) é incapaz de produzir e liberar um número adequado de células maduras para o sangue periférico (YOSHIDA, 2007; HELLSTROM-LINDBERG et al., 2008). A hematopoese ineficaz é atribuída à uma suscetibilidade anormal à apoptose nas células progenitoras e à capacidade de resposta limitada dessas células a fatores de crescimento (TEFFERI; VARDIMAN, 2009).

As consequências da insuficiência medular são as citopenias periféricas, que frequentemente envolvem as três linhagens de células sanguíneas (eritróide, granulocítica e megacariocítica) e provocam graus variáveis de anemia, neutropenia e trombocitopenia (ECONOMOPOULOU et al., 2008). As citopenias do sangue periférico em combinação com MO hiper celular e displasia são achados característicos das SMD (HOFMANN; NOLTE, 2007). As citopenias podem levar à dependência de transfusões e aumentar a susceptibilidade a infecções e hemorragias (GREENBERG et al., 1997; FENAUX et al., 2004).

1.1.1 Incidência da SMD

A SMD é considerada uma doença de pessoas idosas, pois aproximadamente 80% dos pacientes possuem mais de 60 anos ao diagnóstico (STROM; VELEZ-BRAVO; ESTEY, 2008). É raras na infância, sendo observadas em menos de 5% das neoplasias hematológicas que acometem pacientes com menos de 14 anos de idade (HASLE et al., 2003).

A SMD está entre as doenças hematológicas mais comuns na população idosa, porém, as mudanças na classificação, a falta de inclusão nos registros populacionais e a resistência de alguns médicos em coletar MO de idosos, comprometem a fidelidade dos dados e dificulta o estabelecimento da incidência, além da comparação entre as diferentes

frequências populacionais (GERMING et al., 2008; STROM; VELEZ-BRAVO; ESTEY, 2008). A incidência anual está estimada em mais de 25 casos por 100.000 pessoas e aumenta com a idade, conforme apresentado na tabela 1 (HELLSTROM-LINDBERG et al., 2008).

Tabela 1: Taxa de incidência de Síndrome Mielodisplásica nos EUA por idade ao diagnóstico, no período de 2004-2008.

Idade ao Diagnóstico	Ambos os Sexos		Masculino		Feminino	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<40	362	0.2	190	0.2	172	0.2
40-49	465	0.8	212	0.7	253	0.9
50-59	1221	2.5	668	2.8	553	2.2
60-69	2619	9.2	1477	11.0	1142	7.6
70-79	5149	27.1	3021	36.6	2128	19.8
>80	6414	49.8	3480	77.5	2934	35.2

Fonte: Adaptado de SEER (2012).

Pesquisadores dos Estados Unidos, em 2007, relataram uma incidência anual de 5,4 a 36,2/100.000 em pessoas entre 60 e 84 anos. Segundo os autores, 86,4% dos pacientes diagnosticados tinham mais de 60 anos e apenas 6% menos de 50 anos (MA, 2007). De acordo com dados do programa americano SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*), cerca de 12.000 e 20.000 pacientes com SMD são diagnosticados por ano nos Estados Unidos e na Comunidade Européia, respectivamente. Estes dados indicam que existe um número significativamente maior de casos de SMD do que de leucemias agudas e de doenças mieloproliferativas (GERMING et al., 2008; STROM; VELEZ-BRAVO; ESTEY, 2008).

O primeiro levantamento de SMD no Brasil foi estimado por Magalhães et al. (2010). Neste estudo, foi apresentado o Registro Brasileiro de Síndromes Mielodisplásicas - Aspectos demográficos, clínico-patológicos e terapêuticos em centros de atenção terciária, elaborado com base em estudo realizado com 476 pacientes com SMD em tratamento em 12 centros das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil, diagnosticados no período de 1º de janeiro de 2003 a 31 de dezembro de 2007 (MAGALHÃES et al., 2010). Um dos principais pontos abordados no estudo mostrou que a idade mediana do diagnóstico dos pacientes com SMD foi de 68,3 anos, número menor que observado nos EUA e Europa, mas

muito similar a Japão e Coréia. Destes, 50,8% eram mulheres e 86,6% residentes em zona urbana (MAGALHÃES et al., 2010).

1.1.2 Etiologia da SMD

A SMD é classificada como primária ou *de novo* e secundária ou relacionada com a terapia (t-SMD). As SMD primárias constituem a maioria dos casos e ocorrem sem um evento prévio, enquanto as SMD secundárias desenvolvem-se após um evento mutagênico conhecido (LI et al., 2009).

As t-SMD podem surgir em qualquer idade, geralmente 4-5 anos depois do início de quimioterapia ou radioterapia. A percentagem de anomalias citogenéticas e o risco de transformação em leucemia aguda são significativamente mais elevados nas t-SMD do que na SMD primária. Uma pequena proporção de doentes com SMD, cerca de 4-5%, pode desenvolver transformação blástica em locais extramedulares (sarcoma granulocítico), particularmente na pele, estando esta evolução associada a mau prognóstico (NAEIM; RAO; GRODY, 2008).

Os estudos epidemiológicos têm identificado consistentemente diversos fatores de risco para o acometimento das SMDs tais como o tabaco, exposição ao benzeno e outros solventes orgânicos, agentes químicos agrícolas (pesticidas, herbicidas e fertilizantes), radiações ionizantes, sexo masculino e história familiar de neoplasias hematológicas (JÄDERSTEN; HELLSTRÖM-LINDBERG, 2008; BRUNNING et al., 2008).

Algumas doenças hematológicas, tais como anemia de Fanconi, disqueratose congênita, síndrome de Shwachmann-Diamond e síndrome de Diamond-Blackfan estão também associadas a um risco aumentado de SMD (BRUNNING et al., 2008). Adicionalmente, a exposição a drogas citotóxicas, em particular agentes alquilantes e inibidores da topoisomerase II ou a radiações terapêuticas, está associada a um risco aumentado de desenvolvimento de t-SMD (AUL; GATTERMANN; SCHNEIDER, 1995; JÄDERSTEN; HELLSTRÖM-LINDBERG, 2008).

1.1.3 Classificação da SMD

Vários sistemas de classificação têm sido desenvolvidos com o objetivo de estimar a sobrevida e o risco de transformação para LMA após o diagnóstico de SMD (Tabela 2). A primeira classificação foi proposta pelo Grupo FAB, em 1982 (BENNETT et al., 1982). De

acordo com esta classificação, os pacientes eram diagnosticados com SMD quando apresentavam MO displásica e/ou com 5 a 30% de mieloblastos (BENNETT et al., 1982).

Com base no percentual de blastos presentes no sangue periférico (SP) e na MO, na presença de sideroblastos em anel na MO e no número de monócitos circulantes no SP, foram diferenciados cinco subtipos: anemia refratária (AR), AR com sideroblastos em anel (ARSA), AR com excesso de blastos (AREB), AREB em transformação (AREB-t) e Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC) (BENNETT et al., 1982). O sistema FAB serviu como modelo padrão de classificação para SMD por duas décadas. No entanto, o prognóstico dos pacientes classificados no mesmo subgrupo era muito variável para se estimar a sobrevida ou o risco de transformação para LMA (MUFTI et al., 2008).

Com o objetivo de estratificar os grupos de risco em relação à sobrevida global e à tendência para evolução para LMA, em 1997 foi desenvolvido um novo sistema de classificação, o sistema IPSS (*International Prognostic Score Systems–IPSS*) (GREENBERG et al., 1997).

O IPSS foi derivado de um modelo de progressão baseado em 816 pacientes com SMD primária avaliados em sete estudos prévios. O sistema de pontuação considera a porcentagem de blastos da MO medida em quatro faixas, o número de citopenias periféricas e o cariótipo dividido em três categorias. O valor de IPSS é obtido pela somatória dos valores individuais das três variáveis. Como resultado, os pacientes são estratificados em quatro grupos de risco: baixo (pontuação 0), Intermediário-I (pontuação de 0,5-1), intermediário-II (pontuação de 1,5-2) e elevado (pontuação > 2). Os quatro grupos mostram diferenças significativas na sobrevida global e no risco de transformação para LMA. A sobrevida média varia de 5,7 anos para pacientes de baixo risco a 0,4 anos para pacientes de risco elevado (GREENBERG et al., 1997)

Em 1999, um comitê da Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs modificação na classificação FAB original para melhorar o valor prognóstico da SMD e incorporou características biológicas e genéticas (JAFFE et al., 2001) (Tabela 2). Nesta classificação, a porcentagem de blastos na MO utilizada para o diagnóstico de LMA foi mudada de 30 para 20%. Foram excluídos os subtipos AREB-t e LMMC; este último foi considerado um quadro intermediário entre SMD e doenças mieloproliferativas crônicas, junto com a leucemia mielomonocítica juvenil e a leucemia mielóide crônica atípica. Também, foi criado o subtipo citopenia refratária com displasia em múltiplas linhagens (CRDM), com maior grau de insuficiência medular e curso mais agressivo. A síndrome 5q- foi definida como um novo subtipo e a AREB foi dividida em 1 e 2, de acordo com a porcentagem de blastos na MO

(JAFFE et al., 2001). A classificação proposta pela OMS foi atualizada em setembro de 2008 e algumas mudanças foram realizadas com o objetivo de diminuir o número de pacientes não classificados e gerar categorias mais precisas (Tabela 2).

Em 2010, a partir de uma nova base de dados de pacientes com SMD (n=7.012) acompanhados por instituições de referências internacionais, o índice prognóstico do IPSS sofreu uma reformulação, tornando-se o IPSS-R (revisado) (GREENBERG et al., 2012). Nesta nova revisão, o IPSS-R permaneceu possuindo como variáveis clínicas base para aferir o prognóstico do paciente a citogenética, percentagem de blastos e citopenias no sangue periférico. As mudanças na estratificação prognóstica dos pacientes com SMD foram: 5 em vez de 3 subgrupos citogenéticos de prognóstico com classificações específicas, importância da idade do paciente ao diagnóstico, quantificação de ferritina sérica e lactato desidrogenase como importantes características para a sobrevivência, mas não para a transformação da leucemia mieloide aguda (GREENBERG et al., 2012). O IPSS-R apresenta-se como um método de analisar o prognóstico do paciente com SMD de forma mais precisa do que o IPSS inicial (GREENBERG et al., 1997; GREENBERG et al., 2012).

Tabela 2: Evolução na classificação da Síndrome Mielodisplásica.

FAB (1982)	OMS (2001)	OMS (2008)	Displasia-Linhagem (OMS 2008)	% Blastos MO	% Blastos SP
AR	AR	CRDU			
	SMD-U	AR	Eritróide	< 5	< 1
	CRDM	NR / TR	Não Eritróide	< 5	< 1
	del 5q-	CRDM	Eritróide + outra	< 5	< 1
		del 5q isolada	Eritróide + mega	< 5	< 1
		SMD-U	Unilinhagem + pancito ou CRDM/CRDU com 1% de blastos no SP	< 5	< 1
ARSA	ARSA	ARSA	Eritróide*	< 5	< 1
	CRDM-SA		*>15% sideroblastos em anel	< 5	< 1
AREB	AREB-I	AREB-I	≥ 1 linhagem	5-9	2-4

	AREB-II	AREB-II	≥ 1 linhagem	10-19	5-19
AREB-t	LMA	LMA	Mielóide + outra	≥20	
LMMC	SMD/DMP	SMD/NMP	Variável (monocitose >1	<20	
	LMMC	LMMC	x 10 ⁹ /L)		
	LMMJ	LMMJ			
	LMCa	LMC BCR/abl			
	SMD/DMP-U	neg			
		SMD/NMP-U			

Legenda: AR (Anemia Refratária), ARSA (Anemia refratária com sideroblastos em anel), AREB (Anemia refratária com excesso de blastos), AREB-t (AREB em transformação), LMMC (Leucemia Mielomonocítica Crônica), SMD-U (SMD inclassificável), CRDM (citopenia refratária com displasia de multilinhagem), del 5q (deleção 5q isolada), CRDM-AS (CRDM com sideroblastos em anel), LMA (Leucemia mielóide aguda), SMD/DMP (SMD/doenças mieloproliferativas), LMMJ (Leucemia mielomonocítica juvenil), LMCa (Leucemia mielóide crônica atípica), SMD/DMP-U (SMD/ doenças mieloproliferativas inclassificáveis), CRDU (citopenias refratárias com displasia unilinhagem), NR (neutropenia refratária), TR (trombocitopenia refratária), SMD/NMP (SMD/neoplasias mieloproliferativas), SMD/NMP-U (SMD/neoplasias mieloproliferativas inclassificáveis).

Fonte: Adaptado de Komrokji, Zhang e Bennett (2010).

1.1.5 Patogênese da Síndrome Mielodisplásica

A patogênese desta doença é complexa e envolve mecanismos genéticos, epigenéticos e imunomediados. Como exposto, a SMD é doença clonal da célula progenitora hematopoética inicial (JÄDERSTEN; HELLSTRÖM-LINDBERG, 2008). O desenvolvimento da SMD é um processo que envolve provavelmente múltiplos passos, no qual um evento genético inicial nas células tronco leva ao aparecimento de um clone anormal precursor de células hematopoéticas disfuncionais e morfologicamente displásicas (NAEIM; RAO; GRODY, 2008).

Um dos paradoxos associado à SMD consiste na presença simultânea de citopenias periféricas das três linhagens celulares (granulocítica, eritróide e megacariocítica) e medula óssea hipercelular (OLNEY; LE BEAU, 2002). Na SMD a citopenia periférica resulta do aumento da apoptose nas células progenitoras hematopoéticas (JÄDERSTEN; HELLSTRÖM-LINDBERG, 2008). Os passos iniciais da patogênese das SMD envolvem danos no DNA nas células tronco hematopoéticas pluripotentes, o que conduz ao desenvolvimento de um clone mielodisplásico, o qual apresenta crescimento preferencial relativamente às outras células hematopoéticas, caracterizando o perfil de citopenias bastante peculiar desta doença.

A patogênese da SMD é estabelecida partindo-se de uma célula tronco que adquire sucessivas anomalias genéticas que levam à transformação maligna e expansão clonal (LOOK et al., 2005). As mutações iniciais nas células tronco podem causar bloqueio da diferenciação levando à displasia, enquanto defeitos subsequentes afetam a proliferação causando expansão clonal das células aberrantes e LMA (LOOK et al., 2005; BRUNNING et al. 2008). Deleções cromossômicas terminais ocorrem frequentemente em malignidades hematológicas, com uma incidência relativa que varia entre os distúrbios hematológicos e são mais frequentes na Síndrome Mielodisplásica (PINHEIRO; CHAUFFAILLE; SILVA, 2006a). Pinheiro, Chauffaille e Silva. (2006a) demonstraram o primeiro estudo que correlaciona o isocromossomo 17q e a deleção do 7q32, sugerindo que o achado do i(17) em pacientes com SMD representa um quadro clínico distinto com um perfil prognóstico desfavorável (PINHEIRO; CHAUFFAILLE; SILVA, 2006a).

Ao contrário de outras neoplasias hematológicas caracterizadas por alterações cromossômicas equilibradas, tais como translocações recíprocas e inversões, as quais resultam em mutações dominantes e ativação de oncogenes, a SMD está geralmente associada a anomalias cromossômicas não equilibradas (FEARON et al., 2002). Muitas das anomalias cromossômicas recorrentes na SMD levam à perda de material genético e consequente inativação de genes supressores tumorais (FEARON et al., 2002). A perda de função do gene pode ocorrer por perda ou deleção, mutações pontuais ou pelo silenciamento transcricional via metilação das ilhas CPGs (regiões ricas em citosinas e guaninas) (OLNEY; LE BEAU, 2002).

1.1.6 Citogenética e a Síndrome Mielodisplásica

As neoplasias podem desenvolver-se a partir de uma predisposição genética constitucional seguida de mutações somáticas adquiridas ou de um acúmulo de mutações somáticas que levam ao desenvolvimento do fenótipo neoplásico. As alterações cromossômicas características fornecem informação quanto ao diagnóstico, prognóstico e/ou tratamento para muitos cânceres sendo por isso verdadeiros biomarcadores do câncer humano (KEEN-KIM; NOORAIE; RAO, 2008).

Na SMD têm sido descritas diversas alterações citogenéticas recorrentes, cuja detecção pode facilitar o diagnóstico, prognóstico e tratamento dos doentes, no entanto, nenhuma anomalia cromossômica é patognomônica destas doenças (MALCOVATI; NIMER, 2008). As anomalias cromossômicas ocorrem em quase metade dos casos de SMD *de novo* (30-50%), enquanto nas SMD secundárias estas alterações são observadas em cerca de 95%

dos casos (NAEIM; RAO; GRODY, 2008). À exceção da deleção 5q-, nenhuma anomalia cromossômica está especificamente associada a qualquer subtipo de SMD (NAEIM; RAO; GRODY, 2008).

A gravidade e o risco de transformação leucêmica na SMD aumenta com a presença de alta frequências de anomalias citogenéticas, sendo de 15-20% nos subtipos AR e ARSA e de 75% nos subtipos de AREB e AREB-T (OLNEY; LE BEAU, 2002).

As alterações cromossômicas mais comuns associadas à SMD incluem deleção do braço longo do cromossomo 5 [del(5q) ou 5q-], monossomia 5 (-5), deleção do braço longo do cromossomo 7 [del(7q) ou 7q-], monossomia 7 (-7), trissomia 8 (+8), deleção do braço curto do cromossomo 20 [del(20q) ou 20q-] e nulissomia do Y (-Y). (KEEN-KIM; NOORAIE; RAO, 2008; SKONIECZKA et al., 2009).

Pinheiro, Chauffaille e Silva (2006b) relataram o primeiro caso clínico de pacientes com t(1,19) durante a evolução de SMD para Leucemia Mielóide Aguda (PINHEIRO; CHAUFFAILLE; SILVA, 2006b). Esta translocação entre o cromossomo 1 e 19 é freqüente em crianças portadoras de leucemia linfóide aguda apresentando um perfil prognóstico desfavorável (PINHEIRO; CHAUFFAILLE; SILVA, 2006b) e somente foram descritos 4 casos de t(1,19)(p12,p11) no mundo (GILL et al., 1997; FORREST et al., 2000; ANDO et al., 2002; TCHINDA et al., 2002). Pinheiro et al. (2004) também relataram o quinto caso de SMD com 9q- com outras anormalidades cromossômicas detectadas por banda G (PINHEIRO et al., 2004).

Estas deleções cromossômicas são as anomalias mais comuns na SMD primária ou secundária sendo observadas em quase 50% dos casos (KEEN-KIM; NOORAIE; RAO, 2008; HAASE et al., 2008). As deleções são geralmente intersticiais e ocorrem frequentemente nos cromossomas 5q, 7q, 20q, 11q, 13q, 12p e 17p (KEEN-KIM; NOORAIE; RAO, 2008; HAASE et al., 2008). As monossomias, trissomias e translocações não equilibradas são as segundas anomalias mais frequentes, ocorrendo em 15% dos doentes. As monossomias mais comuns nas SMD envolvem os cromossomas 5, 7 e a nulissomia do Y (KEEN-KIM; NOORAIE; RAO, 2008; HAASE et al., 2008). Embora as translocações equilibradas sejam alterações relativamente comuns em doenças mielóides, nomeadamente na LMA, são muito raras nas SMD (KEEN-KIM; NOORAIE; RAO, 2008; HAASE et al., 2008).

1.2 Lesões no DNA

A integridade do genoma humano é continuamente ameaçada por agentes endógenos resultantes do metabolismo celular ou da replicação e recombinação do DNA, e também por exposições exógenas (Figura 1). As lesões no DNA daí resultantes, se não forem corretamente reparadas, podem conduzir ao acúmulo de mutações em genes cruciais para o metabolismo e crescimento celular normal e que, quando desregulados, poderão contribuir para o gênese de doença. A integridade do material genético é de extrema importância para a viabilidade das células que exigem mecanismos de reparação eficazes das lesões no DNA, sendo capazes de efetuar a reparação de quase todos os tipos de danos.

As respostas ao estresse genotóxico podem ser definidas como uma cascata de sinalização na qual as lesões no DNA atuam como um sinal inicial que é detectado por proteínas sensores e transmitido aos efetores por transdutores de sinais (DUROCHER; JACKSON, 2001). As proteínas efetoras recebem o sinal e executam diversas funções celulares, entre elas, o bloqueio do ciclo celular, o reparo do DNA e a apoptose. Alguns autores sugerem que membros da superfamília de proteínas PI3K (fosfatidilinositol 3-quinases), que são ativadas muito cedo em resposta a lesões no DNA, podem atuar como sensores e/ou iniciadores de mecanismos de resposta ao estresse genotóxico (DUROCHER; JACKSON, 2001; SHILOH et al., 2003).

A família PI3K em humanos inclui as proteínas ataxia telangiectasia mutada (ATM), ATM- e Rad3-related (ATR), ATX/SMG-1, mTOR/FRAP e DNA - dependente proteína quinase (DNAPK) (PLUMB et al., 1999; ROTMAN; SHILOH, 1999; ABRAHAM et al., 2001; BAO et al., 2001). Tanto ATM quanto ATR podem ser ativadas por danos no DNA, embora não seja conhecido exatamente como essas duas quinases reconhecem o dano. ATM responde principalmente a quebras duplas induzidas por radiações ionizantes, ao passo que ATR responde a lesões induzidas pelos raios UV ou a agentes que causam bloqueio na forquilha de duplicação (WRIGHT et al., 1998; HEKMAT-NEJAD et al., 2000; LOWNDES; MURGUIA, 2000; PANDITA et al., 2000; ANDEGEKO et al., 2001).

Não há uma distinção clara entre os sinais que ativam essas duas proteínas, pois ATM também atua em algumas respostas à radiação UV, mediando o reparo de lesões induzidas por esse tipo de radiação e a fosforilação de STAT3 (proteína que participa da proliferação celular e apoptose) (HANNAN et al., 2002; ZHANG et al., 2003). Sabe-se que a ATM também está envolvida na sinalização em resposta a UVA e no controle de apoptose, ao passo que ATR atua na sinalização em resposta a UVC e também no controle de apoptose

(HEFFERNAN et al., 2002; ZHANG et al., 2002). Além disso, ATM está envolvida na resposta ao estresse oxidativo, tendo sido demonstrado que os alvos de ATM/ATR são fosforilados por ATR em resposta à hipóxia e por ATM em resposta à re-oxigenação (HAMMOND et al., 2002; HAMMOND et al., 2003; WATTERS et al., 2003).

A ativação de ATM / ATR pode conduzir as células a um bloqueio do ciclo celular, que pode ocorrer nas fases G1, S ou G2. Esse processo pode ser mediado através da ação de CHK1 e CHK2, correspondentes a duas quinases de *checkpoint* do ciclo celular. O principal responsável pelo checkpoint em G1 é a proteína p53 (CHEHAB et al., 2000; HIRAO et al., 2000). O bloqueio do ciclo celular é uma resposta extremamente importante observada em resposta a danos induzidos no DNA, sendo que interferências nesse mecanismo podem resultar em acúmulo de alterações genéticas e/ou proliferação celular descontrolada, levando à instabilidade genômica e desenvolvimento neoplásico (TLSTY et al., 1995). Diferentes tipos de estresse genotóxico podem ativar mecanismos de controle do ciclo celular diferentes. Podemos citar o exemplo das radiações ionizantes que podem promover os bloqueios nas fases G1/S, intra-S e G2/M algumas horas após a irradiação (KUERBITZ et al., 1992; HAN et al., 1995; BARTEK; LUKAS; LUKAS, 2004), ao contrário que os agentes metilantes, como por exemplo a droga temozolomida, provocam o bloqueio em G2/M após a segunda fase S depois do tratamento com a droga (HIROSE; BERGER; PIEPER, 2001).

As análises de células de mamíferos demonstram que o bloqueio do ciclo nas fases G1, S, e G2 pode ocorrer após a exposição das células a agentes genotóxicos, sendo que esse protege as células de danos genéticos permanentes e da transformação neoplásica (EGUCHI; SHIMIZU; TSUJIMOTO, 1997; JEGGO et al., 2007). O bloqueio do ciclo após lesões no DNA favorece a sobrevivência celular fornecendo um tempo maior para que as células reparem os danos no DNA. Entretanto, dependendo do tipo e número de lesões, devido ao elevado gasto energético que causam ao maquinário celular, a célula pode entrar em apoptose (EGUCHI; SHIMIZU; TSUJIMOTO, 1997; JEGGO et al., 2007).

1.3 Mecanismos de Reparo ao dano no DNA

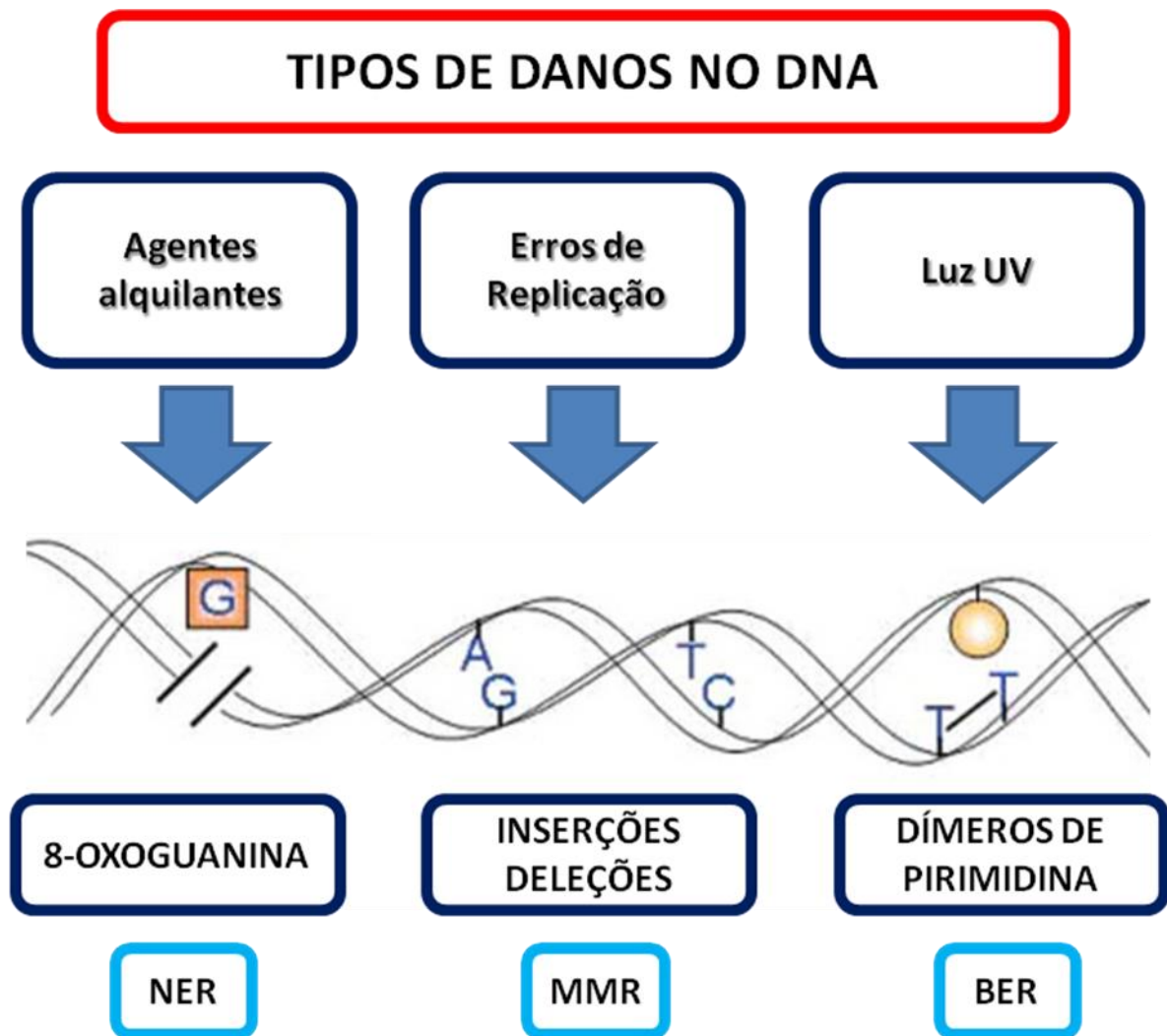
O reparo de DNA é um mecanismo de importância fundamental para a manutenção da integridade dos organismos multicelulares e para garantir sua estabilidade genômica (KIM et al., 2001). Diversos agentes etiológicos são capazes de causar danos ao DNA e, dentre eles, podemos destacar o calor, danos oxidativos, radiações ultravioletas e ionizantes e diversas

substâncias químicas encontradas no meio ambiente, como, por exemplo, a fumaça do cigarro (KAO et al., 2005).

Os mecanismos de reparo do DNA são geralmente divididos em cinco subtipos, com subdivisões em muitos deles de acordo com o tipo de lesão que foi acometida a fita de DNA. Caso o dano ocorra em somente uma fita do DNA, tem-se os mecanismos de Reparação de Erros de Emparelhamento de Bases do DNA (MMR), Reparação por Excisão de Bases (BER) e Reparação por Excisão de Nucleotídeos (NER). Nas vias de reparo NER e BER a lesão é removida e a seqüência de DNA original é restaurada por uma DNA polimerase que utiliza a fita não-danificada como molde, e a quebra resultante na dupla hélice é ligada pela DNA ligase (KAO et al., 2005). Já o mecanismo MMR atua principalmente no reconhecimento e reparação de erros nas inserções de bases e presença de deleções incorporadas no DNA que podem surgir durante a replicação e na recombinação do DNA (LYER et al., 2006). A figura 1 apresenta um quadro resumo sobre os mecanismos de reparo em danos de fita simples no DNA.

No entanto, caso o dano acometa a dupla fita de DNA, tem-se como mecanismos para reparação destas lesões a Recombinação Homóloga (HR) e a Junção de Extremidades Não Homólogas (NHEJ) (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003).

Figura 1: Apresentação esquemática dos tipos de mecanismos de reparo em danos de fita simples (SSB).



Legenda: NER *Nucleotide Excision Repair*; MMR *DNA Mismatch Repair*; BER *Base Excision Repair*.
 Fonte: Adaptado de Boland et al. (2005).

1.3.1 Lesões de Fita Dupla no DNA (*Double-Strand Breaks*)

Um tipo de lesão no DNA potencialmente letal ocorre quando as duas fitas da dupla hélice são quebradas (*Double Strands Breaks*, DSB). As DSB são consideradas o tipo de lesão de maior efeito biológico para a formação de aberrações cromossômicas, morte celular e transformação neoplásica (NATARAJAN et al., 1993; HALL et al., 2000; BELLI; SAPORA; TABOCCHINI, 2002). As DSB podem ser induzidas tanto por agentes exógenos, como as radiações ionizantes e alguns tipos de drogas, quanto por agentes endógenos, como as

espécies reativas de oxigênio (ROS). Uma forquilha de duplicação que encontra uma quebra de fita simples ou outros tipos de lesões também pode produzir uma DSB (SCOTT; PANDITA, 2006).

São conhecidos vários sistemas de reparo do DNA, sendo que aqueles que atuam sobre DSB são principalmente de dois tipos: recombinação homóloga (*homologous recombinational repair* - HRR) e junção de extremidades não-homólogas (*non-homologous end joining* - NHEJ) (WETERINGS; VAN GENT, 2004).

Segundo Allen et al. (2003), existe uma competição entre os mecanismos de reparo homólogo e de junção de extremidades não homólogas no reparo das DSB. No entanto, ainda é obscura a natureza dessa competição (ALLEN et al., 2003). Estudos demonstram que os dois mecanismos de reparo atuam em momentos distintos nas diferentes fases do ciclo celular (BURMA et al., 2006; SONODA et al., 2006).

A NHEJ atua quase que sozinha no reparo da dupla hélice na fase G1 do ciclo celular, enquanto que a HR começa a ter a sua atuação no final da fase S até G2. Isso pode ser compreendido pelo fato de a recombinação homóloga requerer um molde – a fita homóloga intacta –, para que ocorra o reparo, e esta fita homóloga só está disponível no final da fase S (BURMA et al., 2006; SONODA et al., 2006).

1.3.1.1 Junção por Extremidades Não Homólogas (NEHJ)

A principal via de reparo de DSBs em mamíferos é a NHEJ (Figura 2) (PASTWA; BLASIAK, 2003; VALERIE; POVIRK, 2003). Segundo Zhong et al. (2002) a junção de extremidades não-homólogas contribui significativamente para a manutenção da estabilidade genômica nas células de mamíferos (ZHONG et al., 2002; BURMA et al., 2006). Neste caso, as duas extremidades da fita de DNA quebrada são simplesmente reconectadas. Esta via de reparo é considerada uma via não livre de erro, pois a quebra da fita não é reparada com a utilização de uma fita homóloga como molde. Conseqüentemente, inserções e deleções podem ser geradas no local do reparo, comprometendo, assim, a integridade do genoma (BURMA et al., 2006).

As proteínas que fazem parte dessa via incluem o heterodímero formado por KU70 e KU80, e a subunidade catalítica da DNA-PKcs. Heterodímeros das proteínas KU se associam às extremidades das quebras duplas do DNA, e fazem o recrutamento das proteínas Artemis, XRCC4, LIG4 e DNA polimerase μ . A proteína Artemis tem uma atividade exonucleásica que promove o processamento das extremidades da quebra necessário para a ligação

apropriada e para o preenchimento do *gap* pela LIG4 e pela DNA polimerase μ . O complexo MRE11/RAD50/NBS1, que apresenta atividade de exonuclease, endonuclease e de abertura da dupla fita de DNA *in vitro*, também pode estar envolvido no processamento das extremidades (TRUJILLO et al., 1998; PAULL et al., 1999).

Além dessas proteínas, recentemente foi relatada a descoberta de uma outra que também parece estar envolvida na via NHEJ. Ahnesorg, Smith e Jackson (2006) identificaram uma proteína denominada XRCC4-like factor. O mesmo autor mostrou que XLF interage diretamente com o complexo XRCC4-Ligase IV e que a repressão de XLF em linhagens celulares humanas promove radiosensibilidade e uma diminuição na eficiência de NHEJ (AHNESORG; SMITH; JACKSON, 2006).

Resumidamente, nos mecanismos moleculares das NEHJ, tem-se a ligação das proteínas Ku70 e Ku80 às extremidades da quebra. Em seguida há o recrutamento de DNA-PKcs, que sinaliza a presença da quebra e ativa as outras proteínas, o complexo XRCC4-ligase IV, para, assim, dar continuidade à via de reparo por NHEJ (WETERING et al., 2004; BURMA et al., 2006). Desta forma, todos os componentes da via de reparo por junção de extremidades não homólogas tem um papel importante na manutenção da integridade do genoma e, conseqüentemente, na supressão da carcinogênese (BURMA et al., 2006).

1.3.1.2 Recombinação Homóloga (HR)

A Recombinação Homóloga consiste no mecanismo de reparo caracterizado por unir as DSBs utilizando uma fita de DNA homóloga como molde (Figura 2). Como conseqüência, esse tipo de reparo promove uma alta fidelidade e está menos propenso a erros (BELLI; SAPORA; TABOCCHINI, 2002). A via de reparo HR envolve o processamento das extremidades, formando uma região de fita simples no DNA, seguido pela invasão da fita molde do DNA homólogo, formando uma estrutura conhecida como junção de *Holliday* (HABER et al., 2004). A síntese do DNA é então realizada, prosseguindo com a migração da cadeia seguida pela construção do heteroduplex (WEST et al., 2003).

Dentre os inúmeros complexos protéicos envolvidos nas vias de reparo HR, vê-se os da família BRCA (*Breast Cancer Susceptibility Gene*) identificados inicialmente como marcadores moleculares do desenvolvimento do câncer de mama e de ovário. O primeiro a ser identificado, o *BRCA1*, está localizado no cromossomo 17p21.3 (HALL et al., 1990), possui aproximadamente 100 kilobases de sequência genômica, distribuídas em 24 éxons codificantes de uma proteína de 1863 aminoácidos. O segundo, o *BRCA2*, está localizado no

cromossomo 13q12, possuindo 70 kilobases de sequência genômica, distribuída por 27 éxons e codificante de uma proteína de 3418 aminoácidos (THOMPSON; EASTON, 2004).

O gene *BRCA1*, nos tecidos em rápida proliferação celular, pode ajudar a manter a integridade do material genético. O fato de se ter verificado que a proteína BRCA1 tinha interação com o gene *TP53* reforça a teoria de que o gene *BRCA1* está envolvido na reparação das lesões do DNA (THOMPSON; EASTON, 2004).

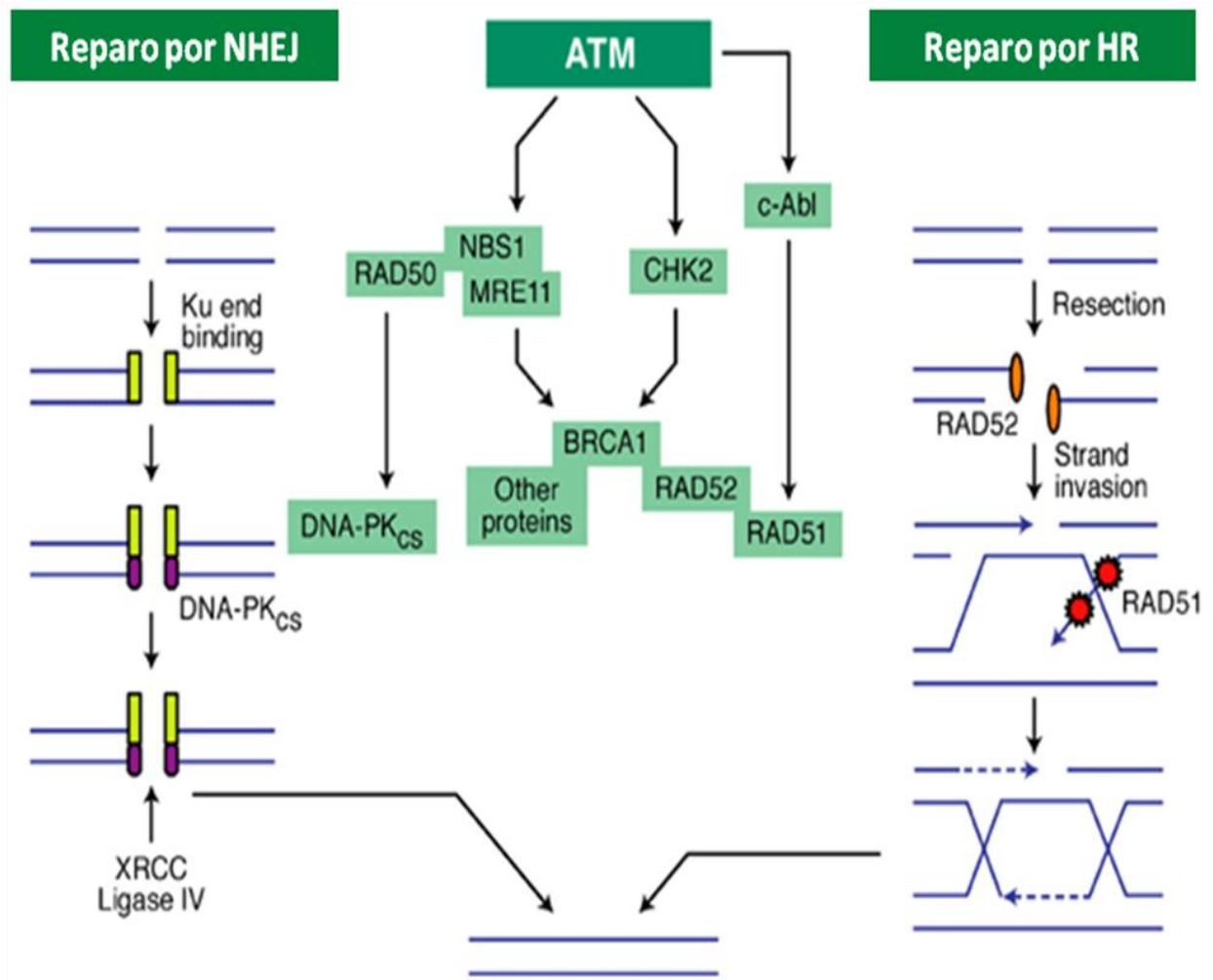
Tanto o BRCA1 como o BRCA2 interagem também com as proteínas do complexo RAD (*Radiation-Sensitive Yeast Mutants*), uma família protéica que está implicada na recombinação e reparação homóloga de DSBs do DNA (HALL et al., 1990; THOMPSON; EASTON, 2004).

As proteínas membros da família RAD tais como a RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, MRE11 e XRS2, são responsáveis por formar um complexo protéico funcional junto à extremidade de DNA danificada (VAN GENT; HOEIJMAKERS; KANNAR, 2001). A proteína RAD51 se associa às regiões de fita simples e é responsável pela sobreposição dessa fita no DNA homólogo (VAN GENT; HOEIJMAKERS; KANNAR, 2001).

O complexo MRE11/RAD50/NBS1 pode atuar nas extremidades das DSBs antes da associação de RAD51. A BRCA2 está envolvida na associação da RAD51 nos locais de fita simples (PELLEGRINI et al., 2002). A BRCA1 também é requerida na via de reparo HRR, possivelmente exercendo atividade regulatória (PELLEGRINI et al., 2002).

Acredita-se que a RAD54 tem um papel importante na HR, pois o complexo RAD51 (acúmulo de proteína RAD51 no local do dano de DNA) não se forma em animais deficientes em RAD54 (THACKER et al., 2005). A RAD52 também desempenha um papel importante na HR. Esta proteína interage e co-localiza com RAD51, facilitando, assim, sua atividade, além de ter a propriedade de ligase diretamente às DSBs, protegendo-as da atividade de exonucleases (THACKER et al., 2005).

Figura 2: Apresentação esquemática dos mecanismos de reparo de Junções por extremidades não homólogas (NHEJ) e Recombinação homóloga (HR) em danos de fita dupla no DNA (DSBs).



REPARO DO DANO NO DNA

Fonte: Adaptado de Pandita et al. (2003).

1.4 Genes de Reparação de DNA e seus Polimorfismos

Polimorfismo pode ser definido como a forma variante ou alternativa de um gene que ocupa um local específico em um cromossomo, denominado geneticamente de *locus*, e esta forma variante recebe a denominação de alelo (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003). Então, quando diferentes alelos de um determinado gene coexistem na população humana, tal evento é denominado de polimorfismo genético (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003). O polimorfismo faz parte das doenças genéticas complexas, onde essas alterações genéticas por si só não são suficientes para causar alterações significantes no paciente (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003). Susceptibilidade prévia aos mais diversos tipos de doenças genéticas como também fatores do meio como, por exemplo, a presença de infecção microbiana, fumo e condições nutricionais, são de grande importância no processo da gênese das doenças e na expressão fenotípica das mesmas (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003). Esse distúrbio genético ocorre em mais de 1% da população, sendo considerado mais prevalente quando comparado com outros tipos de alterações genéticas (TAKASHIBA; NARUISHI, 2006).

Todos os organismos, ao longo de sua existência, sofrem mutações em busca de se adaptar ao ambiente em que vivem, assim, os polimorfismos genéticos surgiram por estas mutações espontâneas (KINANE; HART, 2003; TAKASHIBA; NARUISHI, 2006). O tipo mais comum de polimorfismo é o que envolve um único nucleotídeo, chamado de polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*, SNP) ou polimorfismo de transição, onde ocorre a substituição de um nucleotídeo por outro, ocorrendo a troca de um único par de base, podendo ainda assim afetar a expressão de proteínas, a estrutura e a função de um gene (TAKASHIBA; NARUISHI, 2006). Caso o polimorfismo de nucleotídeo único ocorrer dentro da região codificadora do gene, pode resultar na substituição de um aminoácido, alterando a síntese de uma proteína e podendo alterar a função celular (TAKASHIBA; NARUISHI, 2006). Se a função das proteínas for afetada em um processo biológico, como a resposta inflamatória para um agente microbiano específico, polimorfismos de alguns genes podem aumentar ou diminuir o risco do paciente na expressão fenotípica da doença (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003; TAKASHIBA; NARUISHI, 2006).

Estudos relacionados com polimorfismos em genes de reparação sugerem que estas alterações apresentam grande influência na modulação de efeitos genotóxicos, em resposta ao dano causado ao DNA. Estudos demonstram influência de dezenas de polimorfismos de genes de reparo de DNA relacionados a atividades enzimáticas, relação com a incidência de câncer,

resposta a quimioterápicos e radiosensibilidade (EFFERTH; VOLM, 2005; WANG et al., 2010; LI et al., 2011). O interesse da investigação nesta área tem sido focado majoritariamente no estudo dos polimorfismos dos genes de reparação do DNA como um componente importante da susceptibilidade individual para câncer, considerando a reparação do DNA como um processo muito importante para a proteção do genoma e para a prevenção do câncer (HARMS et al., 2004).

No caso do mecanismo de recombinação homóloga, Friedenson et al. (2007) mostraram que os genes *BRCA1/2* são essenciais para evitar a ocorrência de leucemias e linfomas. Os resultados podem ter implicações favoráveis para o aperfeiçoamento de procedimentos clínicos e quimioterápicos nestes e talvez em outros cânceres. Deficiência de *BRCA1* é também associada com relatos de LMA *de novo* e a terapia (t-LMA). Scardocci et al. (2006) apresentaram que 32% de casos de LMA primárias e 75% de t-LMA possuem redução na expressão do gene *BRCA1*. Em linhagens celulares de Leucemia Mielóide Crônica (LMC), o gene *BRCA1* também é apresentado com baixa expressão; quando avaliado em pacientes em fase acelerada ou crise blástica, o gene *BRCA1* é quase indetectável. Variações polimórficas do gene *BRCA2* são apresentadas com elevada expressão em casos de linhagens celulares oriundas de Linfomas Não Hodgkins de células T ou Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) (SCARDOCCI et al., 2006).

Tem sido associada a presença de polimorfismos em genes de *RAD51* e afins a vários tipos de tumores, principalmente nos casos relacionados a LMA *de novo* e LMA relacionadas com tratamento (LMA e t-AML) (SEEDHOUSE et al., 2004). A presença dos polimorfismos *RAD51-G135C* (rs1801320) e *XRCC3 241Met* aumenta ainda mais o risco de acometimento de LMA e t-AML, e uma combinação tripla de *RAD51-135c*, *XRCC3-241Met* e Glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*) leva a um aumento significativo no risco de LMA (SEEDHOUSE et al., 2004).

Em relação ao mecanismos de Junção por Extremidades Não Homólogas, o componente chave do aparelho da NHEJ são as proteínas DNA-PKs que consistem de uma subunidade heterodimérica no DNA alvo, composta pelo complexo KU70/ KU80 (ou *XRCC6* e *XRCC5*), e uma subunidade catalítica, composta pela proteína *XRCC7* (SMITH; JACKSON, 2009). No caso do gene *LIG4*, biologicamente, a proteína derivada deste gene forma um heterodímero com a proteína *XRCC4* e executa o final da união do acoplamento do mecanismo NHEJ. Isto tem sido demonstrado através da interação, estabilização e estimulação que a proteína *XRCC4* exerce sobre a *LIG4* (CRITCHLOW; BOWATER; JACKSON, 1997; RIBALLO et al., 1999).

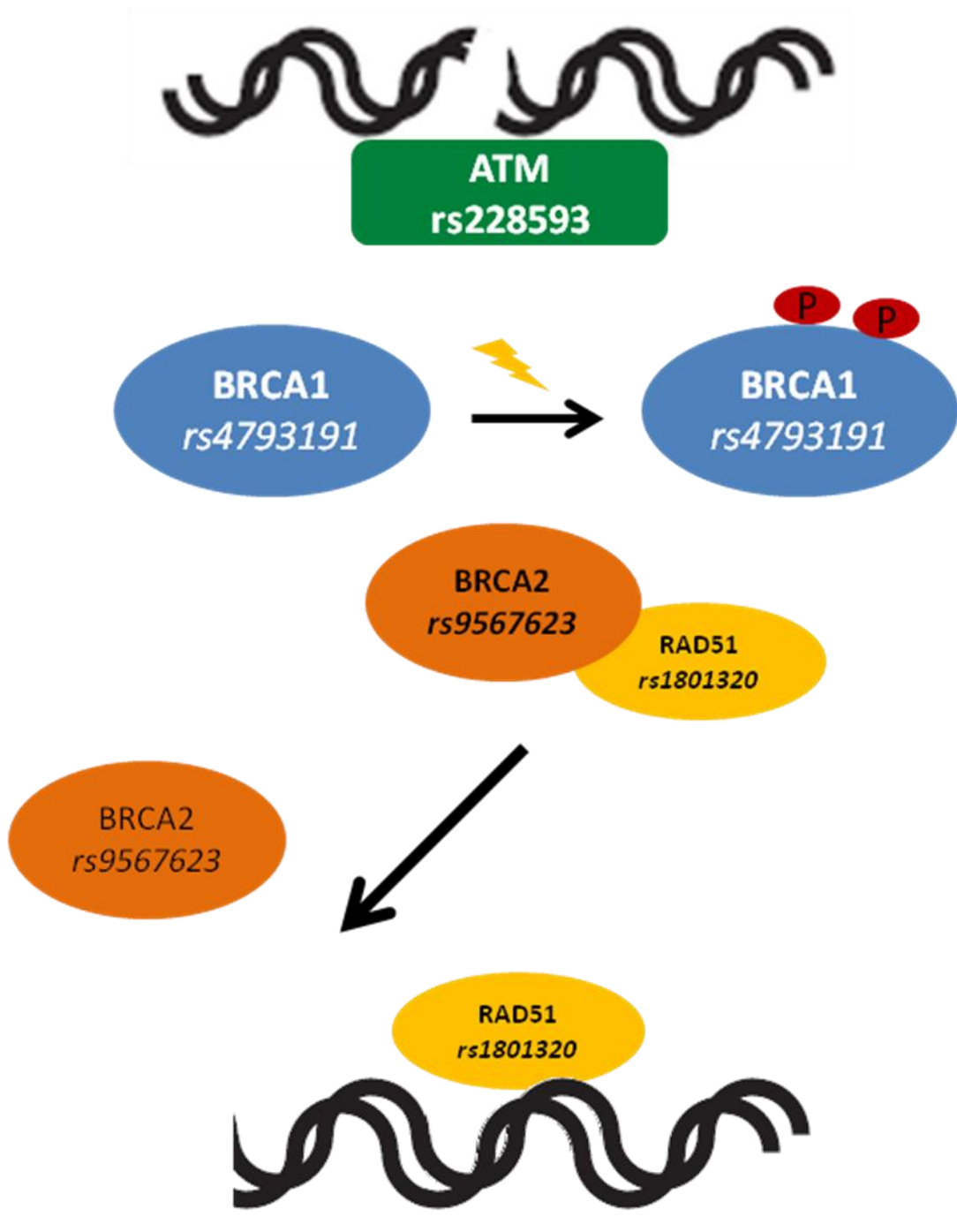
Na literatura, observam-se dezenas de variantes genéticas dos genes XRCC5, XRCC6 e LIG4 já identificadas em diversos tipos de câncer (FU et al., 2003). Fu et al. (2003) relataram que o polimorfismo XRCC6 - 61C>G, em sua região promotora, foi associado com um elevado risco de ocorrência de câncer de mama. Duas outras SNPS de XRCC5 69506G>A (rs3835) e 69632 G>A (rs3834), localizadas em região intrônica do gene XRCC5, não estão associadas com o elevado risco de câncer de mama (FU et al., 2003). No estudo de Tseng et al. (2009), foi avaliado o polimorfismo *LIG4* SNP *rs1805388* correlacionado aos polimorfismos dos genes *XRCC5 rs3835* e *XRCC6 rs2267437* observando que os achados estavam envolvidos com um aumento do risco de acometimento de câncer de pulmão em pacientes fumantes.

Atualmente, muito progresso já tem sido conquistado no campo da reparação mediada por recombinação homóloga ou junção por extremidade não homólogas nas DSBs e concomitantemente uma avaliação do seu impacto sobre a estabilidade genômica e tumorigênese em diversos tipos de cânceres. Porém, não foram encontrados trabalhos que correlacionassem os polimorfismos destes genes com pacientes com Síndrome Mielodisplásica.

A alteração citogenética é o marcador prognóstico de maior importância para a SMD. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos relacionados à gênese destas alterações cromossômicas. O papel dos polimorfismos dos genes *BRCA1 rs4793191*, *BRCA2 rs9567623* e *RAD51 rs1801320*, atuantes em HR (Figura 3), *XRCC5 rs3835*, *XRCC6 rs2267437* e *LIG4 rs1805388* em NEHJ (Figura 4) e o *ATM rs228593* (Figuras 3 e 4) como sensor molecular para o dano em DSBs nas alterações genômicas observadas em células tumorais está começando a ser apreciado somente agora, principalmente na SMD.

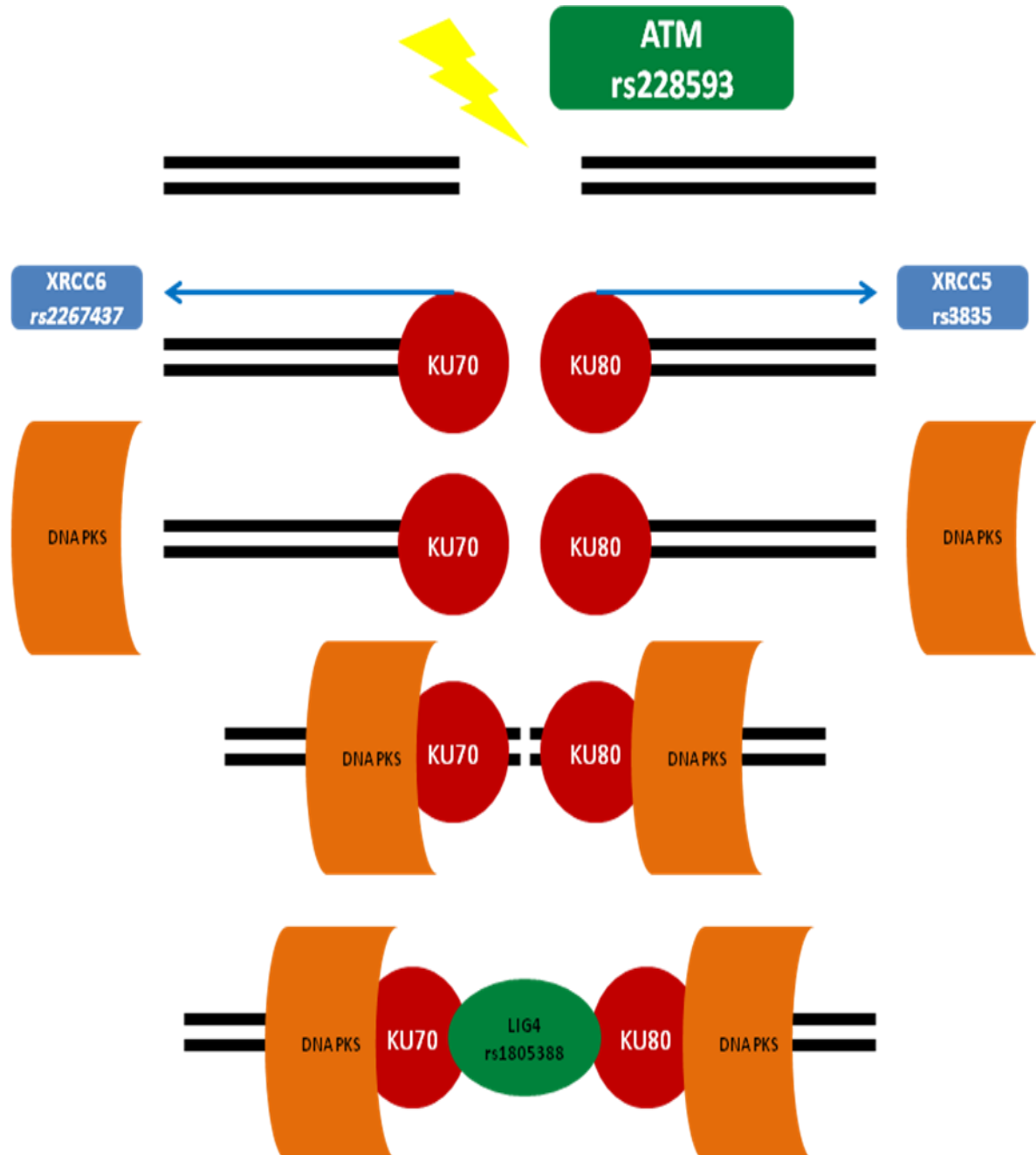
A SMD é a doença clonal mais comum em medula óssea em pacientes idosos do mundo ocidental (MUFTI et al., 2008). Sabendo-se que no processo natural de envelhecimento celular, também denominado senescência, há grande necessidade de se manter estáveis os mecanismos de reparo de DNA, estudos que analisem e confirmem a participação desses polimorfismos na manutenção da estabilidade genômica em pacientes com SMD poderão ajudar no melhor conhecimento da patogenia e da evolução desta doença.

Figura 3: Apresentação esquemática do mecanismo de reparo por Recombinação Homóloga (HR) apresentando os principais genes atuantes e os respectivos polimorfismos analisados no presente estudo.



Fonte: Adaptado de Yoshida e Miki (2004).

Figura 4: Apresentação esquemática do mecanismo de reparo por Junções por Extremidades Não Homólogas (NHEJ) apresentando os principais genes atuantes e os respectivos polimorfismos analisados no presente estudo.



Fonte: Adaptado de Pandita et al. (2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os polimorfismos dos genes relacionados a mecanismos de reparo em danos de fita dupla de DNA e associar as variáveis clínicas observadas em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica.

2.2 Objetivos específicos

1. Detectar as alterações citogenéticas dos pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica com a utilização da metodologia de cariótipo por banda G;
2. Avaliar o Polimorfismo de Único Nucleotídeo *rs4793191* do gene *BRCA1* por PCR-RFLP;
3. Avaliar o Polimorfismo de Único Nucleotídeo *rs9567623* do gene *BRCA2* por PCR-RFLP;
4. Avaliar o Polimorfismo de Único Nucleotídeo *rs1801320* do gene *RAD51* por PCR-RFLP;
5. Avaliar o Polimorfismo de Único Nucleotídeo *rs3835* do gene *XRCC5* por PCR-RFLP;
6. Avaliar o Polimorfismo de Único Nucleotídeo *rs2267437* do gene *XRCC6* por PCR-RFLP;
7. Avaliar o Polimorfismo de Único Nucleotídeo *rs1805388* do gene *LIG4* por PCR-RFLP;
8. Avaliar o Polimorfismo de Único Nucleotídeo *rs228593* do gene *ATM* por PCR-RFLP;
9. Associar os achados moleculares com as variáveis clínicas encontradas nos pacientes com SMD.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará, com o número de protocolo 027.04.12 (ver Apêndice A e B).

Todos os métodos utilizados nesta pesquisa estão descritas de forma esquemática na figura 5.

3.2 Pacientes e obtenção de amostras de origem clínica

Foram utilizadas alíquotas de células de linhagens medulares (10^6 células/mm³) estocadas em solução de Trizol Reagente® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a -80°C provenientes de 60 amostras de medula óssea de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica, diagnosticados entre os anos de 2007 a 2010, no ambulatório de hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio, de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (BRUNNING et al., 2008). Oitenta e dois idosos saudáveis voluntários doadores das amostras de sangue periférico foram incluídos no grupo controle.

3.3 Cariótipo por Banda G

Os cariótipos foram realizados de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer, segundo técnica descrita previamente por Pinheiro e Chauffaille (2009). A citogenética clássica por banda G foi realizada da forma habitual, isto é, a medula óssea colhida em heparina e de forma estéril foi distribuída em dois frascos contendo 7 mL de meio RPMI (pH 7,0), 3 mL de soro fetal bovino e 100µl de L-glutamina. Este material foi cultivado por 24 horas em estufa a 37°C .

Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 70uL de colchicina (Colcemid®), por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspenso em solução hipotônica de KCL 0,075 M e fixado em solução de ácido acético e metanol (3:1) por 4 vezes. Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia e secado ao ar. As bandas foram feitas pela técnica de tripsina-Giemsa, sendo analisadas pelo menos 20 metáfases, sempre que possível, e os cromossomos classificados de

acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana - ISCN 2009. As metáfases foram capturadas em sistema computadorizado (CHROMU) com software para cariotipagem, e o cariótipo digitalizado e impresso em impressora a laser.

3.4 Genotipagem por PCR-RFLP

3.4.1 Extração de DNA Genômico

A extração de DNA foi realizada a partir da utilização do Trizol Reagente® de acordo com o protocolo pelo fabricante. Para cada 10^6 células armazenadas em 1mL de Trizol Reagente® foram adicionados 200µL de Clorofórmio para desproteinização e posterior centrifugação a 11.000 RPM por 15' a 2° C. O RNA presente na fase aquosa foi transferido para um microtubo estéril de 1,5mL para posterior procedimento de extração de RNA total e construção de biblioteca de cDNA para futuros estudos de expressão gênica.

Após a completa remoção da fase aquosa (RNA), foi isolada a interfase (DNA) da fase orgânica (Proteínas e compostos fenólicos) e posteriormente precipitação do DNA com 300µL de etanol absoluto por mL de Trizol Reagente® e misturado por inversão por 3 minutos. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente e posterior sedimentação por centrifugação por 2000 RPM, por 5 minutos a 4°C. Após a remoção do sobrenadante (Proteínas), o pellet de DNA foi lavado com um 1mL de solução 0,1 M de Citrato de Sódio em Etanol 10%.

Incubou-se o pellet de DNA com a solução de lavagem por 30 minutos em temperatura ambiente, com inversão periódica, e posterior centrifugação em 2000 RPM, por 5 minutos a 4°C. Após a lavagem, ressuspendeu-se o pellet de DNA em 2mL de etanol 75%, armazenar por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugar por 2000 RPM, por 5 minutos a 4°C. Secou-se o pellet de DNA em tudo aberto por 15 minutos, ressuspendeu-se em 350µL de NaOH 8mM pH~8,4 e, por fim, armazenou-se a -20°C para posterior experimentos de genotipagem.

Foram realizadas leituras espectrofotométricas nos comprimentos de ondas de 220, 260 e 280nm para aferição de pureza, concentração e contaminação das amostras. A integridade da amostra foi aferida por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Gelred 10.000X (Biotium) e visualizado em transluminador.

3.4.2 PCR-RFLP

O DNA extraído do pool celular foi usado para a caracterização dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) nos genes de reparação *BRCA1* (*rs4793191*), *BRCA2*(*rs9567623*) e *RAD51*(*rs1801320*) (envolvidos nos mecanismos de Recombinação Homóloga); *XRCC5* (*rs3835*), *XRCC6* (*rs2267437*) e *LIG4* (*rs1805388*) (envolvidos no mecanismo de Junção por Extremidade Não Homóloga) e *ATM* (*rs228593*) atuando como sensor molecular dos danos em DSB.

A genotipagem destes polimorfismos foi realizada por meio de técnicas baseadas na amplificação enzimática de um fragmento de DNA seguida de restrição do fragmento amplificado com endonucleases de restrição (PCR-RFLP) nos quais o polimorfismo cria ou abole o local de restrição enzimática.

Para cada um dos polimorfismos analisados foi efetuada uma prévia otimização das condições de PCR e de análise de restrição. As reações de PCR foram efetuadas num volume de reação de 25µL, em que as misturas de PCR para os diferentes polimorfismos contiveram em comum o tampão de PCR, 0,25mM de dNTPs, e 0,5U de Polimerase Taq de DNA, 0,75mM Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 10pMol de primers e de 250ug de DNA genômico. As sequências dos *primers* são indicadas na tabela 03.

Uma alíquota do produto de PCR foi digerida com a enzima de restrição apropriada (Tabela 3), num volume de reação de 25µL, onde se adicionou em comum o tampão de restrição, variando a quantidade de enzima e de produto de PCR, de acordo com protocolo do fabricante. Os fragmentos de DNA amplificados e resultantes da restrição enzimática foram visualizados por eletroforese (2h, 80V) em géis de agarose 2% (p/v) e 3% (p/v), respectivamente, corados com brometo de etídeo (0,2µg/mL). Nestes géis, foram aplicados 10µL de cada amostra misturados com 5µL de Azul de bromofenol juntamente com dois marcadores de massa molecular.

As imagens resultantes foram visualizadas e fotografadas sob luz UV, sendo a interpretação dos resultados do genótipo efetuada por análise do tamanho dos fragmentos de restrição em comparação com dois marcadores de massa molecular.

3.5 Variáveis analisadas e Análises estatísticas

As variáveis analisadas neste estudo foram assim subdivididas:

- Sexo: masculino e feminino;

- Idade: >60 (idade maior que 60 anos) e <60 (idade menor que 60 anos);
- Origem: urbano e rural;
- Cariótipo:

Quanto ao prognóstico: favorável, intermediário e desfavorável.

Quanto a alteração: normal e alterado.

- Celularidade da medula óssea: Normo+Hiper celular (Celularidade normal e hiper celular) e Hipocelular.
- Citopenia no sangue periférico: 0-1 citopenia e 2-3 citopenias.
- Índice prognóstico do IPSS (1997): FAV+INT-1 (Favorável e Intermediário-1) e INT-2+DES (Intermediário-2 e Desfavorável).
- Classificação OMS categorizada: alto risco, baixo risco e SMD secundária.
- Classificação OMS estratificada: 5q- (Síndrome da deleção do 5q), AREB I (Anemia refratária com excesso de blastos tipo 1), AREB II (Anemia refratária com excesso de blastos tipo 2), CRDM (Citopenia refratária com displasia em múltiplas linhagens), AR (Anemia refratária), ARSA (Anemia refratária com sideroblastos em anel) e SMD secundária.

As diferenças entre as distribuições alélicas e genótípicas e a análise do Equilíbrio de Hardy-Weiberg ($p>0,05$) foram analisadas com o teste de qui-quadrado (com um grau de liberdade) ou teste exato de Fisher. O teorema de Hardy-Weinberg consiste na base teórica da genética das populações, avaliando a o princípio do equilíbrio gênico no processo evolutivo, consistindo em uma importante análise na verificação da população proposta nos estudos de polimorfismos.

A análise de regressão logística foi utilizada para estimar a razão de chances (*odds ratio*) para as variáveis que contribuem para o risco de SMD e para ajustar as análises de fatores de confusão que contribuem para a susceptibilidade de SMD. O nível de significância estatística utilizado foi $p<0,05$ (*2-sided*) e todas as análises foram efetuadas com recurso ao software SPSS para Windows na versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

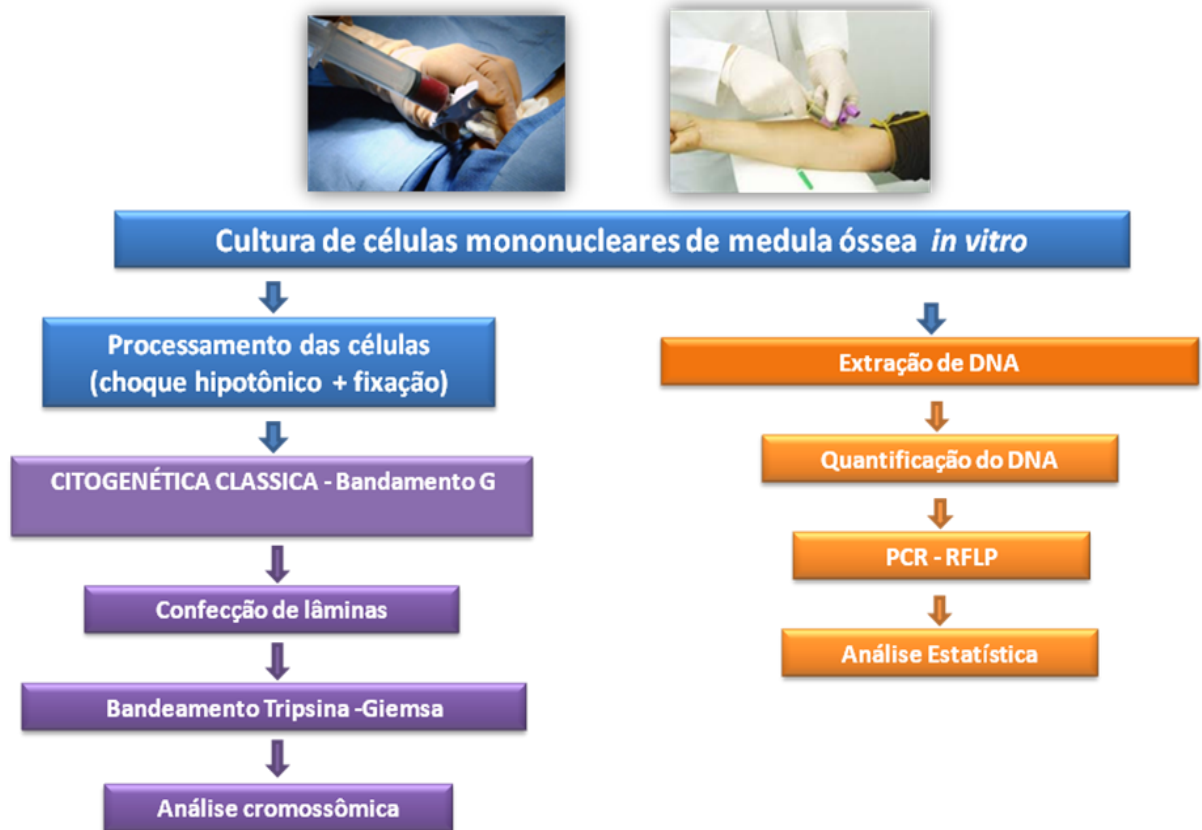
3.6 Fontes de financiamento

O presente projeto foi aprovado no Edital 14/2011 Universal/Faixa A do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo número de processo 476587/2011-5.

Tabela 3: Descrição dos *primers* de cada polimorfismos, temperaturas de anelamento, tamanho do produto de PCR. respectiva enzima e referência para cada polimorfismo analisado.

GENE	PRIMERS	T _m (°C)	ENZIMA / FRAGMENTOS	REFERÊNCIAS
<i>BRCA1</i> <i>rs4793191</i>	3'ACTGCACTGCCTCTTCCACT 5'	64,6°C	<i>PstI</i> 129pb, 232pb 401pb	WANG et al (2010)
	5'TTGCACTGTCCCACACTGTT 3'			
<i>BRCA2</i> <i>rs9567623</i>	3'GGCTTTAGAATCGTGCACT 5'	54,2°C	<i>HhaI</i> 67pb, 198pb 265pb	WANG et al (2010)
	5'CTGGATTCAAGCGATTCTCC 3'			
<i>RAD51</i> <i>rs1801320</i>	3'TGGGAACTGCAACTCATCTGG 5'	52°C	<i>MvaI</i> 86pb, 71pb 157pb	LI et al (2011)
	5'GCGCTCCTCTCTCCAGCAG 3'			
<i>XRCC5</i> <i>rs3835</i>	3'ATGATGAGGAGTGATATGTGGAAGAG 5'	52°C	<i>Alu I</i> 73pb, 78pb 151pb	TSENG et al (2008)
	5'AGTGCTAAGTATCGTCTGCAACTGAT 3'			
<i>XRCC6</i> <i>rs2267437</i>	3'TCTCCACTCGGCTTTTCTTCCA 5'	63°C	<i>Ban I</i> 38pb, 240pb 320pb	WANG et al (2008)
	5'TCTCCCTCCGCTTCGCACTC 5'			
<i>LIG4</i> <i>rs1805388</i>	3'TCTGTATTCGTTCTAAAGTTGAACA 5'	52°C	<i>HpyCH4 III</i> 55pb, 65pb 121pb	TSENG et al (2008)
	5'TGCTTTACTAGTTAAACGAGAAGAT 3'			
<i>ATM</i> <i>rs228593</i>	3'TCCCTGCCCATGATTATCTC 5'	60°C	<i>Bcl I</i> 146pb, 118pb 264pb	WANG et al (2010)
	5'GCCTTCGTACCCTCATCAGT 3'			

Figura 5: Organograma resumo das metodologias utilizadas neste estudo.



4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos pacientes

O número amostral deste estudo (n) foi igual a 60 pacientes para o grupo SMD e 82 idosos voluntários para o grupo controle. A variável idade foi dividida em duas faixas: <60 (menor que 60 anos) e >60 (maior que 60 anos). A média de idade do grupo controle, composto por idosos saudáveis voluntários foi de 62,9 anos (mediana = 65, 22-93). Para o grupo SMD, a média de idade foi de 60,1 anos (mediana = 66, 15-91). Para as faixas de idade propostas, o grupo SMD foi constituído de 38 pacientes com idade >60 anos (63,3%) e 22 pacientes com idade <60 anos (36,7%).

Quanto à variável de gênero, foram incluídos neste estudo 13 indivíduos (15,85%) do sexo masculino e 69 (84,14%) do sexo feminino para o grupo controle. Para o grupo SMD, foram incluídos no estudo 31 pacientes do sexo masculino (51,7%) e 29 pacientes do sexo feminino (48,3%). Quanto à variável origem (dividida em urbano ou rural), obtivemos um total de 37 pacientes de origem urbana (61,7%) e 23 pacientes de origem rural (38,3%) dentro do grupo SMD.

Dos 60 pacientes incluídos neste estudo, 5 (8,33%) foram classificados como SMD secundária ao tratamento e 55 (91,66%) pacientes foram classificados como SMD primária.

Na análise das frequências de variáveis clínicas, a variável celularidade da medula óssea foi dividida em hipocelular, normocelular e hipercelular. Observando os pacientes com SMD, obtivemos 14 pacientes (28,6%) com medula hipocelular, 10 pacientes com medula normocelular (20,4%) e 25 pacientes com medula hipercelular (51,0%).

A variável de números de citopenias no sangue periférico foi dividida em 2 (duas) faixas distintas: 0-1 citopenia e 2-3 citopenias (GREENBERG et al., 1997). Na análise do número de citopenias, observamos um total de 24 pacientes (40,0%) dentro da faixa de 0-1 citopenia e 36 pacientes (60,0%) na faixa de 2-3 citopenias.

Quanto à análise citogenética dos pacientes do grupo SMD, quarenta e quatro pacientes (73,3%) apresentaram resultados, sendo 39 pacientes de SMD primária e cinco pacientes de SMD secundária. Dos pacientes com resultados, 26 pacientes (59,09%) foram classificados como de prognóstico favorável (Figura 7), 10 pacientes (22,72%) como prognóstico intermediário (Figura 8) e 8 pacientes (18,18%) como prognóstico desfavorável (Figura 9), segundo critérios utilizados pelo IPSS e OMS (GREENBERG et al., 1997; BRUNNING et al., 2008) (Tabela 4).

Dentre os 44 pacientes com resultado citogenético, 19 pacientes (43,18%) possuíam cariótipo normal (Figura 6) e 25 pacientes (56,81%) apresentaram cariótipo alterado, dos quais 48% (12/25) apresentaram uma única alteração, 28% (7/25) apresentaram clones com duas alterações e 24% (6/25) apresentaram cariótipo complexo (3 ou mais alterações citogenéticas). Presença de ganho ou perda de cromossomos (aneuploidias) foi observado em 60% (12/25) dos casos com cariótipo alterado.

As alterações mais comuns envolveram o cromossomo 5 (-5/5q-), ocorrendo em 44% dos 25 pacientes com cariótipo alterado. Foram observadas outras alterações frequentes envolvendo o cromossomo 7 (-7/7q-) em 20% dos casos, cromossomo 17 (-17/17p-) em 16%, cromossomo 8 (+8) em 12% e cromossomo 20 (-20/20q-) em 8% dos pacientes. Deleções isoladas do braço longo do cromossomo 5 (5q-) foram encontradas em 24% (6/25) dos casos com cariótipos alterados.

Tabela 4: Citogenética, IPSS (1997) e Classificação OMS (2008) ao diagnóstico dos pacientes com SMD.

Pacientes	Citogenética	IPSS	OMS
1	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2]	HIGH	AREB-II
2	46,XY,-?10,+mar[5]/46,XY[1]	INT-1	CRDM
3	175,XXXXXXXXX,-5,-6,-7,-8,-9,-11,-13,-14[4]/46,XX,del(5)(q15q33)[8]/46,XX[19]		SMD sec.
4	47,XY,+mar[3]/46,XY,[17]	INT-1	CRDM
5	Sem Metáfase		CRDM
6	46,XY,del(5)(q15q33)[7]/46,XY[11]	INT-1	5q-
7	37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/46,XY,del(5)(q15q33)[5]/46,XY[6]	INT-2	AREB-II
8	Sem Metáfase		CRDM
9	46,XY[9]		SMD sec.
10	46,XX[5]	LOW	ARSA
11	90,XXXX,-6,-7,-8,-11,+21,+22[5]/46,XX,del(7)(q23),del(20)(q13.1)[3]/45,XX,-7[5]/45~46,XX,-7,del(7)(q32),del(11)(q32),-17,del(17)(p11.2),del(20)(q13.1)[cp11]	HIGH	AREB-II
12	46,XY[11]	INT-1	CRDM
13	46,XY,del(5)(?q22q33)[3]/45,XY,del(5)(?q22q33),-18[3]/46,XY[14]	INT-1	ARSA
14	46,XY[9]	INT-1	CRDM
15	Sem Metáfase		CRDM
16	46,XX[12]	LOW	ARSA
17	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(?q25)[7]/46,XX[4]	INT-1	CRDM
18	Sem Metáfase		ARSA
19	46,XX[20]	INT-1	CRDM
20	46,XX,del(5)(q15q33)[4]/46,XX[18]	LOW	NR
21	Sem Metáfase		CRDM
22	46,XX[7]	INT-1	CRDM
23	Sem Metáfase		ARSA
24	46,XY[20]	INT-1	AREB-I
25	89,XXY,-20,-22,-Y[4]/46,XY,del(16)(?q22)[5]/46,XY[11]	INT-1	CRDM
26	47,XY,+mar[5],46,XY[11]	INT-1	CRDM
27	46,XY,del(7)(q32)[2]/46,XY[18]	INT-2	CRDM
28	46,XY[8]	INT-1	CRDM
29	Sem Metáfase		SMD sec.
30	Sem Metáfase		CRDM
31	46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12]	INT-1	5q-
32	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[cp8]	INT-2	AREB-II
33	46,XX[25]	INT-1	CRDM

34	46,XX,del(17)(p11.2)[3]/46,XX[4]		SMD sec.
35	46,XY[5]	INT-1	CRDM
36	Sem Metáfase		AREB- II
37	46,XY,del(5)(?q15q33)[7]/46,XY[8]	INT-1	CRDM
38	Sem Metáfase		AR
39	46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17]	INT-1	AREB- I
40	46,XX[22]		SMD sec.
41	46,XX[8]	LOW	AR
42	Sem Metáfase		AR
43	46,XX[11]		SMD sec.
44	46,XY,del(5)(q22q33)[5]/46,XY[7]	LOW	NR
45	46,XY,del(5)(q15q33),del(17)(p11.2)[7]/46,XY[13]	INT-1	CRDM
46	46,X-Y[4]/46,XY[16]	LOW	ARSA
47	46,XX[20]	LOW	CRDM
48	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]	INT-2	CRDM
49	Sem Metáfase		AREB- I
50	47,XX,t(4;11)(q27;q32),+mar[4]/46,XX[16]	INT-1	CRDM
51	46,XY	LOW	AR
52	Sem Metáfase		ARSA
53	46,XX[6]	LOW	AR
54	46,XX[8]	INT-1	CRDM
55	46,XY[6]	LOW	ARSA
56	Sem Metáfase		AR
57	Sem Metáfase		CRDM
58	47,XY,+8[4]/46,XY[5]	INT-1	CRDM
59	44,XX-13,-17[4]/46,XX[5]	INT-1	CRDM
60	Sem Metáfase		CRDM

Legenda: IPSS (Sistema Internacional de Score Prognóstico), OMS (Organização Mundial de Saúde) AR (Anemia refratária), ARSA (Anemia refratária com sideroblastos em anel), AREB (Anemia refratária com excesso de blastos tipo I e II), CRDM (Citopenia refratária com displasia em multilinhagens), del 5q (deleção isolada do 5q), NR (Neutropenia refratária). LOW (prognóstico favorável), INT (Prognóstico intermediário tipo I e II), HIGH (Prognóstico desfavorável).

Figura 6: Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo normal 46,XY[20] de prognóstico favorável de acordo com a classificação do IPSS (GREENBERG et al., 1997).

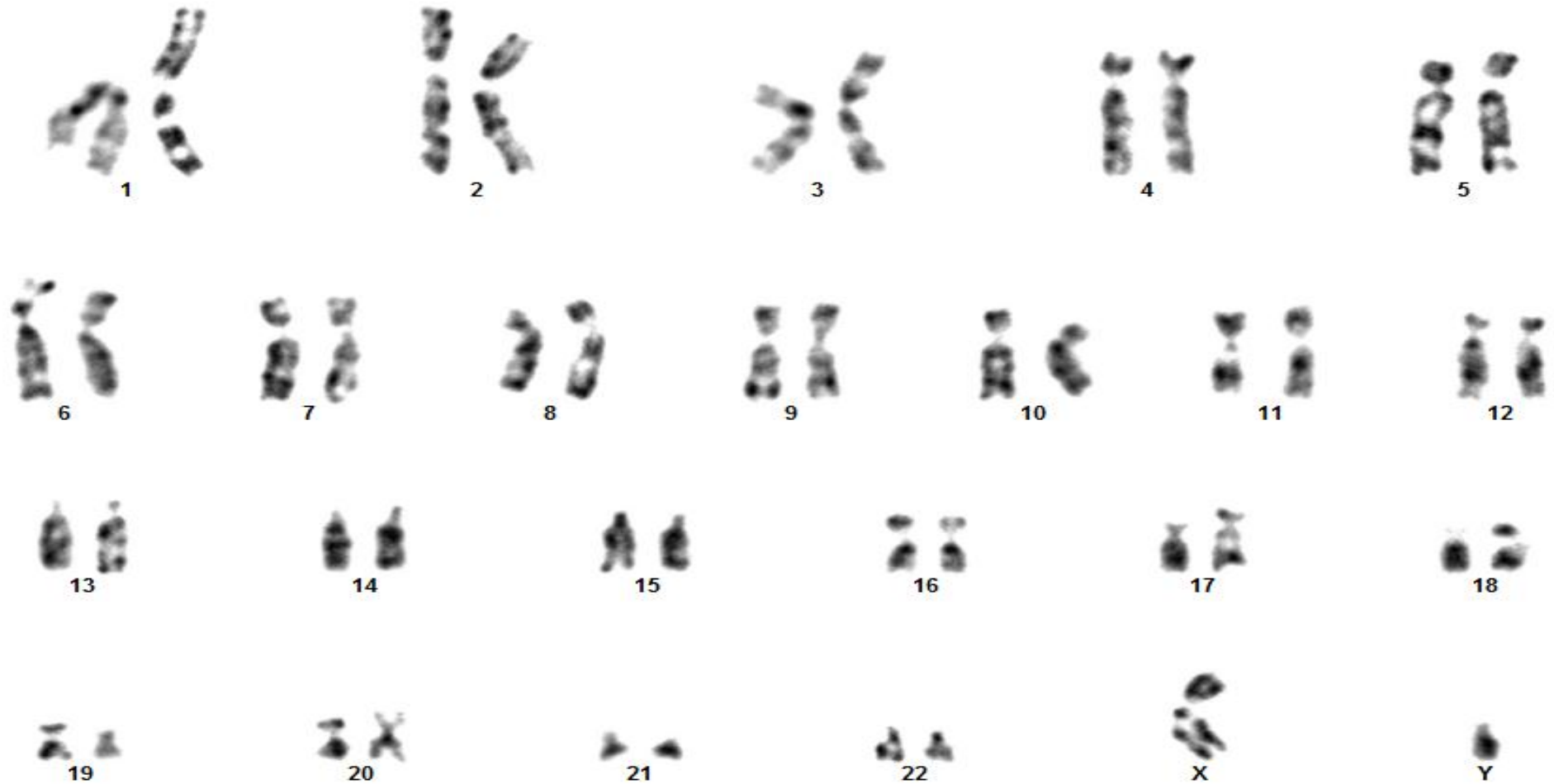


Figura 7: Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo alterado 46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17] de prognóstico favorável de acordo com a classificação do IPSS (GREENBERG et al., 1997).



Figura 8: Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo alterado 47,XY,+8[4]/46,XY[5] de prognóstico intermediário de acordo com a classificação do IPSS (GREENBERG et al., 1997).

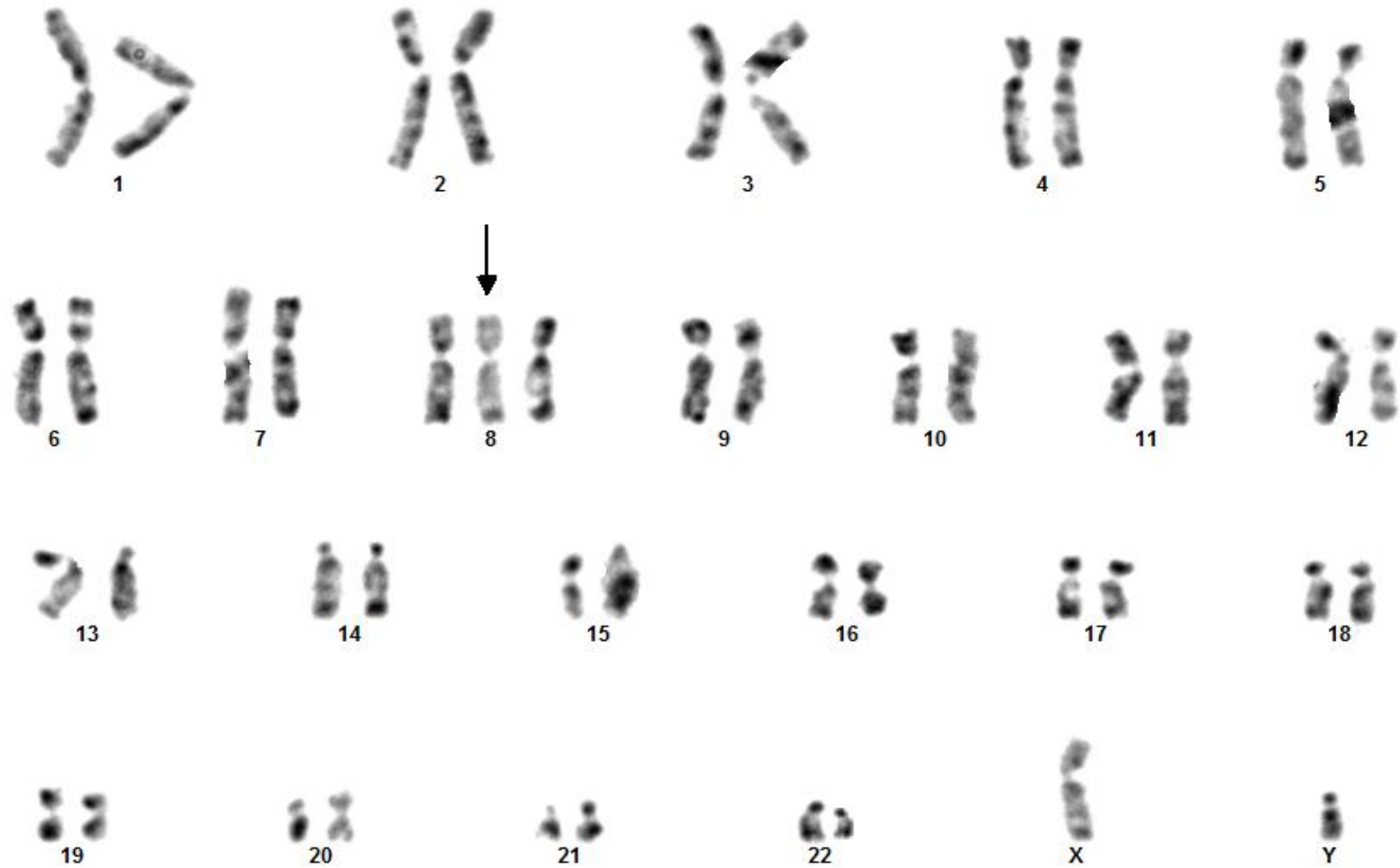


Figura 9: Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo alterado 47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2] de prognóstico desfavorável de acordo com a classificação do IPSS (GREENBERG et al., 1997).



Quanto à classificação OMS (BRUNNING et al., 2008), os pacientes foram divididos em duas classificações distintas: 1) OMS Estratificada, dividida em AREB I (Anemia Refratária com Excesso de Blastos I), AREB II (Anemia Refratária com Excesso de Blastos II), CRDM (Citopenia Refratária com Displasia de Múltiplas Linhagens), 5q- (Deleção do braço longo do cromossomo 5), ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel), AR (Anemia Refratária) e SMD Secundária; 2) OMS Categorizada, dividida em Baixo Risco (CRDM, AR e ARSA), Alto risco (AREB I e AREB II) e SMD secundária.

Na análise da variável OMS Estratificada, observamos 2 pacientes (3,3%) que foram classificados como 5q-, 3 pacientes (5,0%) classificados como AREB I, 5 pacientes (8,3%) como AREB II, 28 pacientes (46,7%) como CRDM, 6 pacientes (10,0%) como AR, 8 pacientes (13,3%) como ARSA e 8 pacientes (13,3%) como SMD secundária. Já na análise da variável OMS Categorizada, foram observados 46 pacientes (76,7%) no grupo Baixo risco, 8 pacientes (13,3) no grupo Alto risco e 6 pacientes (10,0%) no grupo de SMD secundária.

Para a variável IPSS, os pacientes do grupo SMD foram divididos em dois grupos distintos: o primeiro composto pelo prognóstico Favorável (FAV.) e prognóstico Intermediário-1 (INT-1) (FAV+INT-1); o segundo pelo prognóstico Desfavorável (DES) e intermediário-2 (INT-2) (DES+INT-2), segundo a classificação IPSS proposta por Greenberg et al. (1997). Assim, a análise mostrou que 32 pacientes (82,1%) estão inseridos dentro do grupo FAV+INT-1 e 7 pacientes (17,9%) foram agrupados dentro da categoria DES+INT-2.

4.2 Análise dos polimorfismos por PCR-RFLP

As distribuições dos genótipos referentes aos polimorfismos estudados para os genes *XRCC5* (rs3835), *XRCC6* (rs2267437), *LIG4* (rs1805388), *BRCA1* (rs4793191), *BRCA2*(rs9567623), *RAD51*(rs1801320) e *ATM* rs228593, para a correlação entre os indivíduos controles (n=82) e SMD (n=60) serão apresentados nas seções a seguir.

4.2.1 Análise do polimorfismo rs228593 do gene *ATM*

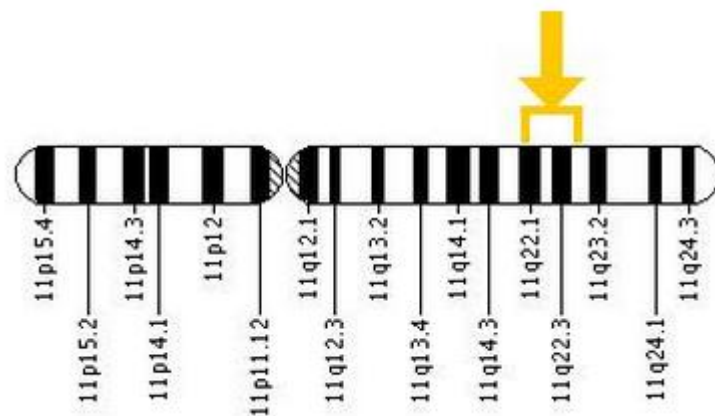
O polimorfismo rs228593 está localizado no braço longo do cromossomo 11 na posição 11q22-q23 na região intrônica do gene *ATM* (Figura 10). As frequências alélicas apresentadas no grupo controle foram de 53 (32,31%) para o alelo selvagem G e 111 (67,68%) para o alelo mutante A. Para o grupo SMD, a frequência alélica foi de 46 (38,33%) para o alelo G e 74 (61,66%) para o alelo A. Não houve associação significativa entre as

frequências alélicas selvagem (G) e mutante (A) para o polimorfismo rs228593 ($p=0,314$) (Tabela 5).

Os genótipos analisados para o polimorfismo rs228593 encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p>0,05$) (Tabela 5). Na análise das frequências genótípicas para o polimorfismo *rs228593* pode-se observar que o genótipo homocigoto selvagem (GG), o heterocigoto (GA) e homocigoto mutante (AA) (Figura 11) apresentaram, respectivamente, as frequências de 6 (7,3%), 41 (50,0%) e 35 (42,6%) para o grupo controle e 13 (21,67%), 20 (33,33%) e 27 (45,0%) para o grupo SMD (Tabela 5).

Através do testes de qui-quadrado, foi obtida associação significativa entre o grupo controle e pacientes do grupo SMD ($p=0,021$). No intuito de verificar qual genótipo está associado com o risco da doença, foi realizada a regressão logística multinomial, obtendo que o genótipo heterocigoto A/G está associado com a diminuição de risco de SMD ($p=0,008$, OR 0,225, IC 0,075-0,680) (Tabela 6).

Figura 10: Representação do cromossomo 11 e a indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs228593 do gene *ATM*



Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ATM>

Tabela 5: Genótipos, distribuição alélica e equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles para o SNP *rs228593* do gene *ATM*.

Gene/SNP	Grupo	Frequência Alélica		<i>p</i> valor*	Frequência Gênica			<i>p</i> valor*	H-W teste	
		G	A		GG	GA	AA		X ²	<i>P</i> valor
ATM rs228593	Controle	53 (32,31)	111 (67,68)	0,314	6 (7,31)	41 (50,0)	35 (42,68)	0,021	1,675	0,1955
	SMD	46 (38,33)	74 (61,66)		13 (21,67)	20 (33,33)	27 (45,0)		5,219	0,0223

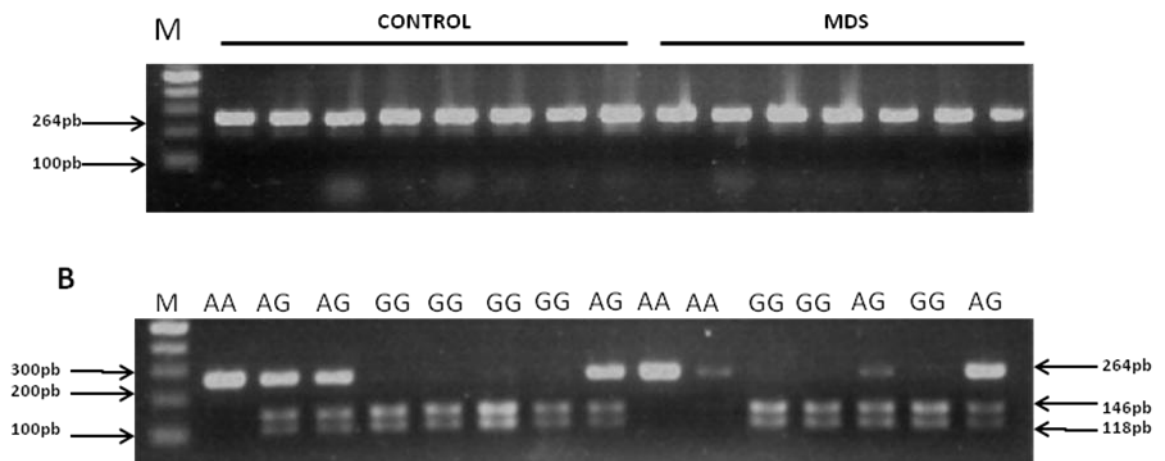
*Teste de Qui-quadrado (χ^2) de Pearson ou Fisher. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,001$.

Tabela 6: Regressão logística multinominal para associar os genótipos do SNP *rs228593* do gene *ATM* entre o grupo controle e o de pacientes com SMD.

Variáveis		IC 95% para Exp (B)				
Grupos	Genótipo	Wald	p valor	Exp (B)	Mínimo	Máximo
Controle	GG					
	GA					
	AA					
SMD	GG	3,449	0,063		0,944	8,352
	GA	6,992	0,008	0,225	0,075	0,680
	AA	3,449	0,063		0,120	1,059

*Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,001$.

Figura 11: A) Gel de Eletroforese 1,5% de agarose em tampão TAE 1X. Representação dos *spots* de PCR resultantes da amplificação de uma região de 264pb do gene *ATM*. B) Gel de Eletroforese 3,0% de agarose em tampão TAE 1X



Detecção dos genótipos na análise do SNP *rs228593* do gene *ATM*. O produto de PCR foi digerido a partir da enzima de restrição *Bcl I* por 3 horas a 60°C. As linhas 2, 5, 6, 7, 8, 12, 13 e 15 apresentam o perfil Homozigótico selvagem (GG); as linhas 3, 4, 9, 14 e 15 apresentam o perfil Heterozigótico (AG) e as linhas 10 e 11 apresentam o perfil Homozigótico mutante (AA). A linha M consiste no marcador de peso molecular de 100pb.

Não foram encontradas significâncias nas análises de correlação da frequência genotípica do polimorfismo *rs228593* do gene *ATM* no grupo SMD com as variáveis sócio-demográficas de sexo ($p=0,285$), idade ($p=0,782$) e origem ($p=0,408$), e para as variáveis clínicas de cariótipo ($p=0,336$), celularidade da medula óssea ($p=0,385$) e para a classificação OMS (2008) ($p=0,174$) (Tabela 7).

Em contrapartida foram encontradas significâncias para as variáveis clínicas do perfil de citopenias do sangue periférico ($p=0,003$) e os índices prognósticos obtidos com o IPSS ($p=0,004$) (Tabela 7).

Na busca de identificar qual genótipo está relacionado com os padrões de citopenias, foi realizado o teste de regressão logística multinomial, obtendo-se uma associação significativa entre o genótipo heterozigoto A/G e a faixa 0-1 da variável citopenia ($p=0,032$, OR 5,250, IC 1, 151-23,937) (Tabela 8). Adicionalmente, o teste de regressão logística multinomial mostrou significância na interação do genótipo heterozigoto A/G no índice de escore de prognóstico favorável para a classificação IPSS (1977) ($p<0,001$, OR 21,95, IC 29,791-16,185) (Tabela 9).

Tabela 8: Regressão Logística Multinomial para correlacionar o genótipo do SNP *rs228593* do gene *ATM* com os padrões de citopenias no grupo de pacientes com SMD.

Variáveis		IC 95% para Exp (B)				
Citopenias	Genótipo	Wald	Exp(B)	p valor	Mínimo	Máximo
0-1	GG	0,339		0,560	0,352	6,880
	AG	4,589	5,250	0,032	1,151	23,937
	AA	0,339		0,560	0,145	2,843
2-3	GG					
	AG					
	AA					

*Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Tabela 9: Regressão Logística Multinomial para correlacionar o genótipo do SNP *rs228593* do gene *ATM* com os grupos de risco do IPSS (GREENBERG et al.,1997) no grupo de pacientes com SMD.

Variáveis		IC 95% para Exp (B)				
IPSS	Genótipo	Wald	Exp (B)	p valor	Mínimo	Máximo
Favorável	GG	0,137		0,711	0,013	19,562
	AG	355,177	21,95	0,000	29,791	16,185
	AA	0,137		0,711	0,051	78,250
Intermediário	GG	0,220		0,639	0,028	9,076
	AG					
	AA	0,220		0,639	0,110	36,306
Desfavorável	GG					
	AG					
	AA					

*Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Tabela 7: Associação da frequência gênica do SNP *rs228593* do gene *ATM* entre os aspectos clínico-demográficos nos pacientes com SMD.

Variáveis	Frequência Gênica/%				X ² Teste		X ² Teste*		OR (IC 95%)	
	GG	AG	AA	Total	X ²	p	AG+AA	X ²	P	
Sexo										
<i>Masculino</i>	5 (8,3)	9 (15,0)	17 (28,3)	31 (51,7)	2,643	0,285	27 (45,0)	2,019	0,204	AA= 0,468 (0,158-1,389)
<i>Feminino</i>	8 (13,3)	11 (18,3)	10 (16,7)	29 (48,3)			21 (35,0)			AG+GG= 1,203 (0,952-1,564)
Idade										
<i>>60 anos</i>	8 (13,6)	14 (23,3)	16 (26,7)	38 (63,3)	0,594	0,782	30 (50,0)	0,072	1,000	AA= 1,158 (0,393-3,407)
<i><60 anos</i>	5 (8,3)	6 (10,0)	11 (18,3)	22 (36,7)			18 (30,0)			AG+GG= 0,965(0,747-1,247)
Origem										
<i>Urbano</i>	6 (10,0)	14 (23,3)	17 (28,3)	37 (61,7)	1,930	0,408	32 (53,3)	2,538	0,183	AA= 0,444 (0,160-1,235)
<i>Rural</i>	7 (11,7)	6 (10,0)	10 (16,7)	23 (38,3)			16 (26,7)			AG+GG= 1,243 (0,922-1,676)
Cariótipo										
<i>Favorável</i>	7 (15,9)	10 (22,7)	9 (20,5)	26 (59,1)	4,687	0,336	20 (45,5)	0,779	0,794	
<i>Normal</i>	3 (6,8)	2 (4,5)	5 (11,4)	10 (22,7)			7 (15,9)			
<i>Desfavorável</i>	1 (2,3)	1 (2,3)	6 (13,6)	8 (18,2)	3,763	0,168	7 (15,9)	1,104	0,472	
<i>Cariótipo Normal</i>	7 (15,9)	7 (15,9)	6 (13,6)	20 (45,5)			14 (31,8)			
<i>Cariótipo Alterado</i>	4 (9,1)	6 (13,6)	14 (31,8)	24 (54,5)			20 (45,5)			
Celularidade MO										
<i>Normo+Hiper celular</i>	9 (18,8)	11 (22,9)	14 (29,2)	34 (70,8)	2,264	0,332	25 (52,1)	2,246	0,242	
<i>Hipo celular</i>	1 (2,1)	6 (12,5)	7 (14,6)	14 (29,2)			13 (27,1)			
Citopenia										
<i>0-1</i>	4 (6,7)	14 (23,3)	6 (10,0)	24 (40,0)	11,517	0,003	20 (33,3)	0,278	0,746	AA= 0,750(0,254-2,216)
<i>2-3</i>	9 (15,0)	6 (10,0)	21 (35,0)	36 (60,0)			28 (46,7)			AG+GG= 1,071 (0,834-1,376)
IPSS (Grupo de Risco)										
<i>Favorável</i>	1 (2,6)	7 (17,9)	2 (5,1)	10 (25,6)	14,304	0,004	9 (23,1)	1,903	0,427	
<i>Intermediário</i>	8 (20,5)	3 (7,7)	16 (41,0)	27 (69,2)			20 (51,3)			
<i>Desfavorável</i>	1 (2,6)	0 (0,0)	1 (2,6)	2 (5,1)			1 (2,6)			
OMS_CATEGORIZADA										
<i>Alto Risco</i>	1 (1,7)	1 (1,7)	6 (10,0)	8 (13,3)	6,230	0,174	7 (11,7)	0,410	0,868	
<i>Baixo Risco</i>	11 (18,3)	15 (25,0)	20 (33,3)	46 (76,7)			36 (60,0)			
<i>SMD Secundária</i>	1 (1,7)	4 (6,7)	1 (1,7)	6 (10,0)			5 (8,3)			
OMS ESTRATIFICADA										
<i>5q-</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,3)	2 (3,3)	17,783	0,110	2 (3,3)	2,917	0,887	
<i>AREB I</i>	0 (0,0)	1 (1,7)	2 (3,3)	3 (5,0)			3 (5,0)			
<i>AREB II</i>	1 (1,7)	0 (0,0)	4 (6,7)	5 (8,3)			4 (6,7)			
<i>CRDM</i>	8 (13,3)	6 (10,0)	14 (23,3)	28 (46,7)			21 (35,0)			
<i>AR</i>	2 (3,3)	3 (5,0)	1 (1,7)	6 (10,0)			4 (6,7)			
<i>ARSA</i>	1 (1,7)	4 (6,7)	3 (5,0)	8 (13,3)			7 (11,7)			
<i>SMD SECUNDÁRIA</i>	1 (1,7)	6 (10,0)	1 (1,7)	8 (13,3)			7 (11,7)			

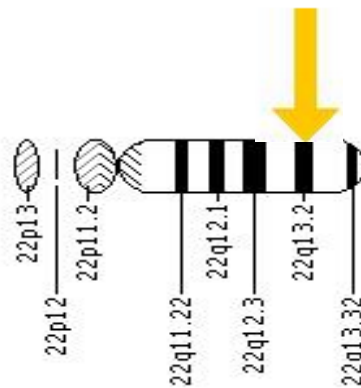
*Teste de Qui-quadrado (x²) de Pearson ou Fisher. Valor estatisticamente significativo para p ≤ 0,05.

4.2.2 Análise do polimorfismo rs2267437 para o gene *XRCC6*

O polimorfismo rs2267437 está localizado no cromossomo 22 na região 22q13.2 promotora do gene *XRCC6* (Figura 12). As frequências alélicas apresentadas no grupo controle foram de 109 (66,46%) para o alelo selvagem C e 55 (33,35%) para o alelo mutante G. Para o grupo SMD a frequência alélica foi de 83 (69,16%) para o alelo G e 37 (30,83%) para o alelo A. Não houve associação significativa entre as frequências alélicas selvagem (G) e mutante (A) para o polimorfismo rs228593 ($p=0,700$) (Tabela 10).

Os genótipos analisados para o polimorfismo rs2267437 encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p>0,05$) (Tabela 10). Na análise das frequências genotípicas para o polimorfismo *rs2267437* pode-se observar que o alelo homozigoto selvagem (GG), o heterozigoto (GC) e o homozigoto mutante (CC) (Figura 13) apresentaram, respectivamente, as frequências de 40 (48,7%), 33 (40,2%) e 9 (10,9%) para o grupo controle e 27 (45,0%), 28 (46,6%) e 5 (8,3%) para o grupo SMD (Tabela 10). Através do teste de qui-quadrado, não foi obtida associação significativa entre o grupo controle e o grupo SMD ($p=0,704$).

Figura 12: Representação do cromossomo 22 e indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs2267437 do gene *XRCC6*.



Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/>

Não foram encontradas significâncias nas análises de correlação da frequência genotípica do SNP *rs2267437* para o gene *XRCC6* no grupo SMD com as variáveis sócio-demográficas de sexo ($p=0,798$), idade ($p=1,000$) e origem ($p=0,923$), como também para as variáveis clínicas de número de citopenias no sangue periférico (0,172), para o índice prognóstico do IPSS ($p=0,101$) e para a classificação OMS (BRUNNING et al., 2008) estratificada ($p=0,331$) e categorizada ($p=0,111$) (Tabela 11).

Adicionalmente, obtivemos uma correlação significativa ($p=0,018$) na análise dos cariótipos (normal x alterado) da medula óssea dos pacientes com SMD e sua interação com

os genótipos do SNP *rs2267437* para o gene *XRCC6* (Tabela 11). Em seguida, foi realizado o teste de regressão logística multinomial, obtendo-se uma associação significativa para o genótipo C/G ($p=0,010$, OR 7,259, IC 1,616-32,600) e CG+GG ($p=0,010$, OR 6,788, IC 1,570-29,354) no aumento do risco de chance da variável de cariótipo normal (Tabela 12).

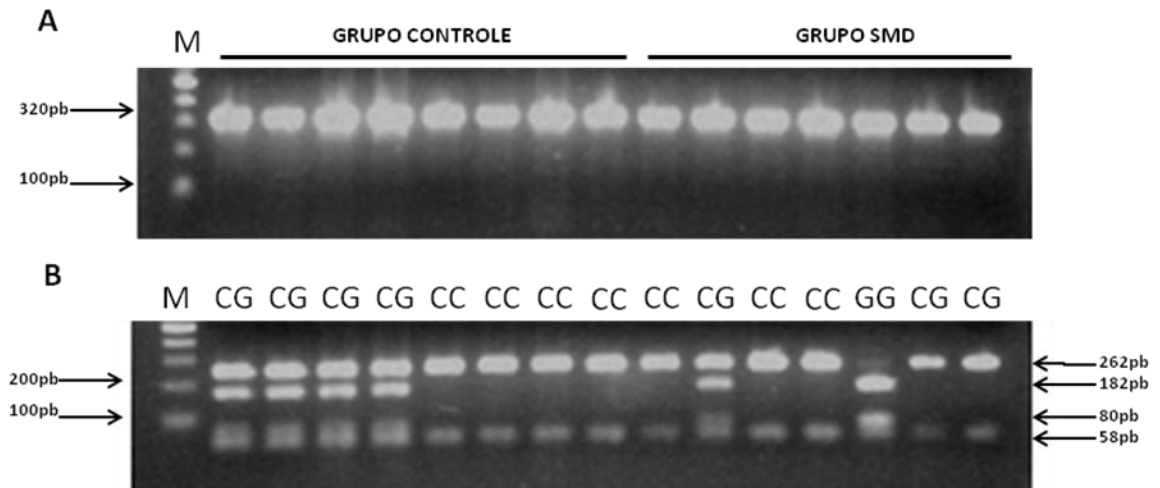
Na análise da correlação dos genótipos do polimorfismo *rs2267437* com as variáveis de celularidade da medula óssea em pacientes com SMD, verificamos uma associação significativa com $p=0,043$. Nesta análise, observamos associação significativa ($p=0,023$, OR 5,556, IC 1,270-24,239) entre o genótipo C/G e a variável de Normo+Hiper celularidade na medula óssea (Tabela 11). Na associação entre genótipo mutante (CG+GG) obtivemos resultado significativo também com a variável Normo+Hiper celularidade na medula óssea ($p=0,023$, OR 4,792, IC 1,238-18,546) (Tabela 13).

Tabela 10: Genótipos, Distribuição Alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles para o SNP *rs2267437* do *XRCC6*.

Gene/SNP	Grupo	Frequência Alélica		<i>p</i> valor*	Frequência Gênica			<i>p</i> valor*	H-W teste	
		C	G		CC	CG	GG		X ²	<i>P</i> valor
XRCC6 <i>rs2267437</i>	Controle	109 (66,46)	55 (33,53)	0,700	40 (48,7)	33 (40,2)	9 (10,9)	0,704	0,304	0,581
	SMD	83 (69,16)	37 (30,83)		27 (45,0)	28 (46,6)	5 (8,33)			

*Teste de Qui-quadrado (χ^2) de Pearson ou Fisher. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,001$.

Figura 13: A) Gel de Eletroforese 1,5% de agarose em tampão TAE 1X. Representação dos spots de PCR resultantes da amplificação de uma região de 320pb do gene *XRCC6*. B) Gel de Eletroforese 3,0% de agarose em tampão TAE 1X.



Deteção dos genótipos na análise do SNP rs2267437 do gene *XRCC6*. O produto de PCR foi digerido a partir da enzima de restrição *Ban I* por 3 horas a 63°C. As linhas 2, 3, 5, 7 e 10 apresentam o perfil Homozigótico selvagem (CC); as linhas 4, 8 e 9 apresentam o perfil Heterozigótico (CG) e as linhas 6 e 11 apresentam o perfil Homozigótico mutante (GG). A linha M consiste no marcador de peso molecular de 100pb.

Tabela 11: Associação da frequência gênica do SNP *rs2267437* do gene *XRCC6* entre os aspectos clínico-demográficos nos pacientes com SMD.

Variáveis	Frequência Gênica/%				X ² Teste		X ² Teste*		OR (IC 95%)	
	CC	CG	GG	Total	X ²	p	CG+GG	X ²	p	
Sexo										
<i>Masculino</i>	15 (25,0)	14 (23,3)	2 (3,3)	31 (51,7)	0,467	0,798	16 (26,7)	0,297	0,614	CC= 1,169 (0,664-2,059)
<i>Feminino</i>	12 (20,0)	14 (23,3)	3 (5,0)	29 (48,3)			17 (28,3)			CG+GG= 0,880 (0,557-1,392)
Idade										
<i>>60 anos</i>	17 (28,3)	18 (30,0)	3 (5,0)	38 (63,3)	0,036	1,000	21 (35,0)	0,003	1,000	CC= 0,984 (0,552-1,755)
<i><60 anos</i>	10 (16,7)	10 (16,7)	2 (3,3)	22 (36,7)			12 (20,0)			CG+GG= 1,013(0,629-1,632)
Origem										
<i>Urbano</i>	16 (26,7)	18 (30,0)	3 (5,0)	37 (61,7)	0,153	0,923	21 (35,0)	0,120	0,793	CC= 0,904 (0,514-1,590)
<i>Rural</i>	11 (18,3)	10 (16,7)	2 (3,3)	23 (38,3)			12 (20,0)			CG+GG= 1,088 (0,672-1,761)
Cariótipo										
<i>Favorável</i>	8 (18,2)	15 (34,1)	3 (6,8)	26 (59,1)	5,654	0,147	18 (40,9)	5,455	0,089	
<i>Normal</i>	3 (6,8)	6 (13,6)	1 (2,3)	10 (22,7)			7 (15,9)			
<i>Desfavorável</i>	6 (13,6)	2 (4,5)	0 (0,0)	8 (18,2)			2 (4,5)			
<i>Cariótipo Normal</i>	3 (6,8)	14 (31,8)	2 (4,5)	19 (43,2)	7,526	0,018	16 (36,4)	7,362	0,012	
<i>Cariótipo Alterado</i>	14 (31,8)	9 (20,5)	2 (4,5)	25 (56,8)			11 (25,0)			
Celularidade MO										
<i>Normo+Hiper celular</i>	12 (24,5)	20 (40,8)	3 (6,1)	35 (71,4)	5,815	0,043	23 (46,9)	5,576	0,027	
<i>Hipo celular</i>	10 (20,4)	3 (6,1)	1 (2,0)	14 (28,6)			4 (8,2)			
Citopenia										
<i>0-1</i>	9 (15,0)	11 (18,3)	4 (6,7)	24 (40,0)	3,839	0,172	15 (25,0)	0,909	0,430	CC= 0,750(0,407-1,382)
<i>2-3</i>	18 (30,0)	17 (28,3)	1 (1,7)	36 (60,0)			18 (30,0)			CG+GG= 1,250 (0,797-1,961)
IPSS (Grupo de Risco)										
<i>FAV+INT-1</i>	11 (28,2)	19 (48,7)	3 (7,7)	33 (84,6)	5,296	0,101	22 (56,4)			
<i>DES+INT-2</i>	5 (12,8)	1 (2,6)	0 (0,0)	6 (15,4)			1 (2,6)			
OMS_CATEGORIZADA										
<i>Alto Risco</i>	7 (11,7)	1 (1,7)	0 (0,0)	8 (13,3)	7,233	0,111	1 (1,7)			
<i>Baixo Risco</i>	18 (30,0)	24 (40,0)	4 (6,7)	46 (76,7)			28 (46,7)			
<i>SMD Secundária</i>	2 (3,3)	3 (5,0)	1 (1,7)	6 (10,0)			4 (6,7)			
OMS ESTRATIFICADA										
<i>5q-</i>	1 (1,7)	1 (1,7)	0 (0,0)	2 (3,3)	13,491	0,331	1 (1,7)	10,038	0,112	
<i>AREB I</i>	3 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (5,0)			0 (0,0)			
<i>AREB II</i>	4 (6,7)	1 (1,7)	0 (0,0)	5 (8,3)			1 (1,7)			
<i>CRDM</i>	12 (20,0)	15 (25,0)	1 (1,7)	28 (46,7)			16 (26,7)			
<i>AR</i>	2 (3,3)	3 (5,0)	1 (1,7)	6 (10,0)			4 (6,7)			
<i>ARSA</i>	1 (1,7)	5 (8,3)	2 (3,3)	8 (13,3)			7 (11,7)			
<i>SMD SECUNDÁRIA</i>	4 (6,7)	3 (5,0)	1 (1,7)	8 (13,3)			4 (6,7)			

*Teste de Qui-quadrado (x²) de Pearson ou Fisher. Valor estatisticamente significativo para p ≤ 0,05.

Tabela 12: Regressão Logística Multinomial para correlacionar o genótipo do SNP *rs2267437* do gene *XRCC6* com as classificações obtidas na análise citogenética no grupo de pacientes com SMD.

Variáveis		IC 95% para Exp (B)				
Citogenética	Genótipo	Wald	Exp (B)	p valor	Mínimo	Máximo
Cariótipo Normal	CC	1,689	0,214	0,194	0,021	2,187
	CG	6,691	7,259	0,010	1,616	32,600
	GG	1,689	4,667	0,194	0,457	47,629
	CG+GG	6,571	6,788	0,010	1,570	29,354
Cariótipo Alterado	CC					
	CG					
	GG					
	CG+GG					

*Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Tabela 13: Regressão Logística Multinomial para correlacionar o genótipo do SNP *rs2267437* do gene *XRCC6* com as classificações obtidas na análise da celularidade da medula óssea no grupo de pacientes com SMD.

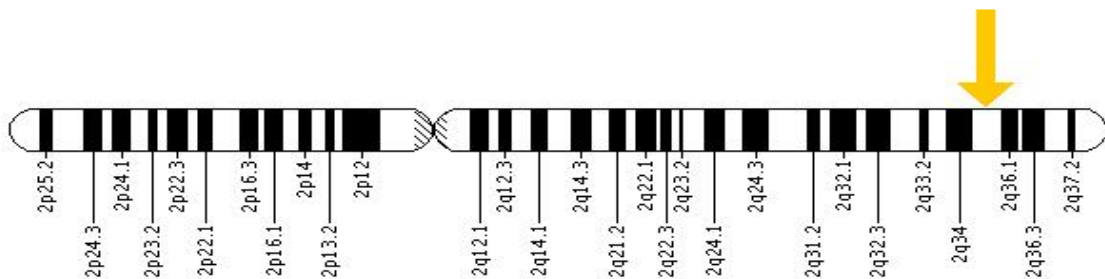
Variáveis		IC 95% para Exp (B)				
Celularidade MO	Genótipo	Wald	Exp (B)	p valor	Mínimo	Máximo
Hipocelular	CC					
	CG					
	GG					
	CG+GG					
Normo+Hiper celular	CC	0,554	0,400	0,457	0,036	4,470
	CG	5,189	5,556	0,023	1,270	24,239
	GG	0,554	2,500	0,457	0,224	27,904
	CG+GG	5,149	4,792	0,023	1,238	18,546

*Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

4.2.3 Análise do polimorfismo rs3835 para o gene *XRCC5*

O polimorfismo rs3835 está localizado no cromossomo 2 na região 2q33.2-36.1 intrônica do gene *XRCC5* (Figura 14). As frequências alélicas apresentadas no grupo controle foram de 86 (52,44%) para o alelo selvagem A e 78 (47,56%) para o alelo mutante G. Para o grupo SMD a frequência alélica foi de 74 (61,66%) para o alelo A e 46 (38,33%) para o alelo G. Não houve associação significativa entre as frequências alélicas selvagem (A) e mutante (G) para o polimorfismo rs3835 ($p=0,146$) (Tabela 14).

Figura 14: Representação do cromossomo 2 e indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs3835 do gene *XRCC5*.



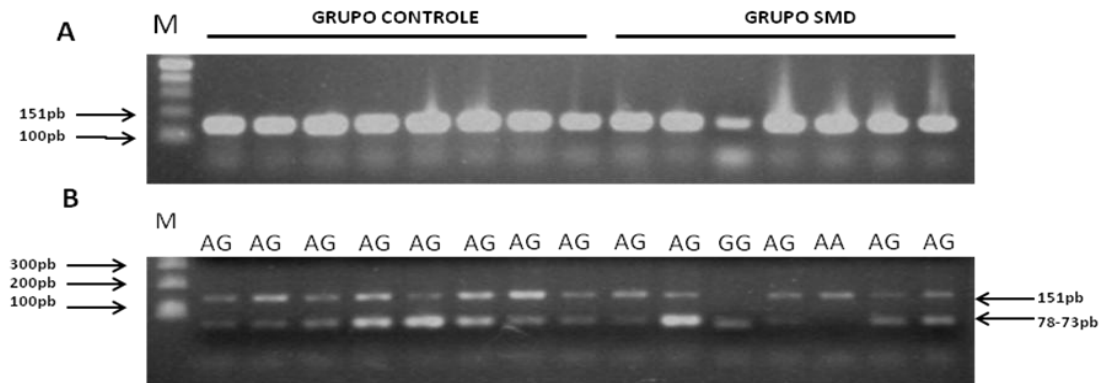
Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/XRCC5>

Os genótipos analisados para o polimorfismo rs3835 encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p>0,05$) (Tabela 14). Na análise das frequências genotípicas para o polimorfismo *rs3835* pode-se observar que o alelo homocigoto selvagem (AA), o heterocigoto (AG) e homocigoto mutante (GG) (Figura 15) apresentaram, respectivamente, as frequências de 5 (6,0%), 76 (92,6%) e 1 (1,2%) para o grupo controle e 21 (21,3%), 32 (53,3%) e 7 (11,6%) para o grupo SMD (Tabela 14). Através do teste de qui-quadrado, foi obtida associação significativa entre o grupo controle e o grupo SMD ($p<0,001$). Associamos o genótipo A/G do polimorfismo rs3835 ($p<0,001$, OR 0,100, IC 0,035-0,289) com a diminuição de risco para SMD (Tabela 15).

Não foram encontradas significâncias nas análises de correlação da frequência genotípica do polimorfismo *rs3835* do gene *XRCC5* no grupo SMD com as variáveis sócio-demográficas de sexo ($p=0,504$), idade ($p=0,517$) e origem ($p=0,283$), e para as variáveis clínicas de cariótipo ($p=0,248$), celularidade da medula óssea ($p=0,567$), número de citopenias

no sangue periférico (0,563) e para a classificação OMS (2008) estratificada ($p=0,284$) e categorizada ($p=861$) (Tabela 16).

Figura 15: A) Gel de Eletroforese 1,5% de agarose em tampão TAE 1X. Representação dos spots de PCR resultantes da amplificação de uma região de 151pb do gene *XRCC5*. B) Gel de Eletroforese 3,0% de agarose em tampão TAE 1X.



Deteção dos genótipos na análise do SNP rs3835 do gene *XRCC5*. O produto de PCR foi digerido a partir da enzima de restrição *Alu I* por 3 horas a 52°C. A linha 13 apresenta o perfil Homozigótico selvagem (AA); as linhas 2-10, 12, 14 e 15 apresentam o perfil Heterozigótico (AG) e a linha 11 apresenta o perfil Homozigótico mutante (GG). A linha M consiste no marcador de peso molecular de 100pb.

Tabela 14: Genótipos, Distribuição Alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles para o SNP *rs3835* do gene *XRCC5*.

Gene/SNP	Grupo	Frequência Alélica		<i>p</i> valor*	Frequência Gênica			<i>p</i> valor*	H-W teste	
		A	G		AA	AG	GG		X ²	<i>p</i> valor
XRCC5 <i>rs3835</i>	Controle	86 (52,44)	78 (47,56)	0,146	5 (6,0)	76 (92,6)	1 (1,2)	0,000	60,258	0,0001
	SMD	74 (61,66)	46 (38,33)		21 (35,0)	32 (53,3)	7 (11,6)			

*Teste de Qui-quadrado (χ^2) de Pearson ou Fisher. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Tabela 15: Regressão Logística Multinomial para associar os genótipos do SNP *rs3835* do gene *XRCC5* entre o grupo controle e o de pacientes com SMD.

Variáveis						
Grupos	Genótipo	Wald	Exp (B)	p valor	IC 95% para Exp (B)	
					Mínimo	Máximo
Controle	AA					
	AG					
	GG					
SMD	AA	0,188	0,600	0,665	0,059	6,052
	AG	6,655	0,100	0,000	0,035	0,289
	GG	0,188	1,667	0,665	0,165	16,810

*Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,001$.

Tabela 16: Associação da frequência gênica do SNP *rs3835* do gene *XRCC5* entre os aspectos clínico-demográficos nos pacientes com SMD.

Variáveis	Frequência Gênica/%			Total	X ² Teste		X ² Teste*		p	OR (IC 95%)
	AA	AG	GG		X ²	p	AG+GG	X ²		
Sexo										
<i>Masculino</i>	9 (15,0)	19 (31,7)	3 (5,0)	31 (51,7)	1,632	0,504	22 (36,7)	1,004	0,418	AA= 0,702 (0,348-1,413) AG+GG= 1,211 (0,828-1,770)
<i>Feminino</i>	12 (20,0)	13 (21,7)	4 (6,7)	29 (48,3)			17 (28,3)			
Idade										
<i>>60 anos</i>	11 (18,3)	22 (36,7)	5 (8,3)	38 (63,3)	1,687	0,517	27 (45,0)	1,669	0,263	AA= 0,637 (0,324-1,253) AG+GG= 1,303 (0,846-2,007)
<i><60 anos</i>	10 (16,7)	10 (16,7)	2 (3,3)	22 (36,7)			12 (20,0)			
Origem										
<i>Urbano</i>	10 (16,7)	22 (36,7)	5 (8,3)	37 (61,7)	2,714	0,283	27 (45,0)	2,697	0,163	AA= 0,565 (0,286-1,116) AG+GG= 1,399 (0,903-2,167)
<i>Rural</i>	11 (18,3)	10 (16,7)	2 (3,3)	23 (38,3)			12 (20,0)			
Cariótipo										
<i>Favorável</i>	7 (15,9)	17 (38,6)	2 (4,5)	26 (59,1)	5,345	0,248	19 (43,2)	2,448	0,347	
<i>Normal</i>	5 (11,4)	3 (6,8)	2 (4,5)	10 (22,7)			5 (11,4)			
<i>Desfavorável</i>	4 (9,1)	4 (9,1)	0 (0,0)	8 (18,2)			4 (9,1)			
<i>Cariótipo Normal</i>	4 (9,1)	13 (29,5)	2 (4,5)	19 (43,2)	3,412	0,229	15 (34,1)	3,388	0,113	
<i>Cariótipo Alterado</i>	12 (27,3)	11 (25,0)	2 (4,5)	25 (56,8)			13 (29,5)			
Celularidade MO										
<i>Normo+Hiper celular</i>	9 (18,4)	21 (42,9)	5 (10,2)	35 (71,4)	2,756	0,323	26 (53,1)	2,682	0,176	
<i>Hipo celular</i>	7 (14,3)	6 (12,2)	1 (2,0)	14 (28,6)			7 (14,3)			
Citopenia										
<i>0-1</i>	7 (11,7)	13 (21,7)	4 (6,7)	24 (40,0)	1,251	0,363	17 (28,3)	0,598	0,582	AA= 0,750(0,356-1,581) AG+GG= 1,159 (0,804-1,671)
<i>2-3</i>	14 (23,3)	19 (31,7)	3 (5,0)	36 (60,0)			22 (36,7)			
IPSS (Grupo de Risco)										
<i>FAV+INT-1</i>	10 (25,6)	18 (46,2)	4 (10,3)	32 (82,1)	2,139	0,396	22 (56,4)	1,673	0,386	
<i>DES+INT-2</i>	4 (10,3)	3 (7,7)	0 (0,0)	7 (17,9)			3 (7,7)			
OMS_CATEGORIZADA										
<i>Alto Risco</i>	2 (3,3)	5 (8,3)	1 (1,7)	8 (13,3)	1,485	0,861	6 (10,0)	0,436	0,896	
<i>Baixo Risco</i>	17 (28,3)	23 (38,3)	6 (10,0)	46 (76,7)			27 (48,3)			
<i>SMD Secundária</i>	2 (3,3)	4 (6,7)	0 (0,0)	6 (10,0)			4 (6,7)			
OMS ESTRATIFICADA										
<i>5q-</i>	2 (3,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,3)	14,156	0,284	0 (0,0)	8,885	0,177	
<i>AREB I</i>	3 (5,0)	5 (8,3)	0 (0,0)	3 (5,0)			5 (8,3)			
<i>AREB II</i>	3 (5,0)	5 (8,3)	0 (0,0)	5 (8,3)			5 (8,3)			
<i>CRDM</i>	11 (18,3)	13 (21,7)	4 (6,7)	28 (46,7)			17 (28,3)			
<i>AR</i>	0 (0,0)	2 (3,3)	1 (1,7)	6 (10,0)			3 (5,0)			
<i>ARSA</i>	2 (3,3)	3 (5,0)	0 (0,0)	8 (13,3)			3 (5,0)			
<i>SMD SECUNDÁRIA</i>	0 (0,0)	8 (13,3)	0 (0,0)	8 (13,3)			6 (10,0)			

*Teste de Qui-quadrado (x²) de Pearson ou Fisher. Valor estatisticamente significante para p≤ 0,05.

4.2.4 Análise do polimorfismo rs1805388 para o gene *LIG4*

O polimorfismo rs1805388 está localizado no cromossomo 13 na região 13q33 do éxon do gene *LIG4* (Figura 16). As frequências alélicas apresentadas no grupo controle foram de 107 (65,24%) para o alelo selvagem T e 57 (34,75%) para o alelo mutante C. Para o grupo SMD a frequência alélica foi de 81 (67,50%) para o alelo T e 39 (32,50%) para o alelo C. Não houve associação significativa entre as frequências alélicas selvagem (T) e mutante (C) para o polimorfismo rs1805388 ($p=0,705$) (Tabela 17).

Figura 16: Representação do cromossomo 13 e indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs1805388 do gene *LIG4*.



Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/LIG4>

Os genótipos analisados para o polimorfismo rs1805388 não se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p<0,001$) (Tabela 17). Na análise das frequências genotípicas para o polimorfismo rs1805388 pode-se observar que o alelo homozigoto selvagem (TT), o heterozigoto (TC) e homozigoto mutante (CC) (Figura 17) apresentaram, respectivamente, as frequências de 25 (30,4%), 57 (69,5%) e 0 (0,00%) para o grupo controle e 21 (35,0%), 39 (45,0%) e 0 (0,00%) para o grupo SMD (Tabela 16). Através do teste de qui-quadrado, não foram obtidas associações significantes entre o grupo controle e o grupo SMD ($p=0,590$) (Tabela 17).

Não foram encontradas significâncias nas análises de correlação da frequência genotípica do polimorfismo rs1805388 do gene *LIG4* no grupo SMD com as variáveis sócio-demográficas de sexo ($p=0,788$), idade ($p=0,577$) e origem ($p=0,781$), e para as variáveis clínicas de cariótipo ($p=0,508$), celularidade da medula óssea ($p=0,501$), número de citopenias no sangue periférico ($p=0,582$), índice de prognóstico do IPSS ($p=0,647$) e para a

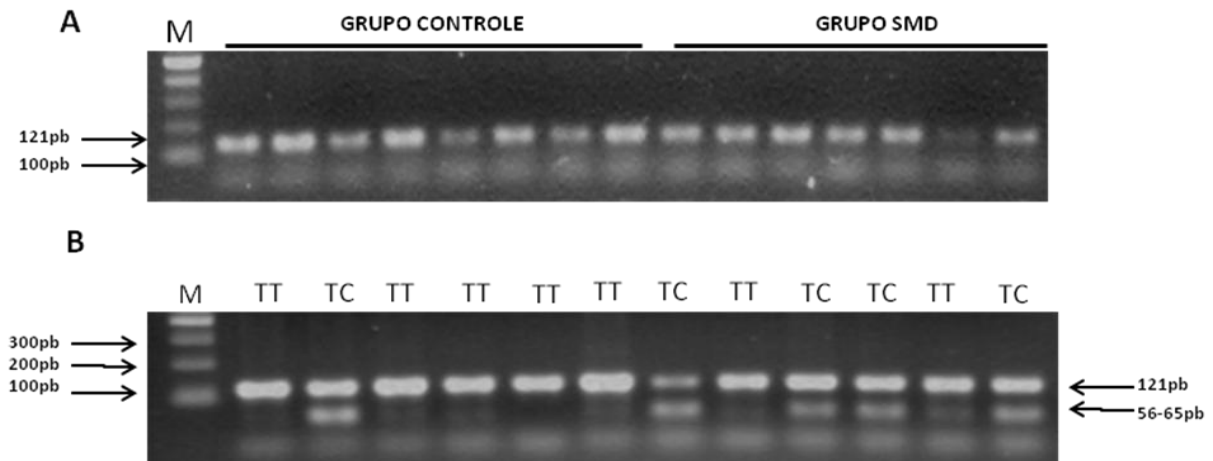
classificação OMS (BRUNNING et al., 2008) estratificada ($p=0,732$) e categorizada ($p=0,521$) (Tabela 18).

Tabela 17: Genótipos, Distribuição Alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles para o SNP *rs1805388* do gene *LIG4*.

Gene/SNP	Grupo	Frequência Alélica		<i>p</i> valor*	Frequência Gênica			<i>p</i> valor*	H-W teste	
		T	C		TT	TC	CC		X ²	<i>P</i> valor
LIG4 <i>rs1805388</i>	Controle	107 (65,24)	57 (34,75)	0,705	25 (30,4)	57 (69,5)	0 (0,00)	0,590	81,551	0,0001
	SMD	81 (67,5)	39 (32,5)		21 (35,0)	39 (65,0)	0 (0,00)			

*Teste de Qui-quadrado (χ^2) de Pearson ou Fisher. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Figura 17: A) Gel de Eletroforese 1,5% de agarose em tampão TAE 1X. Representação dos *spots* de PCR resultantes da amplificação de uma região de 121pb do gene *LIG4*. B) Gel de Eletroforese 3,0% de agarose em tampão TAE 1X.



Deteção dos genótipos na análise do SNP *rs1805388* do gene *LIG4*. O produto de PCR foi digerido a partir da enzima de restrição *HpyCH4III* por 3 horas a 52°C. As linhas 2, 4-7, 9 e 12 apresenta o perfil Homozigótico selvagem (TT) e as linhas 3, 8, 10, 11 E 13 apresentam o perfil Heterozigótico (TC). Não houve frequência do perfil Homozigótico mutante (CC) nas amostras analisadas. A linha M consiste no marcador de peso molecular de 100pb.

Tabela 18: Associação da frequência gênica do SNP *rs1805388* do gene *LIG4* entre os aspectos clínico-demográficos nos pacientes com SMD.

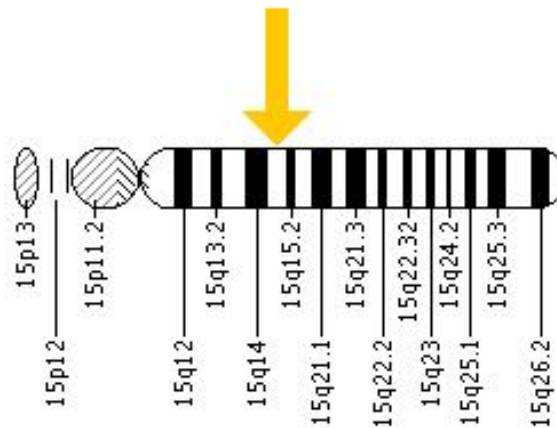
Variáveis	Frequência Gênica/%				X ² Teste		X ² Teste*		OR (IC 95%)	
	TT	TC	CC	Total	X ²	P	TC+CC	X ²	P	
Sexo										
<i>Masculino</i>	10 (16,7)	21 (35,0)	0 (0,0)	31 (51,7)	0,212	0,788	20 (33,3)	0,220	0,791	TT= 0,858 (0,451-1,631)
<i>Feminino</i>	11 (18,3)	18 (30,0)	0 (0,0)	29 (48,3)			17 (28,3)			TC+CC= 1,101 (0,736-1,645)
Idade										
<i>>60 anos</i>	12 (20,0)	26 (43,3)	0 (0,0)	38 (63,3)	0,533	0,577	25 (41,7)	0,745	0,421	TT= 0,753 (0,399-1,421)
<i><60 anos</i>	9 (15,0)	13 (21,7)	0 (0,0)	22 (36,7)			12 (20,0)			TC+CC= 1,206(0,773-1,882)
Origem										
<i>Urbano</i>	12(20,0)	25 (41,7)	0 (0,0)	37 (61,7)	0,280	0,781	24 (40,0)	0,418	0,590	TT= 0,808 (0,426-1,532)
<i>Rural</i>	9 (15,0)	14 (23,0)	0 (0,0)	23 (38,3)			13 (21,7)			TC+CC= 1,148 (0,747-1,764)
Cariótipo										
<i>Favorável</i>	7 (15,9)	19 (43,2)	0 (0,0)	26 (59,1)	1,651	0,508	19 (43,2)	2,448	0,347	
<i>Normal</i>	4 (9,1)	6 (13,6)	0 (0,0)	10 (22,7)			5 (11,4)			
<i>Desfavorável</i>	4 (9,1)	4 (9,1)	0 (0,0)	8 (18,2)			4 (9,1)			
<i>Cariótipo Normal</i>	4 (9,1)	15 (34,1)	0 (0,0)	19 (43,2)	2,530	0,199				
<i>Cariótipo alterado</i>	11 (25,0)	14 (31,8)	0 (0,0)	25 (56,8)						
Celularidade MO										
<i>Normo+Hiper celular</i>	6 (12,2)	8 (16,3)	0 (0,0)	14 (28,6)	0,928	0,501	7 (14,3)	2,027	0,193	
<i>Hipocelular</i>	10 (20,4)	25 (51,0)	0 (0,0)	10 (20,4)			25 (51,0)			
Citopenia										
<i>0-1</i>	7 (11,7)	17 (28,3)	0 (0,0)	24 (40,0)	0,598	0,582	17 (28,3)	1,422	0,285	TT= 0,656 (0,319-1,352)
<i>2-3</i>	14 (23,3)	22 (36,7)	0 (0,0)	36 (60,0)			20 (33,3)			TC+CC= 1,275 (0,864-1,881)
IPSS (Grupo de Risco)										
<i>Bom+Int-1</i>	11 (28,2)	22 (56,4)	0 (0,0)	10 (25,6)	0,613	0,647	22 (56,4)	0,399	0,658	
<i>Ruim+Int-2</i>	3 (7,7)	3 (7,7)	0 (0,0)	6 (15,4)			3 (7,7)			
OMS_CATEGORIZADA										
<i>Alto Risco</i>	2 (3,3)	6 (10,0)	0 (0,0)	8 (13,3)	1,583	0,521	6 (10,0)	2,308	0,353	
<i>Baixo Risco</i>	18 (30,0)	28 (46,7)	0 (0,0)	46 (76,7)			26 (43,3)			
<i>SMD Secundária</i>	1 (1,7)	5 (8,3)	0 (0,0)	6 (10,0)			5 (8,3)			
OMS ESTRATIFICADA										
<i>5q-</i>	1 (1,7)	1 (1,7)	0 (0,0)	2 (3,3)	3,888	0,732	1 (1,7)	5,394	0,534	
<i>AREB I</i>	0 (0,0)	3 (5,0)	0 (0,0)	3 (5,0)			3 (5,0)			
<i>AREB II</i>	2 (3,3)	3 (5,0)	0 (0,0)	5 (8,3)			3 (5,0)			
<i>CRDM</i>	12 (20,0)	16 (26,7)	0 (0,0)	28 (46,7)			14 (23,3)			
<i>AR</i>	1 (1,7)	5 (8,3)	0 (0,0)	6 (10,0)			5 (8,3)			
<i>ARSA</i>	3 (5,0)	5 (8,3)	0 (0,0)	8 (13,3)			5 (8,3)			
<i>SMD SECUNDÁRIA</i>	2 (3,3)	6 (10,0)	0 (0,0)	8 (13,3)			6 (10,0)			

*Teste de Qui-quadrado (x²) de Pearson ou Fisher. Valor estatisticamente significante para p ≤ 0,05.

4.2.5 Análise do polimorfismo rs1801320 do gene *RAD51*

O polimorfismo rs1801320 está localizado no cromossomo 15 na porção do braço longo q15.1 na região 5' *untranslated* do gene *RAD51* (Figura 18). As frequências alélicas apresentadas no grupo controle foram de 134 (81,70%) para o alelo selvagem G e 30 (18,29%) para o alelo mutante C. Para o grupo SMD a frequência alélica foi de 103 (85,83%) para o alelo G e 17 (14,16%) para o alelo C. Não houve associação significativa entre as frequências alélicas selvagem (G) e mutante (C) para o polimorfismo rs1801320 ($p=0,420$) (Tabela 19).

Figura 18: Representação do cromossomo 15 e indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs1801320 do gene *RAD51*.



Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/RAD51>

Os genótipos analisados para o polimorfismo rs1801320 encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p>0,05$) (Tabela 19). Na análise das frequências genotípicas para o polimorfismo rs1801320 pode-se observar que o alelo homocigoto selvagem (GG), o heterocigoto (GC) e homocigoto mutante (CC) (Figura 19) apresentaram, respectivamente, as frequências de 53 (64,6%), 28 (34,1%) e 1 (1,2%) para o grupo controle e 46 (76,6%), 11 (18,3%) e 3 (5,0%) para o grupo SMD (Tabela 19).

Através do teste de qui-quadrado, foi obtida associação significativa em “borderline” entre o grupo controle e o grupo SMD ($p=0,059$) (Tabela 19). No intuito de verificar qual genótipo está associado com o risco da doença, foi realizada a regressão logística multinomial, obtendo que o genótipo heterocigoto G/C está associado com a diminuição de risco de SMD ($p=0,05$, OR 0,453, IC 0,203-1,009) (Tabela 20).

Não foram encontradas significâncias nas análises de correlação da frequência genotípica do polimorfismo rs1801320 do gene *RAD51* no grupo SMD com as variáveis sócio-demográficas de sexo ($p=1,000$) e origem ($p=0,777$), e para as variáveis clínicas de cariótipo ($p=0,250$), celularidade da medula óssea ($p=0,230$), índice prognóstico do IPSS ($p=218$) e para a classificação OMS (2008) categorizada ($p=0,876$) e estratificada ($p=0,610$) (Tabela 21).

Foram encontradas significâncias para a variável sócio-demográfica de idade (dividida em >60 , maior que 60 anos, e <60 , menor que 60 anos) com $p=0,039$ (Tabela 21). Identificamos que o genótipo selvagem G/G foi associado a pacientes com idade maior que 60 anos ($p<0,001$, OR 24,521, IC 64,033-93,907) (Tabela 22).

Adicionalmente, foram encontradas associações significantes para as variáveis clínicas do perfil de citopenias do sangue periférico ($p=0,031$) no grupo de pacientes com SMD (Tabela 21). Identificamos também que o genótipo selvagem G/G está associado com a faixa de 0-1 citopenias no sangue periférico em pacientes com SMD ($p<0,001$, OR 16,099, IC 31,299-82,808) (Tabela 23).

Tabela 19: Genótipos, Distribuição Alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles para o SNP rs1801320 do gene *RAD51*.

Gene/SNP	Grupo	Frequência Alélica		p valor*	Frequência Gênica			p valor*	H-W teste	
		G	C		GG	GC	CC		X ²	P valor
RAD51 rs1801320	Controle	134 (81,70)	30 (18,29)	0,420	53 (64,6)	28 (34,1)	1 (1,2)	0,05	3,635	0,197
	SMD	103 (85,83)	17 (14,16)		46 (76,6)	11 (18,3)	3 (5,0)			

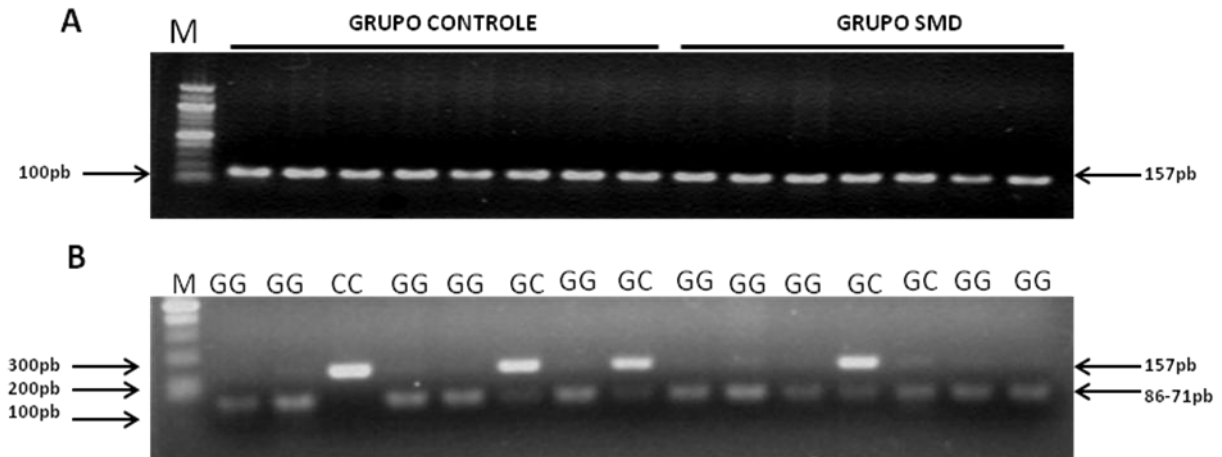
*Teste de Qui-quadrado (χ^2) de Pearson ou Fisher. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Tabela 20: Regressão Logística Multinomial para associar os genótipos do SNP *rs1801320* do gene *RAD51* entre o grupo controle e o de pacientes com SMD.

Variáveis	Genótipo	Wald	Exp(B)	p valor	IC 95% para Exp (B)	
					Mínimo	Máximo
Controle	GG					
	GC					
	CC					
SMD	GG	1,120	0,289	0,290	0,029	2,878
	GC	3,757	0,453	0,053	0,203	1,009
	CC	1,120	3,457	0,290	0,347	34,386

*Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,001$.

Figura 19: A) Gel de Eletroforese 1,5% de agarose em tampão TAE 1X. Representação dos spots de PCR resultantes da amplificação de uma região de 157pb do gene *RAD51*. B) Gel de Eletroforese 3,0% de agarose em tampão TAE 1X.



Detecção dos genótipos na análise do SNP rs1801320 do gene *RAD51*. O produto de PCR foi digerido a partir da enzima de restrição *BstNI* por 10 horas a 60°C. As linhas 2, 3, 5, 6, 8, 10-12, 14 e 15 apresenta o perfil Homozigótico selvagem (GG); as linhas 7, 9, 13 e 14 apresentam o perfil Heterozigótico (GC) e a linha 4 apresentam o perfil Homozigótico mutante (CC). A linha M consiste no marcador de peso molecular de 100pb.

Tabela 21: Associação da frequência gênica do SNP *rs1801320* do gene *RAD51* entre os aspectos clínico-demográficos nos pacientes com SMD.

Variáveis	Frequência Gênica/%				X ² Teste		X ² Teste*			OR (IC 95%)
	GG	GC	CC	Total	X ²	P	GC+CC	X ²	P	
Sexo										
<i>Masculino</i>	23 (38,3)	6 (10,0)	2 (3,3)	31 (51,7)	0,358	1,000	8 (13,3)	0,219	0,763	GG= 0,935 (0,708-1,236)
<i>Feminino</i>	23 (38,3)	5 (8,3)	1 (1,7)	29 (48,3)			6 (10,0)			GC+CC= 1,247 (0,492-3,160)
Idade										
<i>>60 anos</i>	32 (53,3)	6 (10,0)	0 (0,0)	38 (63,3)	6,317	0,039	6 (10,0)	3,297	0,112	GG= 1,323 (0,938-1,868)
<i><60 anos</i>	10 (23,3)	5 (8,3)	3 (5,0)	22 (36,7)			8 (13,3)			GC+CC= 0,434 (0,173-1,089)
Origem										
<i>Urbano</i>	27 (45,0)	8 (13,3)	2 (3,3)	37 (61,7)	0,773	0,777	10 (16,7)	0,736	0,534	GG= 0,883 (0,673-1,159)
<i>Rural</i>	19 (31,7)	3 (5,0)	1 (1,7)	23 (38,3)			4 (6,7)			GC+CC= 1,554 (0,551-4,380)
Cariótipo										
<i>Favorável</i>	18 (40,9)	7 (15,9)	1 (2,3)	26 (59,1)	5,047	0,250	8 (18,2)	2,356	0,376	
<i>Normal</i>	9 (20,5)	1 (2,3)	0 (0,0)	10 (22,7)			1 (2,3)			
<i>Desfavorável</i>	7 (15,9)	0 (0,0)	1 (2,3)	8 (18,2)			1 (2,3)			
<i>Cariótipo Normal</i>	12 (27,3)	6 (13,6)	1 (2,3)	19 (43,2)	4,201	0,106	7 (15,9)	3,794	0,074	
<i>Cariótipo Alterado</i>	22 (50,0)	2 (4,5)	1 (2,3)	25 (56,8)			3 (6,8)			
Celularidade MO										
<i>Normo+Hiper celular</i>	28 (57,1)	7 (8,2)	0 (0,0)	35 (71,4)	3,154	0,230	5 (10,2)	1,335	0,285	
<i>Hipocelular</i>	9 (18,4)	4 (8,2)	1 (2,0)	14 (28,6)			7 (14,3)			
Citopenia										
<i>0-1</i>	22 (36,7)	2 (3,3)	0 (0,0)	24 (40,0)	5,356	0,065	2 (3,3)	5,031	0,031	GG= 1,375 (1,060-1,784)
<i>2-3</i>	24 (40,0)	9 (15,0)	3 (5,0)	36 (60,0)			12 (20,0)			GC+CC= 0,250 (0,061-1,019)
IPSS (Grupo de Risco)										
<i>Bom+Int-1</i>	25 (64,1)	7 (17,9)	1 (2,6)	33 (84,6)	3,152	0,218	8 (20,5)	0,164	1,000	
<i>Ruim+Int-2</i>	5 (12,8)	0 (0,0)	1 (2,6)	6 (15,4)			1 (2,6)			
OMS_CATEGORIZADA										
<i>Alto Risco</i>	6 (10,0)	1 (1,7)	1 (1,7)	8 (13,3)	1,474	0,876	11 (18,3)	0,170	1,000	
<i>Baixo Risco</i>	35 (58,3)	9 (15,0)	2 (3,3)	46 (76,7)			2 (3,3)			
<i>SMD Secundária</i>	5 (8,3)	1 (1,7)	0 (0,0)	6 (10,0)			1 (1,7)			
OMS ESTRATIFICADA										
<i>5q-</i>	2 (3,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,3)	9,780	0,610	0 (0,0)	5,317	0,525	
<i>AREB I</i>	2 (3,3)	1 (1,7)	0 (0,0)	3 (5,0)			1 (1,7)			
<i>AREB II</i>	4 (6,7)	0 (0,0)	1 (1,7)	5 (8,3)			1 (1,7)			
<i>CRDM</i>	19 (31,7)	7 (11,7)	2 (3,3)	28 (46,7)			9 (15,0)			
<i>AR</i>	4 (6,7)	2 (3,3)	0 (0,0)	6 (10,0)			2 (3,3)			
<i>ARSA</i>	8 (13,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (13,3)			0 (0,0)			
<i>SMD SECUNDÁRIA</i>	7 (11,7)	1 (1,7)	0 (0,0)	8 (13,3)			1 (1,7)			

*Teste de Qui-quadrado (x²) de Pearson ou Fisher. Valor estatisticamente significante para p ≤ 0,05.

Tabela 22: Regressão Logística Multinomial para correlacionar o genótipo do SNP *rs1801320* do gene *RAD51* com as variáveis de idade no grupo de pacientes com SMD.

Grupos	Genótipo	Wald	OR	p valor	IC 95% para Exp (B)	
					Mínimo	Máximo
<60						
>60	GG	795,091	24,521	0,000	64,033	93,907
	GC	0,885	0,525	0,347	0,137	2,011
	CC					

*Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Tabela 23: Regressão Logística Multinomial para correlacionar o genótipo do SNP *rs1801320* do gene *RAD51* com os padrões de citopenias no grupo de pacientes com SMD.

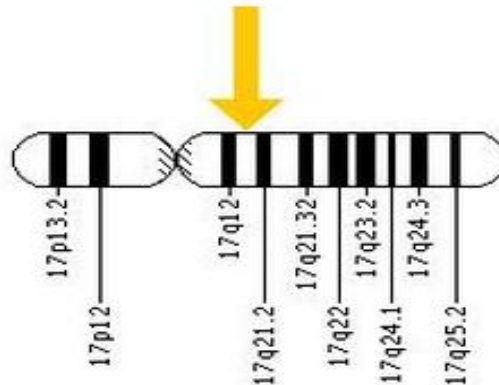
Grupos	Genótipo	Wald	OR	p valor	IC 95% para Exp (B)	
					Mínimo	Máximo
0-1	GG	511,423	16,099	0,000	31,299	82,808
	GC	2,876	0,242	0,090	0,047	1,247
	CC					
2-3	GG					
	GC					
	CC					

*Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

4.2.6 Análise do polimorfismo rs4793191 do gene *BRCA1*

O polimorfismo rs4793191 está localizado no cromossomo 17 na região 17q21 do éxon do gene *BRCA1* (Figura 20). As frequências alélicas apresentadas no grupo controle foram de 107 (65,24%) para o alelo selvagem A e 57 (34,75%) para o alelo mutante G. Para o grupo SMD a frequência alélica foi de 81 (67,50%) para o alelo T e 39 (32,50%) para o alelo C. Não houve associação significativa entre as frequências alélicas selvagem (T) e mutante (C) para o polimorfismo rs4793191 ($p=0,705$) (Tabela 24).

Figura 20: Representação do cromossomo 17 e indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs4793191 do gene *BRCA1*.



Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA1>

Os genótipos analisados para o polimorfismo rs1805388 encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) (Tabela 24). Na análise das frequências genotípicas para o polimorfismo rs1805388 pode-se observar que o alelo homozigoto selvagem (TT), o heterozigoto (TC) e homozigoto mutante (CC) (Figura 21) apresentaram, respectivamente, as frequências de 33 (40,7%), 40 (49,3%) e 8 (9,8%) para o grupo controle e 27 (48,2%), 27 (48,2%) e 2 (3,5%) para o grupo SMD (Tabela 24). Através do testes de qui-quadrado, não foram obtidas associações significantes entre o grupo controle e pacientes do grupo SMD ($p = 0,590$) (Tabela 24).

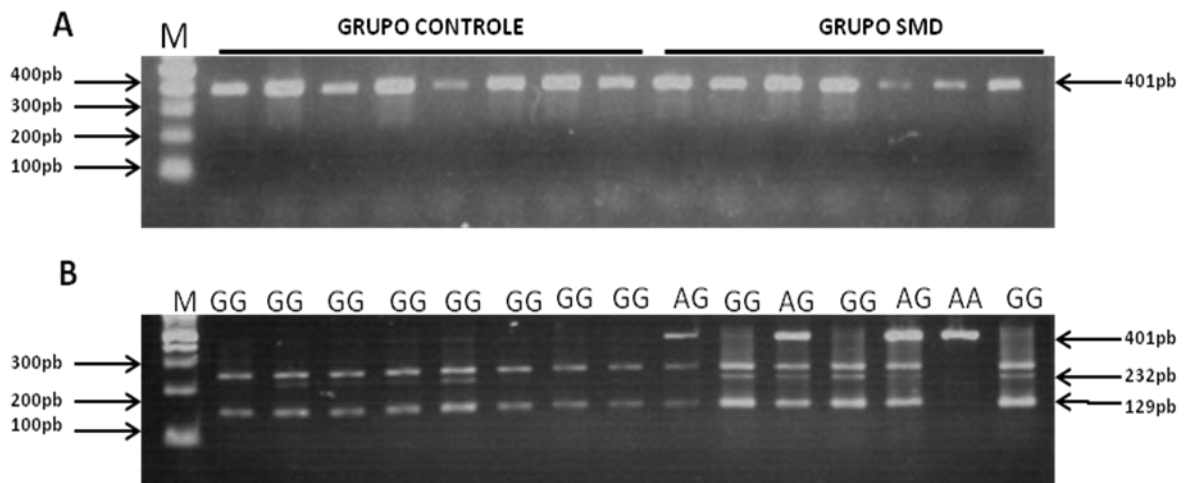
Não foram encontradas significâncias nas análises de correlação da frequência genotípica do polimorfismo rs4793191 do gene *BRCA1* no grupo SMD com as variáveis sócio-demográficas de sexo ($p = 1,000$), idade ($p = 0,200$) e origem ($p = 0,435$), e para as variáveis clínicas de cariótipo ($p = 0,965$), celularidade da medula óssea ($p = 0,372$), número de citopenias no sangue periférico ($p = 0,795$), índice de prognóstico do IPSS ($p = 0,714$) e para a classificação OMS (2008) estratificada ($p = 0,305$) e categorizada ($p = 0,227$) (Tabela 25).

Tabela 24: Genótipos, Distribuição Alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles para o SNP rs4793191 do gene *BRCA1*.

Gene/SNP	Grupo	Frequência Alélica		p valor*	Frequência Gênica			p valor*	H-W teste	
		A	G		AA	AG	GG		X ²	p valor
BRCA1 rs4793191	Controle	106 (65,03)	56 (34,35)	0,542	33 (40,7)	40 (49,3)	8 (9,8)	0,327	0,680	0,409
	SMD	81 (67,5)	31 (25,83)		27 (48,2)	27 (48,2)	2 (3,5)			

*Teste de Qui-quadrado (χ^2) de Pearson ou Fisher. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Figura 21: A) Gel de Eletroforese 1,5% de agarose em tampão TAE 1X. Representação dos spots de PCR resultantes da amplificação de uma região de 401pb do gene *BRCA1*. B) Gel de Eletroforese 3,0% de agarose em tampão TAE 1X.



Detecção dos genótipos na análise do SNP rs4793191 do gene *BRCA1*. O produto de PCR foi digerido a partir da enzima de restrição *PstI* por 3 horas a 37°C. A linha 15 apresenta o perfil Homozigótico Selvagem; as linhas 10, 12 e 14 apresentam perfil Heterozigótico (GC) e as linhas 2-9, 11, 13 e 16 apresentam o perfil Homozigótico mutante (GG). A linha M consiste no marcador de peso molecular de 100pb.

Tabela 25: Associação da frequência gênica do SNP rs4793191 do gene *BRCA1* entre os aspectos clínico-demográficos nos pacientes com SMD.

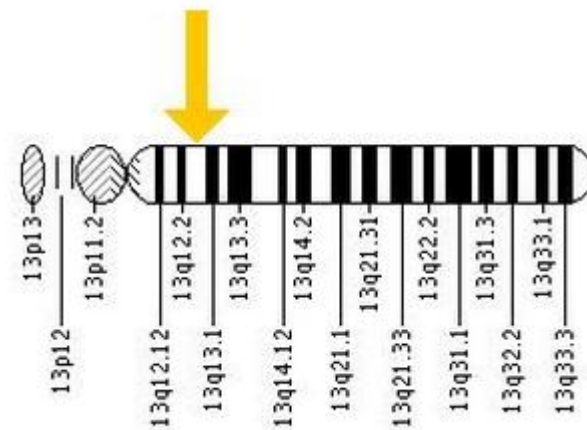
Variáveis	Frequência Gênica/%				X2 Teste		X2 Teste			OR (IC 95%)
	AA	AG	GG	Total	X ²	P	AG+GG	X2	p	
Sexo										
<i>Masculino</i>	15 (26,8)	14 (25,0)	1 (1,8)	30 (53,6)	0,085	1,000	15 (26,8)	0,083	0,795	AA= 1,083 (0,626-1,874) AG+GG= 0,929 (0,561-1,538)
<i>Feminino</i>	12 (21,4)	13 (23,2)	1 (1,8)	26 (46,4)						
Idade										
<i>>60 anos</i>	14 (25,0)	20 (35,7)	2 (3,6)	36 (64,3)	4,056	0,200	22 (39,3)	3,511	0,094	AA= 0,750 (0,440-1,277) AG+GG= 1,333 (0,753-2,360)
<i><60 anos</i>	13 (23,2)	7 (12,5)	0 (0,0)	20 (35,7)						
Origem										
<i>Urbano</i>	15 (26,8)	18 (32,1)	2 (3,6)	35 (62,5)	1,956	0,435	20 (35,7)	1,073	0,409	
<i>Rural</i>	12 (21,4)	9 (16,1)	0 (0,0)	21 (37,5)						9 (16,1)
Cariótipo										
<i>Favorável</i>	12 (29,3)	12 (29,3)	1 (2,4)	25 (61,0)	1,563	0,965	13 (31,7)	0,322	0,911	
<i>Normal</i>	3 (7,3)	4 (9,8)	1 (2,4)	8 (19,5)						5 (12,2)
<i>Desfavorável</i>	4 (9,8)	4 (9,8)	0 (0,0)	8 (19,5)			4 (9,8)			
<i>Cariótipo Normal</i>	8 (19,5)	9 (22,0)	1 (2,4)	18 (43,9)	0,065	1,000	10 (24,4)	0,046	1,000	
<i>Cariótipo Alterado</i>	11 (26,8)	11 (26,8)	1 (2,4)	23 (56,1)						12 (29,3)
Celularidade MO										
<i>Normo+Hiper celular</i>	11 (24,4)	19 (42,2)	2 (4,4)	32 (71,1)	1,980	0,372	6 (13,3)	1,460	0,317	AA=1,566 (0,782-3,137) AG+GG=0,703 (0,371-1,332)
<i>Hipo celular</i>	7 (15,6)	6 (13,3)	0 (0,0)	13 (28,9)						
Citopenia										
<i>0-1</i>	9 (16,1)	12 (21,4)	1 (1,8)	22 (39,3)	0,799	0,795	13(23,2)	0,774	0,423	AA= 0,773 (0,427-1,399) AG+GG= 1,256 (0,763-2,066)
<i>2-3</i>	18 (32,1)	15 (26,8)	1 (1,8)	34 (60,7)						
IPSS (Grupo de Risco)										
<i>Bom+Int-1</i>	14 (37,8)	16 (43,2)	1 (2,7)	31 (83,8)	1,017	0,714	17 (45,9)	0,931	0,405	
<i>Ruim+Int-2</i>	4 (10,8)	2 (5,4)	0 (0,0)	6 (16,2)						2 (5,4)
OMS_CATEGORIZADA										
<i>Alto Risco</i>	5 (8,9)	3 (5,4)	0 (0,0)	8 (14,3)	5,757	0,227	3 (5,4)	2,255	0,426	
<i>Baixo Risco</i>	21 (37,5)	21 (37,5)	1 (1,8)	43 (76,8)						22 (39,3)
<i>SMD Secundária</i>	1 (1,8)	3 (5,4)	1 (1,8)	5 (8,9)			4 (7,1)			
OMS ESTRATIFICADA										
<i>5q-</i>	0 (0,0)	2 (3,6)	0 (0,0)	2 (3,6)	13,985	0,305	2 (3,6)	8,854	0,179	
<i>AREB I</i>	2 (3,6)	1 (1,8)	0 (0,0)	3 (5,4)						1 (1,8)
<i>AREB II</i>	3 (5,4)	2 (3,6)	0 (0,0)	5 (8,9)			2 (3,6)			
<i>CRDM</i>	13(23,2)	13 (23,2)	0 (0,0)	26 (46,4)			13 (23,2)			
<i>AR</i>	5 (8,9)	1 (1,8)	0 (0,0)	6 (10,7)			1 (1,8)			
<i>ARSA</i>	1 (1,8)	5 (8,9)	1 (1,8)	7 (12,5)			6 (10,7)			
<i>SMD SECUNDÁRIA</i>	3 (5,4)	3 (5,4)	1 (1,8)	7 (12,5)			4 (7,1)			

*Teste de Qui-quadrado (χ^2) de Pearson ou Fisher. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

4.2.7 Análise para o polimorfismo rs9567623 do gene *BRCA2*.

O polimorfismo rs9567623 está localizado no cromossomo 13 na região 13q12.3 do intron do gene *BRCA2* (Figura 22). As frequências alélicas apresentadas no grupo controle foram de 132 (80,48%) para o alelo selvagem C e 32 (19,52%) para o alelo mutante T. Para o grupo SMD a frequência alélica foi de 59 (49,16%) para o alelo C e 26 (21,66%) para o alelo T. Não houve associação significativa entre as frequências alélicas selvagem (C) e mutante (T) para o polimorfismo rs9567623 ($p=0,0583$) (Tabela 26).

Figura 22: Representação do cromossomo 13 e indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs9567623 do gene *BRCA2*.



Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA2>

Os genótipos analisados para o polimorfismo rs9567623 encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p>0,05$) (Tabela 26). Na análise das frequências genotípicas para o polimorfismo rs9567623 pode-se observar que o alelo homocigoto selvagem (CC), o heterocigoto (CT) e homocigoto mutante (TT) (Figura 23) apresentaram, respectivamente, as frequências de 51 (62,1%), 30 (36,5%) e 1 (1,2%) para o grupo controle e 35 (58,3%), 24 (40,0%) e 1 (1,6%) para o grupo SMD (Tabela 26). Através dos testes de qui-quadrado, não foram obtidas associações significantes entre o grupo controle e pacientes do grupo SMD ($p=0,886$) (Tabela 26).

Não foram encontradas significâncias nas análises de correlação da frequência genotípica do polimorfismo rs9567623 do gene *BRCA2* no grupo SMD com as variáveis sócio-demográficas de sexo ($p=0,237$), idade ($p=0,864$) e origem ($p=0,330$), e para as variáveis clínicas de cariótipo ($p=0,071$), celularidade da medula óssea ($p=0,126$), número de

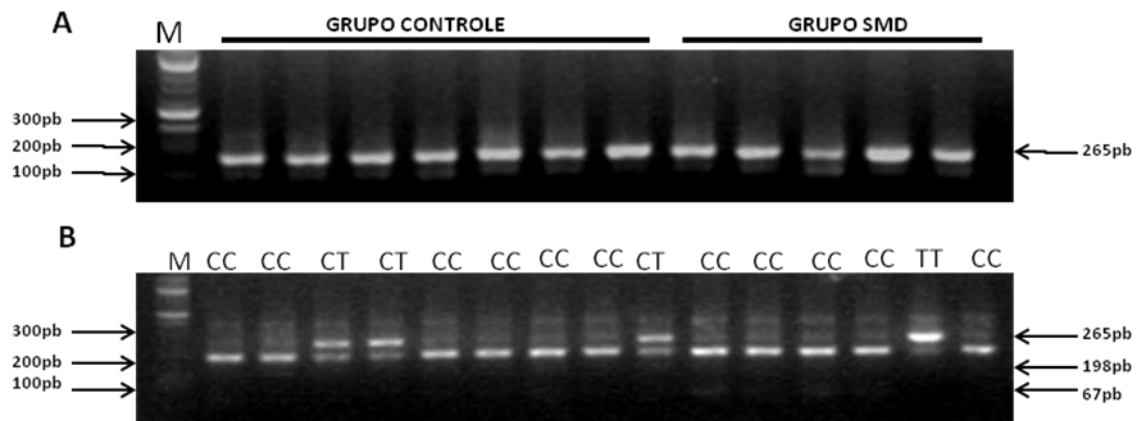
citopenias no sangue periférico ($p=0,654$), índice de prognóstico do IPSS ($p=0,374$) e para a classificação OMS (2008) estratificada ($p=0,301$) e categorizada ($p=0,053$) (Tabela 27).

Tabela 26: Genótipos, Distribuição Alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controles para o SNP rs9567623 do gene *BRCA2*.

Gene/SNP	Grupo	Frequência Alélica		<i>p</i> valor*	Frequência Gênica			<i>p</i> valor*	H-W teste	
		C	T		CC	CT	TT		X ²	<i>p</i> valor
BRCA2 rs9567623	Controle	132 (80,48)	32 (19,51)	0,0583	51 (62,1)	30 (36,5)	1 (1,2)	0,886	2,226	0,135
	SMD	94 (49,16)	26 (21,66)		35 (58,3)	24 (40,0)	1 (1,6)			

*Teste de Qui-quadrado (χ^2) de Pearson ou Fisher. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Figura 23: A) Gel de Eletroforese 1,5% de agarose em tampão TAE 1X. Representação dos *spots* de PCR resultantes da amplificação de uma região de 265pb do gene *BRCA2*. B) Gel de Eletroforese 3,0% de agarose em tampão TAE 1X.



Detecção dos genótipos na análise do SNP rs9567623 do gene *BRCA2*. O produto de PCR foi digerido a partir da enzima de restrição *HhaI* por 3 horas a 37°C. A linha 2, 3, 6-9 e 11-14 apresenta o perfil Homozigótico Selvagem (CC); as linhas 4-5, 10 apresentam perfil Heterozigótico (CT) e as linhas 15 apresentam o perfil Homozigótico mutante (TT). A linha M consiste no marcador de peso molecular de 100pb.

Tabela 27: Associação da frequência gênica do SNP rs9567623 do gene *BRCA2* entre os aspectos clínico-demográficos nos pacientes com SMD.

Variáveis	Frequência Gênica/%				X2 Teste		X2 Teste			OR (IC 95%)
	CC	CT	TT	Total	X ²	P	CT+TT	X2	p	
Sexo										
<i>Masculino</i>	16 (26,7)	15 (25,0)	0 (0,0)	31 (51,7)	2,693	0,237	15 (25,0)	1,192	0,306	CC= 0,788 (0,512-1,212) CT+TT= 1,403 (0,755-2,607)
<i>Feminino</i>	19 (21,4)	9 (15,0)	1 (1,7)	29 (48,3)			10 (16,7)			
Idade										
<i>>60 anos</i>	21 (35,0)	16 (26,7)	1 (1,7)	38 (63,3)	0,861	0,864	17 (28,3)	0,402	0,594	CC= 0,868 (0,567-1,330) CT+TT= 1,230 (0,638-2,371)
<i><60 anos</i>	14 (23,3)	8 (13,3)	0 (0,0)	22 (36,7)			8 (13,3)			
Origem										
<i>Urbano</i>	19 (31,7)	17 (28,3)	1 (1,7)	37 (61,7)	2,281	0,330	18 (30,0)	1,936	0,189	
<i>Rural</i>	16 (26,7)	7 (11,7)	0 (0,0)	23 (38,3)			7 (11,7)			
Cariótipo										
<i>Favorável</i>	19 (43,2)	7 (15,9)	0 (0,0)	25 (61,0)	5,154	0,071	7 (15,9)	5,154	0,071	
<i>Normal</i>	4 (9,1)	6 (13,6)	0 (0,0)	8 (19,5)			6 (13,6)			
<i>Desfavorável</i>	3 (6,8)	5 (11,4)	0 (0,0)	(19,5)			5 (11,4)			
<i>Cariótipo Normal</i>	14 (31,8)	5 (11,4)	0 (0,0)	19 (43,2)	2,946	0,124	5 (11,4)	2,946	0,124	
<i>Cariótipo Alterado</i>	12 (27,3)	13 (29,5)	0 (0,0)	25 (56,8)			13 (29,5)			
Celularidade MO										
<i>Normo+Hiper celular</i>	20 (40,8)	15 (30,6)	0 (0,0)	35 (71,4)	4,083	0,126	15 (30,6)	0,860	0,518	CC= 1,250 (0,806-1,938) CT+TT= 0,667 (0,268-1,660)
<i>Hipocelular</i>	10 (20,4)	3 (6,1)	1 (2,0)	14 (28,6)			4 (8,2)			
Citopenia										
<i>0-1</i>	14 (23,3)	9 (15,0)	1 (1,7)	24 (40,0)	1,563	0,654	10 (16,7)	0,000	1,000	CC= 1,000 (0,646-1,547) CT+TT= 1,000 (0,543-1,843)
<i>2-3</i>	21 (35,0)	15 (25,0)	0 (0,0)	36 (60,0)			15 (25,0)			
IPSS (Grupo de Risco)										
<i>Bom+Int-1</i>	20 (51,3)	13 (33,3)	0 (0,0)	33 (84,6)	1,536	0,374	13 (33,3)	1,536	0,374	
<i>Ruim+Int-2</i>	2 (5,1)	4 (10,3)	0 (0,0)	6 (15,4)			4 (10,3)			
OMS_CATEGORIZADA										
<i>Alto Risco</i>	6 (10,0)	2 (3,3)	0 (0,0)	8 (14,3)	11,212	0,053	2 (3,3)	1,386	0,599	
<i>Baixo Risco</i>	25 (41,7)	21 (35,0)	0 (0,0)	43 (76,8)			21 (35,0)			
<i>SMD Secundária</i>	4 (6,7)	1 (1,7)	1 (1,7)	6 (10,0)			2 (3,3)			
OMS ESTRATIFICADA										
<i>5q-</i>	2 (3,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,3)	14,189	0,301	0 (0,0)	7,038	0,334	
<i>AREB I</i>	3 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (5,0)			0 (0,0)			
<i>AREB II</i>	3 (5,0)	2 (3,3)	0 (0,0)	5 (8,3)			2 (3,3)			
<i>CRDM</i>	13(21,7)	15 (25,0)	0 (0,0)	28 (46,7)			15 (25,0)			
<i>AR</i>	5 (8,3)	1 (1,7)	0 (0,0)	6 (10,0)			1 (1,7)			
<i>ARSA</i>	4 (6,7)	4 (6,7)	0 (0,0)	8 (13,3)			4 (6,7)			
<i>SMD SECUNDÁRIA</i>	5 (8,3)	2 (3,3)	1 (1,7)	7 (12,5)			3 (5,0)			

*Teste de Qui-quadrado (χ^2) de Pearson ou Fisher. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Quanto à caracterização dos pacientes, estudos epidemiológicos realizados em países ocidentais apresentam que a mediana de idade de pacientes com SMD é de 70 anos (± 5 anos) (NISSE et al., 2001; GERMING et al., 2004; MA et al., 2007). No Brasil, tais dados ainda são bastante escassos. Foi encontrado apenas um registro realizado no período de 2003-2007 no qual foram incluídos um total de 476 pacientes de 12 centros distribuídos pelas regiões nordeste, sul e sudeste (MAGALHÃES et al., 2010). Neste estudo, pode-se observar uma mediana de idade de 68,3 anos.

No presente estudo, obtivemos uma mediana de idade de 65 anos corroborando com o levantamento proposto no estudo de Magalhães et al. (2010). Isto mostra que, mesmo sabendo-se que a SMD é mais frequente em população idosa (com idade superior a 60 anos), no Brasil a mediana de idade é inferior aos encontrados nos países ocidentais. Este fato pode ser explicado pela acentuação do envelhecimento da população brasileira (IBGE, 2011) ou devido ao fato das diferentes exposições a agentes genotóxicos, tais como os agrotóxicos, que contribuem para o desenvolvimento de SMD (NISSE et al., 2001).

Quanto à proporção de pacientes do sexo masculino e feminino, este estudo apresentou uma relação de 1,3. Estes dados corroboram com os registros internacionais que apresentam uma razão masculino/feminino entre 1,1 e 2 (GREENBERG et al., 1997; HAASE et al., 2007).

Em relação ao perfil de celularidade da medula óssea, os pacientes do grupo SMD apresentaram medula hipercelular em sua maioria (52,0%). Tais dados corroboram com os dados apresentados por Bernasconi et al. (2008) que associa estes resultados ao próprio perfil patogênico da doença, visto que a característica de apoptose excessiva dos estágios iniciais da doença é equilibrado pelo aumento na proliferação das células progenitoras hematopoiéticas (BERNASCONI et al., 2008; ISHIBASHI; TAMURA; OGATA, 2011).

Quanto ao perfil citogenético dos pacientes com SMD, observamos que 40-60% de pacientes SMD *de novo* apresentaram cariótipo alterado estando de acordo com os estudos de Dakshunamurthy et al. (2005) e Haase et al. (2007 e 2008). Adicionalmente, conforme exposto por Solé et al. (2005) e Haase et al. (2008), as alterações mais comumente observadas no presente estudo compreenderam alterações não balanceadas relacionadas ao cromossomo 7 (-7/7q-) em 20% dos casos, cromossomo 17 (-17/17p-) em 16%, cromossomo 8 (+8) em 12% e cromossomo 20 (-20/20q-) em 8% dos pacientes.

As variações nas frequências das alterações citogenéticas são relatadas na literatura com uma possível associação ao perfil étnico da população submetida ao estudo. Podemos citar que as alterações citogenéticas isoladas no cromossomo 5 (-5/5q-) e no cromossomo 7 (-7/7q-) são mais frequentes na população de SMD dos países ocidentais do que nos países orientais (CHEN et al., 2005).

A alta frequência de alterações citogenéticas com deleção 5q isolada e a presença de cariótipos normais no presente estudo foram os fatores principais que corroboraram com a prevalência de 82,1% classificação de baixo risco e risco intermediário 1 (GREENBERG et al., 1997), estando de acordo com o estudo de Magalhães et al. (2010).

Quanto à classificação OMS (BRUNNING et al., 2008), os resultados obtidos neste estudo corroboram com o estudo de Haase et al. (2007) que apresentam que há uma predominância de SMD de baixo risco (76,7% dos casos neste estudo) nos países ocidentais tendo a prevalência principalmente dos subtipos de AR, ARSA e CRDM em aproximadamente 64% dos casos.

Neste trabalho, realizamos o primeiro estudo de análise da frequência dos polimorfismos dos genes *ATM rs228593*, *BRCA1 rs4793191*, *BRCA2rs9567623*, *RAD51rs1801320*, *XRCC5rs3835*, *XRCC6rs2267437* e *LIG4rs1805388*, na associação com variáveis clínicas em pacientes com SMD.

Dentre os diferentes tipos de proteínas associadas à reparação de danos no DNA, o sensor molecular *ATM* desempenha um importante papel no reconhecimento, sinalização e reparação aos danos de fita dupla no DNA (ABRAHAM et al., 2004). Danos em fita dupla no DNA podem ocorrer como resultado de exposição celular a fatores exógenos, como por exemplo exposição a radiação ionizante, ou a fatores endógenos como resultados de erros no processo de recombinação ou na via de reparação por excisão de bases (TING; LEE, 2004). Em resposta ao DSB, a célula utiliza uma série de proteínas que detectam os danos no DNA (sensores moleculares) desencadeando a ativação de proteínas efetoras que induzem a resposta e reparação da lesão (TING; LEE, 2004).

As principais proteínas atuantes no processo de sensoriamento e resposta inicial aos danos acometidos no DNA são membros da família PIK3 possuindo o ATM como principal proteína efetora (TING; LEE, 2004). A proteína ATM responde ao DSB por fosforilação de outras proteínas chaves envolvidas no controle do ciclo celular e reparo a danos no DNA tais como as proteínas do checkpoint celular (CHEK's), proteínas supressoras tumorais (p53, BRCA1), fatores de reparação (RAD50 e RAD51) e outras moléculas de sinalização (ABL1 e NFKB1) (TING; LEE, 2004).

Polimorfismos no gene *ATM* já foram associados ao risco de outros cânceres, tais como mama e leucemias (WANG et al., 2010; WANG et al., 2011). Importantes achados foram observados na análise de polimorfismos presentes em regiões intrônicas (não codificantes) deste gene. As regiões intrônicas no genoma são alvos de abordagens moleculares que buscam compreender sua função de regiões gênicas portadoras de sequências às quais diversos elementos reguladores da expressão gênica se ligam ou sua fundamental importância na biogênese e processamento do mRNA (*splicing*) (GRUSS et al., 1976; NILSEN, 2003; KIM; GOREN; AST, 2008).

Stankovic et al. (1998) apresentaram que mutações neste gene estão associados com o aumento do risco de câncer, especialmente entre doenças hematológicas tais como leucemias e linfomas. Sabe-se que estas mutações encontram-se dispersas em todo o gene *ATM*, sugerindo que não somente mutações localizadas em éxons (região codificante), mas também mutações em íntrons, estão associadas com a ocorrência de tumores (STANKOVIC et al., 1998). No entanto, não há relatos de estudos de associação de polimorfismos em regiões intrônicas e o risco de SMD.

Neste contexto, realizamos o primeiro estudo de avaliação do polimorfismo rs238593 para o gene *ATM*, um polimorfismo em região intrônica, e associamos o genótipo heterozigoto A/G à diminuição de risco de SMD adicionado de correlação entre a presença da faixa de 0-1 citopenias no sangue periférico e o perfil de prognóstico favorável para a classificação do IPSS (RIBEIRO JR et al., 2012). Estes resultados demonstram o importante papel das variantes alélicas em regiões não codificantes no gene *ATM* e o risco de SMD podendo atuar provavelmente como fatores protetores da estabilidade genômica nas células tronco hematopoiéticas.

Em relação aos genes envolvidos no mecanismo de recombinação homóloga, o gene *BRCA1* possui forte interação com o gene *TP53* o que reforça a teoria de que o gene *BRCA1* está envolvido na reparação das lesões do DNA (THOMPSON; EASTON, 2004). Adicionalmente, o gene *BRCA2* está associado também com o envolvimento no mecanismo de reparação em danos de fita dupla de DNA em células de mamíferos (MARTIN et al., 2005).

Para estes genes, não encontramos associação entre os polimorfismos rs4793191 e rs9567623 para os genes *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente, e as variáveis sócio-demográficas e clínicas no grupo de pacientes SMD. Sabe-se que os genes *BRCA1/2* são essenciais para evitar a ocorrência de câncer da mama, leucemias e linfomas (FRIEDENSON et al., 2010; SCARDOCCI et al., 2006; WANG et al., 2010). Friedenson et al. (2010)

apresentou que a inativação de qualquer um destes genes aumenta o risco para os subgrupos de leucemias e linfomas. Contrariamente, mutações nesses genes provavelmente não estejam associadas com o risco de SMD.

Adicionalmente, o gene *RAD51* é a chave na via de reparação por recombinação homóloga. A proteína RAD51 interage diretamente com a proteína BRCA2 essencial para a mediação da invasão da fita homóloga da cromátide irmã utilizada como molde no processo de reparação por HR, favorecendo a manutenção da estabilidade do genoma (TARSOUNAS; DAVIES; WEST, 2004; THACKER et al., 2005). O mais importante polimorfismo para o gene *RAD51* é o rs1801320 já associado à super expressão da proteína RAD51 (RICHARDSON et al., 2004).

Neste estudo, encontramos uma importante associação do polimorfismo rs1801320 para o gene *RAD51* e a diminuição de risco de pacientes com SMD. Baumann e Steensma (2008) estudaram 292 pacientes norte-americanos e mostraram que o polimorfismo *RAD51*rs1801320 não desempenha um papel importante na patogênese de SMD (BAUMANN; STEENSMA, 2008). Outro estudo com 160 pacientes italianos não mostrou nenhuma associação dos genótipos do polimorfismo *RAD51* rs1801320 com SMD (FABIANI et al., 2009). Mais recentemente, Li et al. (2011) analisaram 275 pacientes chineses com SMD *de novo* e encontraram associação com o polimorfismo *RAD51* rs1801320. Este artigo associou o genótipo homocigoto C/C com o risco aumentado de SMD (OR, 4,13, 95% CI, 1,83-9,53, p=0,001; FPRP=0,071) (Li et al., 2011).

O estudo de Li et al. (2011), apresenta, pela primeira vez, que o polimorfismo do gene *RAD51* pode estar associado ao desenvolvimento de SMD. No entanto, o estudo de Li et al. (2011), demonstra um aumento do risco para casos com genótipo C/C ao passo que demonstramos que o genótipo G/C possui um efeito protetor em SMD. Estes resultados levantam a possibilidade de que o polimorfismo rs1801320 do gene *RAD51* pode estar verdadeiramente associado a SMD.

Uma possível explicação para esses resultados pode estar relacionada com a variação genética entre as populações deste estudo. Alguns estudos mostraram que a diferença na incidência de anormalidades cromossômicas em pacientes com SMD varia de acordo com o grupo em estudo (baixo x alto risco), com possíveis influências geográficas e étnicas (MAGALHÃES et al., 2012). Adicionalmente, de acordo com o registro nacional de SMD, Magalhães et al. (2010) observaram importantes diferenças entre outros relatórios americanos, europeus, asiáticos e até mesmo entre regiões geográficas brasileiras indicando que a

miscigenação racial também pode desempenhar um papel importante na estratificação da SMD.

Outro importante achado para o polimorfismo rs1801320 do gene *RAD51* foi a forte associação do genótipo homozigoto selvagem G/G com pacientes com idade superior a 60 anos e com a presença de uma citopenia, representando uma menor agressividade da doença (GREENBERG et al., 1997). Primeiramente, estes resultados reforçam a ideia que a SMD em pacientes idosos é diferente em relação a SMD de pacientes jovens. Brunning et al. (2008) mostra que SMD em pacientes jovens são raras e possuem uma melhor resposta a agentes quimioterápicos imunossupressores, diferentemente do que em pacientes idosos. Segundo, confirmando os resultados apresentados, a maioria dos pacientes com SMD apresentam o perfil de menor agressividade, frente ao baixo número de citopenias no sangue periférico (0-1), diferentemente dos pacientes com duas ou mais citopenias, característico de uma doença com perfil prognóstico de difícil tratamento (GREENBERG et al., 1997).

Li et al. (2011) apresentaram que provavelmente o genótipo homozigoto C/C para o polimorfismo rs1801320 no gene *RAD51* interage no mecanismos de HR em DSB no DNA especialmente na formação de anormalidades cromossômicas estruturais, os quais consistem em cariótipos padrões de SMD. Em nosso estudo, propomos que os genótipos G/C e GG podem estar associados na promoção de um efeito protetor da estabilidade genômica das células tronco hematopoiéticas acompanhadas de uma diminuição de risco de SMD.

Frente aos polimorfismos avaliados neste estudo, avaliamos também a frequência dos polimorfismos *rs3835*, *rs2267437* e *rs180538* para os genes *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4*, respectivamente, todos atuantes no mecanismo de reparação por junções por extremidades não-homólogas. O mecanismo de reparação por NHEJ é considerada a principal via de reparo de DSB em células eucarióticas por ser ativada em várias fases do ciclo celular, em especial nas fases G0 e G1 (PFEIFFER et al, 2004).

NHEJ é uma forma potencialmente imprecisa de reparação de DSB por resultar na perda de alguns nucleotídeos nas extremidades quebradas do DNA (PFEIFFER et al., 2004; SHRIVASTAV; DE HARO; NICKOLOFF, 2008). Deficiências na via de reparo por NHEJ podem levar ao aumento da instabilidade genômica e conseqüente processo de tumorigênese (DIFILIPPANTONIO et al., 2000; FERGUSON; ALT, 2001). Tal via de reparo envolve diversos genes tais como o *ATM* (como sensor molecular ao dano, semelhante ao mecanismo de HR), os dímeros *XRCC5/6* (traduzindo as proteínas Ku70 e Ku80), a proteína Artemis, *p53* e a *DNA Ligase 4* (SHRIVASTAV; DE HARO; NICKOLOFF, 2008). Entretanto, não há muitos estudos que avaliem a correta ativação e funcionamento destes genes e seus

respectivos produtos protéicos, em especial para os genes *XRCC5/6* e *LIG4*, para cada tipo de câncer, principalmente em SMD.

O dímero *XRCC5/6* desempenha um papel crucial na via por NHEJ, principalmente pelo fato de ser o primeiro complexo protéico que se liga a porção danificada terminal do DNA (LIEBER et al., 2008). Inicialmente, o heterodímero *XRCC5/6* (Ku80/70) reorganiza e liga as extremidades danificadas por DSB e, por fim, recruta o complexo *XRCC7* para a porção final danificada para formar as DNA PKs (LIEBER et al., 2008).

Associações entre polimorfismos nos genes *XRCC5/6* já foram associadas a outros cânceres tais como neoplasias na bexiga, mama e pulmão (FU et al., 2003; WANG et al., 2008; TSENG et al., 2009). No entanto, não encontramos em nossos levantamentos nenhum artigo que relacionasse as frequências de polimorfismos nestes genes com SMD.

Em nossos achados, avaliamos que o genótipo heterozigoto *C/G* e os genótipos mutantes *CG+GG* do polimorfismo rs2267437 do gene *XRCC6* foi associado com a presença de medula óssea com características de celularidade normocelular+hipercelular. Estes genótipos também foram associados à presença de uma maior frequência de cariótipos normais ao diagnóstico dos pacientes com SMD. Adicionalmente a estes achados, observamos que o genótipo *A/G*, referente ao polimorfismo rs3835 do gene *XRCC5*, foi altamente associado com a diminuição de risco para SMD ($p < 0.001$, OR 0.100, CI 0.035-0.289). Provavelmente, alterações polimórficas no genes tradutores do heterodímero *XRCC5/6* estejam associadas a um menor risco de SMD associada a um perfil de doença de menor agressividade (SMD de prognóstico favorável) e não sejam os precursores principais da quebra de estabilidade genômica na via de NHEJ nesta doença.

As DSBs são consideradas as principais lesões no DNA responsáveis pela formação de alterações cromossômicas. Sabe-se que células com deficiência da proteína Ku80 (proteína oriunda do gene *XRCC5*) apresentam-se com um aumento da presença de aberrações cromossômicas, incluindo quebras, translocações e aneuploidias (DIFILIPPANTONIO et al., 2000). Entretanto, Economopoulou et al. (2010) mostraram que não há associação na expressão da proteína ku80 e o perfil prognóstico (citogenética, IPSS ou OMS) de pacientes com SMD. Contrariamente, o mesmo estudo apresentou resultados de expressão da proteína ku70 mostrando que este gene está *downregulated* (baixo expresso) em pacientes com SMD com perfil citogenético de bom prognóstico, também associando esta proteína o subtipo de SMD de baixo risco semelhante aos nossos resultados (ECONOMOPOULOU et al., 2010).

Por outro lado, mutações no gene *LIG4* tradutor da proteína DNA Ligase IV, proteína atuante na finalização e reparação do DNA na via de NHEJ, estão associadas a

síndromes autossômicas caracterizadas por microcefalias, anomalias neurológicas e aumento da susceptibilidade para outras doenças que poderão culminar em câncer (RIBALLO et al., 1999). Neste estudo, o polimorfismo rs1805388 para o gene *LIG4* foi o único polimorfismo que não se apresentou em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,001$). Este polimorfismo foi associado anteriormente com a modulação da predisposição a mieloma múltiplo (RODDAM et al., 2002) e com o aumento de risco de câncer de pulmão em pacientes fumantes (TSENG et al., 2009).

O teorema de Hardy-Weinberg, consistindo a base da teoria genética da evolução, possui o princípio de que uma população para estar em equilíbrio evolutivo necessita possuir um tamanho infinito e que todos os indivíduos na população se acasalem aleatoriamente. Quando ocorrem esses desvios das proporções esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg significa que alguma de suas pressuposições foi violada (FALCONER; MACKAY, 1997).

Os principais fatores que levam a alterações nas frequências gênicas de um dado polimorfismo em populações naturais podem ser devidos a processos sistemáticos como a existência de fluxo gênico, seleção natural, mutações ou a população submetida ao estudo é insuficientemente infinita (FALCONER; MACKAY, 1997), fator principal que provavelmente justifica as análises negativas para o polimorfismo *LIG4* rs1805388.

Em síntese, neste estudo demonstramos que os genes relacionados a DSB são também relacionados a patogênese da SMD. Estes resultados suportam a importância dos polimorfismos rs228593, rs3835, rs2267437 e rs1801320 para os genes *ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* e o *RAD51*, respectivamente, na manutenção da estabilidade genômica das células tronco hematopoiéticas promovendo um melhor entendimento da gênese e etiologia da Síndrome Mielodisplásica.

6 CONCLUSÕES

A partir do desenvolvimento deste estudo, podemos concluir que:

- Associamos os polimorfismos rs3835 e rs2267437 dos genes *XRCC5* e *XRCC6*, respectivamente, atuantes na via de reparo por NHEJ em DSB, com a diminuição de risco para SMD (Figura 24);

- Associamos o polimorfismo rs1801320 para o gene *RAD51*, atuante na via de reparo por HR em DSB, com a diminuição de risco de SMD (Figura 24);

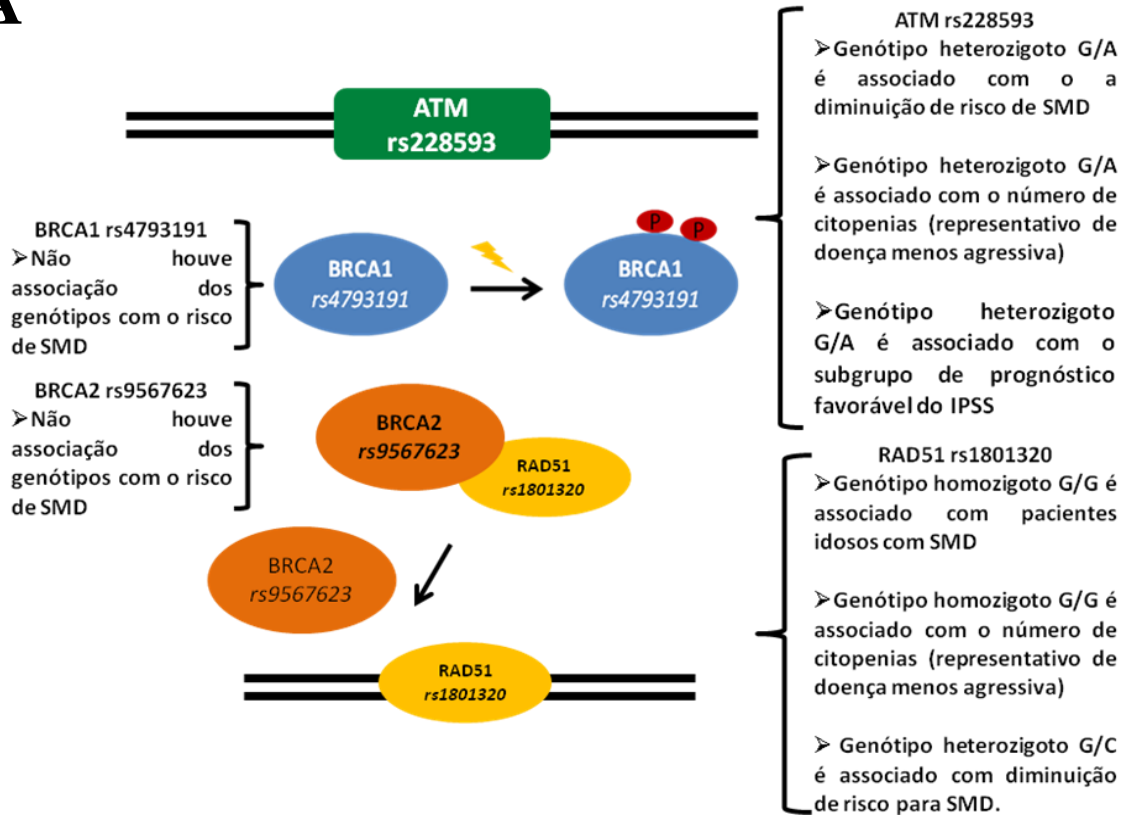
- Associamos o polimorfismo rs228593 do gene *ATM* com pacientes diminuição de risco de SMD adicionado de uma correlação com variáveis de prognóstico favorável para SMD (Figura 24);

- Não obtivemos importantes associações dos polimorfismos rs4793191, rs9567623 e rs1805388 respectivamente para os genes *BRCA1*, *BRCA2* e *LIG4*, entre as variáveis estudadas para os pacientes com SMD (Figura 24);

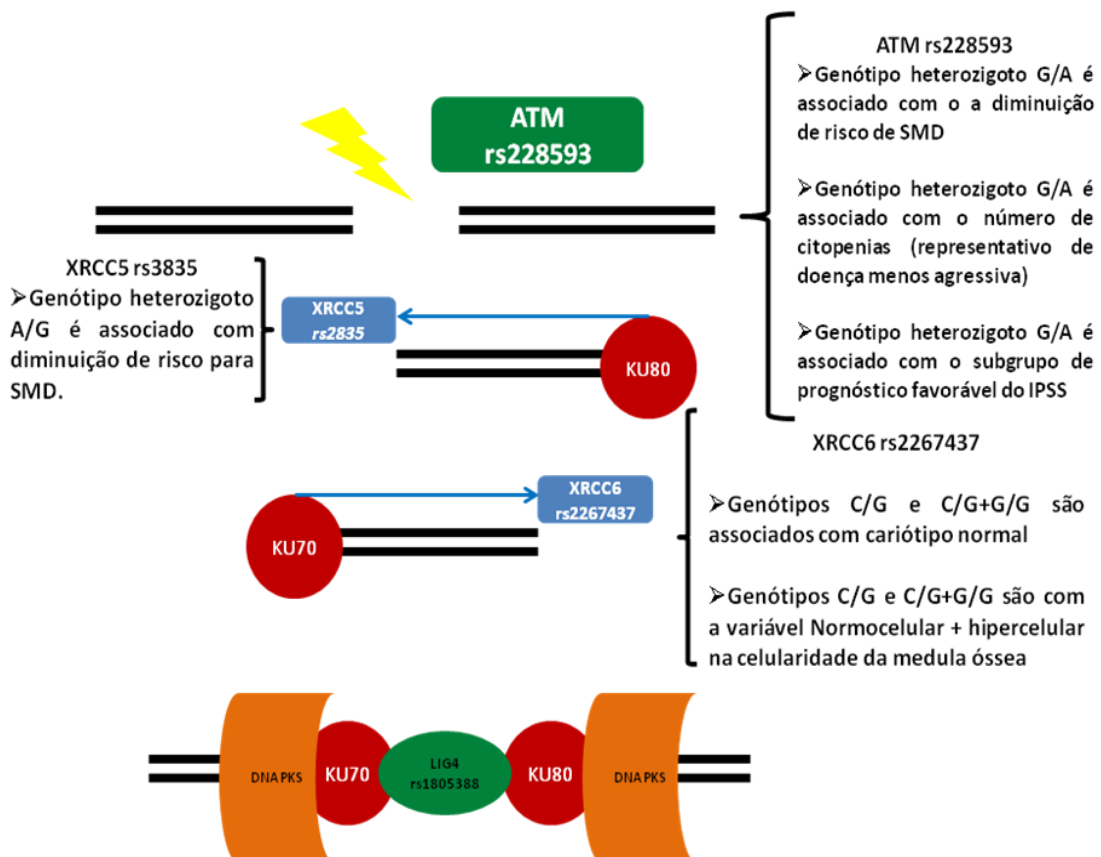
- Demonstramos que os genes relacionados a DSB são relacionados à patogênese da SMD e suportam a importância do estudo desses polimorfismos na manutenção da estabilidade genômica de células tronco hematopoiéticas promovendo um melhor entendimento da gênese e etiologia da Síndrome Mielodisplásica.

Figura 24: Representação esquemática dos resultados obtidos neste estudo

A



B



REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, R. T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. **Genes Dev.**, v. 15, n. 17, p. 2177-2196, 2001.
- ABRAHAM, R. T. PI 3-kinase related kinases: ‘big’ players in stressinduced signaling pathways. **DNA Repair (Amst.)**, v. 3, p. 883–887, 2004.
- AHNESORG, P.; SMITH, P.; JACKSON, S. P. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 301-313, 2006.
- ALLEN, C. Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining. **Mol. Cancer Res.**, v. 1, n. 12, p. 913-920, 2003.
- ANDEGEKO, Y.; MOYAL, L.; MITTELMAN, L.; TSARFATY, I.; SHILOH, Y.; ROTMAN, G. Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 41, p. 38224-38230, 2001.
- ANDO, J.; TAMAYOSE, K.; SUGIMOTO, K.; OSHIMI, K. Late appearance of t(1;19)(q11;q11) in myelodysplastic syndrome associated with dysplastic eosinophilia and pulmonary alveolar proteinosis. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 139, p. 14–17, 2002.
- AUL, C.; GATTERMANN, N.; SCHNEIDER, W. Epidemiological and Etiological Aspects of Myelodysplastic Syndromes. **Leuk. Lymphoma**, v. 16, n. 3, p. 247-262, 1995.
- BAO, S.; TIBBETTS, R. S.; BRUMBAUGH, K. M.; FANG, Y.; RICHARDSON, D. A.; ALI, A.; CHEN, S. M.; ABRAHAM, R. T.; WANG, X. F. ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 969-974, 2001.
- BARTEK, J.; LUKAS, C.; LUKAS, J. Checking on DNA damage in S phase. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 510, p. 792-804, 2004.
- BAUMANN KREUZIGER, L. M.; STEENSMA, D. P. RAD51 and XRCC3 polymorphism frequency and risk of myelodysplastic syndromes. **Am. J. Hematol.**, v. 83, n. 10, p. 822-823, 2008.
- BELLI, M.; SAPORA, O.; TABOCCHINI, M. A. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. **J. Radiat. Res. (Tokyo)**, v. 43, Suppl., p. S13-19, 2002.
- BENNETT, J. M. A comparative review of classification systems in myelodysplastic syndromes (MDS). **Semin. Oncol.**, v.32, n.4, Suppl. 5, p.S3-10, 2005.
- BENNETT, J. M. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndrome. **Br. J. Hematol.**, v.51, p.189-199, 1982.
- BENNETT, J. M. World Health Organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome. **Int. J. Hematol.**, v.72, n.2, p.131-133, 2000.

- BERNASCONI, P. Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: relationship and distinctions – a review. **Br. J. Haematol.**, v. 142, p. 695-708, 2008.
- BOLAND, C. R.; LUCIANI, M. G.; GASCHÉ, C.; GOEL, A. Infection, inflammation, and gastrointestinal cancer. **Gut**, v. 54, n. 9, p. 1321–1331, 2005.
- BRUNNING, R. D.; ORAZI, A.; GERMING, U. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. **WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon: IARC Press, 2008. p. 88-93.
- BURMA, S. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. **DNA Repair (Amst.)**, v. 5, n. 9-10, p. 1042-1048, 2006.
- CALDECOTTE, K. W. XRCC1 and DNA strand break repair. **DNA Repair (Amst.)**, v. 2, p. 955-969, 2003.
- CHAUFFAILLE, M. L. Adding FISH to karyotype in Myelodysplastic syndrome investigation diagnosis: are all questions answered?. **Leuk. Res.**, v. 34, n. 4, p. 413-415, 2010.
- CHEHAB, N. H.; MALIKZAY, A.; APPEL, M.; HALAZONETIS, T. D. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. **Genes Dev.**, v. 143, p. 278-288, 2010.
- CHEN, B.; ZHAO, W. L.; JIN, J.; XUE, Y. Q.; CHENG, X.; CHEN, X. T.; CUI, J.; CHEN, Z. M.; CAO, Q.; YANG, G.; YAO, Y.; XIA, H. L.; TONG, J. H.; LI, J. M.; CHEN, J.; XIONG, S. M.; SHEN, Z. X.; WAXMAN, S.; CHEN, Z.; CHEN, S. J. Clinical and cytogenetic features of 508 Chinese patients with myelodysplastic syndrome and comparison with those in Western countries. **Leukemia**, v. 19, p.767-775, 2005.
- COSTA, R. M.; MENCK, C. F. Genes de Reparo de DNA. In: FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 45-55.
- CRITCHLOW, S. E.; BOWATER, R. P.; JACKSON, S. P. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. **Curr. Biol.**, v. 7, p. 588-598, 1997.
- DAKSHINAMURTHY, A. G.; NOVITZKY, N.; BHARADWAJ, R.; PRAKHYA, B. M. Cytogenetic analysis of 52 Indian patients with de novo myelodysplastic syndromes – a comparative analysis of results with reports from Asia. **Ann. Hematol.**, v. 84, p. 298-303, 2005.
- DIFILIPPANTONIO, M. J.; ZHU, J.; CHEN, H. T.; MEFFRE, E.; NUSSENZWEIG, M. C.; MAX, E. E. et al. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. **Nature**, v. 404, p. 510-514, 2000.
- DUROCHER, D.; JACKSON, S. P. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 132, p. 225-231, 2001.

ECONOMOPOULOU, C.; PAPPAS, V.; KONTSIOTI, F.; PAPAGEORGIOU, S.; KAPSIMALI, V.; PAPASTERIADI, C.; ECONOMOPOULOU, P.; PAPAGEORGIOU, E.; DERVENOULAS, J.; ECONOMOPOULOS, T. Analysis of apoptosis regulatory genes expression in the bone marrow (BM) of adult de novo myelodysplastic syndromes (MDS). **Leuk. Res.**, v.32, n.1, p. 61-69, 2008.

ECONOMOPOULOU, P.; PAPPAS, V.; KONTSIOTI, F.; PAPAGEORGIOU, S.; FOUKAS, P.; LIAKATA, E.; ECONOMOPOULOU, C.; VASSILATOY, D.; IOANNIDOU, E. D.; CHONDROPOULOS, S.; TSIRIGOTIS, P.; PAPAGEORGIOU, E.; DERVENOULAS, J.; ECONOMOPOULOS, T. Expression analysis of proteins involved in the non homologous end joining DNA repair mechanism, in the bone marrow of adult de novo myelodysplastic syndromes. **Ann. Hematol.**, v. 89, n. 3, p. 233-239, 2010.

EFFERTH, T.; VOLM, M. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. **Pharmacol. Therap.**, v. 107, p. 155-176, 2005.

EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer Res.**, v. 57, n. 10, p. 1835-1840, 1997.

FABIANI, E.; D'ALÒ, F.; SCARDOCCI, A.; GRECO, M.; DI RUSCIO, A.; CRISCUOLO, M.; FIANCHI, L.; PAGANO, L.; HOHAUS, S.; LEONE, G.; VOSO, M. T. Polymorphisms of detoxification and DNA repair enzymes in myelodysplastic syndromes. **Leuk. Res.**, v. 33, n. 8, p. 1068-1071, 2009.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. **Introduction to quantitative genetics**. 4th ed. Harlow: Longman Scientific, 1997.

FEARON, E. R. Tumor Suppressor Genes. In: VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. (Ed.). **The genetics basis of human cancer**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 2002. p. 197-206.

FENAUX, P. Myelodysplastic syndromes: From pathogenesis and prognosis to treatment. **Semin. Hematol.**, v.41, n.2, Suppl. 4, p.6-12, 2004.

FERGUSON, D. O.; ALT, F. W. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. **Oncogene**, v. 20, p. 5572-5579, 2001.

FORREST, D. L.; COUBAN, S.; NEVILL, T. J.; LEE, C. Y. L.; WELCH, P. J. Myelodysplastic syndrome and a nonrandom chromosomal abnormality t(1;19): an indolent pathologic entity. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 122, p. 134-136, 2000.

FRIEDENSON, B. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. **BMC Cancer**, v. 7, p. 152, 2007.

FU, Y. P.; YU, J. C.; CHENG, T. C.; LOU, M. A.; HSU, G. C.; WU, C. Y. Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the nonhomologous end-joining genes: a multigenic study on cancer susceptibility. **Cancer Res.**, v. 63, p. 2440-2446, 2003.

GERMING, U. Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. **Ann. Hematol.**, v. 87, n. 9, p. 691-699, 2008.

GERMING, U.; STRUPP, C.; KÜNDGEN, A.; Bowen, D.; Aul, C.; Haas, R.; Gattermann, N. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 89, p. 905-910, 2004.

GILL, J. I.; VARELA, M.; TSIEN, F.; KRAUSE, J. R. der(1)t(1;19)(p12;p11): a new nonrandom chromosomal abnormality in myelodysplastic syndrome. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 94, p. 85-87, 1997.

GOODE, E. L.; ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 11, p. 1513-1530, 2002.

GREENBERG, P. L.; TUECHLER, H.; SCHANZ, J.; SANZ, G.; GARCIA-MANERO, G.; SOLÉ, F.; BENNETT, J. M.; BOWEN, D.; FENAUX, P.; DREYFUS, F.; KANTARJIAN, H.; KUENDGEN, A.; LEVIS, A.; MALCOVATI, L.; CAZZOLA, M.; CERMAK, J.; FONATSCH, C.; LE BEAU, M. M.; SLOVAK, M.L.; KRIEGER, O.; LUEBBERT, M.; MACIEJEWSKI, J.; MAGALHAES, S. M.; MIYAZAKI, Y.; PFEILSTÖCKER, M.; SEKERES, M.; SPERR, W. R.; STAUDER, R.; TAURO, S.; VALENT, P.; VALLESPI, T.; VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; GERMING, U.; HAASE, D. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454-2465, 2012.

GREENBERG, P. L.; COX, C.; LEBEAU, M. M.; FENAUX, P.; MOREL, P.; SANZ, G.; SANZ, M.; VALLESPI, T.; HAMBLIN, T.; OSCIER, D.; OHYASHIKI, K.; TOYAMA, K.; AUL, C.; MUFTI, G.; BENNETT, J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v.89, n.6, p.2079-2088, 1997.

GRUSS, P.; LAI, C. J.; DHAR, R.; KHOURY, G. Splicing is requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40. **PNAS**, v. 76, n. 9, p. 4317-4312, 1979.

HAASE, D. Cytogenetics features in myelodysplastic syndromes. **Ann. Hematol.**, v. 87, p.515-526, 2008.

HABER, J. E.; IRA, G.; MALKOVA, A.; SUGAWARA, N. Repairing a double-strand chromosome break by homologous recombination: revisiting Robin Holliday's model. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, v. 359, n. 1441, p. 79-86, 2004.

HALL, E. J. **Radiobiology for the radiologist**. 5th. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

HALL, J. M.; LEE, M. K.; NEWMAN, B.; MORROW, J. E.; ANDERSON, L. A.; HUEY, B.; KING, M. C. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**, v. 250, p. 1684-1689, 1990.

HAMMOND, E. M.; DENKO, N. C.; DORIE, M. J.; ABRAHAM, R. T.; GIACCIA, A. J. Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest. **Mol. Cell. Biol.**, v. 226, p. 1834-1843, 2002.

HAMMOND, E. M.; DORIE, M. J.; GIACCIA, A. J. ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 14, p.12207-12213, 2003.

HAN, Z.; CHATTERJEE, D.; HE, D. M.; EARLY, J.; PANTAZIS, P.; WYCHE, J. H.; HENDRICKSON, E. A. Evidence for a G2 checkpoint in p53-independent apoptosis induction by X-irradiation. **Mol. Cell Biol.**, v. 15, n. 11, p. 5849-5857, 1995.

HANNAN, M. A.; HELLANI, A.; AL-KHODAIRY, F. M.; KUNHI, M.; SIDDIQUI, Y.; AL-YUSSEF, N.; PANGUE-CRUZ, N.; SIEWERTSEN, M.; AL-AHDAL, M. N.; ABOUSSEKHRA, A. Deficiency in the repair of UV-induced DNA damage in human skin fibroblasts compromised for the ATM gene. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 10, p. 1617-1624, 2002.

HARMS, C.; SALAMA, S. A.; SIERRA-TORRES, C. H.; CAJAS-SALAZAR, N.; AU, W. W. Polymorphisms in DNA repair genes, chromosome aberrations, and lung cancer. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 44, n. 1, p. 74-82, 2004.

HASLE, H. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. **Leukemia**, v.17, n.2, p.277-282, 2003.

HAASE, D.; GERMING, U.; SCHANZ, J.; PFEILSTÖCKER, M.; NÖSSLINGER, T.; HILDEBRANDT, B.; KUNDGEN, A.; LÜBBERT, M.; KUNZMANN, R.; GIAGOUNIDIS, A. A.; AUL, C.; TRÜMPER, L.; KRIEGER, O.; STAUDER, R.; MÜLLER, T. H.; WIMAZAL, F.; VALENT, P.; FONATSCH, C.; STEIDL, C. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. **Blood**, v. 110, p. 4385-4895, 2007.

HEFFERNAN, T. P.; SIMPSON, D. A.; FRANK, A. R.; HEINLOTH, A. N.; PAULES, R. S.; CORDEIRO-STONE, M.; KAUFMANN, W. K. An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage. **Mol. Cell Biol.**, v. 22, n. 24, p. 8552-8561, 2002.

HEKMAT-NEJAD, M.; YOU, Z.; YEE, M. C.; NEWPORT, J. W.; CIMPRICH, K. A. Xenopus ATR is a replication-dependent chromatin-binding protein required for the DNA replication checkpoint. **Curr. Biol.**, v. 10, n. 24, p. 1565-1573, 2000.

HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; MALCOVATI, L. Supportive care, growth factors, and new therapies in myelodysplastic syndromes. **Blood Rev.**, v.22, p.75-91, 2008.

HEREDIA, F. F. **Estudo de Proteínas relacionadas ao fuso mitótico (AURORA A e AURORA B) e ponto de checagem mitótico (CDC20 e MAD2L1) em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica.** Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia, Fundação Antônio Prudente, Escola Cearense de Oncologia, Fortaleza, 2012.

HIRAO, A.; KONG, Y. Y.; MATSUOKA, S.; WAKEHAM, A.; RULAND, J.; YOSHIDA, H.; LIU, D.; ELLEDGE, S. J.; MAK, T. W. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1824-1827, 2000.

HIROSE, Y.; BERGER, M. S.; PIEPER, R. O. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. **Cancer Res.**, v. 615, p. 1957-1963, 2001.

HOFMANN, W. K.; NOLTE, F. Molecular Targets in Myelodysplastic Syndromes. **Cancer Treatment Rev.**, v. 33, p. 542-546, 2007.

IBGE. **Censo Demográfico de 2011**. Dados fornecidos em meio eletrônico.

ISHIBASHI, M.; TAMURA, H.; OGATA, K. Disease progression mechanism in myelodysplastic syndromes: insight into the role of the microenvironment. **Leuk. Res.**, v. 35, p. 1449-1452, 2001.

JÄDERSTEN, M.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. **J. Int. Med.**, v. 265, p. 307-328, 2008.

JAFFE, E. S., SWERDLOW, S. H., CAMPO, E., HARRIS, N. L., PILERI, S. A., STEIN, H., THIELE, J., VARDIMAN, J. W. **WHO classification of tumours: tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon, France, 2001. (WHO Classification of Tumours)

KAO, J.; ROSENSTEIN, B. S.; PETERS, S.; MILANO, M. T.; KRON, S. J. Cellular response to DNA damage. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 1066, p. 243-258, 2005.

KEEN-KIM, D.; NOORAIE, F.; RAO, P. N. Cytogenetic biomarkers for human cancer. **Front. Biosci.**, v. 13, p. 5928-5949, 2008.

KIM, E.; GOREN, A.; AST, G. Alternative splicing: current perspectives. **BioEssays**, v. 30, n. 1, p. 38-47, 2008.

KIM, P. M.; ALLEN, C.; WAGENER, B. M.; SHEN, Z.; NICKOLOFF, J. A. Overexpression of human RAD51 and rad52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 21, p.4352-4360, 2001.

KINANE, D. F.; HART, T. C. Genes and genes polymorphisms associated with periodontal disease. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 14, p. 430-449, 2003.

KOMROKJI, R. S.; ZHANG, L.; BENNETT, J. M. Myelodysplastic syndromes classification and risk stratification. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 24, p. 443-457, 2010.

KUERBITZ, S. J.; PLUNKETT, B. S.; WALSH, W. V.; KASTAN, M. B. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 89, n. 16, p. 7491-7495, 1992.

LEE, K.-M.; CHOI, J.-Y.; KANG, C.; KANG, C. P.; PARK, S. K.; CHO, H.; CHO, D.-Y.; YOO, K.-Y.; NOH, D.-Y.; AHN, S.-H.; PARK, C.-G.; WEI, Q.; KANG, D. Genetic Polymorphisms of Selected DNA Repair Genes, Estrogen and Progesterone Receptor Status, and Breast Cancer Risk. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, p. 4620-4626, 2005.

LI, L.; LIU, X.-P.; NIE, L.; YU, M.-H.; ZANG, Y.; QIN, T.-J.; XIAO, Z.-J. Unique cytogenetics features of primary myelodysplastic syndromes in Chinese patients. **Leuk. Res.**, v. 33, p.1194-1198, 2009.

LI, L.; YANG, L.; ZHANG, Y.; XU, Z.; QIN, T.; HAO, Y.; XIAO, Z. Detoxification and DNA repair genes polymorphisms and susceptibility of primary myelodysplastic syndromes in Chinese population. **Leuk. Res.**, v. 35, n. 6, p. 762-765, 2011.

LIEBER, M. R. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 1-5, 2008.

LIU, L.; YANG, L.; YINGCHANG, M. I.; JIANXIANG, W.; JIANYONG, L. I.; YUE, Z.; XIAOTANG, M.; TIEJUN, Q.; ZEFENG, X.; ZHIJIAN, X. RAD51 and XRCC3 polymorphisms: Impact on the risk and treatment outcomes of de novo inv(16)ort(16;16)/CBF γ -MYH11(+) acute myeloid leukemia. **Leuk. Res.**, v. 35, n. 8, p. 1020-1026, 2011.

LOOK, A. T. Molecular Pathogenesis of MDS. **Hematology**, p. 156-160, 2005.

LOWNDES, N. F.; MURGUIA, J. R. Sensing and responding to DNA damage. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 10, n. 1, p. 17-25, 2000.

LYER, R.; PLUCIENNIK, A.; BURDETT, V.; MODRICH, P. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. **Chem. Rev.**, v. 106, n. 2, p. 302-323, 2006.

MA, X.; DOES, M.; RAZA, A.; MAYNE, S. T. Myelodysplastic syndromes: Incidence and survival in the United States. **Cancer**, v. 109, n. 8, p. 1536-1542, 2007.

MAGALHÃES, S. M. M.; MADEIRA, T. S.; BITTENCOURT, R.; VELLOSO, E.; CHAUFFAILLE, M. L.; AZEVEDO, A. A.; FAGUNDES, E. M.; ZANICHELLI, M. A.; BONFIM, G.; MELO, L. G.; TAVARES, R. S.; BORTOLHEIRO, T. C. Epidemiological and Clinicopathological Data From the Brazilian Registry of Patients with Myelodysplastic Syndromes and Comparative Analysis between different geographic areas. **Blood**, v. 116, abstract 1884, 2010.

MAGALHÃES, S. M. M.; HEREDIA, F. F.; FERNANDES, L. C.; ALMEIDA, P. J.; SOUSA, J. C.; SOUZA, G. F.; PINHEIRO, R. F. Beyond race-related disparities - is myelodysplastic syndrome the same everywhere? **Leuk. Lymphoma**, 2013.

MALCOVATI, L.; NIMER, S. D. Myelodysplastic syndromes: diagnosis and staging. **Cancer Control.**, v. 15, n. 4, p. 4-13, 2008.

MARTIN, J. S.; WINKELMANN, N.; PETALCORIN, M. I. R.; MCILWRAITH, M. J.; BOULTON, S. J. RAD-51-dependent and independent roles of a *Caenorhabditis elegans* BRCA2-related protein during DNA double-strand break repair. **Mol. Cell. Biol.**, v. 25, p. 3127-3139, 2005.

MOHRENWEISER, H. W.; JONES, I. M. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation? **Mutat. Res.**, v. 400, n. 1/2, p.15-24, 1998.

MOHRENWEISER, H. W.; WILSON, D. M.; JONES, I. M. Challenges and complexities in estimating both the functional impact and the disease risk associated with the extensive genetic variation in human DNA repair genes. **Mutat. Res.**, v. 526, p. 93-125, 2003.

MUFTI, G. J.; BENNETT, J. M.; GOASGUEN, J.; BAIN, B. J.; BAUMANN, I.; BRUNNING, R.; CAZZOLA, M.; FENAUX, P.; GERMING, U.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; JINNAI, I.; MANABE, A.; MATSUDA, A.; NIEMEYER, C. M.; SANZ, G.; TOMONAGA, M.; VALLESPI, T.; YOSHIMI, A. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. **Haematologica**, v. 93, n. 11, p. 1712-1727, 2008.

NAEIM, F.; RAO, P. N.; GRODY, W. W. Myelodysplastic Syndromes. In: _____. **Hematopathology**: morphology, immunophenotype, cytogenetics and molecular approaches. 1st ed. New York: Academic Press Publication, 2008. p. 129-154.

NATARAJAN, A. T.; DARROUDI, F.; MEIJERS, M.; ZDZIENICKA, M. Z. Ionizing radiation induced DNA lesions which lead to chromosomal aberrations. **Mutat. Res.**, v. 299, n. 3/4, p. 297-303, 1993.

NILSEN, T. W. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell?. **BioEssays**, v. 25, n. 12, p. 1147–1149, 2003.

NISSE, C.; HAGUENOER, J. M.; GRANDBASTIEN, B. PREUDHOMME, C.; FONTAINE, B.; BRILLET, J. M.; LEJEUNE, R.; FENAUX, P. Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndrome in the North of France. **Br. J. Haematol.**, v. 112, p. 927-935, 2001.

OLNEY, H. J.; LE BEAU, M. M. The Cytogenetics and molecular biology of the Myelodysplastic syndromes. In: STEENSMA, D. P. (Ed.). **Myelodysplastic syndromes**: pathobiology and clinical management. 2nd ed. New York: Informa Healthcare, 2002. p. 49-86.

PANDITA, T. K. Role of ATM in pathways of DNA double-strand-break repair. **Exp. Rev. Mol. Med.**, v. 20, p. 5, 2003.

PANDITA, T. K.; LIEBERMAN, H. B.; LIMA, D. S.; DHAR, S.; ZHENG, W.; TAYA, Y.; KASTAN, M. B. Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. **Oncogene**, v. 19, n. 11, p. 1386-1391, 2000.

PASTWA, E.; BLASIAK, J. Non-homologous DNA end joining. **Acta Biochim. Pol.**, v. 50, n. 4, p. 891-908, 2003.

PAULL, T. T.; ROGAKOU, E. P.; YAMAZAKI, V.; KIRCHGESSNER, C. U.; GELLERT, M.; BONNER, W. M. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. **Curr. Biol.**, v. 10, n. 15, p. 886-895, 2000.

PELLEGRINI, L.; YU, D. S.; LO, T.; ANAND, S.; LEE, M.; BLUNDELL, T. L.; VENKITARAMAN, A. R. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 287-293, 2002.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; KUHFITIG-KULLE, S.; OBE, G. Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 104, p. 7-13, 2004.

PINHEIRO, R. F.; BAHIA, D. M.; PELLOSO, L. A. F.; CAMPOS, M. G. V.; CHAUFFAILLE, M. L. Isolated interstitial 9q deletion in a case of unclassifiable myelodysplastic syndrome. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 153, p. 183–184, 2004.

PINHEIRO, R. F.; CHAUFFAILLE, M. L.; SILVA, M. R. R. A rare case of acute myeloid leukemia evolving from a myelodysplastic syndrome with der(19)t(1;19). **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 169, p. 181–183, 2006b.

PINHEIRO, R. F.; CHAUFFAILLE, M. L.; SILVA, M. R. R. Isochromosome 17q in MDS: a marker of a distinct entity. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 166, p. 189–190, 2006a.

PINHEIRO, R. F.; CHAUFFAILLE, M. L. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 11, p. 1110-1112, 2009.

PLUMB, M. A.; SMITH, G. C.; CUNNIFFE, S. M.; JACKSON, S. P.; O'NEILL, P. DNA-PK activation by ionizing radiation-induced DNA single-strand breaks. **Int. J. Radiat. Biol.**, 755: 553-561, 1999.

REARDON, J. T.; BESSHO, T.; KUNG, H. C.; BOLTON, P. H.; SANCAR, A. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, n. 17, p. 9463-9468, 1997.

RIBALLO, E.; CRITCHLOW, S. E.; TEO, S. H.; DOHERTY, A. J.; PRIESTLEY, A.; BROUGHTON, B.; KYSELA, B.; BEAMISH, H.; PLOWMAN, N.; ARLETT, C. F. et al. Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. **Curr. Biol.**, v. 9, p. 699-702, 1999.

RIBEIRO Jr, H. L.; DE OLIVEIRA, R. T.; MAIA, A. R.; DE SOUSA, J. C.; HEREDIA, F. F.; MAGALHÃES, S. M.; PINHEIRO, R. F. ATM polymorphism is associated with low risk myelodysplastic syndrome (2012). **DNA Repair (Amst.)**, Dec 2012.

RICHARDSON, C.; STARK, J. M.; OMMUNDSEN, M.; JASIN, M. Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. **Oncogene**, v. 23, p. 546–553, 2004.

RODDAM, P. L.; ROLLINSON, S.; O'DRISCOLL, M.; JEGGO, P. A.; JACK, A.; MORGAN, G. J. Genetic variants of NHEJ DNA ligase IV can affect the risk of developing multiple myeloma, a tumour characterised by aberrant class switch recombination. **J. Med. Genet.**, v. 39, p. 900-905, 2002.

ROTMAN, G.; SHILOH, Y. ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. **Oncogene**, v. 18, n. 45, p. 6135-6144, 1999.

SCARDOCCI, A.; GUIDI, F.; D'ALOU, F.; GUMIERO, D.; FABIANI, E.; DIRUSCIO, A.; MARTINI, M.; LAROCCA, L.; ZOLLINO, M.; HOHAUS, S.; LEONE, G.; VOSO, M. Reduced BRCA1 expression due to promoter hypermethylation in therapy-related acute myeloid leukaemia. **Br. J. Cancer**, v. 95, p. 1108-1113, 2006.

SCOTT, S. P.; PANDITA, T. K. The cellular control of DNA double-strand breaks. **J. Cell. Biochem.**, v. 996, p. 1463-1475, 2006.

SEEDHOUSE, C.; FAULKNER, R.; ASHRAF, N.; DAS-GUPTA, E.; RUSSEL, N. Polymorphisms in Genes Involved in Homologous Recombination Repair Interact to Increase the Risk of Developing Acute Myeloid Leukemia. **Clin. Cancer Res.**, v. 10, p. 2675–2680, 2004.

SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nat. Rev. Cancer**, v. 33, p. 155-116, 2003.

SHRIVASTAV, M.; DE HARO, L. P.; NICKOLOFF, J. A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. **Cell Res.**, v. 18, p. 134-147, 2008.

SKONIECZKA, K.; DUSZENKO, E.; WYROWINSKA, E.; HAUS, O. Usefulness of classic cytogenetic testing compared to fluorescence in situ hybridization in genetic diagnosis of 58 patients with myelodysplastic syndromes. **Pol. Arch. Med. Wewn.**, v. 119, n. 6, p. 366-371, 2009.

SMITH, G. C.; JACKSON, S. P. The DNA-dependent protein kinase. **Genes Dev.**, v. 13, p. 916-934, 1999.

SOLÉ, F.; LUÑO, E.; SANZO, C.; ESPINET, B.; SANZ, G. F.; CERVERA, J.; CALASANZ, M. J.; CIGUDOSA, J. C.; MILLÀ, F.; RIBERA, J. M.; BUREO, E.; MARQUEZ, M. L.; ARRANZ, E.; FLORENSA, L. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 928 patients with primary myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 90, p.1168-1178, 2005.

SONODA, E. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. **DNA Repair (Amst.)**, v. 5, n. 9/10, p. 1021-1029, 2006.

STANKOVIC, T.; KIDD, A. M.; SUTCLIFFE, A.; MCGUIRE, G. M.; ROBINSON, P.; WEBER, P.; BEDENHAM, T.; BRADWELL, A. R.; EASTON, D. F.; LENNOX, G. G.; HAITES, N.; BYRD, P. J.; TAYLOR, A. M. ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 62, p.334-345, 1998.

STROM, S. S.; VELEZ-BRAVO, V.; ESTEY, E. H. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. **Semin. Hematol.**, v.45, n.1, p.8-13, 2008.

TAKASHIBA, S.; NARUISHI, K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. **Periodontol**, v. 40, p. 94-106, 2006.

TARSOUNAS, M.; DAVIES, A. A.; WEST, S. C. RAD51 localization and activation following DNA damage. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, v. 359, n. 1441, p. 87-93, 2004.

TCHINDA, J.; VOLPERT, S.; NEUMANN, T.; KENNERKNECHT, I.; RITTER, J.; BUCHNER, T.; BERDEL, W. E.; HORST, J. Novel der(1)t(1;19) in two patients with myeloid neoplasias. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 133, p. 61-65, 2002.

TEFFERI, A.; VARDIMAN, J. W. Mechanism of disease: Myelodysplastic syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, p.1872-1885, 2009.

THACKER, J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. **Cancer Lett.**, v. 219, n. 2, p. 125-135, 2005.

THOMPSON, D.; EASTON, D. The Genetic Epidemiology of Breast Cancer Genes. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v. 9, n. 3, p. 221-236, 2004.

TING, N. S.; LEE, W. H. The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever. **DNA Repair (Amst.)**, v. 3, n. 8/9, p. 935-944, 2004.

TLSTY, T. D.; BRIOT, A.; GUALBERTO, A.; HALL, I.; HESS, S.; HIXON, M.; KUPPUSWAMY, D.; ROMANOV, S.; SAGE, M.; WHITE, A. Genomic instability and cancer. **Mutat. Res.**, v. 337, n. 1, p. 1-7, 1995.

TRUJILLO, K. M.; YUAN, S. S.; LEE, E. Y.; SUNG, P. Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 34, p. 21447-21450, 1998.

TSENG, R. C.; HSIEH, F. J.; SHIH, C. M.; HSU, H. S.; CHEN, C. Y.; WANG, Y. C. Lung Cancer Susceptibility and Prognosis Associated With Polymorphisms in the Nonhomologous End-joining Pathway Genes A Multiple Genotype-Phenotype Study. **Cancer**, v. 115, n. 13, p. 2939-2948, 2009.

VALERIE, K.; POVIRK, L. F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. **Oncogene**, v. 22, n. 37, p. 5792-5812, 2003.

VAN GENT, D. C.; HOEIJMAKERS, J. H.; KANNAR, R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. **Nat. Rev. Genet.**, v. 2, n. 3, p. 196-206, 2001.

WANG, K.; YEC, Y.; XU, Z.; ZHANG, X.; HOUB, Z.; CUIF, Y.; SONG, Y. Interaction between BRCA1/BRCA2 and ATM/ATR associate with breast cancer susceptibility in a Chinese Han population. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 200, n. 1, p. 40-46, 2010.

WANG, S. H.; PENG, L.; LI, C. P.; LI, A. P.; ZHOU, J. W.; ZHANG, Z. D.; LIU, Q. Z. Genetic variants of the XRCC7 gene involved in DNA repair and risk of human bladder cancer. **Int. J. Urol.**, v. 15, p. 534-539, 2008.

WATTERS, D. J. Oxidative stress in ataxia telangiectasia. **Redox Rep.**, v. 81, p. 23-29, 2003.

WEST, S. C. Molecular views of recombination proteins and their control. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 46, p. 435-445, 2003.

WETERINGS, E.; VAN GENT, D. C. The mechanism of non-homologous end joining: a synopsis of synapsis. **DNA Repair (Amst.)**, v. 3, n. 11, p. 1425-1435, 2004.

WOOD, R. D. DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. **Biochimie**, v. 81, p. 39-44, 1999.

WRIGHT, J. A.; KEEGAN, K. S.; HERENDEEN, D. R.; BENTLEY, N. J.; CARR, A. M.; HOEKSTRA, M. F.; CONCANNON, P. Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 95, n.13, p. 7445-7450, 1998.

YOSHIDA, K.; MIKI, Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. **Cancer Sci.**, v. 95, n. 11, p. 866-871, 2004.

YOSHIDA, Y. A new look at apoptosis in MDS; an uneasy neighbor. **Leuk. Res.**, v.31, n.12, p.1617-1619, 2007.

ZHANG, Y.; CHO, Y. Y.; PETERSEN, B. L.; BODE, A. M.; ZHU, F.; DONG, Z. Ataxia telangiectasia mutated proteins, MAPKs, and RSK2 are involved in the phosphorylation of STAT3. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 15, p. 12650-12659, 2003.

ZHANG, Y.; MA, W. Y.; KAJI, A.; BODE, A. M.; DONG, Z. Requirement of ATM in UVA-induced signaling and apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 5, p. 3124-3131, 2002.

ZHONG, Q. BRCA1 facilitates microhomology-mediated end joining of DNA double strand breaks. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 32, p. 28641-28647, 2002.

APÊNDICE A



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: ESTUDO DE GENES RELACIONADOS A MECANISMOS DE REPARO EM DANOS DE DNA EM 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 / Howard Lopes Ribeiro Junior. O abaixo assinado está ciente de que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é estudar as atividades de genes relacionados a mecanismos de reparo em Danos no DNA em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

Antes de sua participação no estudo, você será esclarecido das condições nas quais será desenvolvida a pesquisa clínica. Serão coletado dados pessoais de sexo e idade, apresentação clínica e realização dos exames laboratoriais indicados para esclarecimento

diagnóstico, tais como hemograma completo, citologia e histologia (análise microscópica das células) da medula óssea, avaliação para depósitos de ferro medular, bem como outros exames que são feitos mesmo para os pacientes que não participam de nenhuma pesquisa.

Para a coleta de medula óssea, o material (2mL) será coletado por médico hematologista experiente com agulha de mielograma após punção esternal. A punção de qualquer esternal pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxeadada) ao redor do local de onde foi retirado o sangue sem maiores conseqüências e desaparece em poucos dias.

Ao comparecer ao ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídio /UFC, você receberá todas as instruções sobre o estudo e, se concordar em participar, será solicitado que assine o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

É de sua responsabilidade: comparecer nas datas e horários informados; submeter-se aos procedimentos de rotina do serviço.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária 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 à pesquisadora ou a 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 Serviço de Hematologia 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.

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. Ao assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você está também autorizado tal acesso, mesmo se você se retirar do estudo.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja algum imprevisto ou dúvidas, você deverá procurar o Serviço de Hematologia, no HEMOCE, à Av. José Bastos 3390 ou pelos telefones 85-33668623 e solicitar contato direto com o pesquisador responsável pelo estudo: **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (85-99863473)** ou o aluno de Mestrado Acadêmico **Howard Lopes Ribeiro Junior (85 – 87396142)**.

Poderá contatar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do HUWC-UFC para apresentar recursos ou reclamações em relação ao estudo.

Só 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

Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, eu também estou certificando que toda a informação que eu prestei, é verdadeira e correta, e declaro estar recebendo uma cópia assinada deste documento.

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, tive oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo e também sobre o Estudo, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmo estar livre e espontaneamente decidido a participar do Estudo.

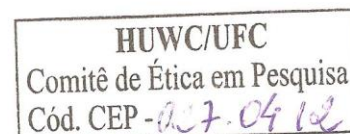
_____/_____/_____
Data

Assinatura do participante da pesquisa

_____/_____/_____
Data

Assinatura do Pesquisador

APÊNDICE B



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430-370 – Fortaleza-CE
FONE: (85) 3366-8589 / 3366-8613 E-MAIL: cephuwc@huwc.ufc.br

Protocolo nº: 027.04.12

Pesquisador Responsável: Howard Lopes Ribeiro Júnior

Departamento / Serviço:

Título do Projeto: “Estudo de Genes Relacionados a Mecanismo de Reparo de DNA em Síndrome Mielodisplásica.”

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou o projeto de pesquisa supracitado e, em tendo sido atendidas as pendências, baseando-se nas normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05), resolveu classificá-lo como: **APROVADO**.

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista: 16/08/13).

Fortaleza, 16 de agosto de 2012.

Dra. Maria de Fátima de Souza
Coordenadora do CEP - HUWC

APÊNDICE C

Artigo aceito para publicação na revista DNA Repair (Amsterdã)

Fator de Impacto: 4,135/ Qualis A1 Medicina I).

Data de Submissão: 31/10/2012

Data de Aceite: 01/11/2012

Publicação: Fevereiro/2013

DNA Repair 12 (2013) 87–89



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

DNA Repair

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dnarepair



Letter to the Editor

ATM polymorphism is associated with low risk myelodysplastic syndrome

To the Editor,

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a clonal hematopoietic stem cell disorder characterized by peripheral cytopenias due to ineffective hematopoiesis. Anemia is the most prevalent cytopenia detected in up to 80% of patients resulting in red blood cell transfusion dependency in more than 50% of cases [1]. According to the pathogenesis of MDS, DNA damage in the hematopoietic stem cells can cause blockage of differentiation leading to dysplasia, while subsequent defects affect proliferation causing clonal expansion of aberrant cells and AML [2,3].

Among the different types of DNA damage and their associated DNA repair proteins, the Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) gene plays a critical role in the recognition, signaling and repairing of DNA Double Strand Breaks (DSBs) [4]. ATM protein (350-kDa, MIM*607585), member of PI3K (phosphoinositide 3-kinases) family protein, is the primary DNA damage sensor of DSBs, phosphorylating a multitude of nuclear targets including p53 and checkpoint kinases [4].

ATM gene mutations increase the risk of cancer, especially among hematological malignancies, leukemia and lymphoma. Twenty different mutations were identified in 15 families (18 patients) with leukemia, lymphoma, or T-cell pre-leukemic clonal proliferations [5]. Mutations were scattered across the ATM gene, suggesting that no single location within the ATM coding sequence was associated with the occurrence of lymphoid tumors [5].

The aim of this report is to evaluate an association of MDS development and polymorphism of the ATM gene among Brazilian patients. For this purpose we analyzed ATM genotypes in groups of MDS patients and age and gender matched controls. Moreover, recent large epidemiological and molecular analyses of ATM indicated that heterozygous carriers of some specific ATM mutations were associated with increased cancer risks and mortality of breast cancer with low-penetrance susceptibility [6,7].

To the best of our knowledge, this is the first report to show that ATM gene polymorphisms may contribute to susceptibility of

MDS. In other studies, the rs228593 SNP has been associated with leukemia and breast cancer [8,9].

Our report evaluated the association of ATM rs228593 allelic variants using the PCR-RFLP (digested with the restriction enzymes *Bcl I* for 3 h at 60°C). Two groups were evaluated: bone marrow samples from 60 MDS Brazilian patients and whole blood sample from 82 healthy elderly volunteers as sex and age-matched controls. Conventional G-Banded karyotypes were prepared of the total cells bone marrow of patients [10].

The chi-square test (with one df) or Fisher's exact test was used to determine the Hardy-Weinberg equilibrium and the differences in genotypes distribution. Logistic regression analysis was used to estimate the odds ratios for variables contributing to the risk of MDS and to adjust the analyses for confounders contributing to MDS susceptibility. All tests were two-sided and considered to be statistically significant with a *p*-value of ≤ 0.05 . SPSS version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for analysis.

The distributions of allele and genotype frequencies of ATM rs228593 SNP in bone marrow from 60 MDS patients and whole blood from 82 elderly volunteers have been shown in Table 1 and Fig. 1. In our study cohort, the genotype distributions for

ATM rs228593 SNP in the MDS and controls groups were in Hardy-Weinberg's equilibrium with $p > 0.05$. There was significant differences in genotypes frequencies of the ATM rs228593 polymorphism between MDS patients and controls ($p = 0.021$). In the logistic regression analysis, our results showed that A/G heterozygote genotype of ATM rs228593 was associated with a decreased risk of developing MDS when compared to control group (OR 0.225/95% CI 0.075–0.680/ $p = 0.008$). However, there were no significant differences in allele distribution between MDS patients and controls group.

The variable cytopenia was divided into two groups: group one with the presence of one cytopenia (representing less aggressive disease) and group two composed of patients with two or three cytopenias (more aggressive disease) [11]. Thus, our results presented that the A/G heterozygote genotype showed association with the number of cytopenias (0–1 cytopenias, $p = 0.002$, OR 8.167, 95% CI 2.185–30.518). Additionally, the results showed association of the A/G heterozygote genotype statistical

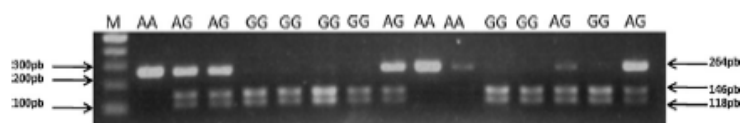


Fig. 1. Representative blots of PCR-RFLP of the ATM rs228593 polymorphism in control and MDS groups, respectively. Three patients with a homozygote wild type (AA), five patients with a heterozygote (AG) and seven a homozygote variant type (GG) are illustrated and their genotypes are indicated. C indicates cytosine; G, guanine; M, molecular weight; A, adenine; T, thymine.

Table 1
Allele and genotypic frequencies, i.e., Hardy-Weinberg test, analysis of IPSS prognosis classification, cytogenetic categorization and multinomial regression for the ATM rs228593 SNP concerning MDS patients and control group.

Group	Allele frequency	p ^a	Genotype frequency			p ^b /OR	H-W test p value	MDS patients variables	Genotype		Total	p ^c /OR	Multinomial logistic regression p value/95% CI interval for exp (B) lower bound/upper bound		
			GC	AG	AA				GC	AA			GC	AA	
Control	G	1.000	GC	AG	AA	0.021/ 0.225	0.1955	Good	1 (2.6)	9	2 (5.1)	10 (25.6)	0.004/ 4.191	GC	AA
	A		6 (4.2)	41 (29.8)	35 (24.6)				0.711/ 0.013– 36.77– 52.44	0.013– 19.562 71.250					
Case	G	0.008 ^d	GC	AG	AA	0.0223	Intermediate	Poor	8 (20.5)	16 (41.0)	27 (69.2)	27 (69.2)	0.003/ 8.167	GC	AA
	A		13 (9.2)	20 (14.1)	27 (19.0)				0.560/ 0.352– 6.880	0.028– 9.076 36.306					
							Cytopenia		4 (6.7)	6 (10.0)	24 (40.0)	24 (40.0)	0.002/ 2.185– 30.518	GC	AA
							2–3	9 (15.0)	21 (35.0)	36 (60.0)	0.560/ 0.352– 6.880			0.560/ 0.352– 6.880	

^a Chi-square of Pearson test.
^b Multinomial logistic regression model to identify the genotype association with increased risk of impairment of the MDS. *p value* in boldface is significant in p < 0.05.
^c **p statistically significant in p < 0.05 or p < 0.001.

significant in the low risk IPSS subgroup variable (OR 43.91/95% CI 36.77–52.44/p < 0.001) among MDS patients.

Among the cytogenetic analysis, 26 (59.1%) patients showed good karyotype, 10 (22.7%) with intermediate karyotype and 8 (18.2) with poor karyotype. Of those, 16 (26.6%) showed no metaphase in karyotype. We observed no association of rs228593 ATM genotypes with karyotype analysis, gender, cellularity, and WHO classification (p < 0.05).

This report suggests that A/G heterozygote genotype in the rs228593 polymorphism in ATM gene is associated with low risk MDS and these results support the importance of ATM gene in the maintenance of genomic stability in patients with MDS, promoting a less aggressive disease and provides a better understanding of the MDS pathogenesis.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES, CNPq and FUNCAP.

- M. Cazzola, M.G. Della Porta, E. Travaglino, L. Malcovati, Classification and prognostic evaluation of myelodysplastic syndromes, *Semin. Oncol.* 38 (Suppl. 5) (2011) 627–634.
- R.D. Brunning, A. Orazi, U. Germing, Myelodysplastic syndromes/neoplasms, *review*, in: S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, J.W. Vardiman (Eds.), *WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*, IARC Press, Lyon, 2008, pp. 88–93.
- S.S. Strom, V. Vélez-Bravo, E.H. Estey, Epidemiology of myelodysplastic syndromes, *Semin. Hematol.* 45 (January (1)) (2008) 8–13.
- R.T. Abraham, PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways, *DNA Repair (Amst)* 3 (2004) 883–887.
- T. Stankovic, A.M. Kidd, A. Sutcliffe, G.M. McGuire, P. Robinson, P. Weber, T. Bedenham, A.R. Bradwell, D.F. Easton, G.G. Lennox, N. Haites, P.J. Byrd, A.M. Taylor, ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998) 334–345.
- A. Renwick, D. Thompson, S. Seal, P. Kelly, T. Chaghtai, M. Ahmed, B. North, H. Jayatilake, R. Barfoot, K. Spanova, L. McGuffog, D.G. Evans, D. Eccles, D.F. Easton, M.R. Stratton, N. Rahman, ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles, *Nat. Genet.* 38 (2006) 873–875.
- D. Thompson, S. Duedal, J. Kirner, L. McGuffog, J. Last, A. Reiman, P. Byrd, M. Taylor, D.F. Easton, Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers, *J. Natl. Cancer Inst.* 97 (2005) 813–822.
- K. Wang, Y. Ye, Z. Xu, X. Zhang, Z. Hou, Y. Cui, Y. Song, Interaction between BRCA1/BRCA2 and ATM/ATR associate with breast cancer susceptibility in a Chinese Han population, *Cancer Genet. Cytogenet.* 1 (2010) 40–46.
- C.-H. Wang, K.-H. Wu, Y.-L. Yang, C.-T. Peng, F.-J. Tsai, D.-T. Lin, C.-F. Chiu, C.-C. Lin, D.-T. Bau, Association between ataxia telangiectasia mutated gene polymorphisms and childhood leukemia in Taiwan, *Chin. J. Physiol.* 54 (2011), 6 413–418.
- M.L. Chaffaille, Adding FISH to karyotype in Myelodysplastic syndrome investigation diagnosis: are all questions answered? *Leuk Res.* 34 (April (4)) (2010) 413–415.
- P. Greenberg, C. Cox, M.M. LeBeau, et al., International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes, *Blood* 89 (1997) 2079–2088.

Howard Lopes Ribeiro Jr.
 Post-Graduate Program in Medical Sciences, Federal
 University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil
 Roberta Taiane Germano De Oliveira
 Cancer Cytogenomic Laboratory, Federal University
 of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil
 Allan Rodrigo Soares Maia
 Juliana Cordeiro De Sousa

Post-Graduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

Fabiola Fernandes Heredia
Cancer Cytogenomic Laboratory, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

Silvia Maria Meire Magalhães
Post-Graduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

Ronald Feitosa Pinheiro^{a, b, *}
^a Post-Graduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Post-Graduate Program of Pathology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

** Corresponding author at: Pereira Valente, 738, Meireles, 60160250 Fortaleza, Ceará, Brazil. Tel.: +55 85 3264 0898; fax: +55 85 3366 8623. E-mail address: ronaldpinheiro@pq.cnpq.br (R.F. Pinheiro)*

31 October 2012
Available online 14 December 2012