



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

HOWARD LOPES RIBEIRO JUNIOR

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS ÀS VIAS DE REPARO DE DANOS EM FITA
DUPLA NO DNA EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

FORTALEZA

2016

HOWARD LOPES RIBEIRO JUNIOR

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS ÀS VIAS DE REPARO DE DANOS EM FITA
DUPLA NO DNA EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

- R369e Ribeiro Junior, Howard Lopes.
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS ÀS VIAS DE REPARO DE DANOS EM FITA DUPLA NO DNA EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA / Howard Lopes Ribeiro Junior. – 2016.
155 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.
1. Síndrome Mielodisplásica. 2. Lesões no DNA. 3. Fita Dupla. 4. Mecanismos de Reparo. 5. Expressão Gênica. I. Título.

CDD 610

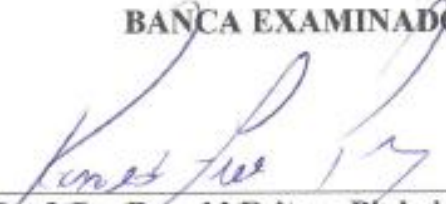
HOWARD LOPES RIBEIRO JUNIOR

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS ÀS VIAS DE REPARO DE DANOS EM FITA
DUPLA NO DNA EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

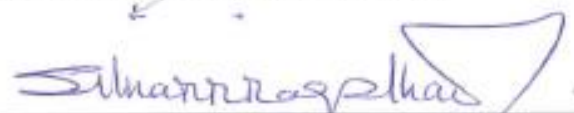
Tese apresentada ao Curso de Doutorado Acadêmico em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, na Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Qualificação em: 09 / 06 / 2016


BANCA EXAMINADORA




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




Profa. Dra. Silva Maria Meira Magalhães
Universidade Federal do Ceará - UFC



Profa. Dra. Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso
Universidade de São Paulo - USP



Profa. Dra. Cláudia do O Pessoa
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ



Dr. Carlos Roberto Koscky Paier
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

*Aos meus pais, irmãos e esposa.
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**, a todos os **Familiares** e **Amigos** pela compreensão da minha ausência neste período de minha formação acadêmica, como também eterno amor e afeto.

A minha amada esposa **Anne Jéssica Carvalho Rogério** pela paciência, carinho e amor em todos os momentos destes nossos mais de 9 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 com sua doçura sempre me atende com gentileza e atenção, tornando ainda maior minha admiração como pessoa, brilhante profissional e grande pesquisadora na área de onco-hematologia.

À **Profa. Dra Cláudia Pessoa do Ó**, por aceitar participar da banca de defesa desta tese, proporcionando discussões e sugestões que servirão para um maior crescimento, aprendizado e incentivo pessoal na minha carreira como pesquisador pesquisa.

Ao **Dr. Carlos Roberto Koscky Paier**, por prontamente aceitar participar da minha banca de qualificação e de defesa desta tese, apresentando, com sua vivência científica, um novo e rico olhar sobre meus resultados.

À **Profa. Dra. Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso**, por sua disponibilidade em se deslocar de São Paulo à Fortaleza para participar desta banca de defesa de tese de doutorado e, conseqüentemente, por suas substanciais e ricas contribuições, enriquecendo ainda mais os resultados obtidos neste trabalho.

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!

A todos do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas**, em especial a **Ivone** e a **Rita**, por seus excelentes trabalhos e auxílios essenciais neste trajeto e por apoiar continuamente a evolução da qualidade formativa deste programa. Meus sinceros agradecimentos.

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

Ao **Allan Rodrigo Soares Maia**, 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**, pela fantástica e maravilhosa amizade. Desejo sempre seu sucesso. Muito obrigado meu amigo.

A todos (as) estudantes de iniciação científica, mestrado e doutorado, pela sincera amizade, trabalho árduo na realização dos exames citogenéticos e companheirismo em todos os momentos do doutorado.

À **Profa. Dra. Delane Viana Gondim**, ao **Helson Freitas da Silveira**, ao **Carlos Roberto de Oliveira Leite**, e à todos os meus amigos servidores da **UFC** pela amizade, apoio, compreensão e profissionalismo. Meus sinceros agradecimentos!

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** e a **CAPES**, 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 hematopoiéticas, 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. As causas da SMD são conhecidas em apenas 15% dos casos. Em relação aos fatores ambientais como desencadeadores da SMD, podem ser incluídos o uso de quimioterapia prévia, especialmente de agentes alquilantes e análogos da purina, radioterapia e tabagismo. 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 o nível de expressão do mRNA dos genes atuantes no mecanismo de reparo em danos de fita dupla no DNA (*BRCA1*, *BRCA2* e *RAD51*, atuantes no mecanismo de Recombinação Homóloga; o *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* relacionados ao mecanismo de Junções por Extremidades não-Homólogas e, por fim, o *ATM*) associando os achados moleculares com suas variantes polimórficas (rs4793191, rs9567623, rs1801320, rs3835, rs2267437, rs1805388 e rs228593, respectivamente) e com variáveis clínicas e sócio-demográficas de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica. Esta análise de genotipagem baseou-se na metodologia de qPCR, entre amostras de medula óssea de 83 pacientes com SMD e 10 amostras de medula óssea de idosos voluntários sadios. Os pacientes com SMD foram diagnosticados de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde e estratificados de acordo com os critérios prognósticos estabelecidos pelo Índice de Score Prognóstico Internacional revisado. Com este estudo foi possível identificar que: 1. os genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* e *RAD51* foram associados significativamente com a variável de celularidade da medula óssea dos pacientes com SMD; 2. o gene *XRCC5* apresentou-se associado com a presença de sideroblastos em anel quanto à análise da medula óssea dos pacientes com SMD; 3. os genes *BRCA2*, *RAD51* e *LIG4* correspondem a possíveis marcadores de pior prognóstico e de progressão clonal em casos de SMD *de novo* de alto grau, estando associados a uma diminuição da sobrevida e a uma elevada chance de evolução para LMA; 4. o gene *XRCC6* é um fator de prognóstico desfavorável para os pacientes de baixo risco, sendo evidente que a diminuição da expressão deste gene é capaz de identificar um subgrupo desfavorável dentro dos pacientes de baixo risco que apresentariam maior dependência transfusional e maior instabilidade genômica e, por fim, 5. os resultados das análises de influência dos polimorfismos funcionais na SMD realçam a importância dos polimorfismos rs228593, rs2267437 e rs1805388 na diferenciação dos níveis de expressão dos genes *ATM*, *XRCC6* e *LIG4*, respectivamente, frente às variáveis clínicas de pacientes com SMD, representando novos alvos para o estudo da patogênese desta doença. Demonstramos que os genes relacionados à reparação das DSBs são também relacionados a patogênese da SMD. Estes resultados suportam a importância dos níveis de expressão dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4*, como também da frequência dos seus respectivos polimorfismos (rs228593, rs4793191, rs9567623, rs1801320, rs3835, rs2267437 e rs1805388) na manutenção da estabilidade genômica das células tronco hematopoiéticas promovendo um melhor entendimento da etiologia, estratificação diagnóstica e prognóstica e do processo de evolução clínica da Síndrome Mielodisplásica.

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

ABSTRACT

The myelodysplastic syndrome (MDS) is a group of clonal hematopoietic stem cell disorders characterized by cytopenia (s) peripheral (s), dysplasia of one or more myeloid cell lineages and increased risk of acute myeloid leukemia development. MDS is considered a disease of elderly people, since approximately 80% of patients are over 60 years of diagnosis. The causes of MDS are known only in 15% of cases. With respect to environmental factors such as MDS triggers may be included the use of prior chemotherapy, especially alkylating agents and purine analogs, radiation therapy and smoking. The pathogenesis of MDS involves DNA damage in hematopoietic stem cells affected probably by double-stranded damage (DSB) in the DNA and the case of joints by non-homologous ends (NHEJ) and homologous recombination main repair mechanisms necessary to ensure stability genomics of stem cells. This cohort study aimed to assess the level of expression of mRNA of the genes active in the repair mechanism of double-stranded DNA damage (*BRCA1*, *BRCA2* and *RAD51*, operating in HR mechanism, the *XRCC5*, *XRCC6* and *LIG4* related mechanism for NHEJ and, finally, the *ATM*) linking the molecular findings with their polymorphic variants (rs4793191, rs9567623, rs1801320, rs3835, rs2267437, rs1805388 and rs228593, respectively) and with clinical and socio-demographic of patients of Myelodysplastic Syndromes. This genotyping analysis was based on qPCR methodology, including bone marrow samples from 83 patients with MDS and 10 bone marrow samples from healthy elderly volunteers. The MDS patients were diagnosed according to the criteria proposed by the World Health Organization and stratified according to the criteria established by prognostic Score Index International Prognostic revised. In this study we observed that: 1. the *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* and *RAD51* genes were significantly associated with cellularity variable bone marrow of patients with MDS; 2. the *XRCC5* gene introduced is associated with the presence of ringed sideroblasts on the analysis of the bone marrow of patients with MDS; 3. The *BRCA2*, *RAD51* and *LIG4* genes correspond to potential markers of poor prognosis and progression in clonal cases of MDS *de novo* of high level, being associated with decreased survival and a high chance of progression to AML; 4. the *XRCC6* gene is a negative prognostic factor for patients at low risk, it is evident that the decrease in expression of this gene is able to identify an unfavorable subgroup within the low-risk patients who have higher dependence transfusion and increased genomic instability and finally, 5 the results of analysis of influence of functional polymorphisms in MDS emphasize the importance of polymorphism rs228593, rs2267437 and rs1805388 in differentiating the expression levels of *ATM*, *XRCC6* and *LIG4* genes, respectively, compared to patients with clinical variables MDS representing novel targets for the study of the pathogenesis of this disease. We demonstrate that the DSBs repair related genes are also related to the pathogenesis of MDS. These results support the importance of the expression levels of *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *XRCC5*, *XRCC6* and *LIG4* genes, as well as the frequency of the respective polymorphisms (rs228593, rs4793191, rs9567623, rs1801320, rs3835, rs2267437 and rs1805388) in the maintenance genomic stability of hematopoietic stem cells promoting a better understanding of the etiology, diagnosis and prognostic stratification and the process of clinical development of Myelodysplastic Syndromes.

Key-words: Myelodysplastic syndrome. DNA lesions. Double strand. Repair mechanisms. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Representação esquemática da gênese das Síndromes Mielodisplásica. | 23 |
| Figura 2: Representação esquemática da patogênese das Síndromes Mielodisplásica. | 30 |
| Figura 3: Apresentação esquemática da exposição genotóxica que leva ao desenvolvimento de danos no DNA nas células tronco susceptíveis ao desencadeamento do processo neoplásico. | 34 |
| Figura 4: Apresentação esquemática das proteínas atuantes na ativação do sensoriamento molecular da proteína ATM em danos de fita dupla no DNA (DSBs). | 37 |
| Figura 5: Apresentação esquemática das proteínas atuantes no mecanismos de reparo de Junções por extremidades não homólogas (NHEJ) em danos de fita dupla no DNA (DSBs). | 40 |
| Figura 6: Apresentação esquemática das proteínas atuantes no mecanismos de reparo por Recombinação Homóloga em danos de fita dupla no DNA (DSBs). | 42 |
| Figura 7: Representação esquemática dos resultados obtidos no estudo de Ribeiro-Jr (2013) e Ribeiro-Jr (2014). | 46 |
| Figura 8: Organograma resumo das metodologias utilizadas neste estudo. | 49 |
| Figura 9: Representação esquemática dos procedimentos da citogenética por banda G. | 50 |
| Figura 10: Representação esquemática dos procedimentos da citogenética por banda G. | 68 |
| Figura 11: Representação do cromossomo 11 e a indicação (barra amarela) da localização do gene <i>ATM</i> . | 71 |
| Figura 12: Nível de expressão do gene <i>ATM</i> em pacientes com SMD frente a variável Celularidade da MO. | 72 |
| Figura 13: Nível de expressão do gene <i>ATM</i> em pacientes com SMD frente a variável Displasia na MO. | 73 |
| Figura 14: Representação do cromossomo 2 e indicação (barra amarela) da localização do gene <i>XRCC5</i> . | 74 |
| Figura 15: Nível de expressão do gene <i>XRCC5</i> em pacientes com SMD frente a presença de Sideroblastos em anel na MO. | 74 |
| Figura 16: Representação do cromossomo 22 e indicação (barra amarela) da localização do gene <i>XRCC6</i> . | 75 |
| Figura 17: Nível de expressão do gene <i>XRCC6</i> em pacientes com SMD frente ao perfil de dependência transfusional. | 76 |
| Figura 18: Nível de expressão do gene <i>XRCC6</i> em pacientes com SMD frente a variável cariótipo normal versus cariótipo alterado. | 77 |

| | |
|--|----|
| Figura 19: Nível de expressão do gene <i>XRCC6</i> em pacientes com SMD frente a classificação diagnóstica da doença. | 78 |
| Figura 20: Representação do cromossomo 13 e indicação (barra amarela) da localização do gene <i>LIG4</i> . | 79 |
| Figura 21: Nível de expressão do gene <i>LIG4</i> em pacientes com SMD frente a variável WPSS (MALCOVATI et al., 2005). | 80 |
| Figura 22: Nível de expressão do gene <i>LIG4</i> em pacientes com SMD frente a classificação diagnóstica da doença. | 81 |
| Figura 23: Nível de expressão do gene <i>LIG4</i> em pacientes com SMD frente a variável de evolução para LMA. | 82 |
| Figura 24: Representação do cromossomo 17 e indicação (barra amarela) da localização do gene <i>BRCA1</i> . | 83 |
| Figura 25: Nível de expressão do gene <i>BRCA1</i> em pacientes com SMD frente a variável de celularidade da medula óssea. | 83 |
| Figura 26: Representação do cromossomo 13 e indicação (barra amarela) da localização do polimorfismo rs9567623 do gene <i>BRCA2</i> . | 84 |
| Figura 27: Nível de expressão do gene <i>BRCA2</i> em pacientes com SMD frente a variável de celularidade da medula óssea. | 85 |
| Figura 28: Nível de expressão do gene <i>BRCA2</i> em pacientes com SMD frente a classificação diagnóstica da doença. | 86 |
| Figura 29: Representação do cromossomo 15 e indicação (barra amarela) da localização do gene <i>RAD51</i> . | 87 |
| Figura 30: Nível de expressão do gene <i>RAD51</i> em pacientes com SMD frente a variável de celularidade da medula óssea em pacientes com SMD. | 88 |
| Figura 31: Nível de expressão do gene <i>RAD51</i> em pacientes com SMD frente a classificação diagnóstica da doença. | 89 |
| Figura 32: Nível de expressão do gene <i>RAD51</i> em pacientes com SMD que evoluíram para LMA. | 90 |
| Figura 33: Resultados dos níveis de expressão dos genes <i>ATM</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> e <i>RAD51</i> em pacientes com SMD hipocelular. | 91 |
| Figura 34: Resultados dos níveis de expressão dos genes <i>BRCA2</i> , <i>RAD51</i> e <i>LIG4</i> em pacientes com SMD. | 91 |
| Figura 35: Resultado do nível de expressão do gene <i>XRCC5</i> em pacientes com SMD com | 92 |

presença de sideroblastos em anel.

- Figura 36:** Resultado do nível de expressão do gene *XRCC6* em pacientes com SMD com dependência transfusional, cariótipo alterado e diagnosticados como CRDU, ARSA e CRDM. 92
- Figura 37:** Análises de associação entre o nível de expressão do gene *ATM* e a sobrevida dos pacientes com SMD. **A.** Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). **B.** Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida. 94
- Figura 38:** Análises de associação entre o nível de expressão do gene *LIG4* e a sobrevida dos pacientes com SMD. **A.** Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). **B.** Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida. 95
- Figura 39:** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *XRCC5* e *BRCA1* em pacientes com SMD. 96
- Figura 40:** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *XRCC5* e *RAD51* em pacientes com SMD. 97
- Figura 41:** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *BRCA1* e *RAD51* em pacientes com SMD. 98
- Figura 42:** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *BRCA2* e *RAD51* em pacientes com SMD. 98
- Figura 43:** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes com SMD. 99
- Figura 44:** Análises das comparações entre os genótipos do polimorfismo rs228593, de acordo com o modelo genético dominante (GG versus GA + AA), e a variável do índice prognóstico do IPSS-R aos níveis de expressão do gene *ATM*. 101
- Figura 45:** Análises das comparações entre os genótipos do polimorfismo rs228593, de acordo com o modelo genético recessivo (AA versus GA + GG), e a variável do índice prognóstico do IPSS-R aos níveis de expressão do gene *ATM*. 102
- Figura 46:** Análises das comparações entre os genótipos do polimorfismo rs2267437, de acordo com o modelo genético recessivo (GG versus CG + CC), e a variável da idade dos pacientes com SMD frente aos níveis de expressão do gene *XRCC6*. 103
- Figura 47:** Análises das comparações entre os genótipos do polimorfismo rs2267437, de acordo com o modelo genético recessivo (GG versus CG + CC), e a variável da celularidade da medula óssea dos pacientes com SMD frente aos níveis de expressão do gene *XRCC6*. 104
- Figura 48:** Análises das comparações entre os genótipos do polimorfismo rs2267437, de 105

acordo com o modelo genético recessivo (GG versus CG + CC), e a variável da classificação diagnóstica da OMS dos pacientes com SMD frente aos níveis de expressão do gene *XRCC6*.

Figura 49: Análises das comparações entre os genótipos do polimorfismo rs1805388, de acordo com o modelo genético recessivo (TT versus CT + CC), e a variável de idade frente aos níveis de expressão do gene *LIG4*. 106

Figura 50: Análises das comparações entre os genótipos do polimorfismo rs1805388, de acordo com o modelo genético recessivo (TT versus CT + CC), e a presença de citopenias frente aos níveis de expressão do gene *LIG4*. 107

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1: Evolução na classificação da Síndrome Mielodisplásica. | 25 |
| Tabela 2: Representação das variáveis estabelecidas no IPSS. | 26 |
| Tabela 3: Representação das variáveis estabelecidas no WPSS. | 26 |
| Tabela 4: Representação das variáveis estabelecidas no IPSS-R. | 27 |
| Tabela 5: Genes avaliados por qPCR envolvidos nos mecanismos de reparo em DSBs no DNA. | 52 |
| Tabela 6: Caracterização das variáveis sócio-demográficas dos pacientes com SMD. | 60 |
| Tabela 7: Estratificação dos pacientes pela classificação da WHO. | 61 |
| Tabela 8: Caracterização das variáveis clínicas relacionadas aos achados da medula óssea em pacientes com SMD. | 62 |
| Tabela 9: Caracterização dos resultados dos cariótipos e seu impacto prognóstico em pacientes com SMD ao diagnóstico. | 64 |
| Tabela 10: Descrição clínica dos pacientes com SMD. | 68 |
| Tabela 11: Caracterização das variáveis clínicas relacionadas aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD. | 69 |
| Tabela 12: Estratificação das variáveis associadas ao risco prognóstico dos pacientes com SMD ao diagnóstico. | 70 |
| Tabela 13: Caracterização das escolhas terapêuticas e evolução clínica dos pacientes com SMD. | 70 |
| Tabela 14: Caracterização dos <i>cutoffs</i> na análise de associação entre os níveis de expressão dos genes de reparo em DSBs e a sobrevida dos pacientes com SMD. | 93 |
| Tabela 15: Frequência dos genótipos dos pacientes com SMD. | 100 |

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>Hidróxido 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

| | | |
|-------------|--|----|
| | BACKGROUND | 20 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 22 |
| 1.1 | Aspectos gerais das Síndromes Mielodisplásicas (SMDs) | 22 |
| 1.2 | Classificação Clínica e Prognóstica da SMD | 24 |
| 1.3 | Incidência da SMD | 27 |
| 1.4 | Etiologia da Síndrome Mielodisplásica | 29 |
| 1.5 | Patogênese da Síndrome Mielodisplásica | 30 |
| 1.6 | Citogenética e a Síndrome Mielodisplásica | 32 |
| 1.7 | Lesões no DNA | 33 |
| 1.8 | Mecanismos de Reparo ao dano no DNA | 34 |
| 1.9 | Sensoriamento das Lesões no DNA | 35 |
| 1.10 | Lesões de Fita Dupla no DNA (<i>Double-Strand Breaks</i>) | 37 |
| 1.10.1 | Junção por Extremidades Não Homólogas (NEHJ) | 38 |
| 1.10.2 | Recombinação Homóloga (HR) | 40 |
| 1.11 | Polimorfismos de Genes de Reparação de DNA <i>versus</i> nível de expressão de mRNA | 43 |
| 2 | OBJETIVOS | 47 |
| 2.1 | Objetivo geral | 47 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 47 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 48 |
| 3.1 | Casuística | 48 |
| 3.2 | Aspectos éticos | 48 |
| 3.3 | Cariótipo por Banda G | 49 |
| 3.4 | Análise da Expressão do mRNA por qPCR | 50 |
| 3.4.1 | Obtenção de amostras de células da medula óssea | 50 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.4.2 | Extração de RNA Total | 51 |
| 3.4.3 | Síntese de cDNA | 51 |
| 3.4.4 | qPCR (PCR quantitativa em tempo real) | 52 |
| 3.4.5 | Validação e definição dos genes endógenos utilizados nas análises dos dados de qPCR | 54 |
| 3.4.6 | Validação da qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras de cDNA dos pacientes avaliados | 54 |
| 3.5 | Variáveis clínico-laboratoriais analisadas | 55 |
| 3.6 | Análises estatísticas | 57 |
| 3.6.1 | Análises estatísticas para a análise dos dados de expressão gênica | 57 |
| 3.6.2 | Análises estatísticas para a avaliação da associação dos dados de expressão dos genes avaliados e a sobrevida dos pacientes com SMD baseado no software <i>Cutoff Finder</i> . | 58 |
| 3.6.3 | Análises estatísticas para a análise dos dados de expressão gênica <i>versus</i> a frequência gênica dos polimorfismos de cada gene | 58 |
| 4 | RESULTADOS | 60 |
| 4.1 | Caracterização dos pacientes | 60 |
| 4.2 | Análise do nível de expressão gênica por qPCR em amostras de <i>pool</i> celular da medula de pacientes com SMD | 71 |
| 4.2.1 | Análise do nível de expressão do gene <i>ATM</i> | 71 |
| 4.2.2 | Análise do nível de expressão do gene <i>XRCC5</i> | 74 |
| 4.2.3 | Análise do nível de expressão do gene <i>XRCC6</i> | 75 |
| 4.2.4 | Análise do nível de expressão do gene <i>LIG4</i> | 79 |
| 4.2.5 | Análise do nível de expressão do gene <i>BRCA1</i> | 83 |
| 4.2.6 | Análise do nível de expressão do gene <i>BRCA2</i> | 84 |
| 4.2.7 | Análise do nível de expressão do gene <i>RAD51</i> | 87 |
| 4.3 | Análises de sobrevida dos pacientes com SMD em relação aos níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de reparo em danos de fita dupla do DNA | 93 |
| 4.4 | Análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de reparo em danos de fita dupla do | 96 |

| | | |
|------------|--|------------|
| | DNA | |
| 4.5 | Análise do nível de expressão gênica por qPCR em amostras de <i>pool</i> celular associadas às frequências dos polimorfismos e as variáveis dos pacientes com SMD | 99 |
| 4.5.1 | Análise do nível de expressão do gene <i>ATM</i> associado ao polimorfismo rs228593 e as variáveis sócio-demográficas e clínicas dos pacientes com SMD. | 100 |
| 4.5.2 | Análise do nível de expressão do gene <i>XRCC6</i> associado ao polimorfismo rs2267437 e as variáveis sócio-demográficas e clínicas dos pacientes com SMD. | 102 |
| 4.5.3 | Análise do nível de expressão do gene <i>LIG4</i> associado ao polimorfismo rs1805388 e as variáveis sócio-demográficas e clínicas dos pacientes com SMD. | 106 |
| 5 | DISCUSSÃO | 108 |
| 6 | CONCLUSÕES | 122 |
| | REFERÊNCIAS | 122 |
| | APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente | 123 |
| | APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Voluntário | 136 |
| | ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC | 142 |
| | ANEXO B: Artigo publicado na revista Hematological Oncology (FI: 3.084) | 147 |

BACKGROUND

O Laboratório de Citogenômica do Câncer (LCC), sob coordenação do Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro e da Profa. Dra. Silvia Maria Meira Magalhães, tem como propósito, desde 2007, estudar todos os aspectos clínicos e laboratoriais que estão relacionados a Síndrome Mielodisplásica. Atualmente, o LCC faz parte do Serviço de Hematologia da Universidade Federal do Ceará sendo referência no diagnóstico e tratamento de doenças hematológicas de pacientes adultos, além de ser reconhecido pelo *The Myelodysplastic Syndrome Foundation* como centro de excelência em Síndrome Mielodisplásica no Brasil.

Em 2010, uni-me ao LCC como possível estudante de Mestrado em Ciências Médicas. Nesta ocasião, fui indagado pelo Prof. Ronald sob qual linha de pesquisa eu gostaria de desenvolver meu projeto de pesquisa. O curioso foi o modo da indagação. O Prof. Ronald apresenta-me um singelo papel (amassado e entrelaçado por algumas tiras de fita adesiva) com diversas anotações de linhas de pesquisa que ele almejava estudar. Avaliando o "documento", senti-me interessado pelo tópico intitulado de *Estudo de Polimorfismos*. Com a decisão, fui intimado: -"Você tem uma semana para apresentar-me uma linha de pesquisa com estudos de polimorfismos em SMD". Desafio aceito.

No prazo estipulado, após uma semana imerso em artigos, dúvidas e incertezas, apresentei uma proposta inicial de estudar Telômeros em SMD. De imediato a ideia foi rejeitada. O Dr. Ronald alegou que já haviam muitos estudos neste campo, especialmente em um grupo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, liderado pelo Prof. Rodrigo Calado. Em seguida, após mais uma semana, apresentei ao Prof. Ronald o projeto de pesquisa intitulado: *estudo dos genes relacionados a mecanismos de reparo em danos de DNA em síndrome mielodisplásica*, com foco principal na avaliação de polimorfismos de genes relacionados a mecanismos de reparo em danos de fita dupla de DNA e suas associações com variáveis clínicas observadas em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica. Felizmente, a proposta de projeto foi apreciada e aprovada pelo Prof. Ronald, pela banca de seleção de Mestrado em Ciências Médicas e pelo CNPq.

Após esta última reunião, passaram-se dois anos de pesquisas, trabalhos experimentais, análises estatísticas e produções de manuscritos. Como principais resultados do referido projeto de pesquisa, obtivemos as seguintes publicações:

- ❖ *ATM polymorphism is associated with low risk myelodysplastic syndrome (DNA Repair - 2012)*

- ❖ *Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome (Hematological Oncology - 2014)*
- ❖ *DNA repair genes are related to MDS pathogenesis - Mesa-Redonda - MDS: emerging insights in molecular abnormalities: from bench to bedside (Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2013)*

Tomando por base os resultados publicados, surgiram-me importantes questionamentos quanto à continuidade da referida pesquisa, tais como: *Qual o perfil de expressão do mRNA dos genes relacionados ao mecanismo de reparo em danos de fita dupla no DNA em pacientes com SMD? Qual a influência desses polimorfismos na expressão do mRNA dos genes em questão? Qual o impacto real destes achados moleculares no diagnóstico, prognóstico e na sobrevida dos pacientes com SMD? São estes marcadores moleculares importantes para o entendimento da patogênese da SMD?*

A partir dos questionamentos expostos, foi desenvolvida uma linha de pesquisa com maior abrangência, intitulada de **"EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS ÀS VIAS DE REPARO DE DANOS EM FITA DUPLA NO DNA EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA"** tendo como objetivo geral de avaliar o nível de expressão do mRNA dos genes atuantes no mecanismo de reparo em danos de fita dupla no DNA e associá-los às respectivas variantes polimórficas e com as variáveis clínicas e sócio-demográficas de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica. Assim, a partir desta linha de pesquisa, ingressei no programa de Doutorado em Ciências Médicas e, nestes últimos 3 anos, desenvolvi a presente tese de doutoramento.

Nestes quase 6 anos de convivência com o grupo de pesquisa do Laboratório de Citogenômica do Câncer pude vivenciar experiências pessoais e profissionais inestimáveis e inesquecíveis. Estimo que esta tese de doutoramento seja um pequeno pilar que eleve ainda mais o poder científico deste grupo e que eu permaneça nesta família por um longo e próspero futuro.

Enfim, foi assim que tudo começou e é assim que tudo continuará.

Howard Lopes Ribeiro Jr.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais das Síndromes Mielodisplásicas (SMDs)

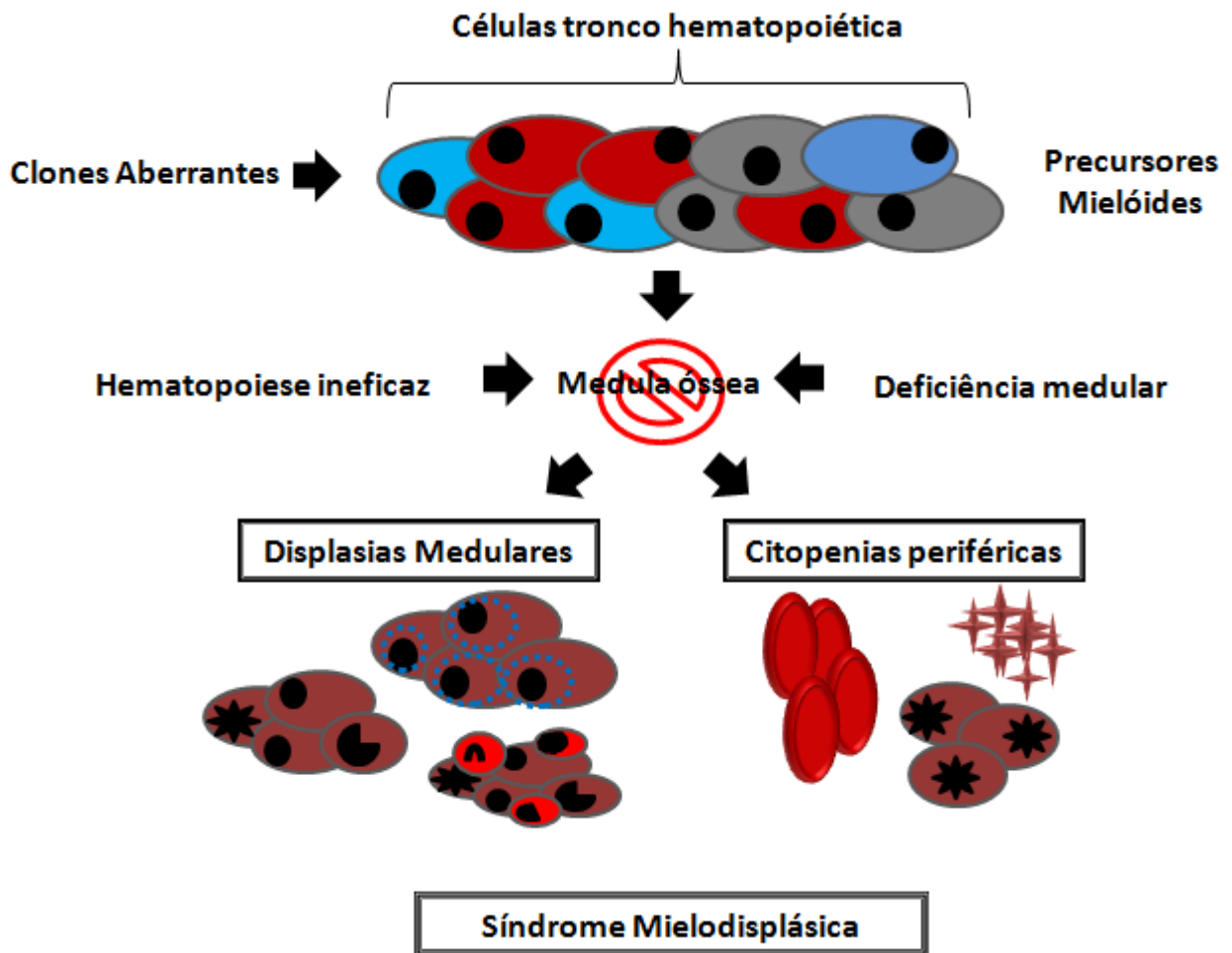
A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é um grupo de doenças clonais das células progenitoras hematopoéticas caracterizadas por citopenia(s), displasia de uma ou mais linhagens celulares e aumento do risco de desenvolvimento de leucemia mieloide aguda (LMA) (BRUNNING et al., 2008; MALCOVATI et al., 2011; GREENBERG et al., 2012; GREENBERG et al., 2013) (Figura 1). 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; ADÈS et al., 2014).

As alterações na proliferação, maturação e processo de apoptose das células tronco hematopoéticas provocam o quadro de hematopoese ineficaz, uma condição na qual a medula óssea (MO) torna-se incapaz de produzir e liberar um número adequado de células maduras para o sangue periférico (YOSHIDA, 2007; HELLSTROM-LINDBERG et al., 2008) (Figura 1). O processo de hematopoese ineficaz em SMD é resultado do aumento da susceptibilidade dos progenitores mieloides clonais à apoptose e à capacidade de resposta limitada dessas células a fatores de crescimento, o que leva à presença das citopenias, apesar do paciente possuir uma medula geralmente hiperclular (TEFFERI; VARDIMAN, 2009a; ADÈS et al., 2014) (Figura 1). Em muitos casos, a progressão para LMA é oligoclonal, em vez de monoclonal; sabe-se que a expansão de subclones menores também podem contribuir para a transformação para LMA (ADÈS et al., 2014) (Figura 1).

As consequências da insuficiência medular são as citopenias periféricas, que podem envolver as três linhagens de células sanguíneas (eritroide, 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 hiperclular e displasia são achados característicos das SMD (HOFMANN; NOLTE, 2007).

É importante salientar que as citopenias podem levar à dependência de transfusões e aumentar a susceptibilidade a infecções e hemorragias (GREENBERG et al., 1997; MALCOVATI et al., 2011; GREENBERG et al., 2012; GREENBERG et al., 2013).

Figura 1: Representação esquemática da gênese das Síndromes Mielodisplásica.



Fonte: Adaptado de Hellstrom-Lindberg et al (2008) e Economopoulou et al (2008).

As causas da SMD são conhecidas em apenas 15% dos casos (ADÈS et al., 2014). Em crianças, a predisposição genética é evidente em um terço dos casos, inclusive em crianças com síndrome de Down, anemia de Fanconi e neurofibromatose (NIEMEWEER; BAUMANN, 2008; ADÈS et al., 2014). Já em adultos, a predisposição genética é menos comum, mas deve ser investigado em adultos jovens ou em famílias com outros casos de SMD, LMA ou anemia aplástica (NIEMEWEER; BAUMANN, 2008; ADÈS et al., 2014).

Em relação aos fatores ambientais como desencadeadores da SMD, podem ser incluídos o uso de quimioterapia prévia, especialmente de agentes alquilantes e análogos da purina e radioterapia (STROM; VELEZ-BRAVO; ESTEY, 2008; BOWEN, 2013; IRONS; KERZIC, 2014; ADÈS et al., 2014). Quanto aos fatores ocupacionais, podem ser citados a exposição ao benzeno e seus derivados e um excesso de casos é relatado em trabalhadores agrícolas e industriais (BOWEN, 2013; ADÈS et al., 2014). Essas SMDs secundárias, especialmente nos casos ocorridos

após a quimioterapia, geralmente têm mau prognóstico, como a presença de achados citogenéticos complexos (STROM; VELEZ-BRAVO; ESTEY, 2008; BOWEN, 2013; IRONS; KERZIC, 2014; ADÈS et al., 2014).

1.2 Classificação Clínica e Prognóstica 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 Frances - Americano - Britânico (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).

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 1). 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 (JAFFE et al., 2001).

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 1).

Tabela 1: 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 x 10 ⁹ /L) | <20 | |
| | LMMC | LMMC | | | |
| | 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).

O Sistema Internacional de Score Prognóstico, ou IPSS, foi derivado de um modelo de prognóstico baseado em 816 pacientes com SMD primária avaliados em sete estudos prévios. O sistema de pontuação considera a porcentagem de blastos da MO medida reestruturado em cinco 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 a 2,0) e elevado (pontuação > 2,5) (Tabela 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 ano para pacientes de risco elevado (GREENBERG et al., 1997).

Tabela 2: Representação das variáveis estabelecidas no IPSS.

| Variável | Estratificação de risco / Valor dos escores | | | | | |
|-------------------------------------|---|-----------------|------|------------------|--------|------|
| | Baixo | Intermediário I | | Intermediário II | | Alto |
| | 0 | 0.5 | 1.0 | 1.5 | 2.0 | ≥2.5 |
| Blastos na MO | <5% | 5-10% | - | 11-20% | 21-30% | >30% |
| Cariótipo* | Bom | Intermediário | Ruim | - | - | - |
| Citopenia** | 0 ou 1 | 2 ou 3 | - | - | - | - |
| Frequência de Evolução para LMA (%) | 19 | 30 | | 33 | | 45 |
| Sobrevida média (anos) | 5.7 | 3.5 | | 1.2 | | 0.4 |

* Cariótipo: Bom= normal ou -Y, del(5q), del(20q); Intermediário = outras anormalidades; Ruim = complexos (3 anormalidades) ou anormalidades do cromossomo 7.

** Citopenias: contagem de neutrófilos < 100.000/ul, hemoglobina < 10 g/dl.

Fonte: Adaptado de Greenberg et al (1997).

Malcovati et al (2011) estabeleceu um novo sistema de prognóstico, o WPSS (*WHO Classification-Based Prognostic Scoring System*) (Tabela 3). Para o WPSS, foram incluídos novos parâmetros moleculares e clínicos laboratoriais, tais como as variáveis obtidas na classificação WHO (BRUNNING et al, 2008), as alterações citogenética estratificadas de acordo com o IPSS (GREENBERG et al., 1997) e dependência transfusional (como um indicador de anemia sintomática).

Estes novos achados auxiliaram na decisão terapêutica dos pacientes com SMD e podem ser utilizados como guias no seguimento clínico desses pacientes (Tabela 3).

Tabela 3: Representação das variáveis estabelecidas no WPSS.

| Variável | Estratificação de risco / Valor dos escores | | | |
|-----------------------------|---|---------------|---------------|---------|
| | Muito Baixo | Baixo | Intermediário | Alto |
| | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Categoria OMS (2001) | AR, ARSA, 5q- | CDDM, RCDM-SA | AREB-1 | AREB-II |
| Cariótipo* | Bom | Intermediário | Ruim | - |
| Dependência Transfusional** | Nenhuma | Regular | - | - |

* Cariótipo: Bom= normal ou -Y, del(5q), del(20q); Intermediário = outras anormalidades; Ruim = complexos (3 anormalidades) ou anormalidades do cromossomo 7.

** Dependência Transfusional: ≥ 1 unidade de concentrado de hemácias cada 8 semanas durante 4 meses.

Fonte: Adaptado de Malcovati et al (2005).

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, originando o IPSS-R (revisado) (GREENBERG et al., 2012) (Tabela 4). Nesta nova revisão, o IPSS-R permaneceu possuindo como variáveis clínicas laboratoriais 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 mielóide aguda (GREENBERG et al., 2012) (Tabela 4).

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 4).

Tabela 4: Representação das variáveis estabelecidas no IPSS-R.

| Variável | Valor dos escores | | | | | | |
|---|-------------------|----------|---------------|--------|---------------|------|------------|
| | 0 | 0.5 | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 3.0 | 4.0 |
| Blastos na MO | ≤2% | - | >2-<5% | - | 5-10% | >10% | - |
| Cariótipo* | Muito Bom | - | Bom | - | Intermediário | Ruim | Muito Ruim |
| Hemoglobina (g/dL) | ≥10 | - | 8 - 10 | <8 | - | - | - |
| Plaquetas (mm ³) | ≥100 | 50-100 | <50 | - | - | - | - |
| Neutrófilos (mm ³) | ≥0.8 | <0.8 | - | - | - | - | - |
| Estratificação de risco | | | | | | | |
| | Muito baixo | Baixo | Intermediário | Alto | Muito Alto | | |
| | ≤1.5 | >1.5 - 3 | >3 - 4.5 | >4.5-6 | >6 | | |
| Sobrevida (anos) | 8.8 | 5.3 | 3.0 | 1.6 | 0.8 | | |
| Média de tempo de Evolução para LMA, 25%, ano | - | 10.8 | 3.2 | 1.4 | 0.73 | | |

* Cariótipo: Muito Bom= -Y, del(11q); Bom= Normal, del(5q), del(12q), del(20q), duplo - incluindo o del(5q); Intermediário = del(7q), +8, +19, i(17q), outras anormalidades simples ou duplas; Ruim = complexos (3 anormalidades), -7, inv(3)/t(3q)/del(3q), duplos incluindo o -7/del(7q); Muito ruim= complexos (>3 anormalidades).

1.3 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). A SMD é rara na infância, sendo observada em menos de 5% das neoplasias hematológicas que acometem pacientes menores de 14 anos de idade apresentando um bom curso clínico (HASLE et al., 2003; NIEMEYER; BAUMANN, 2008).

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 observadas em diversas regiões do mundo (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 (HELLSTROM-LINDBERG et al., 2008).

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).

Dados mais recentes do SEER analisados a partir de um levantamento realizado entre 2007 e 2011 mostram uma taxa de incidência global de 4,9 casos por 100.000 habitantes (COGLE, 2015). A taxa de incidência é menor entre pessoas com menos de 40 anos, 0,14 caso por 100.000 habitantes, aumentando progressivamente com a idade, chegando a 36 casos por 100.000 habitantes em pacientes com mais de 80 anos (SEKERES, 2010).

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).

Destaca-se, atualmente, o estudo de Belli et al (2015), como o mais atual perfil epidemiológico de SMD na América do Sul, incluindo o Brasil. Nesse estudo, retrospectivamente, foram avaliados um total de 1.080 pacientes, sendo destes 635 argentinos, 345 brasileiros e 100 chilenos (BELLI, et al., 2015). Em relação aos achados brasileiros, Belli et al (2015) destacam que, na população avaliada, houve predomínio de pacientes do sexo masculino (193/345, razão de

1,3), com média de idade de 65 ± 17 anos, com prevalência maior de casos de CRDM (105/345), seguidos de casos de AREB em 89 casos (BELLI et al., 2015). Coincidentemente, os principais achados, frente as observações do índice prognóstico (IPSS-R) dos pacientes com SMD, mostraram um predomínio de casos de pacientes com baixo risco (34%), seguidos de pacientes com risco intermediário, em 23% dos casos.

1.4 Etiologia da Síndrome Mielodisplásica

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, tendo a idade como seu principal fator de risco, enquanto as SMD secundárias desenvolvem-se após um evento mutagênico conhecido (LI et al., 2009; SEKERES, 2010). As t-SMD podem surgir em qualquer idade, geralmente 4-5 anos depois do início de quimioterapia ou radioterapia (NAEIM; RAO; GRODY, 2008).

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 (NAEIM; RAO; GRODY, 2008). Cerca de 4-5% de pacientes com SMD podem desenvolver transformação blástica em locais extramedulares (sarcoma granulocítico), particularmente na pele, estando esta evolução associada a um prognóstico ruim (NAEIM; RAO; GRODY, 2008).

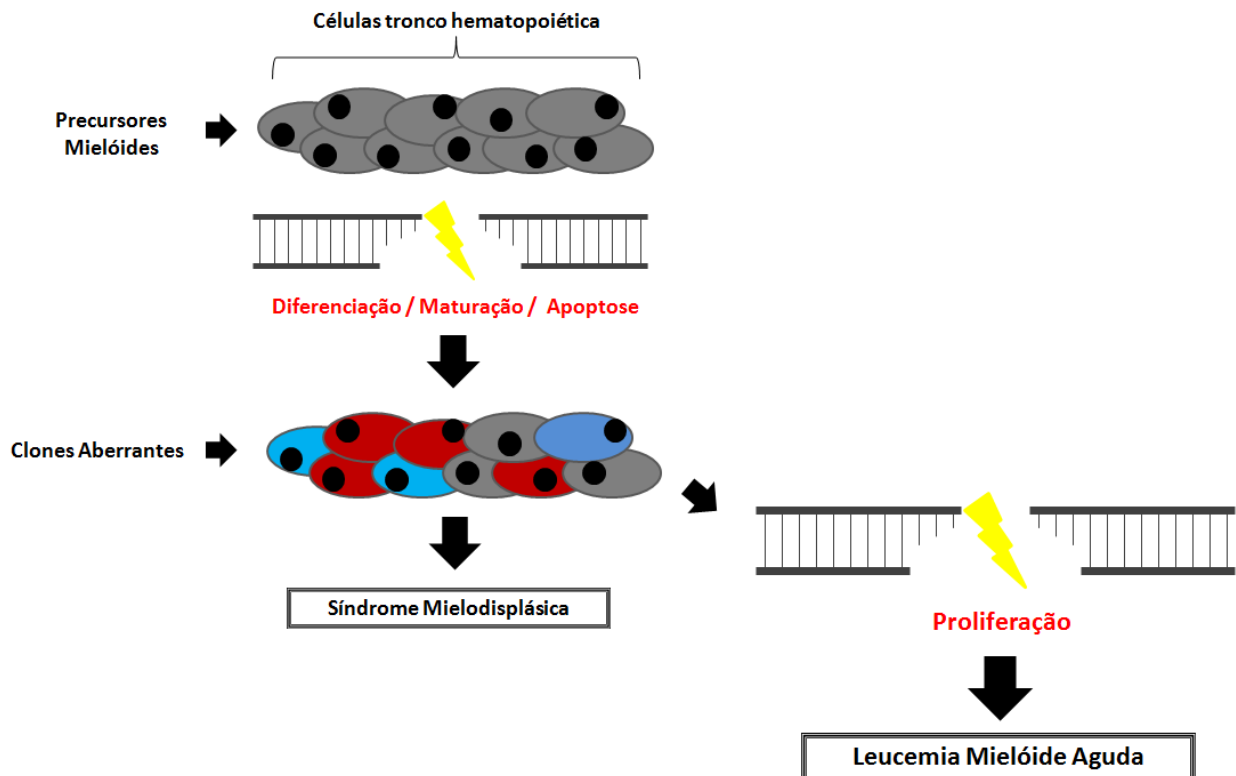
Os estudos epidemiológicos têm identificado consistentemente diversos fatores de risco para o acometimento das SMDs tais como o tabaco, exposição ao benzeno e outros solventes orgânicos, agentes químicos agrícolas (pesticidas, herbicidas e fertilizantes), radiações ionizantes, pertencer ao sexo masculino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

1.5 Patogênese da Síndrome Mielodisplásica

A patogênese desta doença é complexa e pode envolver tanto mecanismos genéticos, epigenéticos como imunomediados. Como exposto, a SMD é uma doença clonal da célula progenitora hematopoiética 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 (lesão no DNA) leva ao aparecimento de um clone anormal precursor de células hematopoiéticas disfuncionais e morfologicamente displásicas (NAEIM; RAO; GRODY, 2008) (Figura 2).

Figura 2: Representação esquemática da patogênese das Síndromes Mielodisplásica.



Fonte: Adaptado de Hellstrom-Lindberg et al (2008) e Economopoulou et al (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 hiperplásica (OLNEY; LE BEAU, 2002) sendo resultante um quadro de citopenia periférica devido um aumento da apoptose nas células progenitoras hematopoiéticas (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 hematopoiéticas, caracterizando o perfil de citopenias bastante peculiar desta doença (Figura 2).

A patogênese da SMD é estabelecida partindo-se de uma célula tronco que adquire sucessivas alterações genéticas que levam à transformação maligna e expansão clonal (LOOK et al., 2005) (Figura 2). As mutações iniciais nas células tronco podem causar bloqueio da diferenciação levando à displasia, enquanto defeitos subsequentes afetam a proliferação e susceptibilidade à apoptose causando expansão clonal das células aberrantes e LMA (LOOK et al., 2005; BRUNNING et al. 2008) (Figura 2).

Ao contrário de outras neoplasias hematológicas caracterizadas por alterações cromossômicas equilibradas, tais como translocações recíprocas e inversões ocorridas em LMA, as quais resultam em mutações dominantes e ativação de oncogenes, a SMD está geralmente associada a alterações cromossômicas não equilibradas (FEARON et al., 2002). Muitas das alterações 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). É importante ser citado que deleções cromossômicas terminais ocorrem frequentemente em malignidades hematológicas, com um perfil de incidência que varia entre as distintas doenças oncohematológicas e são mais frequentes na Síndrome Mielodisplásica (PINHEIRO; CHAUFFAILLE; SILVA, 2006a).

A citogenética na atualidade é a mais importante variável na determinação do prognóstico da SMD, contribuindo para a sua heterogeneidade (BERNASCONI et al., 2013). Usando o cariótipo convencional, aproximadamente 50% dos pacientes com SMD de novo e até 80% dos pacientes com SMD secundária, apresentam alterações (LEE et al., 2015). Muitas dessas alterações representam eventos genéticos secundários resultantes da instabilidade genômica ao invés de serem parte da patogênese primária, com exceção da del5q (LEE et al., 2015). Usando uma coorte de 2902 pacientes diagnosticados com SMD de novo, Schanz et al. definiu um novo escore com 5 grupos de prognóstico citogenético (SCHANZ et al., 2012), posteriormente adicionado ao IPSS-R.

1.6 Citogenética e a Síndrome Mielodisplásica

Sabe-se que 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 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). Para a 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 80% dos casos (NAEIM; RAO; GRODY, 2008; LEE et al., 2015). À exceção da deleção 5q-, nenhuma anomalia cromossômica está especificamente associada a qualquer subtipo de SMD (NAEIM; RAO; GRODY, 2008). É importante destacar que 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).

Continuamente, nosso grupo de estudo têm envidado esforços para publicar novos achados citogenéticos relacionados ao diagnóstico e prognóstico da SMD. 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). Adicionalmente, Pinheiro, Chauffaille e Silva (2006b) publicaram o primeiro caso clínico de pacientes com t(1,19) durante a evolução de SMD para Leucemia Mielóide Aguda (PINHEIRO; CHAUFFAILLE; SILVA, 2006b) e o quinto caso de SMD com 9q- com outras anormalidades cromossômicas detectadas por banda G (PINHEIRO et al., 2004). A translocação entre o cromossomo 1 e 19 é frequente em crianças portadoras de leucemia linfóide aguda que apresenta um perfil prognóstico desfavorável (PINHEIRO; CHAUFFAILLE; SILVA, 2006b) e somente foram descritos 4 casos de t(1,19)(p12,p11) no mundo (ANDO et al., 2002; TCHINDA et al., 2002).

As deleções cromossômicas são as alterações 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

cromossomos 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).

1.7 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 3) (HOEIJMAKERS, 2009). Estima-se que mais de 10.000 lesões no genoma sejam produzidas diariamente (HOEIJMAKERS, 2009). 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 a gênese da 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 (HOEIJMAKERS, 2009).

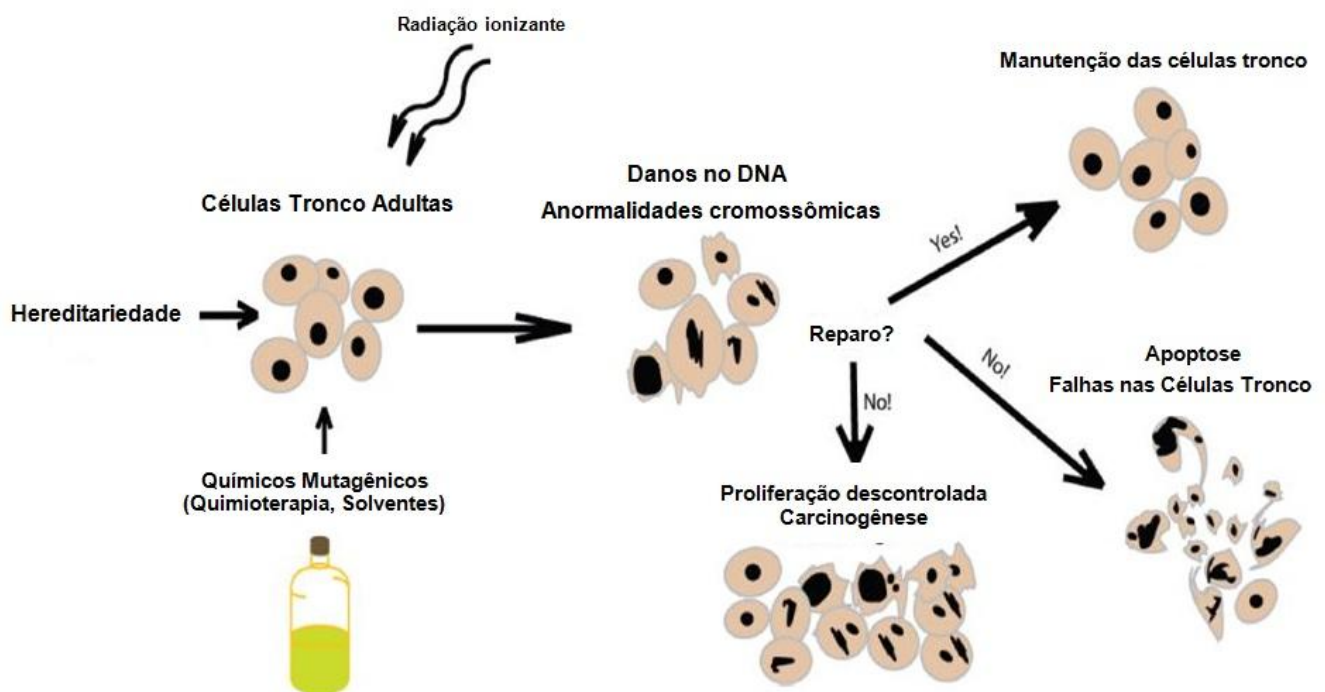
Os danos gerados por estas lesões podem levar a várias modificações biológicas que incluem: alterações na transcrição de alguns genes, falhas reprodutivas, mutações herdáveis ou não, morte celular e doenças como o câncer (OZTURK e DEMIR, 2011), contribuindo provavelmente para o envelhecimento, doenças relacionadas à senescência e neurodegeneração (IYAMA e WILSON, 2013). Tais modificações são resultado da instabilidade genômica que ocorre quando vários processos envolvidos na manutenção e replicação do genoma são disfuncionais ou quando há uma relevante exposição a agentes carcinógenos (LANGIE et al., 2015).

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).

Existem várias linhas de defesa contra a indução e persistência de dano ao DNA de uma célula. Primariamente, existem os agentes que previnem a formação do dano como peptídeos detoxificantes e os antioxidantes, como vitamina C e E (OZTURK e DEMIR, 2011).

Secundariamente, há vias de resposta ao dano no DNA que removem um erro já existente através de vias de reparo de DNA reduzindo assim a possibilidade de indução de mutações. E por fim existe a célula já lesada que pode ser eliminada através de morte espontânea ou apoptose. Independente do mecanismo usado, o reparo da lesão ao DNA é indispensável para a manutenção da integridade do genoma (KENYON; GERSON, 2007; OZTURK e DEMIR, 2011), que por sua vez é essencial para a viabilidade e longevidade de um organismo saudável (KENYON; GERSON, 2007; IYAMA e WILSON, 2013).

Figura 3: Apresentação esquemática da exposição genotóxica que leva ao desenvolvimento de danos no DNA nas células tronco e contribuem no desencadeamento do processo neoplásico.



Fonte: Adaptado de Kenyon (2007).

1.8 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; HOEIJMAKERS, 2009; IYAMA; WILSON, 2013). Diversos agentes etiológicos são capazes de causar danos ao DNA e, dentre eles, podemos destacar o calor, agentes oxidantes, 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 categorias, 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; IYAMA e WILSON, 2013). 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; IYAMA e WILSON, 2013).

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; IYAMA e WILSON, 2013). As lesões de fita dupla são as mais deletérias formas de dano ao DNA e ativam o processo de morte celular, se não reparada, e desencadeando quadro de instabilidade do genoma (BOHGAKI, BOHGAKI e HAKEM, 2010).

1.9 Sensoriamento das Lesões no DNA

Sabe-se que 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. Como foco deste estudo, um tipo de lesão no DNA potencialmente letal ocorre quando as duas fitas da dupla hélice são quebradas (*Double Strands Breaks*, DSB) (IYAMA e WILSON, 2013). A resposta celular imediata frente a um DSB exige que o sinal de danos ao DNA seja transmitida com rapidez e precisão para inúmeros processos em toda a célula (CICCIA; ELLEDGE, 2010; BENSIMON et al., 2011).

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 (SHILOH et al., 2003; BENSIMON et al., 2011). 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) (BAO et al., 2001; LEMPIAINEN; HALAZONETIS, 2009).

O mecanismo de transdução de sinal que dissemina o alarme de dano ao DNA inicia-se com proteínas de sensoriamento que detectam o dano ou a alteração da cromatina e mediam a ativação de transdutores, que por sua vez transmitem o alarme para numerosas proteínas efetores participantes dos distintos mecanismos de reparo ao DNA inerentes ao maquinário celular (CICCIA; ELLEDGE, 2010) (Figura 4). Adicionalmente, sabe-se que o gene *ATM* é o responsável por ativar a via de resposta ao dano do ciclo celular mediante fosforilação da proteína p53 (SHIEH et al., 1997; SILICIANO et al., 1997) (Figura 4). Neste contexto, o transdutor primário do alarme em DSBs é o ATM (membro da família de PI3K), atuante como uma proteína quinase de fosforilação de serina-treonina (Figura 4).

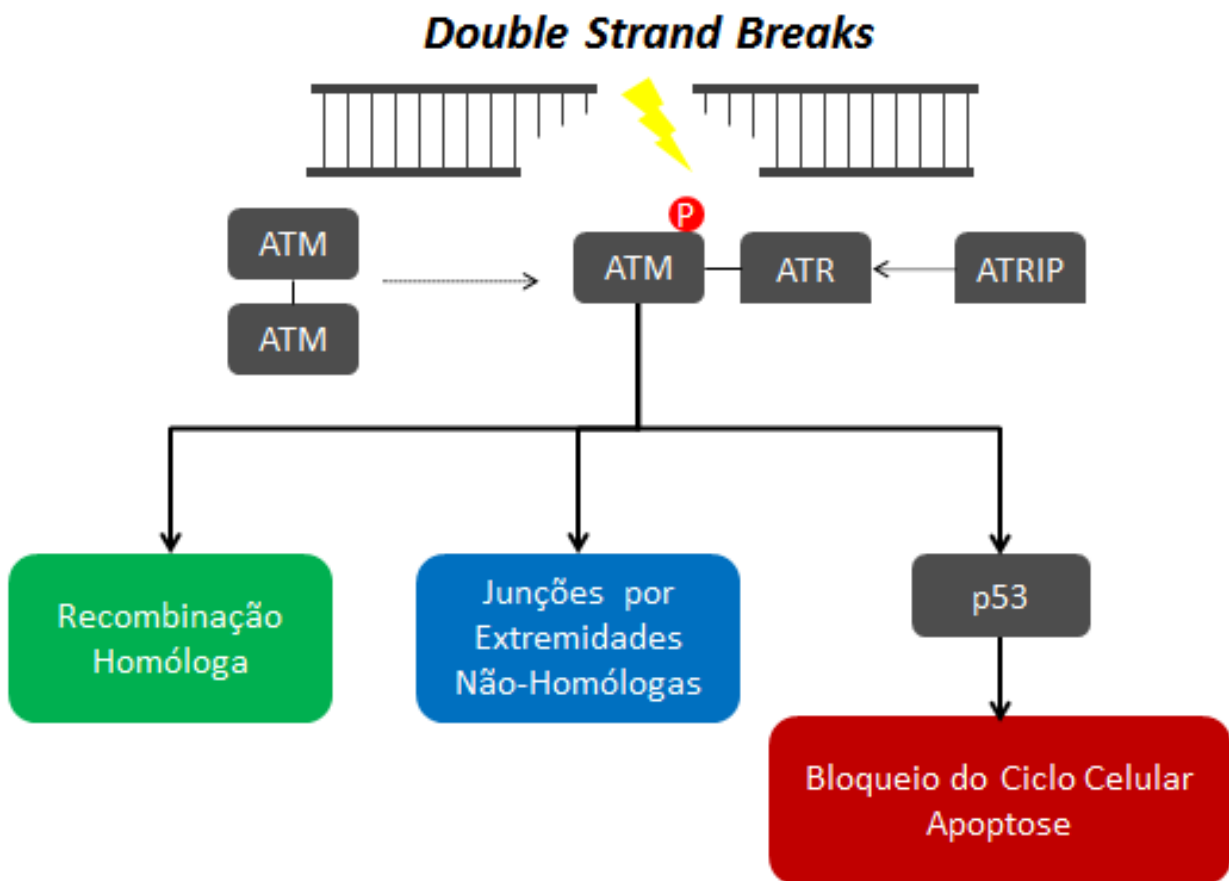
Sabe-se que tanto ATM quanto ATR podem ser ativadas por danos no DNA, embora não seja conhecido exatamente como essas duas quinases reconhecem o dano. A ATM responde principalmente a quebras duplas induzidas por radiações ionizantes e espécies reativas de oxigênio (ALEXANDER; WALKER, 2010; BENSIMON et al., 2011), ao passo que ATR responde a lesões induzidas pelos raios UV ou a agentes que causam bloqueio na forquilha de duplicação (ANDEGEKO et al., 2001; BENSIMON et al., 2011). As proteínas ATM e ATR apresentam uma redundância funcional e compartilham a sobreposição de um mesmo substrato; preferencialmente juntos, estas proteínas fosforilam os resíduos de serina e treonina que são seguidas pela glutamina em seus substratos (“SQ/TQ” motifs) (LOPEZ-CONTRERAS; FERNANDEZ-CAPETILLO, 2010; FLYNN; ZOU, 2011; BENSIMON et al., 2011).

Não há uma distinção clara entre os sinais que ativam essas duas proteínas, pois a 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 (BENSIMON et al., 2011). Além disso, a 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 (WATTERS et al., 2003; BENSIMON et al., 2011).

A ativação de ATM pode conduzir as células a um bloqueio do ciclo celular, que pode ocorrer nas fases G1, S ou G2 (MYERS; CORTEZ, 2006; JAZAYERI et al., 2006) (Figura 4). 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 (BARTEK; LUKAS, 2007), 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).

Figura 4: Apresentação esquemática das proteínas atuantes na ativação do sensoriamento molecular da proteína ATM em danos de fita dupla no DNA (DSBs).



Fonte: Adaptado de Pandita et al. (2003) e Yoshida e Miki (2004).

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

As DSB são consideradas o tipo de lesão de maior efeito biológico para a formação de anormalidades cromossômicas, morte celular e transformação neoplásica (BELLI; SAPORA; TABOCCHINI, 2002; BOHGAKI; HAKEM, 2010; IYAMA e WILSON, 2013). Diversas doenças humanas derivam-se de deficiências em HR e NHEJ e exibem defeitos no desenvolvimento

imunológico e neurológico, assim como sensibilidade à radiação, fenótipos de envelhecimento precoce e predisposição ao câncer (IYAMA e WILSON, 2013).

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 replicação que encontra uma quebra de fita simples ou outros tipos de lesões também pode produzir uma DSB (SCOTT; PANDITA, 2006; BOHGAKI; HAKEM, 2010; IYAMA e WILSON, 2013). As DSBs também são geradas durante o processo normal de recombinação meiótica (HARTLERODE; SCULLY, 2009).

As falhas no reparo correto das DSBs podem resultar na morte celular ou na formação de rearranjos cromossômicos, incluindo deleções e translocações que, por sua vez, podem promover a transformação neoplásica (BENSIMON et al., 2011). A fim de lidar com esta lesão, as células ativam uma complexa rede de vias que conduzem para a reparação dos danos e a retomada do ciclo celular normal ou morte celular programada. Atuantes em DSBs vêm-se dois tipos principais de mecanismos de reparo: recombinação homóloga (*homologous recombinational repair* - HRR) e junção de extremidades não-homólogas (*non-homologous end joining* - NHEJ) (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003; WETERINGS; VAN GENT, 2004; OZTURK e DEMIR, 2011; IYAMA e WILSON, 2013).

Segundo Allen e colaboradores (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 (BURMA et al., 2006; SONODA et al., 2006). 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).

1.10.1 Junção por Extremidades Não Homólogas (NHEJ)

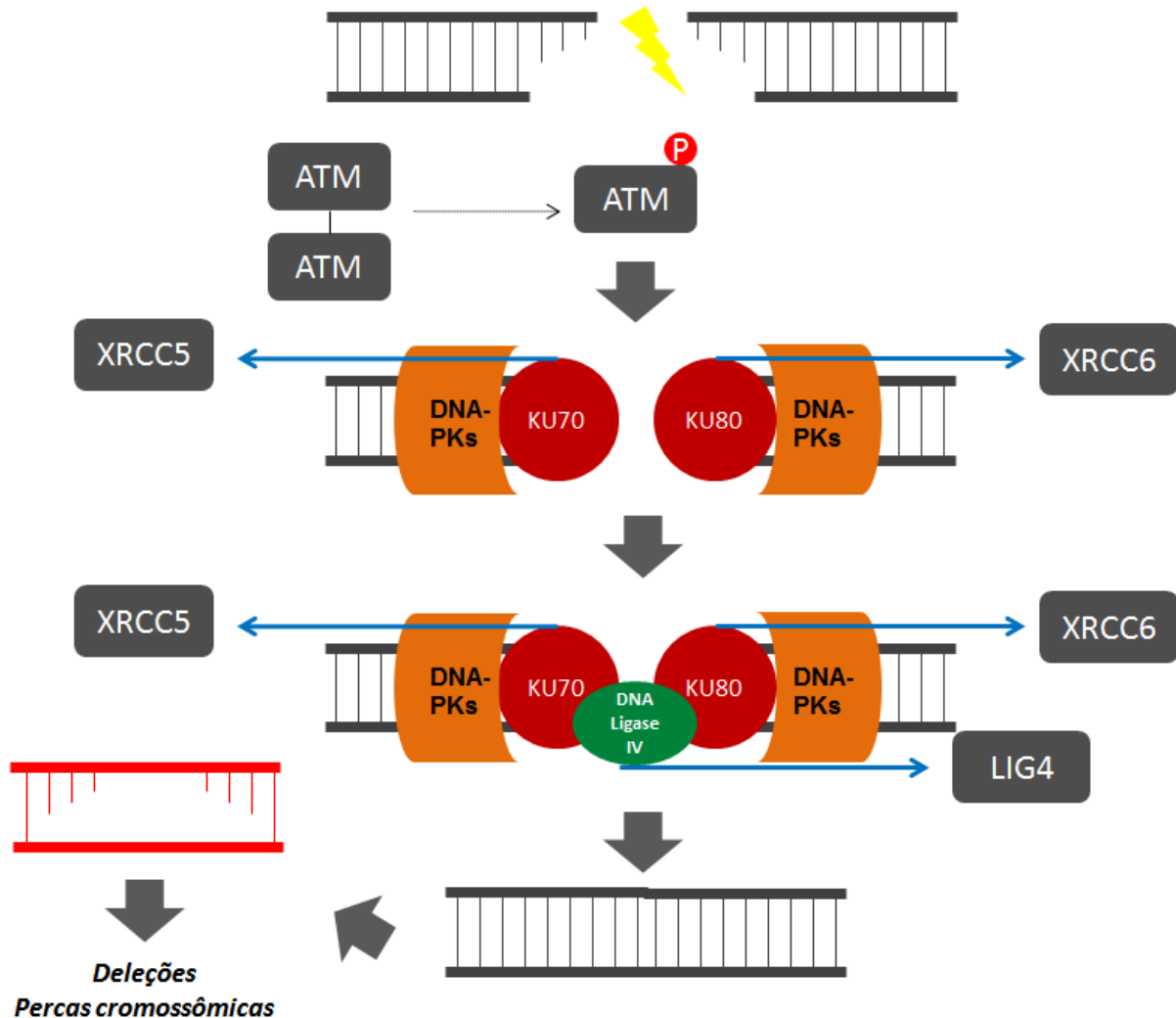
Sabe-se que a principal via de reparo de DSBs em mamíferos é a NHEJ (Figura 2) (PASTWA; BLASIAK, 2003; VALERIE; POVIRK, 2003), atuante, mais especificamente, na fase G1 do ciclo celular (BELLI et al., 2003 WEST et al., 2003). Segundo Zhong et al. (2002) a junção de extremidades não-homólogas contribui 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 (Figura 5). 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 (BURMA et al., 2006; IYAMA e WILSON, 2013) (Figura 5). Consequentemente, inserções e deleções gênicas podem ser geradas no local do reparo, comprometendo, assim, a integridade do genoma (BURMA et al., 2006) (Figura 5), estando amplamente associado ao acometimento de novas anormalidades cromossômica (BOULEY et al., 2015)

O mecanismo de reparo baseado em NHEJ é dependente dos complexos proteicos Ku70 (correspondente ao gene *XRCC6*) / Ku80 (correspondente ao gene *XRCC5*), que se ligam às extremidades no local da lesão, e da DNA Ligase IV que une as pontas danificadas pela lesão (ECONOMOPOULOS et al., 2010; RIBEIRO-JR et al., 2014). O gene *XRCC6*, localizado no cromossomo 22q13.2, e o gene *XRCC5*, localizado no cromossomo 2, na região q35, são responsáveis por codificar a proteína Ku70 e Ku80, respectivamente, correspondendo a DNA helicases dependente de ATP essenciais para o funcionamento do mecanismo de reparo por NHEJ (PUBMED, 2016). Em relação ao gene *LIG4*, vê-se que este está localizado no cromossomo 13, na região q33-q34, codifica a proteína DNA ligase IV, responsável por finalizar o reparo por NHEJ, unindo os filamentos danificados em uma reação dependente de ATP (PUBMED, 2016).

Resumidamente, nos mecanismos moleculares das NEHJ, tem-se a ligação das proteínas KU70 e KU80 às extremidades da quebra, no local da lesão (Figura 5) (LIEBER, 2008; ANDERSON et al., 2010; IYAMA e WILSON, 2013). Em seguida há o recrutamento de DNA-PKcs (codificada pelo gene *XRCC7*) (AHNESORG; SMITH; JACKSON, 2006; LIEBER, 2008; ANDERSON et al., 2010), que sinaliza a presença da quebra e ativa as outras proteínas, tal como o complexo XRCC4-ligase IV, para, assim, dar continuidade à via de reparo por NHEJ (WETERING et al., 2004; BURMA et al., 2006; LIEBER, 2008; ANDERSON et al., 2010) (Figura 5). 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; LIEBER, 2008; ANDERSON et al., 2010).

Figura 5: Apresentação esquemática das proteínas atuantes no mecanismo de reparo de Junções por extremidades não homólogas (NHEJ) em danos de fita dupla no DNA (DSBs).



Fonte: Adaptado de Pandita et al. (2003) e Yoshida e Miki (2004).

1.10.2 Recombinação Homóloga (HR)

A Recombinação Homóloga consiste no mecanismo de reparo caracterizado por unir as DSBs utilizando-se de uma fita de DNA homólogo como molde (IYAMA e WILSON, 2013) (Figura 6). Destaca-se que este mecanismo de reparo pode atuar tanto na fase S quanto na fase G2 do ciclo celular (BELLI et al., 2003 WEST et al., 2003). Como consequência, esse tipo de reparo promove uma alta fidelidade e está menos propenso a erros (BELLI; SAPORA; TABOCCHINI, 2002; IYAMA e WILSON, 2013). 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).

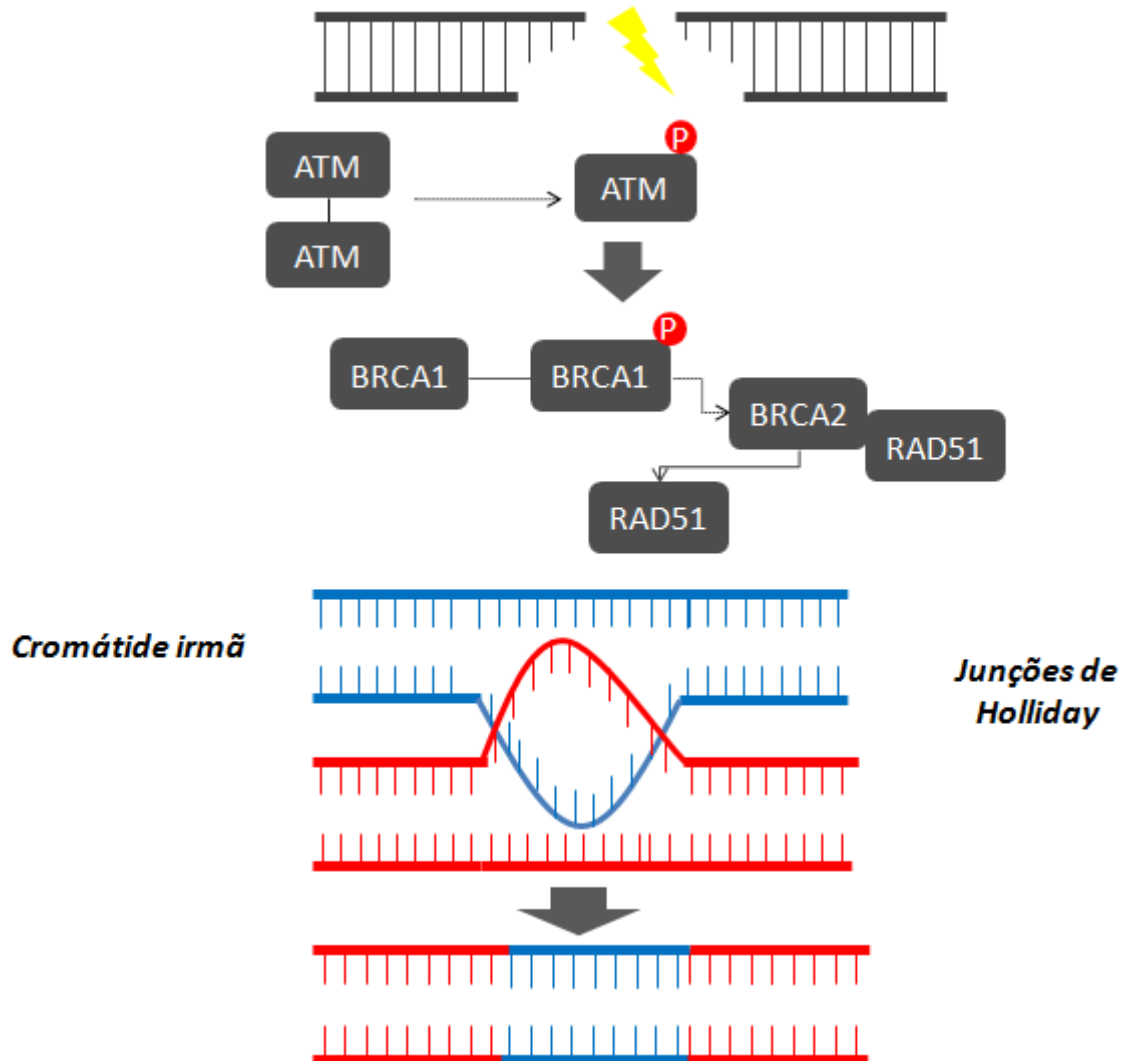
Dentre os inúmeros complexos protéicos envolvidos nas vias de reparo HR, vê-se os da família BRCA (*Breast Cancer Susceptibility Gene*) identificados inicialmente como marcadores moleculares do desenvolvimento do câncer de mama e de ovário. O primeiro a ser identificado, o *BRCA1*, está localizado no cromossomo 17 na região p21.3 (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; IYAMA e WILSON, 2013).

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; IYAMA e WILSON, 2013). 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; IYAMA e WILSON, 2013) (Figura 6).

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 HR, possivelmente exercendo atividade regulatória (PELLEGRINI et al., 2002) (Figura 6).

Em relação aos demais membros da família RAD, acredita-se que a proteína 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). Já a proteína RAD52 também desempenha um papel importante na HR, pois interage e colocaliza-se com a proteína RAD51, facilitando, assim, sua atividade, além de ter a propriedade de ligar-se diretamente às DSBs, protegendo-as da atividade de exonucleases (THACKER et al., 2005).

Figura 6: Apresentação esquemática das proteínas atuantes no mecanismos de reparo por Recombinação Homóloga em danos de fita dupla no DNA (DSBs).



Fonte: Adaptado de Pandita et al. (2003) e Yoshida e Miki (2004).

Muitos estudos tem demonstrado que SNPs (RIBEIRO JR et al, 2013; RIBEIRO-JR et al, 2014), status de metilação (ZHOU et al., 2015) e expressão de genes e proteínas de reparo do DNA (ECONOMOPOULOU et al, 2010) podem afetar a capacidade de reparo de células tumorais. Frente ao contexto exposto, sabe-se que 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. O papel dos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *RAD51*, atuantes em HR (Figura 6), *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* em NEHJ (Figura 5) e o *ATM* (Figura 4),

atuante como sensor molecular para o dano em DSBs, nas alterações genômicas observadas em células tumorais está começando a ser apreciado, principalmente na SMD (ECONOMOPOULOU et al, 2010; RIBEIRO JR et al, 2013; RIBEIRO-JR et al, 2014).

No entanto, não foram encontrados trabalhos que correlacionassem o nível de expressão do mRNA de genes de reparo em DSBs, especificamente em células oriundas do *pool* medular de pacientes com SMD. Assim, 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 genes na manutenção da estabilidade genômica, especialmente nas células tronco hematopoiéticas de pacientes com SMD, poderão ajudar no melhor conhecimento da patogenia e da evolução desta doença.

1.11 Polimorfismos de Genes de Reparo de DNA *versus* nível de expressão de mRNA

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; KATARA, 2014). 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).

A 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; WANG et al., 2012). Essa alteração genética ocorre em mais de 1% da população, sendo considerado mais prevalente quando comparado com outros tipos de alterações genéticas (TAKASHIBA; NARUISHI, 2006; KATARA, 2014).

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; KATARA, 2014).

Caso o polimorfismo de nucleotídeo único ocorra 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; KATARA, 2014). 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; WANG et al., 2012).

Albert (2011) define os polimorfismos genéticos em 4 classes distintas, sendo elas:

- ❖ **Polimorfismo genético de classe 0 - Função não definida:** são os polimorfismos que não possuem função determinada ou está prevista somente sua função teórica, mas não foram demonstradas experimentalmente.
- ❖ **Polimorfismo genético de classe 1 - Funcional *in vitro*:** são os polimorfismos que possuem função definida somente a nível *in vitro*. O efeito funcional do polimorfismo classe 1, como por exemplo de um elemento regulador de DNA-alvo ou de um mecanismo que tenha sido demonstrado utilizando-se de ensaios *in vitro*. No entanto, não se conhece o papel do polimorfismo no nível de expressão do seu respectivo gene (*in vitro*) e seu papel no maquinário celular *in vivo*.
- ❖ **Polimorfismo genético de classe 2 - Funcional *in vivo*:** adicionalmente a todos os aspectos apresentados para os polimorfismos de classe 1, adiciona-se o conhecimento do impacto do polimorfismo na expressão do seu gene em modelos de sistemas celulares *in vivo*, tais como células humanas transformadas e culturas celulares primárias, usando método de expressão gênica e imunoprecipitação, por exemplo. E, por fim, a função *in vivo* do polimorfismo é correlacionada com uma mudança funcional em tecido humano.
- ❖ **Polimorfismo genético de classe 3 - Fenótipo Funcional:** em adição aos pontos estabelecidos nas classes 1 e 2, o polimorfismo de classe 3 possui sua função demonstrada *in vivo* usando-se de modelo de organismos tais como modelos *knockout* e sua função é confirmada com uma mudança funcional em tecido humano.

Em síntese, os polimorfismos funcionais (PFs) correspondem às alterações no DNA que possuem um efeito na função do gene, seja na expressão de mRNA ou tradução da proteína (LIAO, LEE, 2010; ALBERT, 2011). Os PFs podem alterar as conformações do mRNA e, conseqüentemente, afetar o seu nível de estabilidade (ALBERT, 2011) e também podem alterar as conformações de suas proteínas alvos (LIAO, LEE, 2010).

Os PFs em genes de reparo de DNA têm sido amplamente estudados por impactarem o processo de instabilidade genômica e estarem correlacionados com suscetibilidade a diversos tipos de cânceres (IARMACOVAI et al, 2008). Alguns 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 a 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 (WANG et al., 2010; LI et al., 2011).

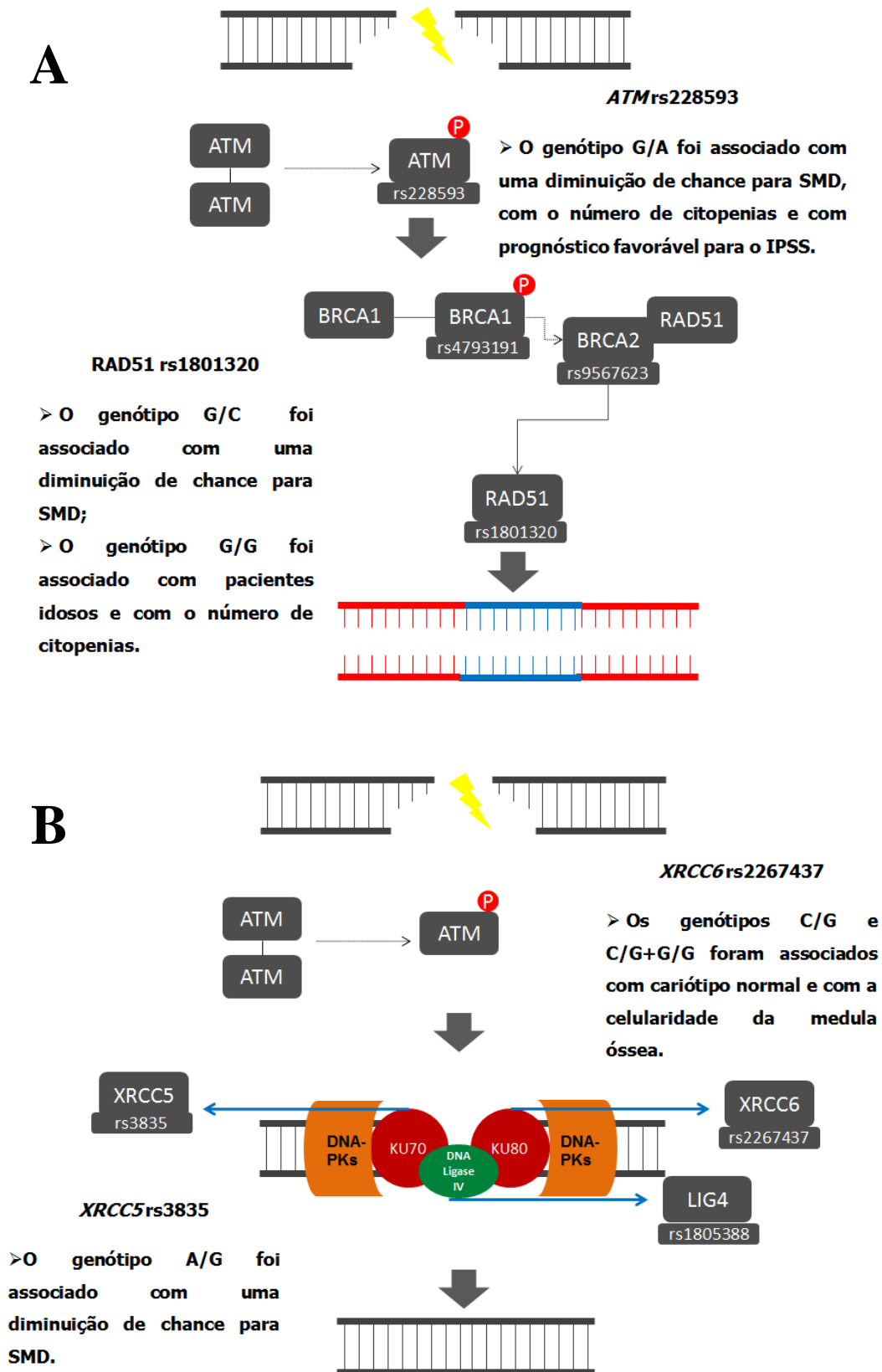
O interesse da investigação nesta área tem sido focado majoritariamente no estudo dos polimorfismos dos genes de reparação do DNA como um componente importante da susceptibilidade individual para câncer, considerando a reparação do DNA como um processo muito importante para a proteção do genoma e para a prevenção do câncer (HARMS et al., 2004).

Recentemente, nosso grupo apresentou os primeiros estudos de coorte (60 amostras de medula óssea de pacientes com SMD, oriundos do Hospital Universitário Walter Cantídio, e 82 amostras de sangue periférico de idosos voluntários sadios) de associação da frequência de polimorfismos de genes de reparo (*BRCA1* rs4793191, *BRCA2* rs9567623, *RAD51* rs1801320, *XRCC5* rs3835, *XRCC6* rs2267437, *LIG4* rs1805388 e o *ATM* rs228593) e a susceptibilidade para SMD em pacientes brasileiros (RIBEIRO-JR, 2013; RIBEIRO-JR, 2014) (Figura 7).

Neste estudo, foi demonstrado que os genes relacionados a DSB são também relacionados à patogênese da SMD. Estes resultados reforçaram 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 etiologia da Síndrome Mielodisplásica (RIBEIRO-JR, 2013; RIBEIRO-JR, 2014).

No entanto, enfatiza-se que não há descrição na literatura sobre nenhum relato relativo ao impacto destes polimorfismos no nível de expressão dos seus respectivos genes em Síndrome Mielodisplásica, ou seja, de acordo com os pressupostos estabelecidos por Albert (2011), não há a confirmação se tais polimorfismos são funcionais ou não em SMD.

Figura 7: Representação esquemática dos resultados obtidos no estudo de Ribeiro-Jr (2013) e Ribeiro-Jr (2014).



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o nível de expressão do mRNA dos genes atuantes no mecanismo de reparo em danos de fita dupla no DNA e associá-los às respectivas variantes polimórficas e com as variáveis clínicas-laboratoriais dos pacientes com Síndrome Mielodisplásica.

2.2 Objetivos específicos

1. Levantamento dos prontuários dos pacientes com SMD quanto à obtenção das variáveis clínicas dos pacientes com SMD (ver seção 3.6).
2. Detectar as alterações cromossômicas pelo estudo do cariótipo por banda G em cultura de curta duração *in vitro* da medula óssea de pacientes com SMD.
3. Avaliar o papel da expressão dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* quanto às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD.
4. Associar o nível de expressão dos genes de reparo de danos de fita dupla no DNA (Tabela 5) com as frequências dos polimorfismos estabelecidas previamente no estudo de Ribeiro Jr. et al., (2013) e Ribeiro Jr. et al., (2014) frente às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Neste estudo foram incluídas 83 amostras de *pool* celular de medula óssea de pacientes portadores de SMD diagnosticados de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde (BRUNNING, 2008), e seguidos no Ambulatório de Síndrome Mielodisplásica do Hospital Universitário Walter Cantídio na Universidade de Federal do Ceará (HUWC/UFC), no período de 2007 a 2015. Além das amostras de medula óssea de pacientes portadores de SMD, foram analisadas 10 amostras de *pool* medular oriundas indivíduos saudáveis doadores voluntários de medula óssea (Figura 8).

Foram excluídos deste estudo pacientes portadores de quaisquer outras doenças que não fossem Síndrome Mielodisplásica, que não foram diagnosticados no Laboratório de Citogenômica do Câncer no período compreendido entre os anos de 2007 a 2015 ou que a amostra não tivesse qualidade suficiente para a obtenção fiel dos resultados experimentais.

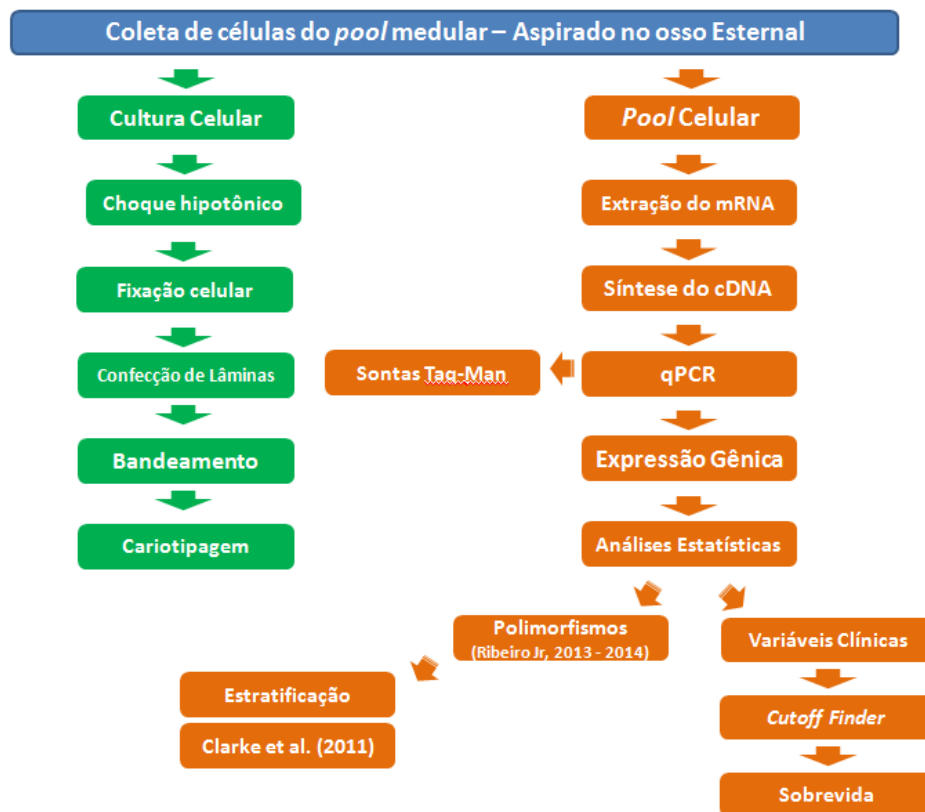
3.2 Aspectos éticos

A presente pesquisa foi submetida e aprovada (Nº do processo: 1.292.509) pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Walter Cantídio, através do sistema da Plataforma Brasil, utilizando-se de Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentados na sessão apêndice deste projeto.

Nestes termos, a equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

A representação esquemática da metodologia a ser utilizada neste projeto encontra-se apresentada na figura 8.

Figura 8: Organograma resumo das metodologias utilizadas neste estudo.

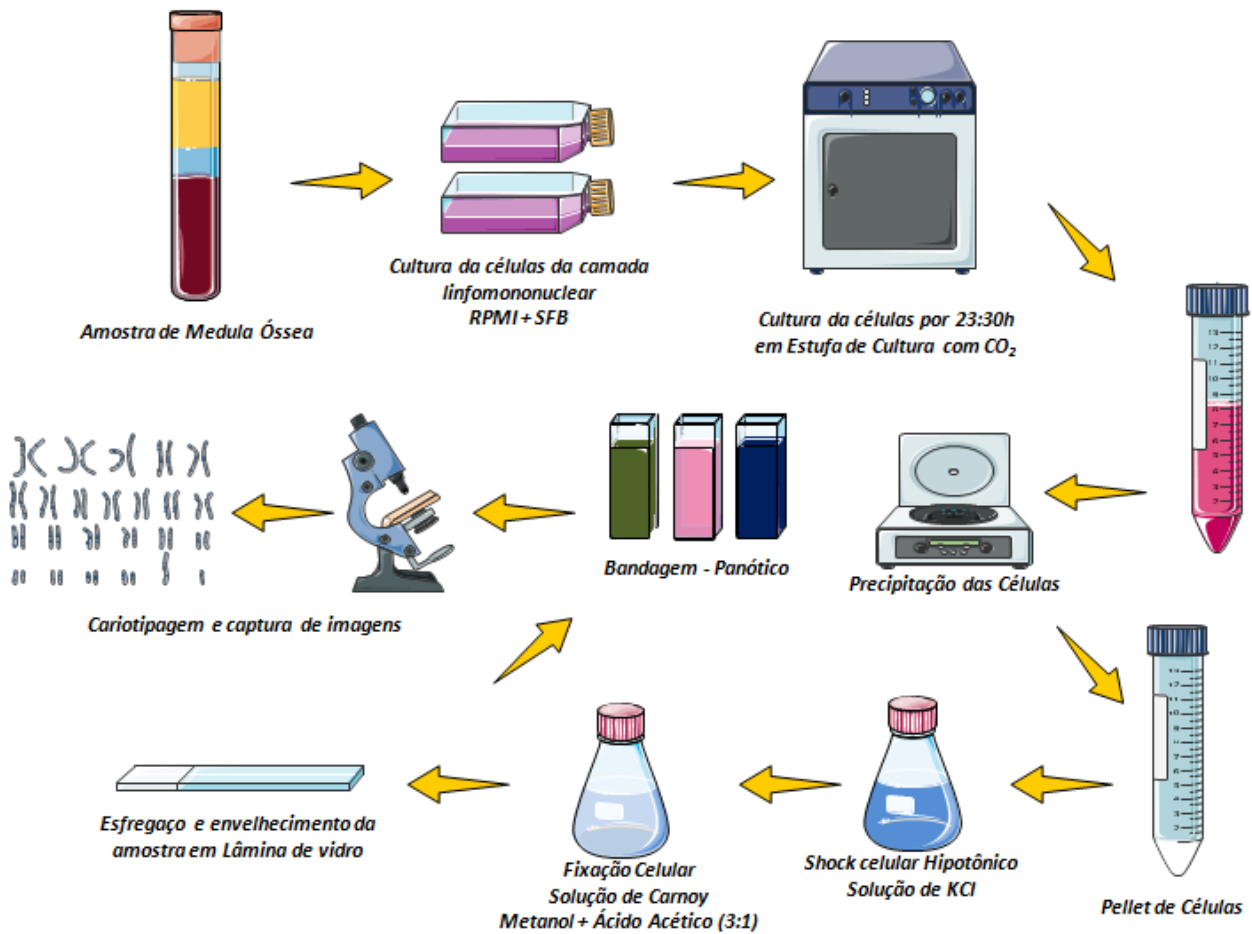


3.3 Cariótipo por Banda G

Os cariótipos foram realizados de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer, segundo a técnica descrita por Chauffaille adaptado por Pinheiro (PINHEIRO et al, 2009) (Figura 9). A medula óssea foi colhida em heparina e de forma estéril foi dividida em dois frascos contendo 7 mL de meio RPMI 1640 (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 50 µL de colchicina (Colcemid®), por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspensão em solução hipotônica de KCl 0,075 M e fixado em solução de metanol e ácido acético (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 (GTG), sendo analisadas pelo menos 20 metáfases, sempre que possível, e os cromossomos classificados de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana - ISCN 2013. As metáfases foram capturadas em sistema computadorizado (Cytovision) com software para cariotipagem e o cariótipo foi digitalizado e impresso em impressora a laser.

Figura 9: Representação esquemática dos procedimentos da citogenética por banda G.



3.4 Análise da Expressão do mRNA por qPCR

3.4.1 Obtenção de amostras de células da medula óssea

Ao diagnóstico, as 93 amostras de medula óssea (sendo 83 amostras de pacientes com SMD e 10 amostras de indivíduos saudáveis) foram coletadas em tubos de vidro Vacutainer® contendo EDTA e processadas conforme procedimento de rotina do Laboratório de Citogenômica do Câncer do HUWC/UFC.

Para a separação das células do *pool* celular da medula óssea, realizou-se a transferência da amostra de medula óssea para um tubo do tipo Falcon de 50 mL onde foi lavada com solução de lise (25mL de solução de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato de amônio 0,01 M). O conteúdo foi agitado lentamente por 3 minutos e centrifugado a 13200 rpm por 10 minutos a 4° C. Em seguida foi desprezada a fase aquosa e acrescentado 250µL de PBS, dependendo do volume do material obtido.

Posteriormente, foi acrescentado 750 μ L de *Trizol LS Reagent*[®] (Invitrogen, EUA) para cada 250 μ L de volume de PBS aplicado no pool medular. O material foi homogeneizando com pipeta até dissolução completa. Após este procedimento, o material foi armazenado no freezer a – 80°C.

3.4.2 Extração de RNA Total

A extração de RNA das células do *pool* medular dos pacientes com SMD e dos controles foi realizada a partir da utilização do *Trizol LS Reagent*[®] de acordo com o protocolo pelo fabricante. Para cada 10⁶ células armazenadas em 1mL de *Trizol Reagent*[®] foram adicionados 200 μ L de Clorofórmio para desproteinização e posterior centrifugação a 11.000 RPM por 15' a 2° C. O RNA total presente na fase aquosa foi transferido para um microtubo estéril de 1,5mL, precipitado com 0,5 mL de isopropanol, e incubado em temperatura ambiente durante 10 minutos.

O RNA total foi, então, recuperado por 10 minutos de centrifugação à 4° C e 12.000g e posteriormente lavado com 1 mL de etanol 75% (v/v) em água deionizada tratada com diethylpirocarbonate (DEPC) 0,1%. Após ser seco, o RNA foi diluído em água DEPC para evitar a sua degradação.

Foram realizadas leituras espectrofotométricas nos comprimentos de ondas de 230, 260 e 280 nm , obtendo-se suas relações para posterior aferição de contaminação das amostras. A qualidade das amostras de RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e as bandas de RNA 18S e 28S foram visualizadas em luz ultravioleta.

3.4.3 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada com a utilização do Kit para Transcrição Reversa da *Applied Biosystems*[®] (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems*[®]). Os procedimentos referentes à síntese do cDNA foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

Para cada reação de transcrição reversa foram utilizados uma quantidade otimizada de RNA total para uma concentração final de 2000ng. Para cada reação, utilizou-se de 2,0 μ L de *buffer*, 0,8 μ L de dNTP, 2,0 μ L de *Random Primers*, 1,25 μ L de *Multiscribe Reverse Transcriptase*[™] e 1,0 μ L de *RNase Inhibitor*.

A quantidade citada de cada reagente foi multiplicada pelo número de amostras de RNA total para a confecção de um “Mix” de reação. Posteriormente, 6,8 μ L deste Mix foi adicionado a

cada microtubo de PCR de 0,2 mL. Em seguida foram adicionados as quantidades otimizadas de RNA total para cada amostra nos microtubos devidamente identificados em um volume final de 3,2µL. Por fim, o volume final de 10µL de cada reação foram submetidos ao termociclador onde foram realizados os seguintes ciclos de termociclagem para a síntese de cDNA: 25°C por 10 minutos e 37°C por 120 minutos.

Por fim, as amostras de cDNA foram armazenadas em um freezer a uma temperatura de -20°C.

3.4.4 qPCR (PCR quantitativa em tempo real)

A quantificação da expressão gênica dos sete genes avaliados neste estudo (Tabela 5) foi realizada a partir da análise da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) realizadas no aparelho *7500 Real-Time PCR System*® (*Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*) disponível no Laboratório de Citogenômica do Câncer. As reações foram preparadas utilizando-se do *TaqMan*® *Universal PCR Marter Mix* (*Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*) otimizado para reações com sonda *TaqMan assay*® (Tabela 5) e contendo a *AmpliTaq Gold* DNA polimerase, os dNTPs e tampão otimizados.

Tabela 5: Genes avaliados por qPCR envolvidos nos mecanismos de reparo em DSBs no DNA.

| GeneBank | Símbolo | Nomenclatura | Mecanismo de reparo | TaqMan Assay | SNP* |
|-----------|--------------|--|-----------------------------------|---------------|-----------|
| NM_000051 | <i>ATM</i> | Ataxia telangiectasia mutated | Sinalização de DSB | Hs01112344_m1 | rs228593 |
| NM_007294 | <i>BRCA1</i> | Breast cancer 1, early onset | Supressor tumoral e Reparo por HR | Hs01556191_m1 | rs479319 |
| NM_000059 | <i>BRCA2</i> | Breast cancer 2, early onset | Supressor tumoral e Reparo por HR | Hs01037423_m1 | rs9567623 |
| NM_002875 | <i>RAD51</i> | RAD51 recombinase | Reparo por HR | Hs00947967_m1 | rs1801320 |
| NM_021141 | <i>XRCC5</i> | X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 | Reparo por NHEJ | Hs00897854_m1 | rs3835 |
| NM_001469 | <i>XRCC6</i> | X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster | Reparo por NHEJ | Hs00750856_s1 | rs2267437 |

| | | cells 6 | | | |
|-------------|-------------|-------------------------------|-----------------|---------------|-----------|
| NM_002312 | <i>LIG4</i> | Ligase IV, DNA, ATP-dependent | Reparo por NHEJ | Hs00934061_m1 | rs1805388 |
| NM_004048.2 | <i>B2M</i> | Beta-2-Microglobulin | Gene Endógeno | Hs99999907_m1 | - |
| NM_021009.5 | <i>UBC</i> | Ubiquitin C | Gene Endógeno | Hs00824723_m1 | - |

***SNP**, Single Nucleotides Polymorphisms. SNPs avaliados no estudo de Ribeiro Jr. (2013) e Ribeiro Jr. (2014)

Os preparos e armazenamentos dos materiais foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, excetuando o volume final de cada reação otimizado em 10 µL. Para cada reação foram utilizados 5,0 µL de TaqMan PCR Master Mix, 0,5 µL de sonda *TaqMan assay*® e 2,5µL de cDNA (diluído 1:5). Após esta etapa, as placas das reações foram centrifugadas por 1 minuto a 4500 rpm.

As condições para a reação de PCR foram as seguintes: pré-aquecimento a 50° C por 2 minutos, ativação da polimerase a 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação (15 segundos a 95° C) e anelamento e extensão (60 segundos a 60°C). Na preparação das reações foram utilizadas placas de polipropileno para 96 reações (*MicroAmp 96-well Plates, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*) cobertas com adesivos para microplacas ópticas resistentes a álcool e a altas temperaturas (*Optical Adhesive film, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*). Todas as etapas do procedimento descrito foram realizadas com as amostras imersas em gelo com pouca exposição à luz.

Cada amostra foi avaliada em duplicata e foram consideradas para análise somente as amostras cujas diferenças de amplificação não excedeu a 0,8 ciclos ($\Delta Cq \leq 0,8$) (VAN VANDERSON et al., 2002). As duplicatas das amostras que apresentaram diferenças maiores que um ciclo e meio, mesmo após repetição do experimento, foram desconsideradas. Em todas as placas foram realizados controles negativos (NTC) das reações para todos os genes estudados sendo que, para estas reações, foram adicionados 2,5µL de água ao invés de cDNA. Todas as reações que mostraram amplificação para qualquer um dos controles negativos foram desconsideradas.

Adicionalmente, foi utilizado para cada placa e por cada gene estudado, uma amostra de referência (REF), em duplicata, a fim de padronizar e validar todas as placas do experimento. A amostra referência foi composta por cDNA oriundo de mRNA de um *pool* de duas linhagens celulares oriundas de tumores humanos disponibilizada pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP.

Os resultados foram avaliados através do software *Sequence Detection System v1.3* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) para obtenção dos valores de *quantitative cycle* (*Cq*). A partir do *threshold* estabelecido, os valores de *Cq* foram fornecidos pelo *software* do aparelho *7500 Real-Time PCR System®* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) para a realização das análises estatísticas. Ao final de cada corrida os dados foram exportados para planilhas do software Excel para o cálculo dos valores de ΔCq e de $2^{-\Delta Cq}$ tanto dos genes alvos quanto dos genes endógenos (LIVAK et al, 2001). A nomenclatura padrão utilizada para os experimentos da PCR quantitativa em tempo real foi baseada no MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN et. al., 2009).

3.4.5 Validação e definição dos genes endógenos utilizados nas análises dos dados de qPCR.

Tendo em vista a necessidade de validar a estabilidade do nível de expressão de genes candidatos a controles endógenos para os experimentos de qPCR realizados no presente estudo (PFAFFL, 2001; LIVAK, 2001), foi utilizado o software *geNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002) correspondendo a uma ferramenta que permite a identificação estatística dos melhores controles endógenos de um grupo de candidatos a normalizadores para um dado experimento.

O *geNorm* consiste de uma aplicação em Microsoft Excel que calcula automaticamente uma medida (valor M) de estabilidade de expressão para cada gene controle em um dado grupo de amostras ou um fator de normalização quando são selecionados mais de um gene como possíveis candidatos a controle endógeno a partir dos valores de *Cq* obtidos de cada amostra individualmente. Entende-se como gene endógeno estável aquele ou aqueles genes que obtiverem o menor valor de M (VANDESOMPELE et al., 2002). Assim, para este estudo, obtivemos que os genes mais estáveis nas amostras de cDNA obtidas a partir do mRNA da medula óssea de pacientes com SMD submetidos a presente pesquisa foram a $\beta 2$ -microglobulina e *Ubiquitina*.

3.4.6 Validação da qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras de cDNA dos pacientes avaliados.

Sabe-se que a ocorrência de dados classificados como *outliers*, frente às amostras avaliadas em um dado estudo, pode interferir na precisão da estimativa correta das análises realizadas. Assim, inicialmente, antes de qualquer avaliação dos dados para realização de análises estatísticas, a fim de determinar a qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das

amostras dos pacientes avaliados, utilizou-se, neste estudo, o software *Best Keeper* (PFAFFL, 2004).

Com este aplicativo em Excel, pode-se calcular o desvio padrão de cada amostra para cada gene alvo avaliado com base em valores brutos de *Cq*, independentemente da eficiência da amostra (PFAFFL, 2004). As amostras de cada gene com o menor SD é considerada a mais estável. Neste sentido, iniciamos este estudo com um total de 112 amostras de cDNA oriundas de medula óssea de pacientes SMD, mantendo-se, somente o total de 83 amostras para prosseguimento das análises estatísticas.

3.5 Variáveis analisadas

As variáveis analisadas neste estudo foram assim subdivididas:

- Sexo: masculino e feminino;
- Idade (Categorizada de acordo como IPSS-R): ≤ 60 anos, $>60 - \leq 70$ anos, $>70 - \leq 80$ anos e >80 anos;
- Origem: urbano e rural;
- Quanto à classificação OMS (2001/2008) (JAFFE et al., 2001; BRUNNING et al., 2008), os pacientes foram divididos em oito classificações distintas: CRDU (Citopenia Refratária com Displasia de Única Linhagem), ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel), CRDM (Citopenia Refratária com Displasia de Múltiplas Linhagens), AREB I (Anemia Refratária com Excesso de Blastos I), AREB II (Anemia Refratária com Excesso de Blastos II), t-SMD (SMD Secundária ao tratamento), LMMC (Leucemia Mielomonocítica Crônica) e CRDM-SA (Citopenia Refratária com Displasia de Múltiplas Linhagens com presença de Sideroblastos em anel);
- Forma da SMD: os pacientes foram estratificados quanto a forma da doença, sendo definida, de acordo com a classificação OMS em **baixo grau**, correspondendo aos casos de AR, CRDM e ARSA, e **alto grau**, sendo definida pelos casos de AREB I, AREB II e t-SMD (GILL et al., 2016);
- Celularidade da medula óssea: Hipocelular, Normocelular e Hipercelular;
- Celularidade da medula óssea (Categorizada): Normo+Hipercelular (Celularidade normal e hipercelular) e Hipocelular;
- Presença de Fibrose na medula óssea: Presença e Ausência;
- Presença de Displasias na medula óssea: 0, 1 displasia, 2 displasias e 3 displasias;
- Presença de Diseritropoese: Sim e Não;

- Presença de Dismegacariopose: Sim e Não;
- Presença de Micromegacariócito: Sim e Não;
- Presença de Sideroblastos em anel: $\geq 1\%$ - $< 15\%$, $\geq 15\%$ - $< 50\%$ e $\geq 50\%$;
- Faixas de percentagens de Blastos: $\leq 2\%$, $> 2\%$ - $< 5\%$, $5\% - 10\%$ e $> 10\%$;
- Cariótipo:
 - Quanto a alteração: normal e alterado;
 - Cariótipo (Aneuploidia): normal, alterado não aneuploide, aneuploide;
 - Cariótipo (Presença de alteração no 5q): normal, alterado com 5q e alterado sem 5q;
 - Cariótipo (Presença de alteração no 7q): normal, alterado com 7q e alterado sem 7q;
 - Cariótipo (Presença de alteração no 11q): normal, alterado com 11q e alterado sem 11q;
 - Cariótipo (Complexo - alterações no mesmo clone): normal, 1 alteração, 2 alterações e 3 ou mais alterações;
 - Cariótipo (presença de alterações estruturais): 1 alteração, 2 alterações, 3 ou mais alterações;
 - Quanto ao prognóstico (IPSS-R): muito favorável, favorável, intermediário, desfavorável e muito desfavorável;
- Classificação dos valores de hemoglobina (HB) de acordo com o IPSS-R: $\geq 10\text{g/dL}$, $8 - < 10\text{g/dL}$ e $< 8\text{g/dL}$;
- Classificação dos valores de hemoglobina (HB) (categorizada): $\geq 8\text{g/dL}$ e $< 8\text{g/dL}$;
- Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) de acordo com o IPSS-R: ≥ 800 por mm^3 e < 800 por mm^3 ;
- Classificação dos valores de plaquetas de acordo com o IPSS-R: ≥ 100.000 por mm^3 , $\geq 50.000 - < 100.000$ por mm^3 e < 50.000 por mm^3 ;
- Classificação do número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS-R: 1 citopenia, 2 citopenias e 3 citopenias;
- Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R (categorizada): muito baixo e baixo versus intermediário, alto e muito alto;
- Classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS (MALCOVATI et al., 2011): muito baixo e baixo versus intermediário, alto e muito alto;
- Dependência Transfusional: sim e não (utilizando-se o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (MALCOVATI et al., 2005);
- Óbito: sim e não;
- Evolução para LMA: sim e não.

3.6 Análises estatísticas

3.6.1 Análises estatísticas para a avaliação dos dados de expressão gênica

Os resultados referentes às análises do nível de expressão gênica foram analisados com base no valor de cada Cq (quantitative cycle), para cada amostra de cDNA (em duplicata). Para normalizar os valores de Cq , de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o Cq determinado para uma amostra foi subtraído da média geométrica dos Cq 's dos genes constitutivos utilizados (*Beta-2-Microglobulin* e *Ubiquitin*) da mesma amostra, gerando assim os valores de ΔCq e, conseqüentemente, de $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK et al, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados de cada variável analisada apresentavam-se com distribuição normal (dados paramétricos, com grupos com menos de 50 casos). Os valores de *outliers* foram retirados (quando ocorreram), por não representarem os resultados que o estudo tinha o objetivo de generalizar (p-valor >0.05 para o teste de Shapiro-Wilk).

Os dados paramétricos foram analisados através do teste t de Student, para a comparação da média entre dois grupos, e do teste de ANOVA, para a comparação das médias em variáveis com mais de dois grupos. O pós-teste (*post-hoc*) para a ANOVA foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Caso houvesse homogeneidade de variâncias (p-valor $\geq 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Tukey. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados (p-valor <0,05), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Games-Howell.

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

Os dados sobre o nível de expressão gênica (valores de $2^{-\Delta Cq}$) foram expressos em média \pm desvio padrão (SD), com intervalo de confiança (CI) (máximo e mínimo), a fim de determinar a possível associação entre o nível de expressão dos genes frente cada variável analisada. O nível de significância estatística utilizado foi de $p < 0,05$ e todas as análises foram efetuadas com recurso do software SPSS para Windows (versão 20.0).

3.6.2 Análises estatísticas para a avaliação da associação dos dados de expressão dos genes avaliados e a sobrevida dos pacientes com SMD baseado no software *Cutoff Finder*.

As sobrevidas globais dos pacientes com SMD em relação ao nível de expressão dos genes de reparo em DSBs foram avaliadas pelo método de Kaplan-Meier considerado-se como evento o óbito por qualquer causa, sendo o tempo de acompanhamento a data de diagnóstico até a data do óbito (descrita em meses). As diferenças entre as curvas de sobrevivência foram feitas pelo teste de *LogRank*. Para esta análise, a variável de expressão gênica foi reajustada para pontos de corte (*Cutoff points*) estabelecidos pelo algoritmo do software *Cutoff Finder* (BUDCZIES et al., 2012).

O *Cutoff Finder* é uma ferramenta on-line disponível gratuitamente (<http://molpath.charite.de/cutoff>) que disponibiliza um conjunto de métodos de otimização e visualização de pontos de *cut-off* para avaliação de novos potenciais biomarcadores de dados moleculares (BUDCZIES et al., 2012), tais como os dados provenientes de análises de expressão gênica e protéica, utilizando-se da estatística R como suporte para a visualização e computação estatística (CORE TEAM, 2012). Para as análises de sobrevida, foi utilizada a ferramenta de **análise de significância de correlação com a variável de sobrevivência pelo teste de log-rank** proveniente do software *Cutoff Finder* (BUDCZIES et al., 2012).

Este método se encaixa para os modelos de análises de risco proporcional de *Cox* para uma variável dicotomizada (binária) e uma variável de análise de sobrevida (BUDCZIES et al., 2012). A análise de sobrevida é executada utilizando-se das funções *coxph* e *survfit* do pacote estatístico R (THERNEAU; LUMLEY, 2011). O ponto de corte ideal é definido como o ponto com o desdobramento mais significativo obtido pelo teste de *log-rank* (BUDCZIES et al., 2012) aumentando o poder do teste em afastar a hipótese nula dos resultados. O *odds-ratio*, incluindo intervalos de confiança de 95%, também são calculados por essa ferramenta do software *Cutoff Finder* (BUDCZIES et al., 2012).

3.6.3 Análises estatísticas para a avaliação dos dados de expressão gênica *versus* a frequência gênica dos polimorfismos de cada gene

Os resultados referentes às associações entre os níveis de expressão gênica, as frequências observadas na análises das distribuições genotípicas dos sete polimorfismos avaliados no presente estudo (Tabela 5) e as variáveis sócio-demográficas e clínicas dos pacientes com SMD foram avaliadas com base no valor de $2^{-\Delta Cq}$ para cada gene e a frequência dos polimorfismos avaliados.

Todos os genótipos para os sete polimorfismos avaliados neste estudo (Tabela 5) foram divididos e analisados em três modelos genéticos distintos, de acordo com estudo por Clarke et al. (2011):

1. *modelo de distribuição genotípica* - correspondendo à associação do genótipo selvagem *versus* o genótipo heterozigótico *versus* o genótipo polimórfico;

2. *modelo genético dominante* - correspondendo à associação do genótipo selvagem *versus* o genótipo heterozigoto + genótipo polimórfico e

3. *modelo genético recessivo* - correspondendo à associação do genótipo polimórfico *versus* o genótipo heterozigoto + genótipo selvagem.

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados apresentavam-se em uma distribuição normal (dados paramétricos). Os dados paramétricos foram analisados através do teste de ANOVA *two-way*. A ANOVA *two-way* compara a média das diferenças entre os grupos que foram divididos em duas variáveis independentes (presença de polimorfismos *versus* variável clínica, por exemplo, sendo chamadas de fatores) e associadas a uma variável dependente (nível de expressão do gene). O objetivo principal de uma ANOVA *two-way* é entender se existe uma interação entre as duas variáveis independentes sobre a variável dependente.

Os dados sobre o nível de expressão gênica (valores de $2^{-\Delta Cq}$) foram expressos em média \pm desvio padrão (SD), com intervalo de confiança (CI) (máximo e mínimo), a fim de determinar a possível associação entre a expressão de cada gene e a frequência de cada polimorfismos *versus* cada variável analisada. O nível de significância estatística utilizado foi de $p < 0,05$ e todas as análises foram efetuadas com recurso do software SPSS para Windows (versão 20.0).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos pacientes

O número amostral deste estudo (n) foi igual a 83 pacientes para o grupo SMD e 10 voluntários para o grupo controle (Tabela 6). Quanto às variáveis sócio-demográfica dos pacientes com SMD, observou-se que, frente à variável de gênero, foram incluídos neste estudo 37 indivíduos (44,6%) do sexo masculino e 46 (55,4%) do sexo feminino para o grupo SMD (Tabela 6).

Frente a variável idade, esta foi dividida em duas faixas: Idade categorizada (≤ 60 anos, >60 anos) e idade categorizada pelo IPSS 2012 (GREENBERG et al, 2012) (≤ 60 anos, $>60 - \leq 70$ anos, $>70 - \leq 80$ anos e >80 anos). Para o grupo SMD, a média de idade foi de 64,6 anos (mediana = 67 anos / mínimo de 22 anos e máximo de 91 anos) com uma predominância de pacientes com idade superior a 60 anos em 65,1% (54/83) dos casos avaliados (Tabela 6).

Quanto à variável origem (dividida em urbano ou rural), foram avaliados um total de 52 pacientes de origem urbana (65,8%) e 27 pacientes de origem rural (34,2%) dentro do grupo SMD (Tabela 6). Adicionalmente, 95,8% dos pacientes afirmam que tiveram exposição prévia à tóxicos ao diagnóstico de SMD (Tabela 6).

Tabela 6: Caracterização descritiva das variáveis sócio-demográficas dos pacientes com SMD.

| | Variáveis | Nº | % |
|--|----------------------|----|--------|
| Grupo | Caso | 83 | 100,0% |
| Sexo | Feminino | 46 | 55,4% |
| | Masculino | 37 | 44,6% |
| Idade (Categorizada de acordo com o IPSS 2012) | ≤ 60 anos | 29 | 34,9% |
| | $>60 - \leq 70$ anos | 19 | 22,9% |
| | $>70 - \leq 80$ anos | 22 | 26,5% |
| | >80 anos | 13 | 15,7% |
| Idade (categorizada) | <60 anos | 29 | 34,9% |
| | ≥ 60 anos | 54 | 65,1% |
| Origem | Urbana | 52 | 65,8% |
| | Rural | 27 | 34,2% |
| Exposição à tóxicos | Não | 1 | 4,2% |
| | Sim | 23 | 95,8% |

Em relação às variáveis clínicas dos pacientes com SMD, identificou-se que 74 (89,15%) dos pacientes foram classificados como SMD primária e 9 (10,8%) foram classificados como SMD secundária ao tratamento (t-SMD) (Tabela 7). Na análise da variável da classificação OMS

(2001/2008) (JAFFE et al., 2001; BRUNNING et al., 2008), observamos 9 pacientes (10,8%) como CRDU, 12 (14,5%) pacientes como ARSA, 37 (44,6%) pacientes como CRDM, 4 (4,8%) pacientes classificados como AREB I, 9 (10,8%) pacientes como AREB II, 9 (10,8%) pacientes como SMD secundária, 2 (2,4%) pacientes como LMMC e 2 (2,4%) como CRDM-AS (Tabela 7). Quanto à forma da SMD, foi observado que 60 (82,2%) dos casos foram inseridos nas formas de baixo grau da doença e 13 (17,8%) foram definidas como formas de alto grau (Tabela 7).

Tabela 7: Estratificação descritiva diagnóstica dos pacientes pela classificação da WHO (2001/2008).

| | Variáveis | Nº | % |
|-------------------------------------|------------|----|-------|
| Classificação da WHO | CRDU | 9 | 10,8% |
| | ARSA | 12 | 14,5% |
| | CRDM | 37 | 44,6% |
| | AREB I | 4 | 4,8% |
| | AREB II | 9 | 10,8% |
| | SMD-sec | 9 | 10,8% |
| | LMMC | 1 | 1,2% |
| | CRDM-SA | 2 | 2,4% |
| Classificação da WHO (categorizada) | CRDU | 9 | 10,8% |
| | ARSA | 12 | 14,5% |
| | CRDM | 37 | 44,6% |
| | AREB | 13 | 17,7% |
| | LMMC | 2 | 2,4% |
| | SMD-sec | 9 | 10,8% |
| Formas da SMD | Baixo Grau | 60 | 82,2% |
| | Alto Grau | 13 | 17,8% |

Quanto à variável celularidade da medula óssea, estabelecida pela biópsia da medula óssea dos pacientes com SMD, foi dividida em hipocelular, normocelular e hiperclular e categorizada em hipocelular *versus* normocelular + hipocelular. Foram observados que 11 pacientes (20,4%) apresentaram medula óssea hipocelular, seguidos de 9 pacientes com medula óssea normocelular (16,7%) e 34 pacientes com medula hiperclular (63,0%) (Tabela 8). Adicionalmente, foi observado que 11 (52,4%) pacientes apresentaram fibrose na medula óssea (Tabela 8).

Quanto a presença de displasias na medula óssea, observou-se que 22 (50,0%) dos pacientes apresentaram dois tipos de displasias, corroborando com a predominância de 72,7% dos casos inseridos na faixa de presença de 2-3 displasias na medula óssea (Tabela 8). Dentre as principais displasias observadas no mielograma ao diagnóstico, observou-se que houve um predomínio de achados de disgranulopoiese, em 31 (70,5%) casos, seguidos de diseritropoiese

(35/79,5%), dismegacariopoiese (20 / 45,5%) e presença de micromegacariócitos (11/22,4%) na medula óssea dos pacientes com SMD (Tabela 8).

Ao analisar a celularidade da medula óssea, foi possível identificar que 59 (71,1%) pacientes não apresentaram sideroblastos em anel na análise do mielograma ao diagnóstico (Tabela 8). Em contrapartida, observou-se que 6 (7,2%) pacientes foram inclusos na faixa de 1% - 14%, seguidos de 6 (7,2%) pacientes inclusos na faixa de $\geq 15\%$ - $< 50\%$ e, por fim, 12 (14,5%) dos pacientes apresentaram uma contagem superior a 50% de sideroblastos em anel na medula óssea, ao diagnóstico (Tabela 8).

Quanto à percentagem de blastos observados ao mielograma, identificou-se que 71 (74,7%) pacientes apresentaram menos que 2% de blastos na medula óssea ao diagnóstico (Tabela 6). É importante ser citado que 8 (8,4%) pacientes foram inclusos na faixa de $> 2\%$ - $< 5\%$ de presença de blastos, seguidos de 7 (7,4%) pacientes inseridos na faixa de 5%-10% e 9 (9,5%) pacientes inseridos na faixa de mais que 10% de blastos na medula óssea (Tabela 8).

Tabela 8: Caracterização descritiva das variáveis clínicas relacionadas aos achados da medula óssea em pacientes com SMD.

| | Variáveis | Nº | % |
|------------------------------------|---------------------------|----|-------|
| Celularidade da medula óssea | Hipocelular | 11 | 20,4% |
| | Normocelular | 9 | 16,7% |
| | Hiper celular | 34 | 63,0% |
| Celularidade (categorizada) | Hipocelular | 11 | 20,4% |
| | Normocelular+hipercelular | 43 | 79,6% |
| Fibrose na medula óssea | Ausência | 10 | 47,6% |
| | Presença | 11 | 52,4% |
| Displasias na medula óssea | 1 | 12 | 27,3% |
| | 2 | 22 | 50,0% |
| | 3 | 10 | 22,7% |
| Presença de diseritropoiese | Não | 9 | 20,5% |
| | Sim | 35 | 79,5% |
| Presença de dismegalocariopoiese | Não | 24 | 54,5% |
| | Sim | 20 | 45,5% |
| Presença de disgranulopoiese | Não | 13 | 29,5% |
| | Sim | 31 | 70,5% |
| Presença de micromegariocito | Não | 38 | 77,6% |
| | Sim | 11 | 22,4% |
| Presença de Sideroblastos em anel | 0% | 59 | 71,1% |
| | $\geq 1\%$ - $\leq 14\%$ | 6 | 7,2% |
| | $\geq 15\%$ - $< 50\%$ | 6 | 7,2% |
| | $\geq 50\%$ | 12 | 14,5% |
| Faixas das percentagens de blastos | $\leq 5\%$ | 69 | 83,1% |

| | | |
|------------|---|------|
| >5% - ≤10% | 6 | 7,2% |
| >10% | 8 | 9,6% |

Quanto à análise citogenética dos pacientes do grupo SMD, observou-se que cinquenta e seis pacientes (67,5%) apresentaram resultados e 27 (32,5%) apresentaram ausência de metáfase ao diagnóstico (Tabela 9 e 10). Dentre os 56 pacientes com resultado citogenético (Figura 10), identificou-se que 32 (57,1%) pacientes possuíam cariótipo normal (Tabela 10) e 24 (42,9%) pacientes apresentaram cariótipo alterado, dos quais 16 (28,6%) pacientes apresentaram uma única alteração e 13 (72,2%) pacientes apresentaram clones com 1 (um) alteração estrutural. Adicionalmente, 14 (25,0%) pacientes apresentaram a presença de ganho ou perda de cromossomos (aneuploidias) dentre os pacientes com cariótipo alterado (Tabela 9 e Tabela 10).

Quanto às alterações citogenéticas mais comuns que acometem os pacientes com SMD, observou-se que 9 (16,1%) pacientes apresentaram alteração no cromossomo 5 (-5/5q-) (Tabela 9 e Tabela 10). Adicionalmente, foram observadas outras alterações frequentes em SMD, tais como as envolvendo os cromossomos 7 (-7/7q-) e 11 (-11/11q-), sendo observado em 7,1% dos casos avaliados (Tabela 9 e Tabela 10).

Dos pacientes com resultados (exceto os pacientes com SMD-sec), quanto à classificação prognóstica frente ao resultado citogenético estabelecido pelo IPSS-R (GREENBERG et al., 2012), verificou-se que houve um predomínio de pacientes com prognóstico favorável em 38 (74,5%) casos (Tabela 9).

Tabela 9: Caracterização descritiva dos resultados dos cariótipos e seu impacto prognóstico em pacientes com SMD ao diagnóstico.

| | Variáveis | Nº | % |
|--|--|----|-------|
| Cariótipo (Alterado versus Normal) | Normal | 32 | 57,1% |
| | Alterado | 24 | 42,9% |
| Cariótipo (Aneuploide versus não Aneuploide) | Normal | 32 | 57,1% |
| | Alterado não Aneuploide | 10 | 17,9% |
| | Aneuploide | 14 | 25,0% |
| Cariótipo (Presença de alteração no 5q) | Normal | 32 | 57,1% |
| | Alterado com 5q- | 9 | 16,1% |
| | Alterado sem 5q- | 15 | 26,8% |
| Cariótipo (Presença de alteração no 7q) | Normal | 32 | 57,1% |
| | Alterado com 7q- | 4 | 7,1% |
| | Alterado sem 7q- | 20 | 35,7% |
| Cariótipo (Presença de alteração no 11q) | Normal | 32 | 57,1% |
| | Alterado com 11q- | 4 | 7,1% |
| | Alterado sem 11q- | 20 | 35,7% |
| Cariótipo (alterado) | Normal | 32 | 57,1% |
| | 1 alteração | 16 | 28,6% |
| | 2 alterações | 4 | 7,1% |
| | 3 ou mais alterações | 4 | 7,1% |
| Cariótipo (Presença de Alterações Estruturais) | 1 alteração estrutural | 13 | 72,2% |
| | 2 alterações estruturais | 3 | 16,7% |
| | 3 ou mais alterações estruturais | 2 | 11,1% |
| Classificação do cariótipo de acordo com o IPSS-R | Muito favorável | 1 | 2,0% |
| | Favorável | 38 | 74,5% |
| | Intermediário | 9 | 17,6% |
| | Desfavorável | 0 | 0,0% |
| | Muito desfavorável | 3 | 5,9% |
| Classificação do cariótipo de acordo com o IPSS-R (categorizada) | Muito favorável + favorável | 39 | 76,5% |
| | Intermediário + desfavorável+ muito desfavorável | 12 | 23,5% |

Tabela 10: Descrição clínica dos pacientes com SMD.

| Paciente | Sexo | Idade | Celularidade | Sideroblastos (%) | Blastos (%) | Cariótipo - ISCN 2013 | OMS | IPSS-R | DP | e-LMA | Óbito |
|----------|------|-------|---------------|-------------------|-------------|--|---------|------------------------|----|-------|-------|
| 1 | F | 28 | - | 50 | 0 | 46,XX[20] | AR | Baixo (>1.5-3) | S | N | N |
| 2 | M | 24 | - | 0 | 0 | 46,XY[9] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | S | N | S |
| 3 | F | 78 | - | 0 | 0 | 46,X,i(x)(q10),del(17)(q22q23.3)[7]/46,XX[13] | AR | Baixo (>1.5-3) | N | N | - |
| 4 | F | 69 | Normocelular | 0 | 0 | 46,XX,del(5)(q12q33)[18]/46,XX[2] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | S | N | N |
| 5 | F | 45 | Normocelular | 0 | 0 | 46,XX[7] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | N | - | - |
| 6 | F | 41 | Hipocelular | 0 | 0 | Ausência de Metáfase | CRDM | - | S | - | - |
| 7 | F | 83 | Normocelular | 0 | 0 | 46,XX[20] | AR | Muito Baixo (<=1.5) | N | N | N |
| 8 | M | 85 | Hipocelular | 38 | 1 | 46,XY[15] | CRDM-SA | Baixo (>1.5-3) | S | N | S |
| 9 | M | 47 | Normocelular | 2 | 4 | 47,XY,+mar[5]/46,XY,del(5)(q31)[5]/46,XY[15] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | S | N | S |
| 10 | M | 67 | Normocelular | 0 | 37 | Ausência de Metáfase | AREB II | - | - | S | - |
| 11 | M | 30 | - | 0 | 2 | 46,XY[24] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | N | N | N |
| 12 | M | 55 | - | 0 | 0 | 46,XY[15] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | N | N | N |
| 13 | M | 53 | - | 0 | 0 | 46,XY[20] | CRDM | Intermediário (>3-4.5) | S | N | - |
| 14 | F | 63 | Hiper celular | 0 | 0 | 46,XX[20] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | N | N | - |
| 15 | F | 70 | Hiper celular | 66 | 0 | Ausência de Metáfase | ARSA | - | S | N | - |
| 16 | M | 66 | Hiper celular | 18 | 0 | 46,XY[17] | LMMC I | Baixo (>1.5-3) | N | S | S |
| 17 | M | 91 | - | 30 | 1 | 46,X-Y[4]/46,XY[16] | ARSA | Muito Baixo (<=1.5) | N | N | - |
| 18 | M | 62 | Hiper celular | 0 | 18 | 47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2] | AREB II | Muito Alto (>6) | S | N | S |
| 19 | F | 64 | - | 0 | 0 | 46,XY[9] | SMD-sec | - | N | N | N |
| 20 | F | 84 | - | 0 | 0 | 46,XX,del(20)(q13.1)[7]/46,XX[16] | AR | Baixo (>1.5-3) | - | - | - |
| 21 | F | 71 | Hiper celular | 0 | 0 | 46,XX[6] | AR | Muito Baixo (<=1.5) | N | N | N |
| 22 | F | 50 | Hiper celular | 37 | 1 | 46,XX[11] | ARSA | Muito Baixo (<=1.5) | N | N | N |
| 23 | F | 71 | - | 0 | 3 | Ausência de Metáfase | CRDM | - | N | N | N |
| 24 | F | 77 | - | 0 | 18 | Ausência de Metáfase | AREB II | - | - | S | S |
| 25 | M | 61 | Hiper celular | 53 | 2 | 46,XY[20] | CRDM | Muito Baixo (<=1.5) | S | N | N |
| 26 | M | 45 | Hipocelular | 0 | 0 | 47,XY,+mar[3]/46,XY[17] | CRDM | Alto (>4.5-6) | N | N | N |
| 27 | M | 66 | Hiper celular | 0 | 6 | 46,XY[20] | AREB I | Intermediário (>3-4.5) | N | N | - |
| 28 | M | 70 | Hiper celular | 0 | 2 | Ausência de Metáfase | CRDM | - | N | - | - |
| 29 | M | 88 | - | 0 | 28 | 46,XY[17] | AREB II | Muito Alto (>6) | S | S | S |
| 30 | M | 81 | Hiper celular | 70 | 0 | 46,XX[20] | ARSA | Baixo (>1.5-3) | S | N | - |
| 31 | M | 66 | Hiper celular | 0 | 17 | Ausência de Metáfase | AREB II | - | S | S | S |
| 32 | F | 74 | Hipocelular | 0 | 0 | Ausência de Metáfase | SMD-sec | - | N | N | - |
| 33 | M | 80 | - | 0 | 8 | 47,XY,+8[12]/46,XY[8] | AREB I | Intermediário (>3-4.5) | N | S | S |
| 34 | M | 88 | Hiper celular | 0 | 0 | 46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | S | S | S |
| 35 | F | 87 | - | 0 | 7 | 46,XX[20] | SMD-sec | - | N | N | N |
| 36 | F | 41 | Normocelular | 80 | 3 | Ausência de Metáfase | ARSA | - | S | N | - |
| 37 | F | 66 | Hiper celular | 0 | 0 | 46,XX[25] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | N | N | - |
| 38 | M | 68 | Hiper celular | 0 | 1 | 46,XY,del(5)(q15q33)[7]/46,XY[11] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | S | N | - |
| 39 | M | 81 | - | 0 | 0 | Ausência de Metáfase | CRDM | - | N | N | - |
| 40 | F | 30 | Hipocelular | 2 | 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] | AREB II | Muito Alto (>6) | S | N | S |

| | | | | | | | | | | | |
|----|---|----|--------------|----|-----|---|---------|------------------------|---|---|---|
| 41 | M | 62 | - | 0 | 0 | Ausência de Metáfase | CRDM | - | - | N | N |
| 42 | M | 41 | Hipocelular | 0 | 0 | 46,XY[10] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | N | N | N |
| 43 | M | 65 | Hipercelular | 0 | 2 | 47,XY,+mar[5],46,XY[11] | CRDM | Intermediário (>3-4.5) | S | N | S |
| 44 | F | 44 | Normocelular | 5 | 0 | Ausência de Metáfase | CRDM | - | S | N | S |
| 45 | M | 77 | - | 0 | 0 | 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] | CRDM | Alto (>4.5-6) | S | N | S |
| 46 | M | 82 | Hipercelular | 0 | 1 | 89,XXY,-20,-22,-Y[4]/46,XY,del(16)(?q22)[5]/46,XY[11] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | S | N | N |
| 47 | M | 49 | Hipercelular | 0 | 3 | 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] | CRDM | Muito Alto (>6) | S | N | S |
| 48 | M | 45 | Hipercelular | 0 | 0 | 46,XY[8] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | N | S | S |
| 49 | M | 48 | Hipocelular | 0 | 0 | 46,XY[20] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | N | N | N |
| 50 | M | 63 | Hipercelular | 12 | 10 | 37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/46,XY,del(5)(q15q33)[5]/46,XY[6] | AREB II | Muito Alto (>6) | S | N | N |
| 51 | F | 56 | Hipercelular | 0 | 0 | 46,XX[20] | CRDM | Muito Baixo (<=1.5) | N | N | N |
| 52 | F | 71 | Hipercelular | 24 | 1 | 46,XX[25] | CRDM-SA | Baixo (>1.5-3) | S | - | - |
| 53 | M | 80 | - | 4 | 1 | 46,XX[20] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | S | N | S |
| 54 | F | 58 | Hipocelular | 0 | 2 | Ausência de Metáfase | CRDM | - | S | S | S |
| 55 | F | 66 | Hipercelular | 48 | 4 | Ausência de Metáfase | ARSA | - | S | N | N |
| 56 | F | 40 | - | 0 | 0 | 46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(?q25)[7]/46,XX[4] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | S | N | S |
| 57 | F | 57 | Hipercelular | 0 | 2 | 46,XX[10] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | S | N | - |
| 58 | F | 74 | Hipercelular | 0 | 1 | Ausência de Metáfase | CRDM | - | N | N | N |
| 59 | F | 72 | - | 0 | 17 | Ausência de Metáfase | AREB II | - | S | N | S |
| 60 | F | 62 | - | 0 | 0 | Ausência de Metáfase | CRDM | - | S | N | N |
| 61 | F | 41 | Hipocelular | 0 | 0 | 44,XX,-13,-17[4]/46,XX[5] | CRDM | Intermediário (>3-4.5) | S | N | N |
| 62 | F | 71 | - | 0 | 0 | 175,XXXXXXXXX,-5,-6,-7,-8,-9,-11,-13,-14[4]/46,XX,del(5)(q15q33)[8]/46,XX[19] | SMD-sec | - | - | N | N |
| 63 | F | 70 | - | 0 | 3 | Ausência de Metáfase | AR | - | N | N | N |
| 64 | F | 79 | - | 5 | 2 | Ausência de Metáfase | AR | - | - | N | N |
| 65 | F | 83 | Hipercelular | 69 | 0 | Ausência de Metáfase | ARSA | - | N | N | N |
| 66 | F | 86 | Hipercelular | 80 | 1 | Ausência de Metáfase | ARSA | - | N | N | - |
| 67 | F | 80 | Hipercelular | 77 | 0,5 | 46,XX[5] | ARSA | Baixo (>1.5-3) | S | N | - |
| 68 | F | 77 | - | 0 | 0 | Ausência de Metáfase | SMD-sec | - | S | N | N |
| 69 | F | 46 | Hipercelular | 0 | 0 | 46,XX[8] | AR | Baixo (>1.5-3) | S | N | N |
| 70 | F | 36 | - | 0 | 0 | Ausência de Metáfase | SMD-sec | - | - | N | N |
| 71 | M | 58 | Hipocelular | 70 | 1 | 46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12] | ARSA | Baixo (>1.5-3) | N | S | S |
| 72 | M | 73 | Normocelular | 0 | 5 | 46,XY[11] | AREB I | Alto (>4.5-6) | S | N | - |
| 73 | F | 22 | Hipocelular | 0 | 4 | 46,XX,del(5)(q15q33)[4]/46,XX[18] | CRDM | Muito Baixo (<=1.5) | N | N | S |
| 74 | F | 40 | - | 0 | 0 | Ausência de Metáfase | SMD-sec | - | - | N | N |
| 75 | F | 80 | Hipercelular | 0 | 0 | 47,XX,t(4;11)(q27;q32),+mar[4]/46,XX[16] | CRDM | Baixo (>1.5-3) | N | N | N |
| 76 | F | 77 | Normocelular | 0 | 0 | Ausência de Metáfase | CRDM | - | N | N | N |

| | | | | | | | | | | | |
|----|---|----|-------------|----|-----|----------------------------------|---------|----------------|---|---|---|
| 77 | F | 26 | Hipocelular | 0 | 0 | 46,XX,del(17)(q11.2)[3]/46,XX[4] | SMD-sec | - | N | N | N |
| 78 | F | 72 | Hiperclular | 49 | 0 | 46,XX[12] | ARSA | Baixo (>1.5-3) | N | N | - |
| 79 | F | 60 | - | 0 | 0 | 46,XX[20] | AR | Baixo (>1.5-3) | S | N | N |
| 80 | M | 74 | Hiperclular | 66 | 0 | 45,X,-Y[18]/46,XY[7] | ARSA | Baixo (>1.5-3) | N | N | N |
| 81 | M | 71 | - | 0 | 12 | Ausência de Metáfase | AREB II | - | S | N | S |
| 82 | M | 66 | Hiperclular | 0 | 8,5 | Ausência de Metáfase | AREB I | - | S | N | S |
| 83 | M | 81 | Hiperclular | 53 | 0 | 46,XX[20] | SMD-sec | - | N | N | N |

Legenda: IPSS-R (Sistema Internacional de Score Prognóstico Revisado), OMS (Organização Mundial de Saúde), DP (Dependência Transfusional), e-LMA (Evolução para Leucemia Mielóide Aguda), 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), SMD-sec (SMD relacionada a terapia). S (Sim), N (Não), M (Masculino), F (Feminino).

Figura 10: Representação esquemática de resultados citogenéticos a partir de amostras de medula óssea de pacientes com SMD.



A. Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo normal 46,XX[20] de prognóstico favorável de acordo com a classificação do IPSS-R (GREENBERG et al., 2012). **B.** Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo alterado del(5)(q31)[5] de prognóstico favorável de acordo com a classificação do IPSS-R (GREENBERG et al., 2012). **C.** Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo alterado del(7)(q32)[2] de prognóstico intermediário de acordo com a classificação do IPSS-R (GREENBERG et al., 2012). **D.** Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo alterado del(5)(q31),del(7)(q22),+8[10] de prognóstico desfavorável de acordo com a classificação do IPSS-R (GREENBERG et al., 2012).

Quanto aos achados clínicos observados no sangue periférico dos pacientes com SMD, foi observado, ao hemograma, que 40 (48,2%) pacientes apresentaram Hb inferior a 8g/dL, que 56 (67,5%) pacientes apresentaram contagem de neutrófilos (ANC) superior a 800 por mm^3 e, por fim, 41 (49,4%) pacientes apresentaram contagem de plaquetas superior a 100.000/ mm^3 (Tabela 11).

Frente à variável indicativa do números de citopenias identificados no sangue periférico dos pacientes com SMD, em acordo com os critérios estabelecidos Greenberg e colaboradores (2012), foi observado que houve um predomínio de pacientes com a presença de 1 (uma) citopenia ao hemograma em 37 (38,9%) casos avaliados (Tabela 11).

Tabela 11: Caracterização descritiva das variáveis clínicas relacionadas aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD.

| Variáveis | Nº | % |
|--|--------------------------------------|----------|
| Classificação dos valores de hemoglobina (HB) | $\geq 10\text{g/dL}$ | 21 25,3% |
| | $\geq 8 - <10\text{g/dL}$ | 22 26,5% |
| | $<8 \text{ g/dL}$ | 40 48,2% |
| Classificação dos valores de hemoglobina (HB) (categorizada) | $\geq 8 \text{ g/dL}$ | 43 51,8% |
| | $<8 \text{ g/dL}$ | 40 48,2% |
| Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) | $\geq 800/\text{mm}^3$ | 56 67,5% |
| | $<800/\text{mm}^3$ | 27 32,5% |
| Classificação dos valores de plaquetas | $\geq 100.000/\text{mm}^3$ | 41 49,4% |
| | $\geq 50.000 - <100.000/\text{mm}^3$ | 18 21,7% |
| | $<50.000/\text{mm}^3$ | 24 28,9% |
| | $<50.000/\text{mm}^3$ | 24 28,9% |
| Classificação dos valores de plaquetas (categorizada) | ≥ 50.000 | 59 71,1% |
| | <50.000 | 24 28,9% |
| Número de citopenias de acordo com o IPSS-R | 1 | 47 56,6% |
| | 2 | 20 24,1% |
| | 3 | 16 19,3% |

Frente a variável prognóstica estabelecida pelo IPSS-R (GREENBERG et al., 2012), verificou-se que 7 (13,7%) pacientes foram classificados como muito bom prognóstico; 31 (60,8%) pacientes foram definidos com bom prognóstico; 5 (9,8%) pacientes definidos com prognóstico intermediário e 3 (9,7%) e 5 (9,8%) pacientes foram estabelecidos como prognóstico alto e muito alto, respectivamente (Tabela 12). Em relação à variável prognóstica estabelecida pelo WPSS, observou-se que houve um predomínio de casos de baixo risco, em 18 (36,0%) casos, seguidos de pacientes estabelecidos ao prognóstico de risco intermediário e alto em 32,0% e 14,0% dos casos avaliados, respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12: Estratificação descritiva das variáveis associadas ao risco prognóstico dos pacientes com SMD ao diagnóstico.

| Variáveis | | Nº | % |
|---|-------------------------------|----|-------|
| Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R | Muito baixo (≤ 1.5) | 7 | 13,7% |
| | Baixo ($>1.5-3$) | 31 | 60,8% |
| | Intermediário ($>3-4.5$) | 5 | 9,8% |
| | Alto ($>4.5-6$) | 3 | 5,9% |
| | Muito alto (>6) | 5 | 9,8% |
| Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R (categorizada) | Muito baixo+baixo | 38 | 74,5% |
| | Intermediário+alto+muito alto | 13 | 25,5% |
| Classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS | Muito baixo | 6 | 12,0% |
| | Baixo | 18 | 36,0% |
| | Intermediário | 16 | 32,0% |
| | Alto | 7 | 14,0% |
| | Muito alto | 3 | 6,0% |

Quanto ao acompanhamento terapêutico do paciente com SMD, foi observado que 39 (52,0%) pacientes tornaram-se dependentes transfusionais, quando utilizado o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses estabelecido por Malcovati e colaboradores (2005) (Tabela 13). Por fim, verificou-se que 24 (40,0%) pacientes foram a óbito e 10 (12,8%) pacientes evoluíram para LMA no decorrer da execução do presente estudo (Tabela 13).

Tabela 13: Caracterização descritiva das escolhas terapêuticas e evolução clínica dos pacientes com SMD.

| Variáveis | | Nº | % |
|---------------------------|-----|----|-------|
| Dependência transfusional | Não | 36 | 48,0% |
| | Sim | 39 | 52,0% |
| Óbito | Não | 36 | 60,0% |
| | Sim | 24 | 40,0% |
| Evolução para LMA | Não | 68 | 87,2% |
| | Sim | 10 | 12,8% |

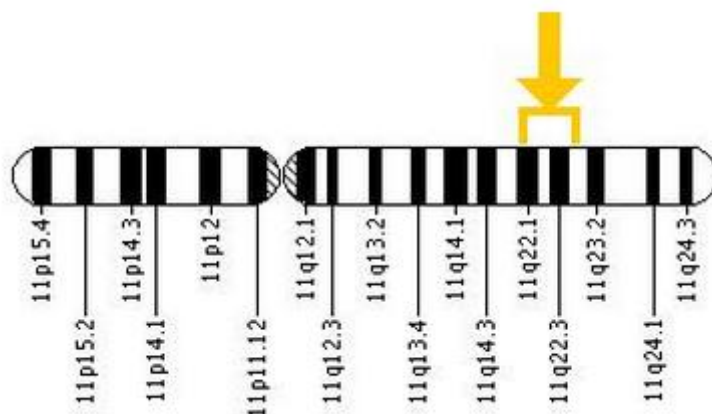
4.2 Análise do nível de expressão gênica por qPCR em amostras de *pool* celular da medula de pacientes com SMD

Os níveis de expressão gênica referente aos genes *XRCC5*, *XRCC6*, *LIG4*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51* e *ATM* para a associação entre os indivíduos controles (n=10) e as amostras de *pool* celular dos pacientes com SMD (n=83), e suas respectivas variáveis clínicas, serão apresentados nas seções a seguir.

4.2.1 Análise do nível de expressão do gene *ATM*

O gene *ATM* está localizado no braço longo do cromossomo 11 na posição 11q22-q23 (Figura 11).

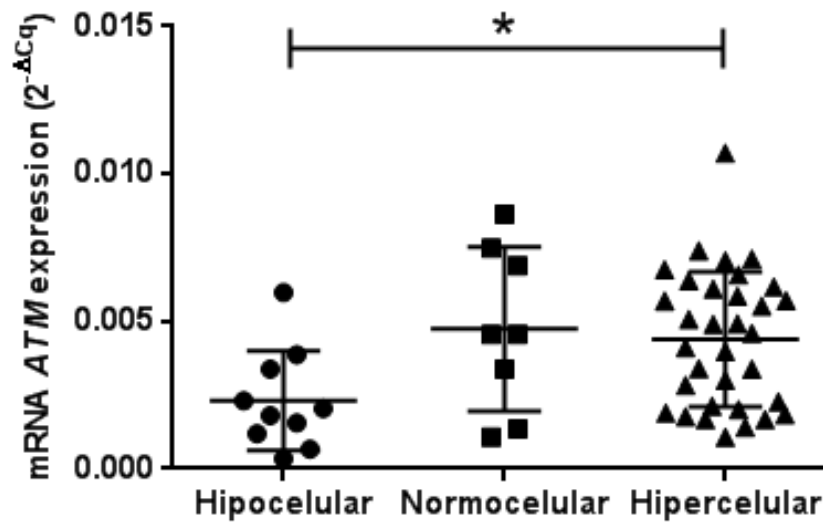
Figura 11: Representação do cromossomo 11 e a indicação (barra amarela) da localização do gene *ATM*.



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

Para o gene *ATM*, encontramos associações significantes com relação à variável de celularidade e presença de alterações displásicas na medula óssea dos pacientes com SMD. Inicialmente, quanto à associação do nível de expressão do gene *ATM* e o perfil de celularidade da medula óssea de pacientes com SMD, identificou-se que o gene *ATM* apresenta uma menor expressão em pacientes com medula hipocelular frente a pacientes com medula hipercelular ($p=0.037$; IC= 0,0001076 - 0,004051) (Figura 12A).

Figura 12: Nível de expressão do gene *ATM* em pacientes com SMD frente a variável Celularidade da MO.

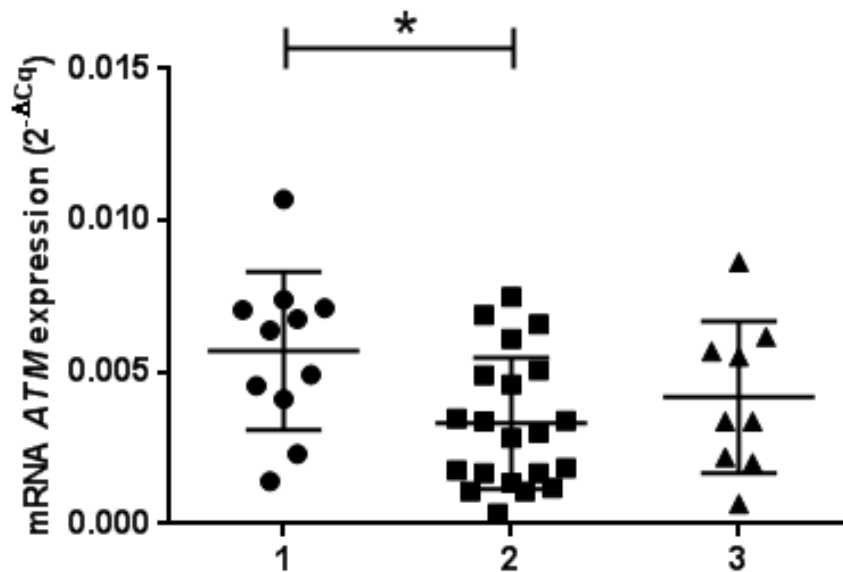


| | | Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$) | | | | | | ANOVA‡ | Teste de Levene | Tukey <i>post-hoc</i> test |
|------------------------------|---------------|---|-------|----------|---------------|----------|----------|--------------|-----------------|----------------------------|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | | | |
| Celularidade da medula óssea | Hipocelular | 10 | 20,0% | 0,002314 | 0,001692 | 0,000344 | 0,005983 | 0.043 | 0.273 | 0.037* |
| | Normocelular | 7 | 14,0% | 0,004349 | 0,002756 | 0,001070 | 0,008631 | | | - |
| | Hiper celular | 33 | 66,0% | 0,004393 | 0,002292 | 0,001067 | 0,01071 | | | 0.037* |

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

Quanto à análise da variável do número de displasias identificados na medula óssea dos pacientes com SMD, identificou-se que pacientes com apenas 1 displasia na MO apresentam uma maior expressão do gene *ATM* frente à pacientes com 2 displasias ($p=0.026$; IC= 0,004526 - 0,0002444) (Figura 13).

Figura 13: Nível de expressão do gene *ATM* em pacientes com SMD frente a variável Displasia na MO.



| | | Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$) | | | | | | ANOVA‡ | Teste de Levene | Tukey <i>post-hoc</i> test |
|---------------------------|--------------|---|-------|----------|---------------|-----------|----------|--------------|-----------------|----------------------------|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | | | |
| Displasia da medula óssea | 1 displasia | 11 | 26,8% | 0,005703 | 0,002603 | 0,001408 | 0,01071 | 0.034 | 0.793 | 0.026* |
| | 2 displasias | 21 | 51,2% | 0,003318 | 0,002161 | 0,000344 | 0,007479 | | | 0.026* |
| | 3 displasias | 9 | 22,0% | 0,004182 | 0,002504 | 0,0006628 | 0,008631 | | | - |

‡ANOVA one-way. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

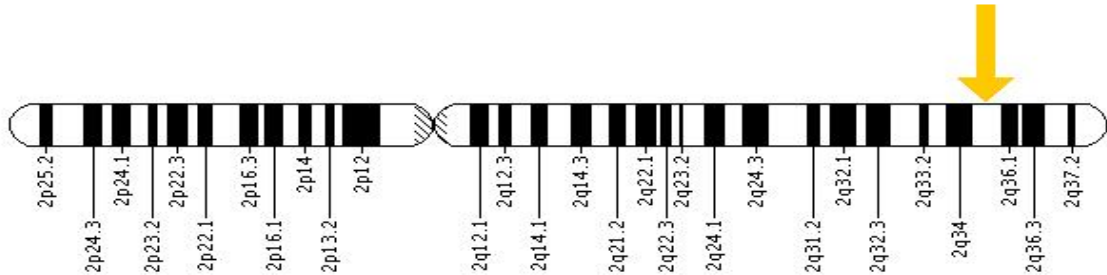
Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Por fim, verificou-se que não houve associação significativa entre o nível de expressão do gene *ATM* frente à associação dos pacientes com SMD *versus* controles como também com as demais variáveis avaliadas neste estudo ($p > 0,05$).

4.2.2 Análise do nível de expressão do gene *XRCC5*

O gene *XRCC5* está localizado no cromossomo 2 na região 2q33.2-36.1 (Figura 14).

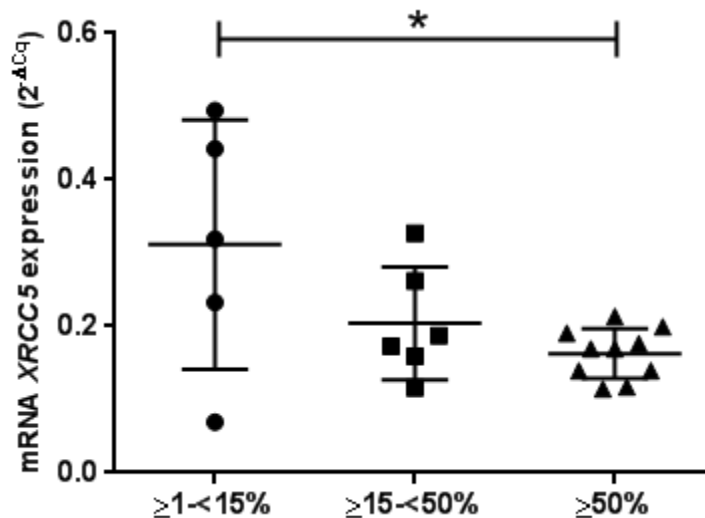
Figura 14: Representação do cromossomo 2 e indicação (barra amarela) da localização do gene *XRCC5*.



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

Para o gene *XRCC5*, foi identificada uma importante associação frente à variável de presença de sideroblastos em anel na medula óssea dos pacientes com SMD. Nesta análise, verificou-se que pacientes que possuem um valor inserido na faixa de 1-14% possuem um maior nível de expressão do *XRCC5* frente aos pacientes inseridos com valores maiores de 50% de sideroblastos em anel na MO ($p=0.024$; IC= 0,2787 - 0,01868) (Figura 15).

Figura 15: Nível de expressão do gene *XRCC5* em pacientes com SMD frente à presença de Sideroblastos em anel na MO.



| | | Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$) | | | | | | | | |
|---|-------------|---|-------|--------|---------------|---------|--------|--------|-----------------|---------------------------|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | ANOVA† | Teste de Levene | Tukey <i>pos-hoc</i> test |
| Presença de Sideroblastos em anel na MO | ≥1% - ≤14% | 5 | 23,8% | 0,3115 | 0,1701 | 0,06905 | 0,4948 | 0.030 | 0,983 | 0,024* |
| | ≥15% - <50% | 6 | 28,6% | 0,2041 | 0,07674 | 0,1161 | 0,3271 | | | - |
| | ≥50% | 10 | 47,6% | 0,1629 | 0,03409 | 0,1144 | 0,2135 | | | 0,024* |

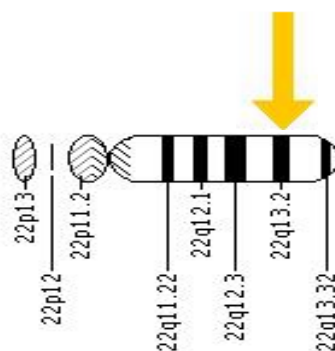
†ANOVA one-way. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.
Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Não foram obtidas associações significantes entre o nível de expressão do gene *XRCC5* e os grupos de pacientes com SMD *versus* controle como também com as demais variáveis analisadas neste estudo ($p > 0,05$).

4.2.3 Análise do nível de expressão do gene *XRCC6*

O gene *XRCC6* está localizado no cromossomo 22 na região 22q13.2 (Figura 16).

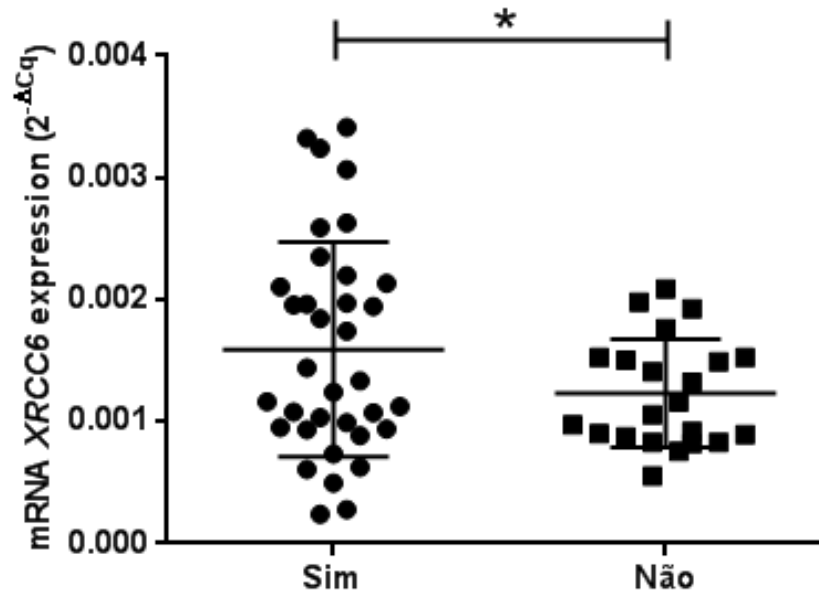
Figura 16: Representação do cromossomo 22 e indicação (barra amarela) da localização do gene *XRCC6*.



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

Destaca-se neste estudo que foram obtidas importantes associações entre o nível de expressão do gene *XRCC6* e as variáveis dependência transfusional, análises citogenéticas e classificação clínica da SMD. Quanto à variável dependência transfusional do grupo de pacientes com SMD, pôde-se observar que pacientes com dependência transfusional, definido de acordo com os critérios estabelecidos por Malcovati e colaboradores (2005), apresentaram um maior nível de expressão do gene *XRCC6* do que pacientes sem dependência transfusional ($p=0.048$; IC= 0,0007118767 - 0,0000039686) (Figura 17).

Figura 17: Nível de expressão do gene *XRCC6* em pacientes com SMD frente ao perfil de dependência transfusional.

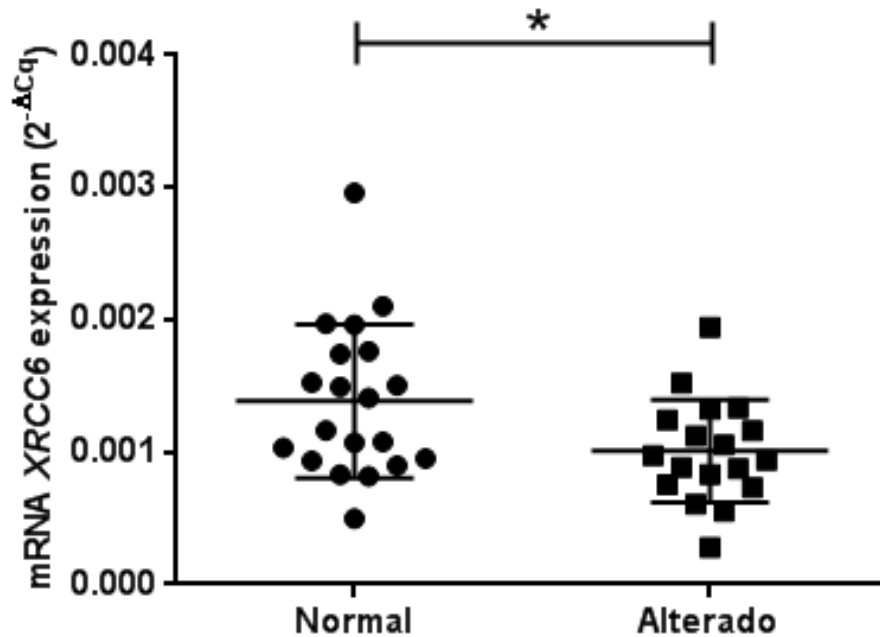


| | | Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$) | | | | | | | |
|----------------------------------|------------|---|-------|-----------|---------------|-----------|-----------|-----------------|--------------|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | Teste de Levene | p-valor† |
| Dependência transfusional | Não | 22 | 38,6% | 0,0012319 | 0,00044438 | 0,0002409 | 0,0005539 | 0.001 | 0.048 |
| | Sim | 35 | 61,4% | 0,0015898 | 0,00088080 | 0,003415 | 0,002090 | | |

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.
Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Na análise do nível de expressão do *XRCC6* e o perfil citogenético dos pacientes com SMD, inicialmente, observou-se que pacientes com cariótipo normal possuem uma maior expressão do gene *XRCC6* em relação à pacientes com resultado de cariótipo alterado ($p=0.023$; IC= 0,0000549605 – 0,0007003144) (Figura 18).

Figura 18: Nível de expressão do gene *XRCC6* em pacientes com SMD frente a variável cariótipo normal versus cariótipo alterado.



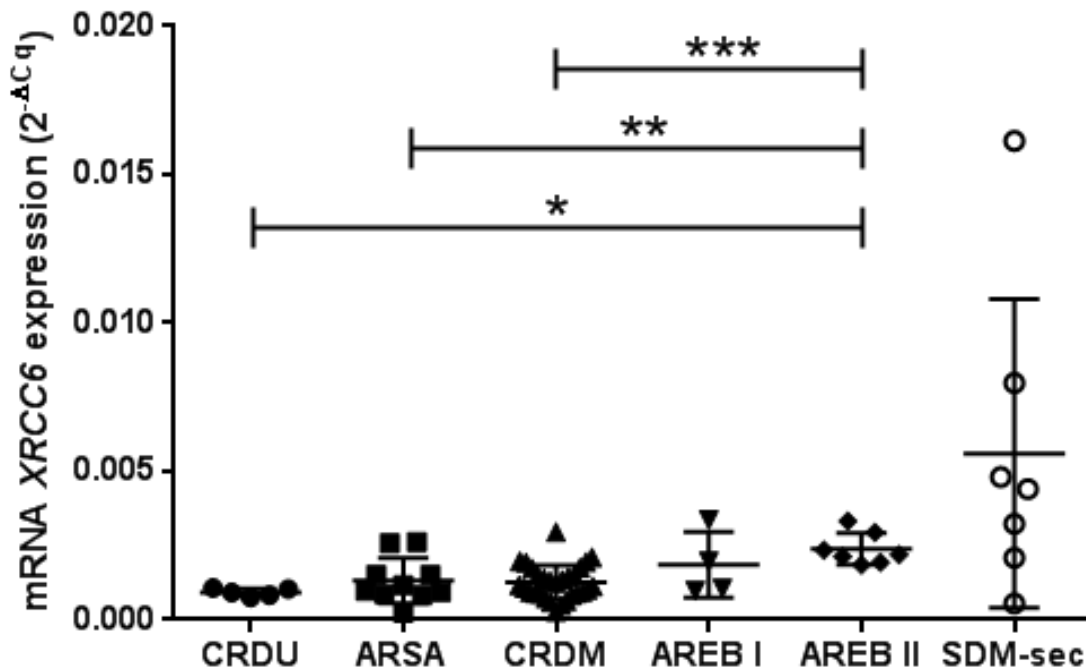
| | | Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$) | | | | | | | |
|---|-----------------|---|-------|----------|---------------|-----------|----------|-----------------|--------------|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | Teste de Levene | p-valor† |
| Cariótipo Normal versus Alterado | Normal | 20 | 52,6% | 0,001385 | 0,0005805 | 0,0004964 | 0,002962 | 0.100 | 0.023 |
| | Alterado | 18 | 47,4% | 0,001008 | 0,0003871 | 0,0002798 | 0,001944 | | |

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

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

Quanto a classificação dos pacientes de acordo com as definições estabelecidas pela OMS (BRUNNING et al., 2008), verificou-se importantes associações entre as categorias Controle, CRDU, ARSA, CRDM, AREB II e SMD-sec frente ao nível de expressão do gene *XRCC6* (Figura 19). Foi identificado que pacientes classificados como AREB II possuem uma maior expressão do gene *XRCC6* em relação aos pacientes diagnosticados como CRDU ($p=0.002$; IC= 0,0022811379 - 0,000657081), ARSA ($p=0.042$; IC= 0,002096340 - 0,0000028616) e CRDM ($p=0.007$; IC= 0,001939520 - 0,000313439) (Figura 19).

Figura 19: Nível de expressão do gene *XRCC6* em pacientes com SMD frente a classificação da OMS (BRUNNING et al., 2008).



| | | Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$) | | | | | | ANOVA‡ | Teste de Levene | Games-Howell <i>post-hoc</i> test |
|----------------------------------|---------|---|--------|-----------|---------------|-----------|----------|----------------|-----------------|--|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | | | |
| Classificação diagnóstica da SMD | CRDU | 5 | 8,06% | 0,0009222 | 0,0001333 | 0,000755 | 0,001073 | 0,00003 | 0,000001 | 0.002* |
| | ARSA | 10 | 16,13% | 0,001329 | 0,0007677 | 0,0002409 | 0,002630 | | | 0.042** |
| | CRDM | 29 | 46,77% | 0,001265 | 0,0005758 | 0,0002798 | 0,002962 | | | 0.007*** |
| | AREB I | 4 | 6,45% | 0,001845 | 0,001107 | 0,0009915 | 0,003364 | | | - |
| | AREB II | 7 | 11,29% | 0,002391 | 0,0005441 | 0,001845 | 0,003321 | | | 0.002* 0.042** 0.007*** |
| | SDM-sec | 7 | 11,29% | 0,005607 | 0,005200 | 0,0005539 | 0,01614 | | | - |

‡ANOVA one-way. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

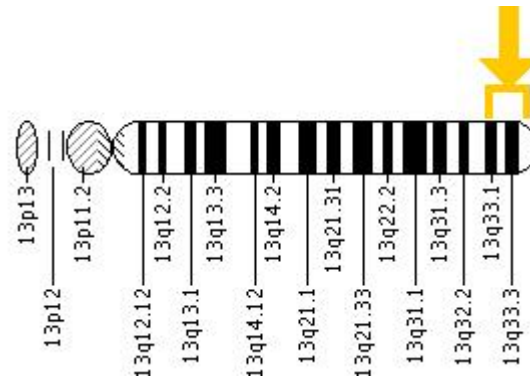
Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Não foram obtidas associações significantes entre o nível de expressão do gene *XRCC6* e os grupos de pacientes com SMD *versus* controle como também com as demais variáveis analisadas neste estudo ($p > 0,05$).

4.2.4 Análise do nível de expressão do gene *LIG4*

O gene *LIG4* está localizado no braço longo do cromossomo 13 na região 13q33 (Figura 20).

Figura 20: Representação do cromossomo 13 e indicação (barra amarela) da localização do gene *LIG4*.

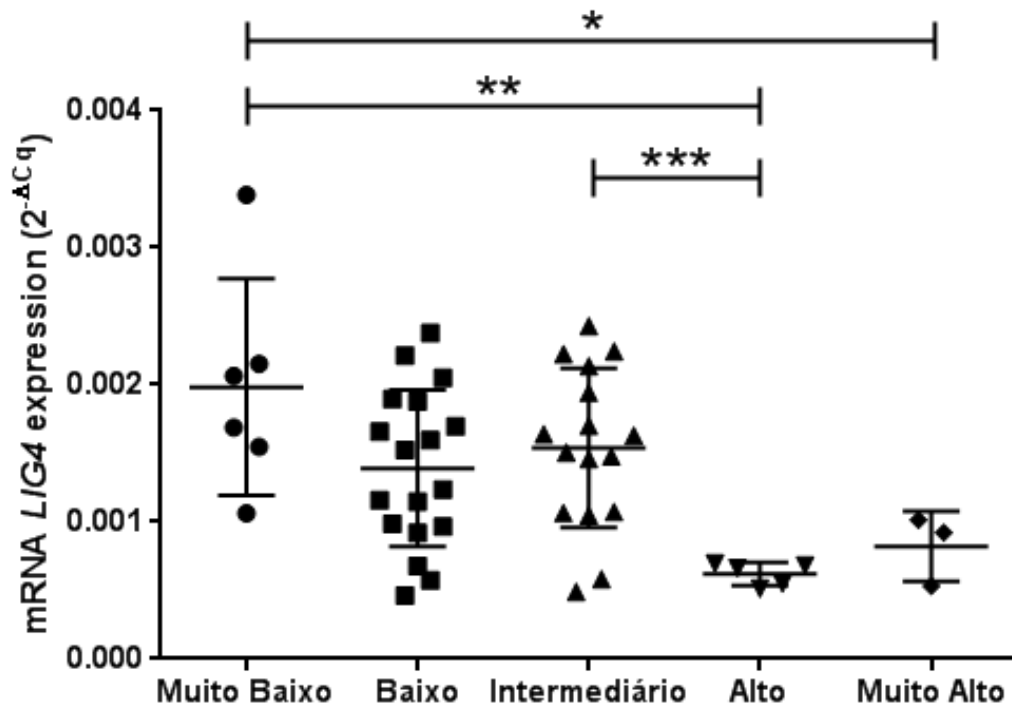


Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/LIG4>

Quanto às análises do gene *LIG4*, verificaram-se importantes associações do nível de expressão deste gene com as variáveis de estratificação prognóstica do WPSS, estratificação diagnóstica estabelecida pela OMS e evolução para LMA.

Primeiramente, para o índice de *score* prognóstico estabelecido pelo WPSS (MALCOVATI et al., 2005), verificou-se que pacientes inseridos no sub-grupo prognóstico de alto ($p=0.002$; IC= 0,000384025 - 0,002342063) e muito alto risco ($p=0.045$; IC=0,000018003 – 0,002304498) apresentaram um perfil de diminuição da expressão do gene *LIG4* quando comparados aos pacientes estratificados no subgrupo de muito baixo risco (Figura 21). Adicionalmente, pacientes de alto risco apresentaram também menor expressão do gene *LIG4* quando associados a pacientes de risco prognóstico intermediário ($p=0.023$; IC=0,000091528 – 0,001748252).

Figura 21: Nível de expressão do gene *LIG4* em pacientes com SMD frente à variável WPSS (MALCOVATI et al., 2011).



| | | Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$) | | | | | | ANOVA‡ | Teste de Levene | Tukey <i>post-hoc</i> test |
|---------------------|---------------|---|--------|-----------|---------------|-----------|----------|--------------|-----------------|----------------------------|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | | | |
| Grupo de risco WPSS | Muito baixo | 6 | 12,50% | 0,001984 | 0,0007911 | 0,001063 | 0,003386 | 0.002 | 0.067 | 0.045* |
| | Baixo | 18 | 37,50% | 0,001390 | 0,0005713 | 0,0004637 | 0,002379 | | | - |
| | Intermediário | 16 | 33,33% | 0,001541 | 0,0005793 | 0,0004922 | 0,002429 | | | 0.023*** |
| | Alto | 5 | 10,42% | 0,0006208 | 0,00008347 | 0,0005124 | 0,000697 | | | 0.002** |
| | Muito alto | 3 | 6,25% | 0,0008226 | 0,0002559 | 0,0005319 | 0,001014 | | | 0.023*** |

‡ANOVA one-way. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

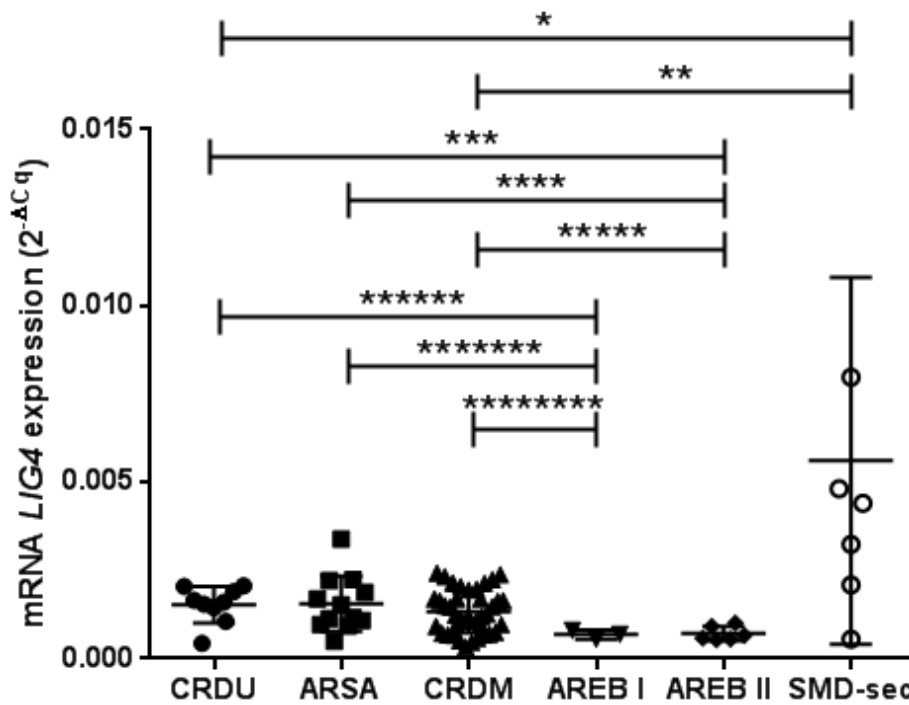
Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Quanto à classificação clínica dos pacientes de acordo com os critérios preconizados pela OMS, observou-se, primeiramente, que pacientes diagnosticados como SMD-sec possuem um maior nível de expressão do gene *LIG4* em relação à pacientes definidos como CRDU ($p=0.020$; IC= 0,001400011 - 0,000104616) e CRDM ($p=0.002$; IC= 0,000944327 - 0,000169940) (Figura 22).

Contrariamente, pacientes diagnosticados como AREB II apresentaram um perfil de menor expressão do gene *LIG4* em relação a pacientes classificados como CRDU ($p=0.012$; IC= 0,001470252 - 0,000167697), ARSA ($p=0.034$; IC= 0,001644932 - 0,000051168) e CRDM ($p=0.001$; IC= 0,001022093 - 0,000225496) (Figura 22). Adicionalmente, pacientes

diagnosticados como AREB I também apresentaram uma menor expressão do gene *LIG4* quando comparados a pacientes CRDU ($p=0.011$; IC= 0,001497868 - 0,000191445), ARSA ($p=0.028$; IC= 0,00166882 - 0,000078581) e CRDM ($p=0.002$; IC= 0,001054699 - 0,000244254) (Figura 22).

Figura 22: Nível de expressão do gene *LIG4* em pacientes com SMD frente a classificação diagnóstica da doença.

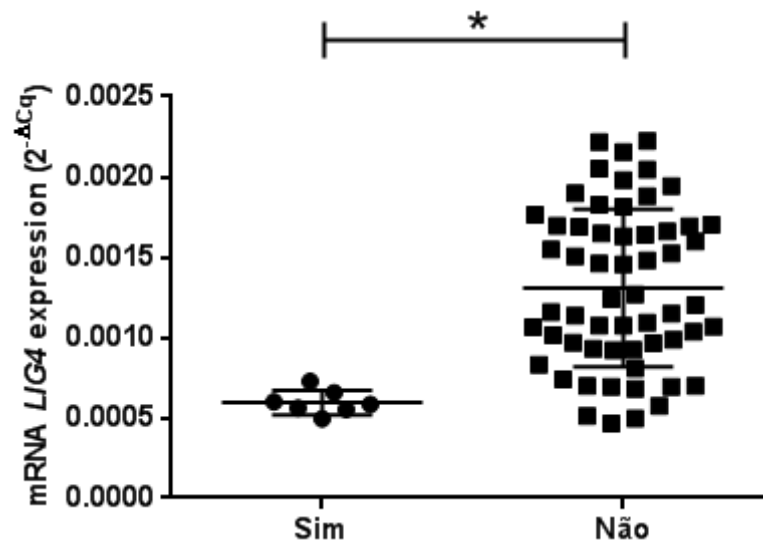


| | | Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$) | | | | | | ANOVA‡ | Teste de Levene | Games-Howell <i>pos-hoc</i> test |
|----------------------------------|---------|---|--------|-----------|---------------|-----------|-----------|--------------|-----------------|----------------------------------|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | | | |
| Classificação diagnóstica da SMD | CRDU | 9 | 11,84% | 0,001529 | 0,0005170 | 0,0004344 | 0,002065 | 0.004 | 0.004 | 0.020* |
| | ARSA | 12 | 15,79% | 0,001559 | 0,0007865 | 0,0004922 | 0,003386 | | | 0.012*** |
| | CRDM | 39 | 51,32% | 0,001334 | 0,0006017 | 0,000335 | 0,002429 | | | 0.011***** |
| | AREB I | 3 | 3,95% | 0,0006848 | 0,0001284 | 0,0005507 | 0,0008067 | | | 0.034**** |
| | AREB II | 6 | 7,89% | 0,0007105 | 0,0002056 | 0,0005319 | 0,001014 | | | 0.028***** |
| | SMD-sec | 7 | 9,21% | 0,005607 | 0,005200 | 0,0005539 | 0,01614 | | | 0.002** |

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

Adicionalmente, observou-se que pacientes que apresentaram quadro clínico de evolução para LMA também apresentaram um menor nível de expressão do gene *LIG4* em relação aos pacientes que não evoluíram para LMA ($p < 0.000$; IC= 0,0005720865 – 0,0008535738) (Figura 23).

Figura 23: Nível de expressão do gene *LIG4* em pacientes com SMD frente à variável de evolução para LMA.



| | | Nível de Expressão (2 ^{-ΔCq}) | | | | | | | |
|-------------------|-----|---|-------|-----------|---------------|-----------|-----------|-----------------|----------|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | Teste de Levene | p-valor‡ |
| Evolução para LMA | Não | 58 | 89,2% | 0,001308 | 0,0004891 | 0,0004637 | 0,002225 | 0,000078 | <0.0000 |
| | Sim | 7 | 10,8% | 0,0005947 | 7,598e-005 | 0,0004922 | 0,0007256 | | |

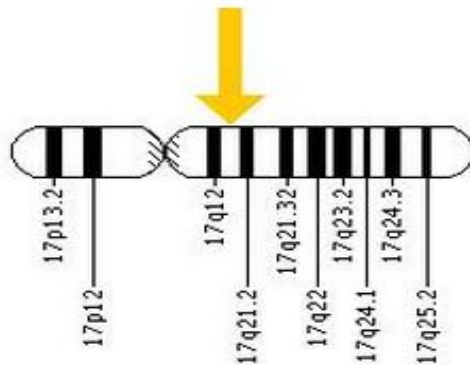
‡Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.
Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão do gene *LIG4* e os grupos de pacientes com SMD *versus* controle como também com as demais variáveis analisadas neste estudo ($p > 0.05$).

4.2.5 Análise do nível de expressão do gene *BRCA1*

O gene *BRCA1* está localizado no braço longo do cromossomo 17 na região 17q21 (Figura 24).

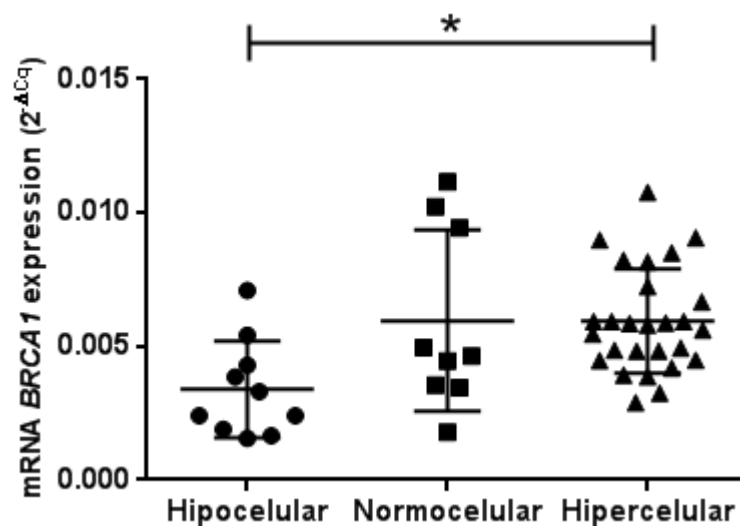
Figura 24: Representação do cromossomo 17 e indicação (barra amarela) da localização do gene *BRCA1*.



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

Frente às análises do gene *BRCA1*, verificou-se importantes associações do nível de expressão deste gene com a variável de celularidade da medula óssea. Foi observado que pacientes com medula óssea hipocelular possuem um menor nível de expressão do gene *BRCA1* em relação à pacientes com medula óssea hipercelular ($p=0.004$; 0,004309409 – 0,00806780) (Figura 25).

Figura 25: Nível de expressão do gene *BRCA1* em pacientes com SMD frente a variável de celularidade da medula óssea.



| | | Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$) | | | | | | ANOVA‡ | Teste de Levene | Games-Howell <i>pos-hoc</i> test |
|------------------------------|---------------|---|-------|----------|---------------|----------|----------|--------------|-----------------|----------------------------------|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | | | |
| Celularidade da medula óssea | Hipocelular | 10 | 21,7% | 0,003390 | 0,001809 | 0,001553 | 0,007095 | 0,011 | 0.014 | 0.004* |
| | Normocelular | 9 | 19,6% | 0,005962 | 0,003391 | 0,001788 | 0,01116 | | | - |
| | Hiper celular | 27 | 58,7% | 0,005948 | 0,001947 | 0,002896 | 0,01077 | | | 0.004* |

‡ANOVA one-way. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

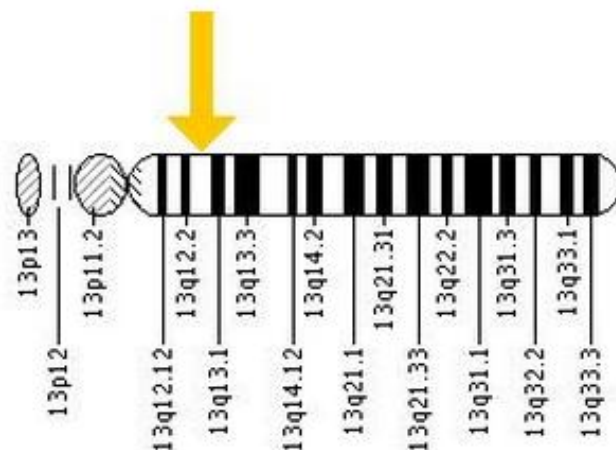
Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão do gene *BRCA1* e os grupos de pacientes com SMD *versus* controle como também com as demais variáveis analisadas na presente pesquisa ($p > 0,05$).

4.2.6 Análise do nível de expressão do gene *BRCA2*

O gene *BRCA2* está localizado no braço longo do cromossomo 13 na região 13q12.3 (Figura 26).

Figura 26: Representação do cromossomo 13 e indicação (barra amarela) da localização do gene *BRCA2*.

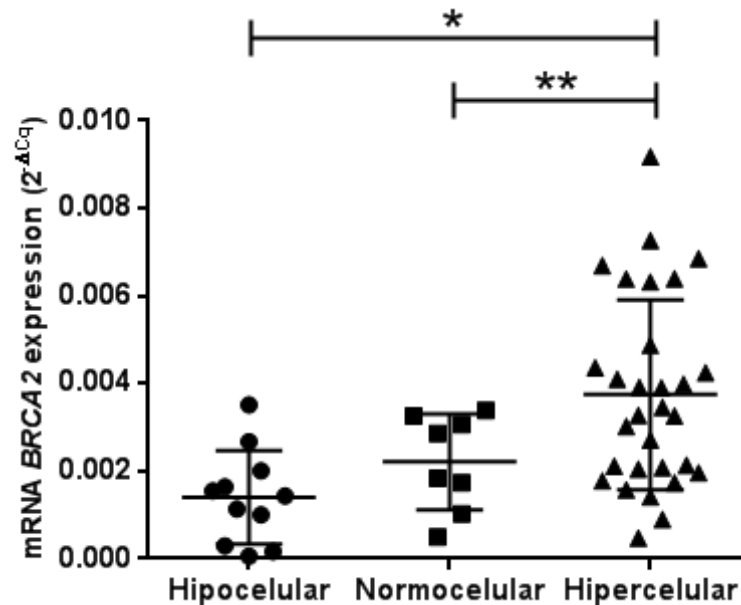


Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA2>

Frente às análises do gene *BRCA2*, verificou-se importantes associações do nível de expressão deste gene com as variáveis de celularidade da medula óssea e a estratificação diagnóstica estabelecida pela OMS.

Observou-se, inicialmente, que, semelhantemente ao observado para o gene *BRCA1*, foi identificado que pacientes com medula óssea hipocelular também possuem um menor nível de expressão do gene *BRCA2* em relação à pacientes com medula óssea hiperclular ($p=0.0001$; IC= 0,003587129 - 0,001097069) (Figura 27). Adicionalmente, pacientes com medula hiperclular também apresentaram maior expressão do gene *BRCA2* quando comparado a pacientes com medula normocelular ($p=0.028$; IC= 0,002918181 - 0,000153016) (Figura 27).

Figura 27: Nível de expressão do gene *BRCA2* em pacientes com SMD frente a variável de celularidade da medula óssea.



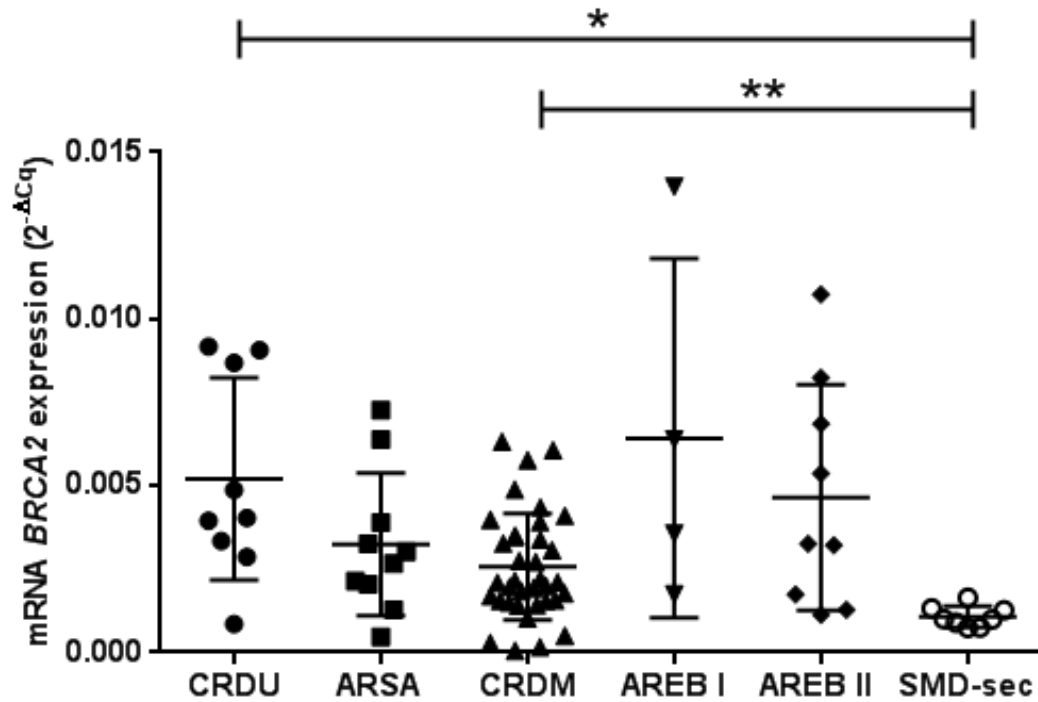
| | | Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$) | | | | | | ANOVA† | Teste de Levene | Games-Howell <i>pos-hoc</i> test |
|------------------------------|--------------|---|-------|----------|---------------|------------|----------|--------|-----------------|----------------------------------|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | | | |
| Celularidade da medula óssea | Hipocelular | 11 | 17,2% | 0,001406 | 0,001062 | 6,010e-005 | 0,003509 | 0.002 | 0.024 | 0.0001* |
| | Normocelular | 8 | 14,1% | 0,002212 | 0,001091 | 0,000504 | 0,003388 | | | 0.028** |
| | Hiperclular | 30 | 53,1 | 0,003748 | 0,002166 | 0,0004713 | 0,009175 | | | 0.0001* 0.028** |

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

Quanto à estratificação dos pacientes frente à classificação clínica estabelecida pela OMS (BRUNNING et al., 2008), observou-se que todos os pacientes diagnosticados como SMD-sec apresentaram uma menor expressão do gene *BRCA2* quando associados aos

pacientes estratificados nos subgrupos clínicos de CRDU ($p=0.028$; IC= 0,000436257 – 0,007825264) e CRDM ($p=0.00008$; IC= 0,000632120 – 0,002349759) (Figura 28).

Figura 28: Nível de expressão do gene *BRCA2* em pacientes com SMD frente a classificação diagnóstica da doença.



| | | Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$) | | | | | | ANOVA† | Teste de Levene | Games-Howell <i>post-hoc</i> test |
|----------------------------------|---------|---|-------|----------|---------------|------------|----------|---------------|-----------------|-----------------------------------|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | | | |
| Classificação diagnóstica da SMD | CRDU | 9 | 11,8% | 0,005207 | 0,003033 | 0,0008583 | 0,009175 | 0.0003 | 0.00002 | 0.028* |
| | ARSA | 10 | 15,8% | 0,003246 | 0,002137 | 0,0004713 | 0,007268 | | | - |
| | CRDM | 36 | 44,7% | 0,002568 | 0,001594 | 6,010e-005 | 0,006321 | | | 0.00008** |
| | AREB-I | 4 | 5,3% | 0,006421 | 0,005388 | 0,001743 | 0,01398 | | | - |
| | AREB-II | 9 | 11,8% | 0,004648 | 0,003382 | 0,001134 | 0,01074 | | | - |
| | SMD-sec | 8 | 10,5% | 0,001077 | 0,0003118 | 0,0007386 | 0,001642 | | | 0.028* 0.00008** |

†ANOVA one-way. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

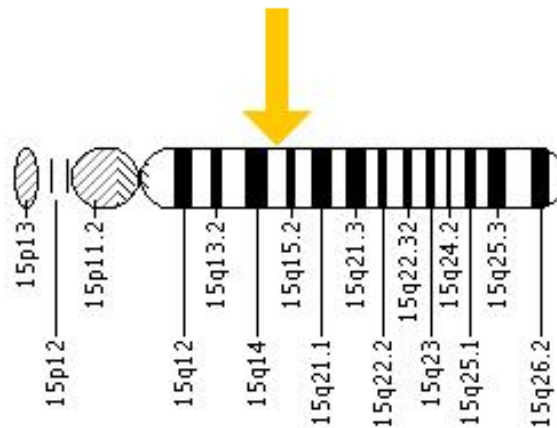
Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão do gene *BRCA2* e os grupos de pacientes com SMD *versus* controle como também com as demais variáveis analisadas na presente pesquisa ($p > 0.05$).

4.2.7 Análise do nível de expressão do gene *RAD51*

O gene *RAD51* está localizado no braço longo do cromossomo 15 na região 15q15.1 (Figura 29).

Figura 29: Representação do cromossomo 15 e indicação (barra amarela) da localização do do gene *RAD51*.

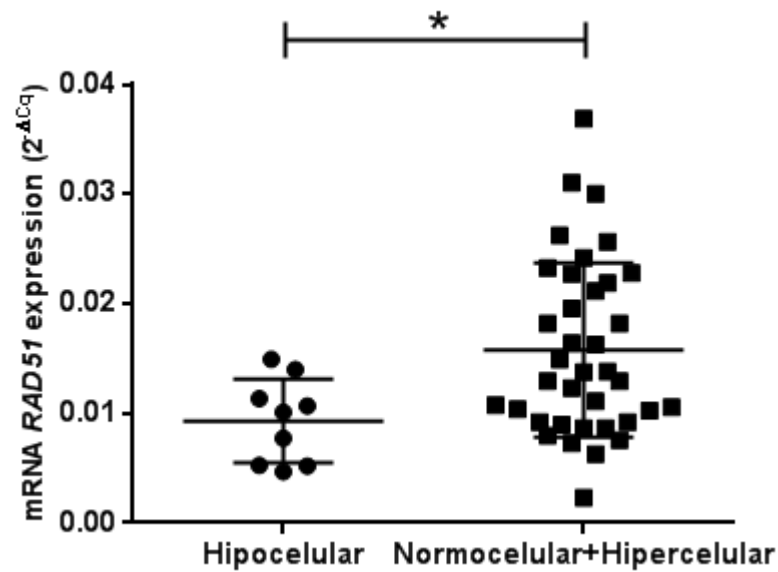


Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/RAD51>

Frente às análises do gene *RAD51*, verificou-se importantes associações do nível de expressão deste gene com às variáveis relacionadas a celularidade da medula óssea, de estratificação diagnóstica estabelecida pela OMS e de evolução para LMA.

Quanto ao perfil de celularidade da medula óssea de pacientes com SMD, observou-se que pacientes com medula óssea hipocelular apresentam uma menor expressão do gene *RAD51* em relação à pacientes com medula óssea categorizada em normocelular + hipercelular ($p=0.001$; IC= 0,0102183912 – 0,0027145849) (Figura 30).

Figura 30: Nível de expressão do gene *RAD51* em pacientes com SMD frente à variável de celularidade da medula óssea em pacientes com SMD.



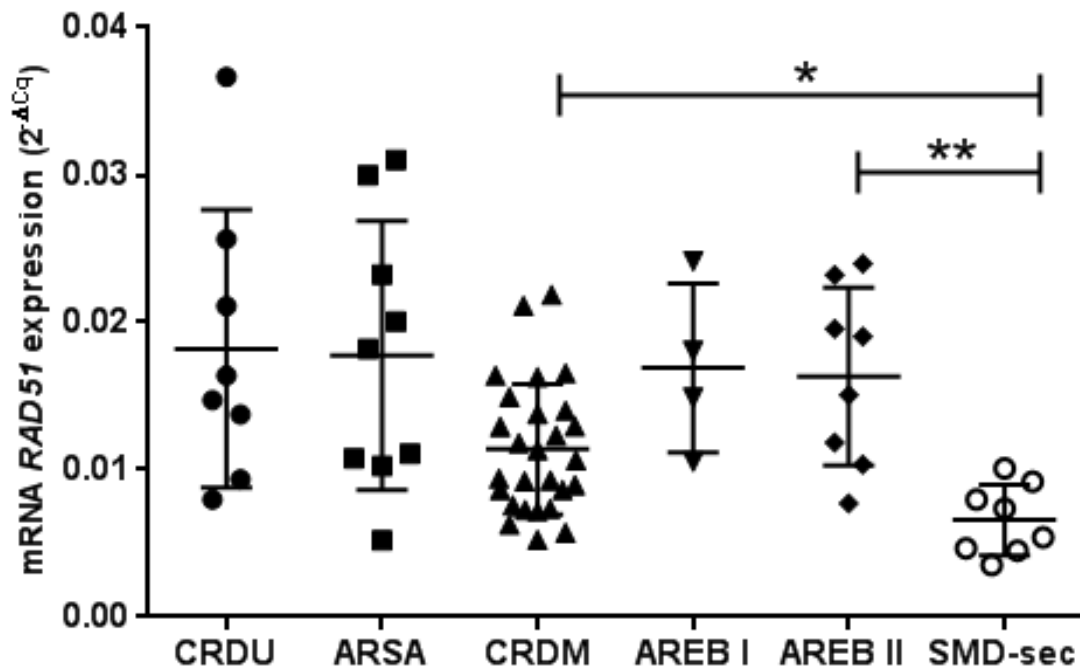
| | | Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$) | | | | | | Teste de Levene | p-valor† |
|---|-----------------------------|---|-------|----------|---------------|----------|---------|-----------------|----------|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | | |
| Celularidade da medula óssea (Categorizada) | Hipocelular | 9 | 19,6% | 0,009313 | 0,003833 | 0,004668 | 0,01493 | 0,028 | 0,001 |
| | Normocelular + Hipercelular | 37 | 80,4% | 0,01578 | 0,007956 | 0,002292 | 0,03686 | | |

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

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

Quanto à classificação clínica dos pacientes de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS (BRUNNING et al., 2008), identificou-se que pacientes com SMD-sec possuem uma menor expressão do gene *RAD51* quando comparados a pacientes diagnosticados como CRDM ($p=0,007$; IC= 0,001066676 – 0,008538328) e AREB II ($p=0,018$; IC= 0,001628146 – 0,017876114) (Figura 31).

Figura 31: Nível de expressão do gene *RAD51* em pacientes com SMD frente a classificação diagnóstica da doença.

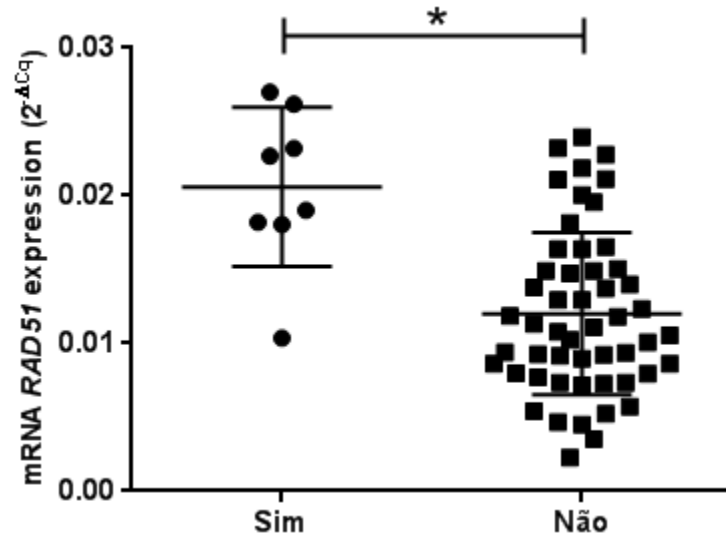


| | | Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$) | | | | | | | | |
|----------------------------------|---------|---|--------|----------|---------------|----------|---------|--------------|-----------------|----------------------------------|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | ANOVA† | Teste de Levene | Games-Howell <i>pos-hoc</i> test |
| Classificação diagnóstica da SMD | CRDU | 8 | 11,25% | 0,01820 | 0,009433 | 0,007971 | 0,03666 | 0.001 | 0.003 | - |
| | ARSA | 9 | 15,0% | 0,01776 | 0,009140 | 0,005200 | 0,03103 | | | - |
| | CRDM | 27 | 46,25% | 0,01139 | 0,004417 | 0,005243 | 0,02186 | | | 0.007* |
| | AREB I | 4 | 5,0% | 0,01691 | 0,005722 | 0,01055 | 0,02415 | | | - |
| | AREB II | 8 | 11,25% | 0,01634 | 0,006035 | 0,007716 | 0,02397 | | | 0.018** |
| | SMD-sec | 8 | 11,25% | 0,006592 | 0,002396 | 0,003535 | 0,01008 | | | 0.007* 0.018** |

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

Por fim, foi possível identificar que pacientes que apresentaram, no percurso da doença, uma evolução clínica para LMA, apresentaram um aumento do nível de expressão do gene *RAD51* em relação à pacientes que não evoluíram para LMA ($p=0.0001$; IC= 0,0127392110 – 0,00440796995) (Figura 32).

Figura 32: Nível de expressão do gene *RAD51* em pacientes com SMD que evoluíram para LMA.



| | | Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$) | | | | | | | |
|--------------------------|------------|---|-------|---------|---------------|----------|---------|-----------------|--------------|
| | | N | % | Média | Desvio Padrão | Mínimo | Máximo | Teste de Levene | p-valor† |
| Evolução para LMA | Não | 52 | 87,2% | 0,01202 | 0,005492 | 0,002292 | 0,02397 | 0.817 | 0.001 |
| | Sim | 8 | 12,8% | 0,02060 | 0,005391 | 0,01036 | 0,02701 | | |

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

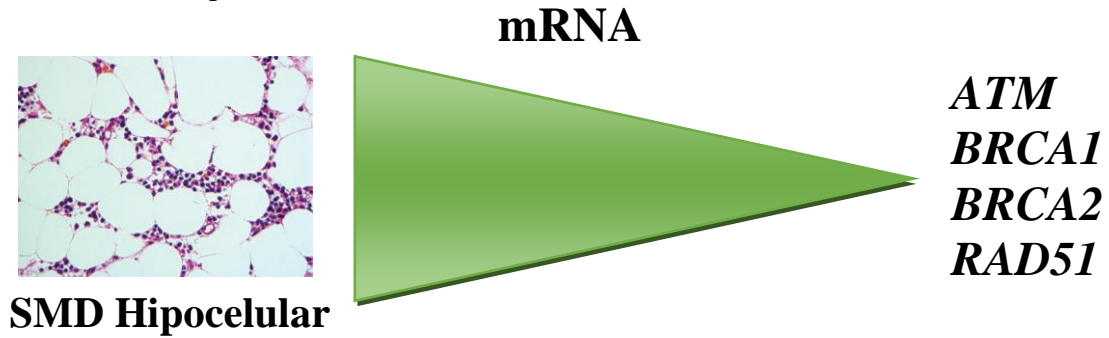
Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão do gene *RAD51* e os grupos de pacientes com SMD *versus* controle como também com as demais variáveis analisadas na presente pesquisa ($p > 0,05$).

Em síntese, pode ser definido que os resultados apresentados demonstram que:

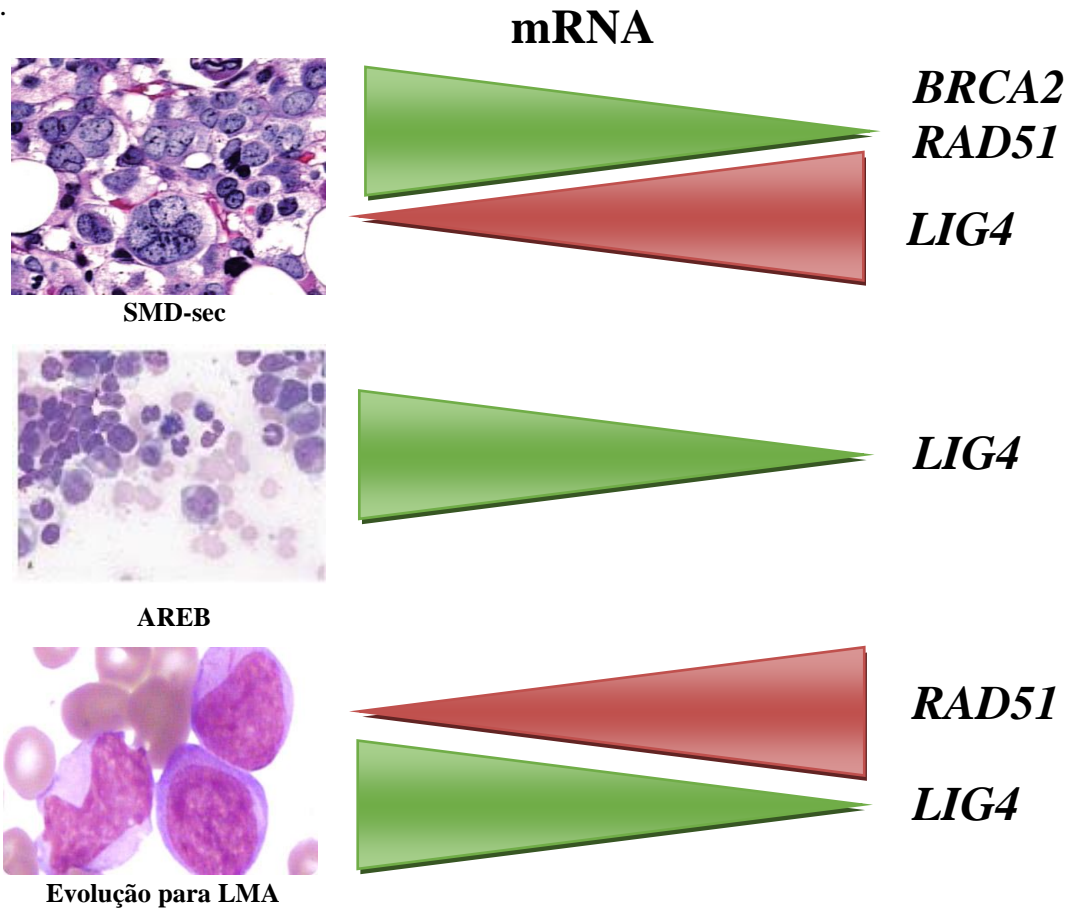
1. Há um importante diminuição de expressão dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* e *RAD51* em pacientes com SMD hipocelular (Figura 33);

Figura 33: Resultados dos níveis de expressão dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* e *RAD51* em pacientes com SMD hipocelular.



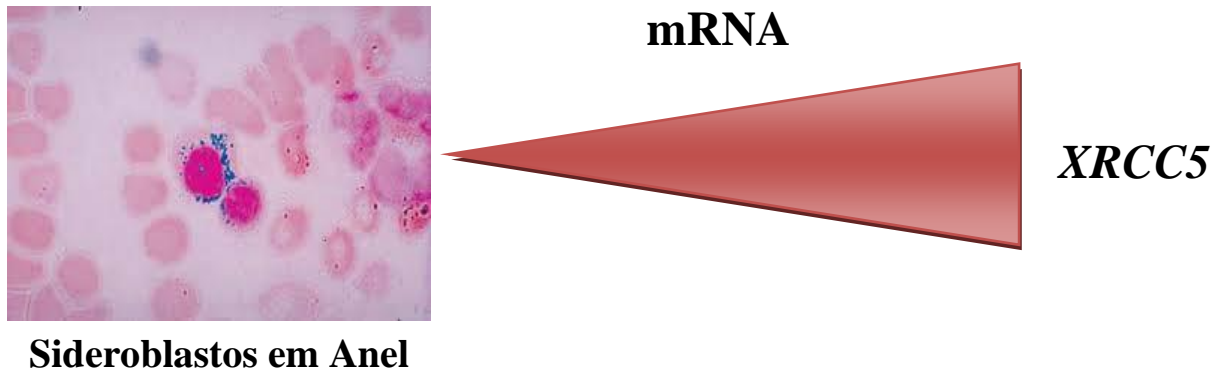
2. Há um perfil diferencialmente expresso dos genes *LIG4*, *BRCA2* e *RAD51* em pacientes diagnosticados como AREB e SMD-sec e que evoluíram para LMA (Figura 34);

Figura 34: Resultados dos níveis de expressão dos genes *BRCA2*, *RAD51* e *LIG4* em pacientes com SMD.



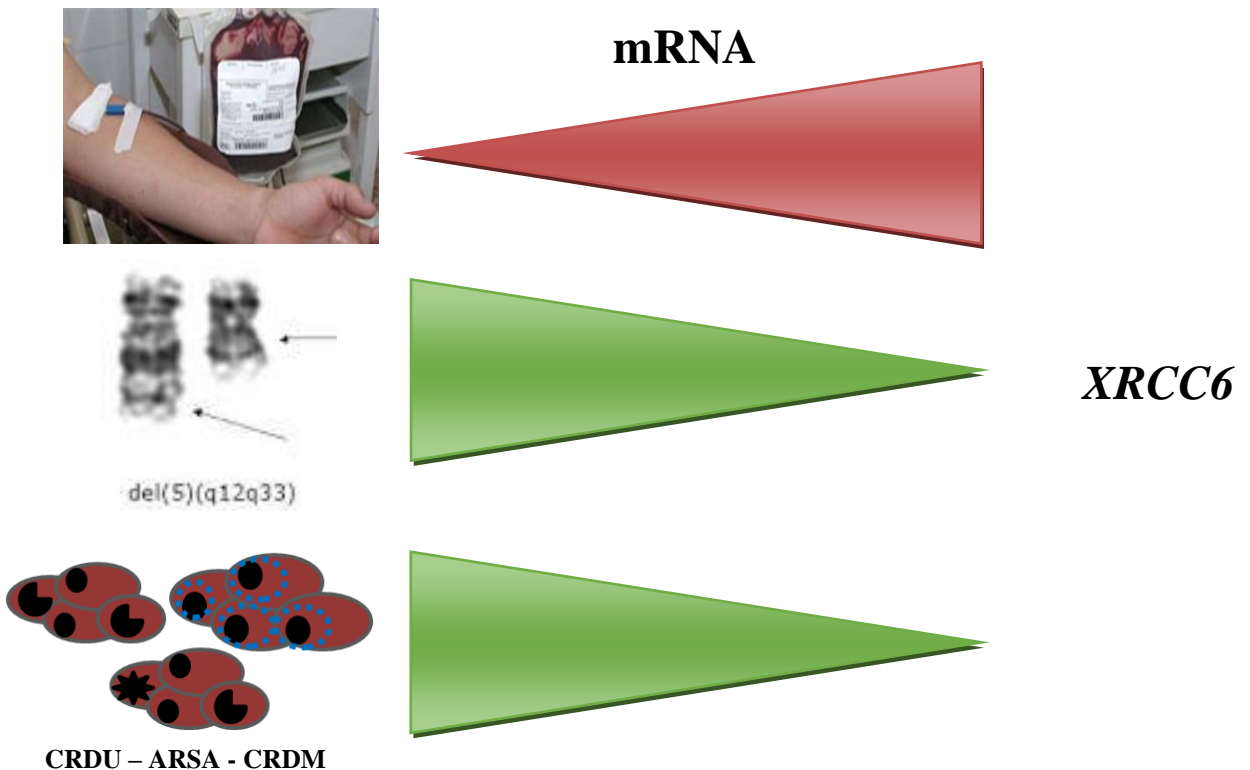
3. Há um significativo aumento de expressão do gene *XRCC5* em pacientes com SMD com a presença de 1-14% de sideroblastos em anel (Figura 35);

Figura 35: Resultado do nível de expressão do gene *XRCC5* em pacientes com SMD com presença 1-14% de sideroblastos em anel.



4. Há um significativo aumento de expressão do gene *XRCC6* em pacientes com SMD que estiveram associados à dependência transfusional, cariótipo alterado e diagnosticados como CRDU, ARSA e CRDM (Figura 36).

Figura 36: Resultado do nível de expressão do gene *XRCC6* em pacientes com SMD com dependência transfusional, cariótipo alterado e diagnosticados como CRDU, ARSA e CRDM.



4.3 Análises de sobrevida dos pacientes com SMD em relação aos níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de reparo em danos de fita dupla do DNA

Para a realização das análises de associação entre os níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de reparo em DSB e a sobrevida dos pacientes com SMD, foi inicialmente definido o *cutoff* (baseado no algoritmo estabelecido pelo software *Cutoff Finder*) de cada perfil de expressão, por gene, para que se tornasse possível realizar o teste de *log-rank* associado com o gráfico de curva de sobrevida estabelecido por *Kaplan-Meier*. Os dados dos *cutoffs*, por gene, estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14: Caracterização dos *cutoffs* na análise de associação entre os níveis de expressão dos genes de reparo em DSBs e a sobrevida dos pacientes com SMD.

| Gene | Cutoff* | Faixa** | | OR | IC | | p.valor |
|--------------|----------|------------|------------|------|------|------|----------------|
| | | Superior | Inferior | | | | |
| <i>ATM</i> | 0.003429 | 33 (39,8%) | 50 (60,2%) | 0.22 | 0.09 | 0.56 | 0.00047 |
| <i>BRCA1</i> | 0.008793 | 21 (25,3%) | 62 (74,7%) | 0.24 | 0.03 | 1.78 | 0.13 |
| <i>BRCA2</i> | 0.003146 | 40 (48,2%) | 43 (51,8%) | 1.93 | 0.85 | 4.37 | 0.11 |
| <i>RAD51</i> | 0.01646 | 35 (42,2%) | 48 (57,8%) | 1.47 | 0.63 | 3.44 | 0.026 |
| <i>XRCC5</i> | 0.144 | 60 (72,3%) | 23 (27,7%) | 1.91 | 0.71 | 5.2 | 0.19 |
| <i>XRCC6</i> | 0.001515 | 47 (56,6%) | 36 (43,4%) | 1.42 | 0.55 | 3.67 | 0.47 |
| <i>LIG4</i> | 0.000659 | 69 (83,1%) | 14 (16,9%) | 0.21 | 0.09 | 0.51 | 0.00015 |

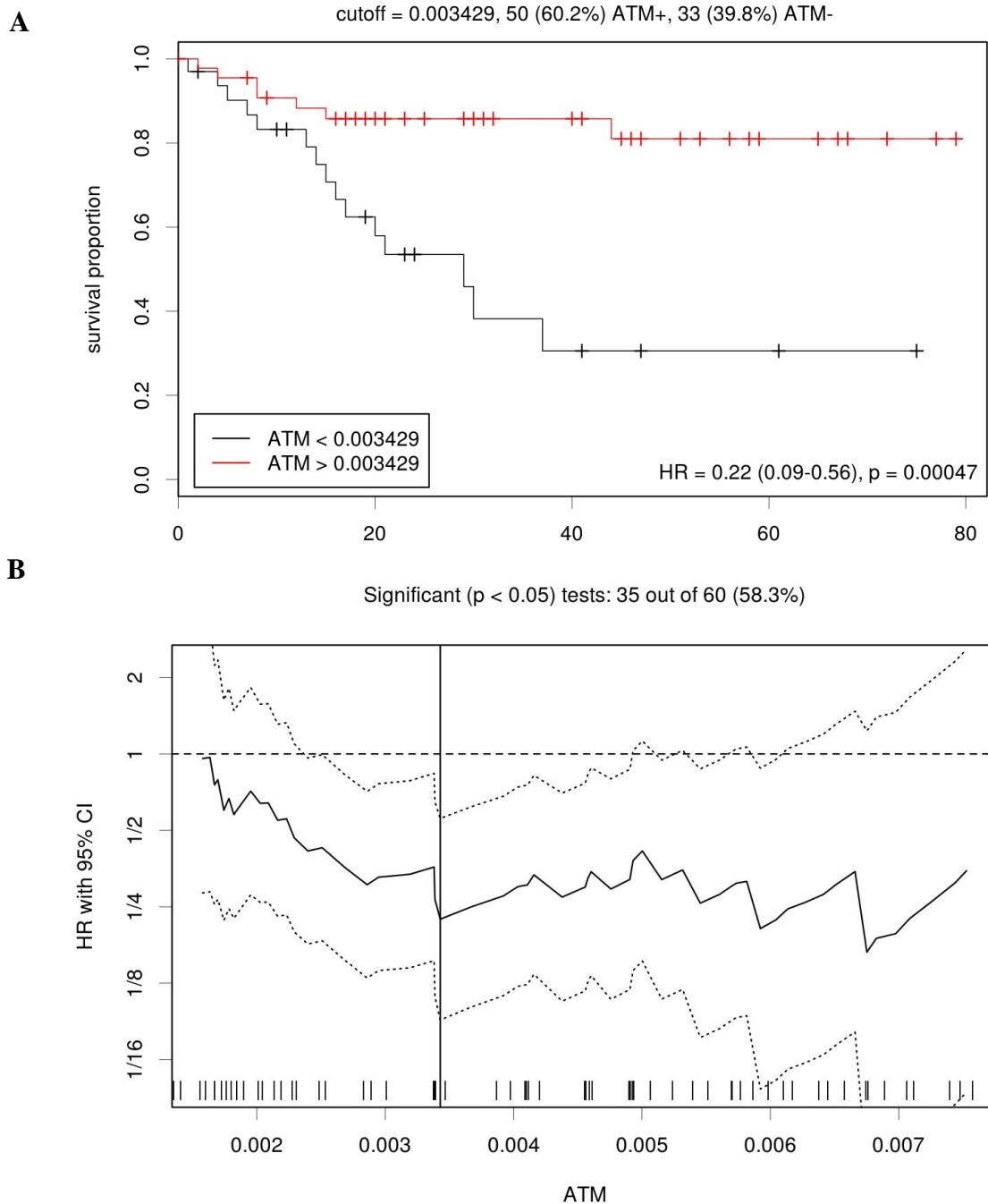
*Algoritmo estabelecido pelo software *Cutoff Finder*

**Faixa de pacientes com expressão superior ou inferior ao *cut-off* estabelecido.

OR – Odds-Ratio / IC – Intervalo de Confiança

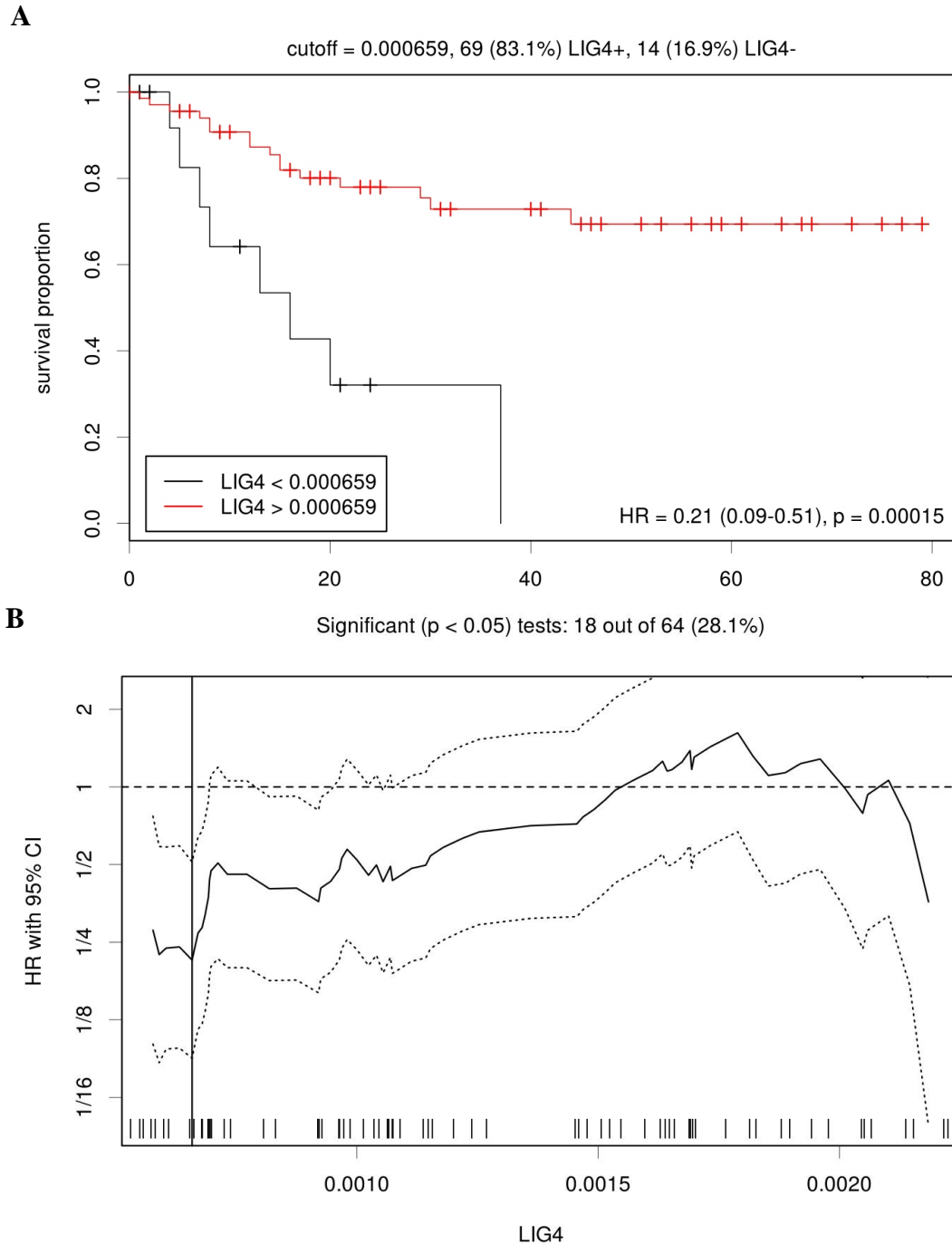
A tabela 14 apresenta, inicialmente, a análise de correlação da sobrevida dos pacientes com SMD e o nível de expressão do gene *ATM*, demonstrando que 33 (39,8%) pacientes com níveis de expressão superior ao *cutoff* de 0.003429 possuem uma maior sobrevida (Figura 37A), com uma taxa de risco (HR, *hazard ratio*) de 0.22 (IC= 0.09-0.56) e com uma correlação significativa (p=0.00047) entre 58,3% dos pontos de corte investigados, conforme apresentado na figura 37B.

Figura 37: Análises de associação entre o nível de expressão do gene *ATM* e a sobrevida dos pacientes com SMD. **A.** Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). **B.** Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida.



Por fim, identificou-se que 14 (16,9%) dos pacientes com maior expressão do gene *LIG4* apresentam uma maior sobrevida em relação a um *cutoff* de 0.000659 (p=0.00015) (Figura 38A), podendo ser verificado uma HR de 0.21 (IC= 0.09-0.051) em relação a uma abrangência de 28,1% dos *cut-offs* analisados (Figura 38B, Tabela 14).

Figura 38: Análises de associação entre o nível de expressão do gene *LIG4* e a sobrevida dos pacientes com SMD. **A.** Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). **B.** Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida.



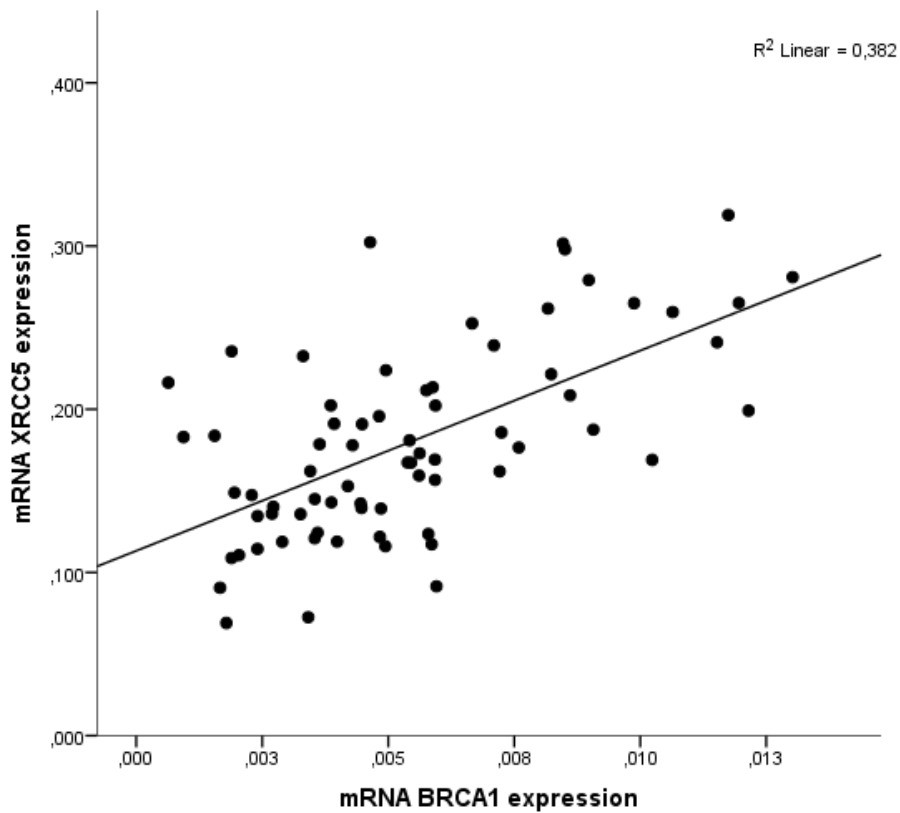
Não foram encontradas associações significantes entre os níveis de expressão dos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *XRCC5* e *XRCC6* em relação a sobrevida dos pacientes com SMD (Tabela 14).

4.4 Análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de reparo em danos de fita dupla do DNA

Para as análises de correlação entre os genes, foi analisada a influência da expressão de cada gene sobre a expressão dos demais a partir da análise do teste de correlação de *Pearson* (R) e obtenção do r^2 (*R square*), a fim de definir a influência que um gene tem sobre o outro, buscando-se caracterizar como se comporta determinado mecanismo de reparo em SMD.

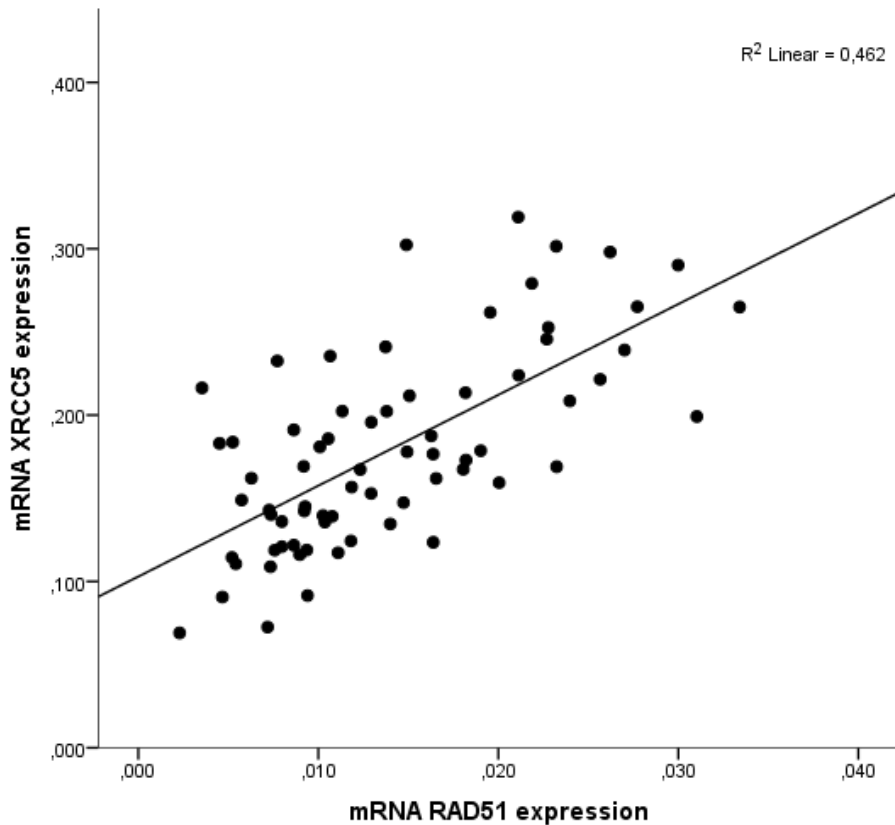
Inicialmente, na análise de correlação de *pearson*, observou-se que há uma forte correlação entre o gene *XRCC5* e o gene *BRCA1* ($r=0.618$; $p<0.001$), demonstrando que estes genes são responsáveis por 38,2% ($r^2=0.382$) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em pacientes com SMD (Figura 39).

Figura 39: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *XRCC5* e *BRCA1* em pacientes com SMD.



Adicionalmente, foi identificado que há uma forte correlação entre os genes *XRCC5* e *RAD51* ($r=0.680$; $p<0.001$), mostrando que estes genes são responsáveis por 46,2% ($r^2=0.462$) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em pacientes com SMD (Figura 40).

Figura 40: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *XRCC5* e *RAD51* em pacientes com SMD.



Em seguida, observou-se que há uma correlação forte entre os níveis de expressão dos genes *BRCA1* e *RAD51* ($r=0.809$; $p<0.001$) e moderada entre os genes *BRCA2* e *RAD51* ($r=0.471$; $p<0.001$). Estes dados demonstram que o gene *RAD51* influencia 65,4% ($r^2=0.654$) (Figura 41) e 22,1% ($r^2=0.221$) (Figura 42) do nível de expressão dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente.

Figura 41: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *BRCA1* e *RAD51* em pacientes com SMD.

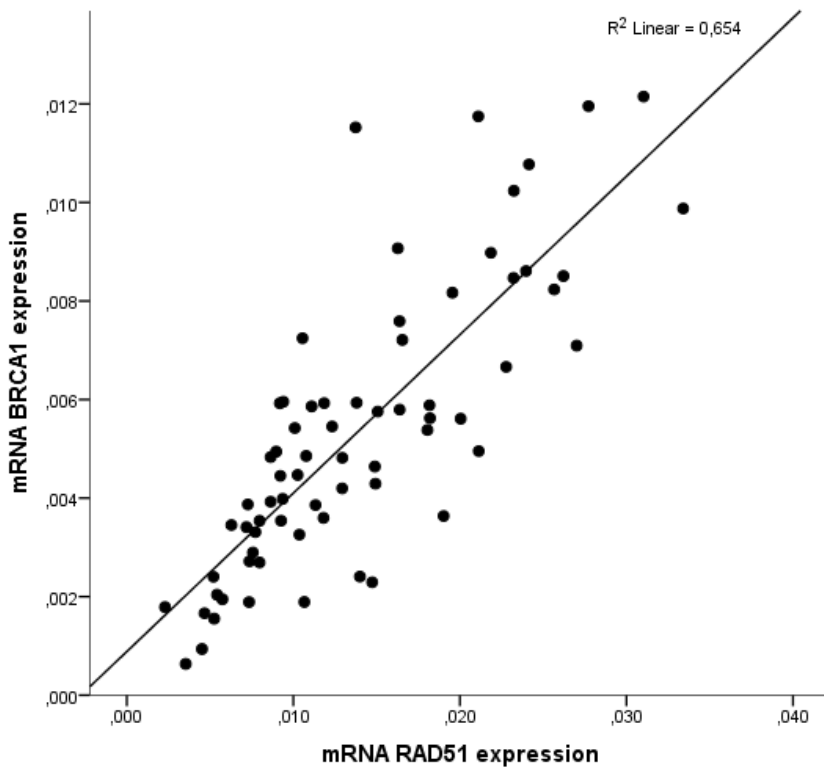
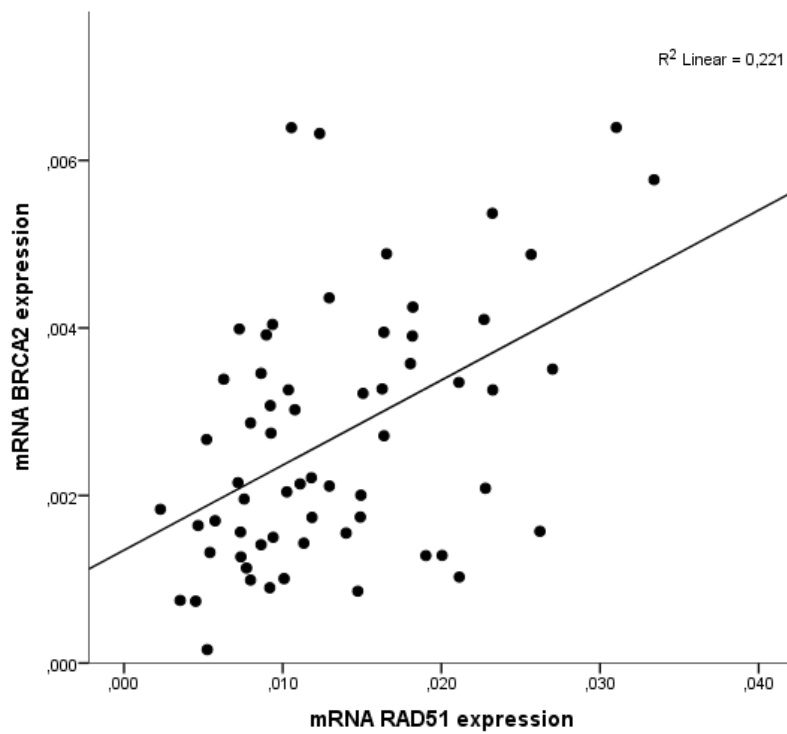
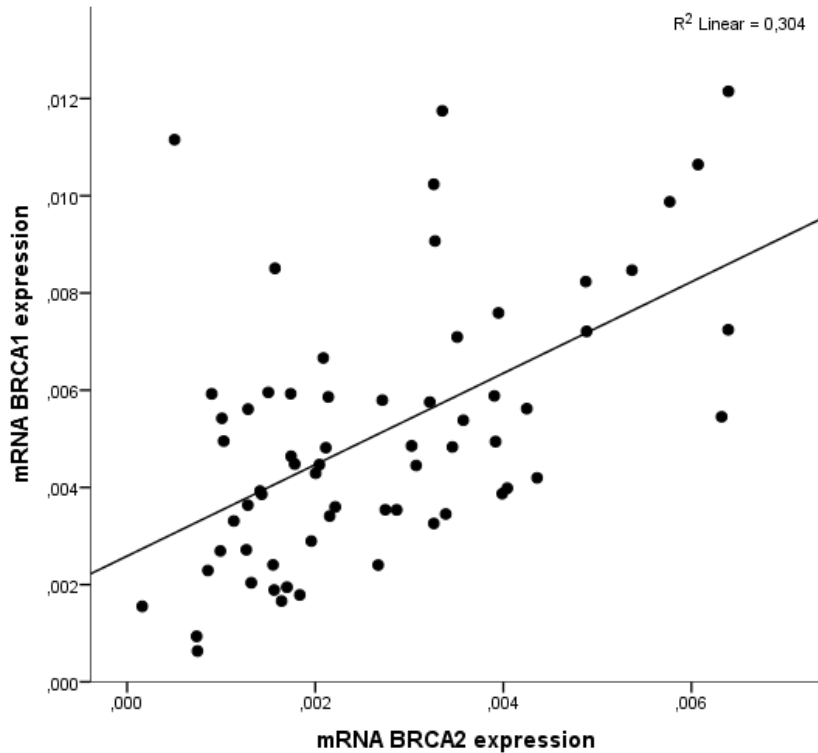


Figura 42: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *BRCA2* e *RAD51* em pacientes com SMD.



Por fim, observou-se que há uma correlação moderada entre os níveis de expressão dos genes *BRCA1* e *BRCA2* ($r=0.551$; $p<0.001$) demonstrando que o gene *BRCA1* influencia 30,4% ($r^2=0.304$) do nível de expressão do gene *BRCA2* e vice-versa (Figura 43).

Figura 43: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes com SMD.



4.5 Análise do nível de expressão gênica por qPCR em amostras de *pool* celular associadas às frequências dos polimorfismos e as variáveis dos pacientes com SMD.

Foram analisados um total de 47 pacientes com resultados das análises das frequências genotípicas dos polimorfismos dos genes de reparo (*XRCC6 rs2267437*, *XRCC5 rs3835*, *LIG4 rs1805388*, *BRCA1 rs4793191*, *BRCA2 rs9567623*, *RAD51 rs1801320*, e o *ATM rs228593*) obtidas a partir dos estudos de Ribeiro Jr. e colaboradores (2013 e 2014) (Tabela 15).

Os resultados referentes às associações significantes entre os níveis de expressão gênica, entre as frequências genotípicas e as variáveis sócio-demográficas e clínicas dos pacientes com SMD estabelecidas para este estudo serão apresentados nas seções a seguir.

Tabela 15: Frequência dos genótipos dos pacientes com SMD.

| Genotype | MDS n° (%) |
|------------------------|------------|
| ATM rs228593 | |
| <i>G/G (wt)</i> | 10 (21,3) |
| <i>A/G (ht)</i> | 13 (27,7) |
| <i>A/A (mt)</i> | 24 (51,1) |
| XRCC6 rs2267437 | |
| <i>C/C (wt)</i> | 21 (44,7) |
| <i>C/G (ht)</i> | 21 (44,7) |
| <i>G/G (mt)</i> | 5 (10,6) |
| XRCC5 rs3835 | |
| <i>A/A (wt)</i> | 18 (38,3) |
| <i>A/G (ht)</i> | 22 (46,8) |
| <i>G/G (mt)</i> | 7 (14,9) |
| LIG4 rs1805388 | |
| <i>C/C (wt)</i> | 0 (0,0) |
| <i>T/C (ht)</i> | 31 (66,0) |
| <i>T/T (mt)</i> | 16 (34,0) |
| BRCA1 rs473191 | |
| <i>A/A (wt)</i> | 18 (38,3) |
| <i>A/G (ht)</i> | 23 (48,9) |
| <i>G/G (mt)</i> | 2 (4,3) |
| <i>N/A*</i> | 4 (8,5) |
| BRCA2 rs9567623 | |
| <i>C/C (wt)</i> | 30 (63,8) |
| <i>C/T (ht)</i> | 16 (34,0) |
| <i>T/T (mt)</i> | 1 (2,1) |
| RAD51 rs1801320 | |
| <i>G/G (wt)</i> | 37 (78,7) |
| <i>G/C (ht)</i> | 7 (14,9) |
| <i>C/C (mt)</i> | 3 (6,4) |
| Total | 47 |

*Amostras sem discriminação alélica.

wt: Wild-type - Genótipo Selvagem

ht: heterozygous - Genótipo heterozigoto

mt: mutated - Genótipo polimórfico

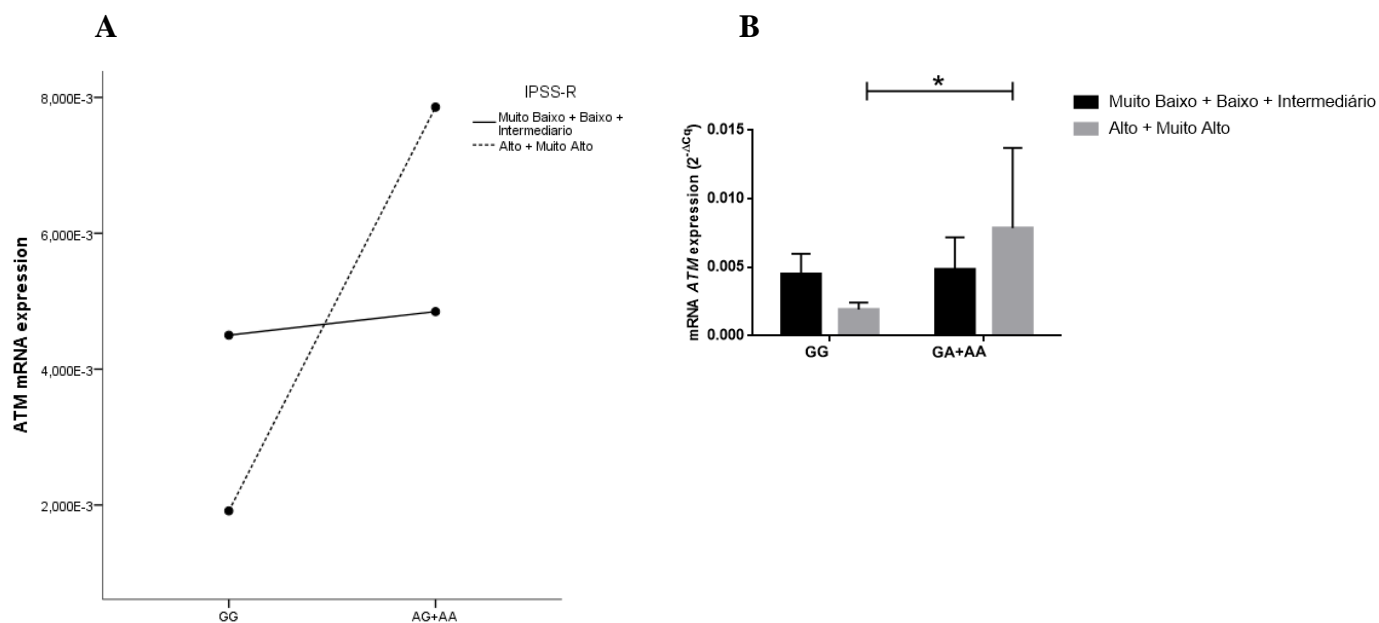
4.5.1 Análise do nível de expressão do gene *ATM* associado ao polimorfismo rs228593 e as variáveis sócio-demográficas e clínicas dos pacientes com SMD.

Em relação à estratificação dos pacientes quanto ao índice prognóstico do IPSS-R, foi identificado que há fortes indícios de que os genótipos do polimorfismo rs228593 (Teste $F = 5,580$; $p = 0,024$), individualmente e na interação com os subtipos prognósticos do IPSS-R (Teste $F = 4,418$; $p = 0,043$) estão associados com um perfil diferenciado do nível de expressão do gene *ATM* em pacientes com SMD (Figuras 44 e 45).

Tanto para as análises do modelo genético dominante (Figura 44) quanto o recessivo (Figura 45), foi possível observar que houve um significativo aumento da expressão do gene *ATM* em pacientes de SMD de alto e muito alto risco influenciado pela presença do genótipo

polimórfico AA / GA+AA quando comparados com pacientes com o genótipo GG (Figuras 44 e 45).

Figura 44: Análises das comparações entre os genótipos do polimorfismo rs228593, de acordo com o modelo genético dominante (GG versus GA + AA), e a variável do índice prognóstico do IPSS-R aos níveis de expressão do gene *ATM*.

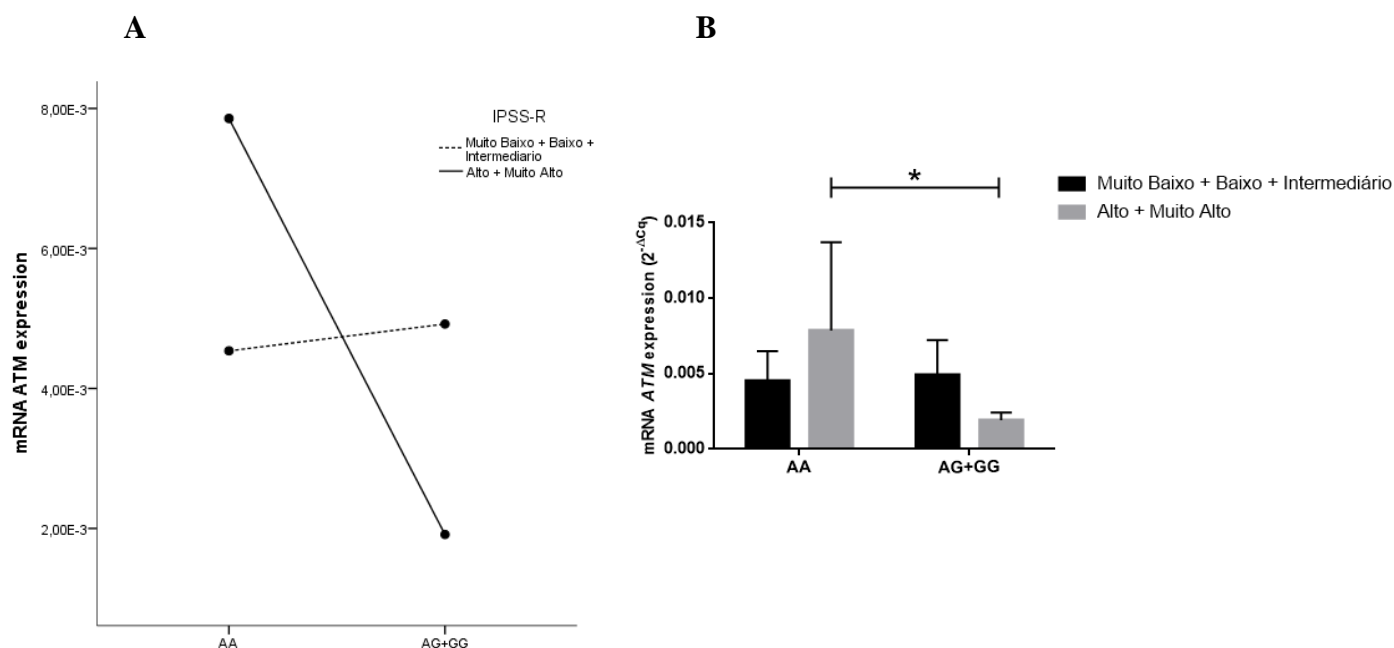


| Genótipos* | Variáveis** | N | Média | Desvio Padrão | Teste de efeito entre as variáveis*** | | | |
|------------|-------------------------------------|----|--------------------|---------------------|---------------------------------------|-------------------|----------|--------------|
| | | | | | Efeitos | Quadrado da Média | Teste F | p-valor |
| GG | Muito Baixo + Baixo + Intermediário | 8 | ,004500 331875 | ,0014984 4512919 | Genótipos | 0,000045 | 5,579647 | 0.024 |
| | Alto + Muito Alto | 2 | ,001913 9645 | ,0005076 4963588 | | | | |
| GA+AA | Muito Baixo + Baixo + Intermediário | 22 | ,004846 8204090 | ,0023486 9971992 | IPSS-R | <0,000000 | 0,025342 | 0.874 |
| | Alto + Muito Alto | 5 | ,007857 0650000 | ,0058516 2583695 | | | | |
| | | | | | Genótipos* IPSS-R | 0,000036 | 4,417867 | 0.043 |

*Genótipos do polimorfismo rs228593. **IPSS-R.

***Análise do teste de ANOVA two-way com diferença significativa quando o $p < 0.05$.

Figura 45: Análises das comparações entre os genótipos do polimorfismo rs228593, de acordo com o modelo genético recessivo (AA versus GA + GG), e a variável do índice prognóstico do IPSS-R aos níveis de expressão do gene *ATM*.



| Genótipos* | Variáveis** | N | Média | Desvio Padrão | Teste de efeito entre as variáveis *** | | | |
|------------|-------------------------------------|----|---------|---------------|--|-------------------|----------|---------|
| | | | | | Efeitos | Quadrado da Média | Teste F | p-valor |
| AA | Muito Baixo + Baixo + Intermediário | 13 | 0,00453 | 0,001959 | Genótipos | 0,000037 | 5,579647 | 0.040 |
| | Alto + Muito Alto | 5 | 0,00785 | 0,005852 | | | | |
| GA+GG | Muito Baixo + Baixo + Intermediário | 17 | 0,00492 | 0,002307 | IPSS-R | <0,000000 | 0,025342 | 0.874 |
| | Alto + Muito Alto | 2 | 0,00191 | 0,000508 | | | | |

*Genótipos do polimorfismo rs228593. **IPSS-R.

***Análise do teste de ANOVA two-way com diferença significativa quando o $p < 0.05$.

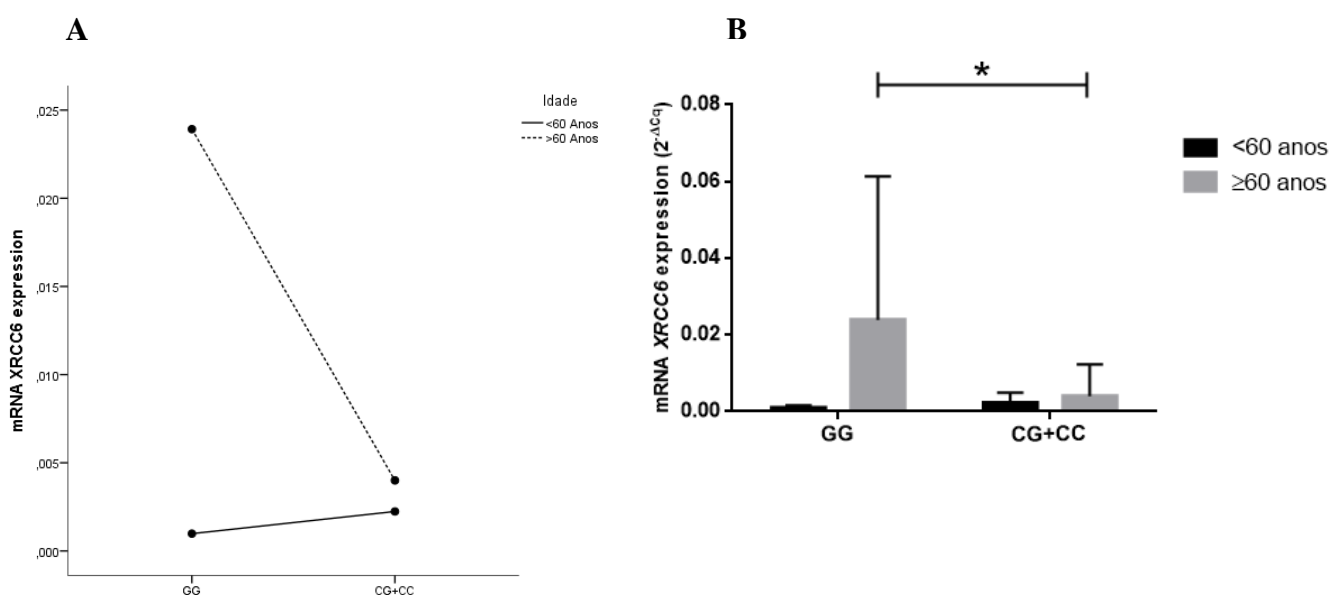
4.5.2 Análise do nível de expressão do gene *XRCC6* associado ao polimorfismo rs2267437 e às variáveis sócio-demográficas e clínicas dos pacientes com SMD.

Foram identificadas importantes interações entre a presença do polimorfismo rs2267437 e as variáveis de idade (Figura 46), celularidade da medula óssea (Figura 47) e estratificação clínica dos pacientes de acordo com a OMS (Figura 48), frente ao perfil de expressão do gene *XRCC6* em pacientes com SMD.

Quanto à análise da variável idade dos pacientes com SMD pode-se dizer que a interação desta variável com a presença de diferentes genótipos para o polimorfismo

rs2267437 pode explicar as diferenças de expressão do gene *XRCC6* nesta população (Teste $F = 4,449$; $p = 0,041$) (Figura 46A e 46B). Em relação a esta análise de interação, frente à análise do modelo recessivo, podemos destacar que a presença da variante homozigota polimórfica GG aumenta significativamente o nível de expressão do gene *XRCC6* em pacientes com idade superior a 60 anos quando comparados a pacientes com o genótipo CG+CC (Figura 46A e 46B).

Figura 46: Análises das comparações entre os genótipos do polimorfismo rs2267437, de acordo com o modelo genético recessivo (GG versus CG + CC), e a variável da idade dos pacientes com SMD associadas aos níveis de expressão do gene *XRCC6*.



| Genótipos* | Variáveis** | N | Média | Desvio Padrão | Teste de efeito entre as variáveis *** | | | |
|------------|-------------|----|--------------|---------------|--|-------------------|----------|--------------|
| | | | | | Efeitos | Quadrado da Média | Teste F | p-valor |
| GG | <60 anos | 2 | 0,00098 2 | 0,000605 | Genótipos | 0,000373 | 3,455793 | 0.070 |
| | ≥60 anos | 3 | 0,02392 1 | 0,037425 | | | | |
| CG+CC | <60 anos | 16 | 0,00223 8 | 0,037425 | Idade | 0,000653 | 6,053233 | 0.018 |
| | ≥60 anos | 26 | 0,00400 0 | 0,008329 | | | | |
| | | | | | Genótipos* Idade | 0,000480 | 4,448874 | 0.041 |

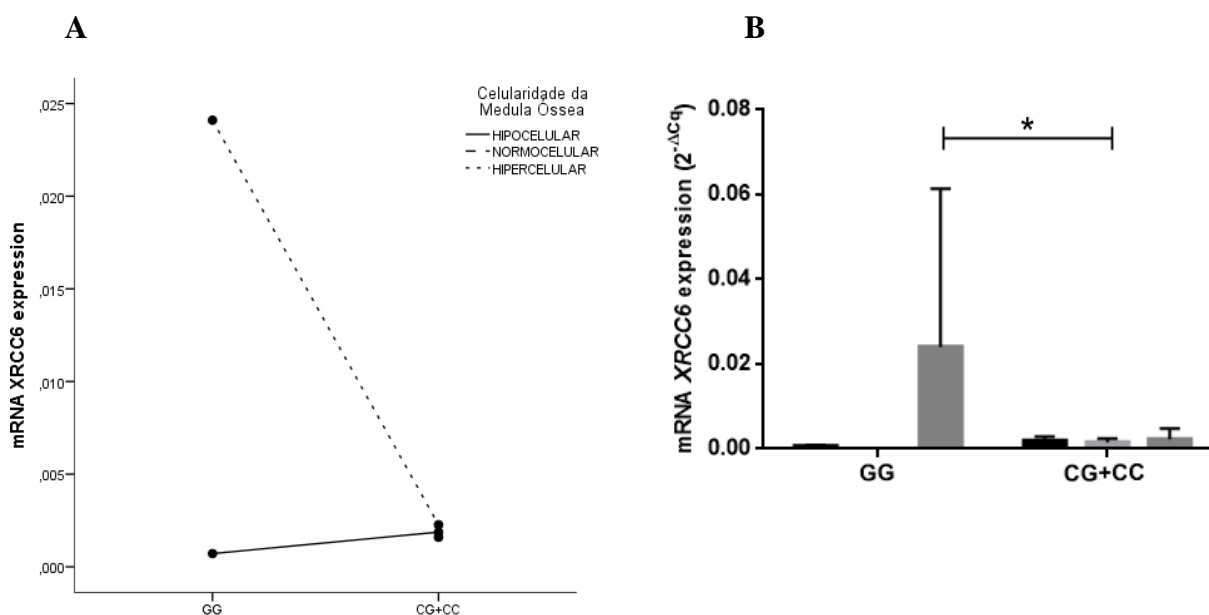
*Genótipos do polimorfismo rs2267437. **Idade.

***Análise do teste de ANOVA two-way com diferença significativa quando o $p < 0.05$.

Também para o modelo genético recessivo, observou-se que existe um efeito significativo dos genótipos do polimorfismo rs2267437 (Teste $F = 5,230$; $p = 0,028$) e da

variável de celularidade (Teste $F = 4.926$, $p=0.033$), seja individualmente ou na interação (Teste $F= 6,469$; $p= 0,016$), sobre a expressão do gene *XRCC6*, indicando que a presença do genótipo polimórfico GG afeta de forma significativa o aumento do nível de expressão do gene *XRCC6* em pacientes com medula hiper celular quando comparados a pacientes com variante selvagem CG+CC (Figura 47A e 47B).

Figura 47: Análises das comparações entre os genótipos do polimorfismo rs2267437, de acordo com o modelo genético recessivo (GG versus CG+CC), e a variável da celularidade da medula óssea dos pacientes com SMD frente aos níveis de expressão do gene *XRCC6*.



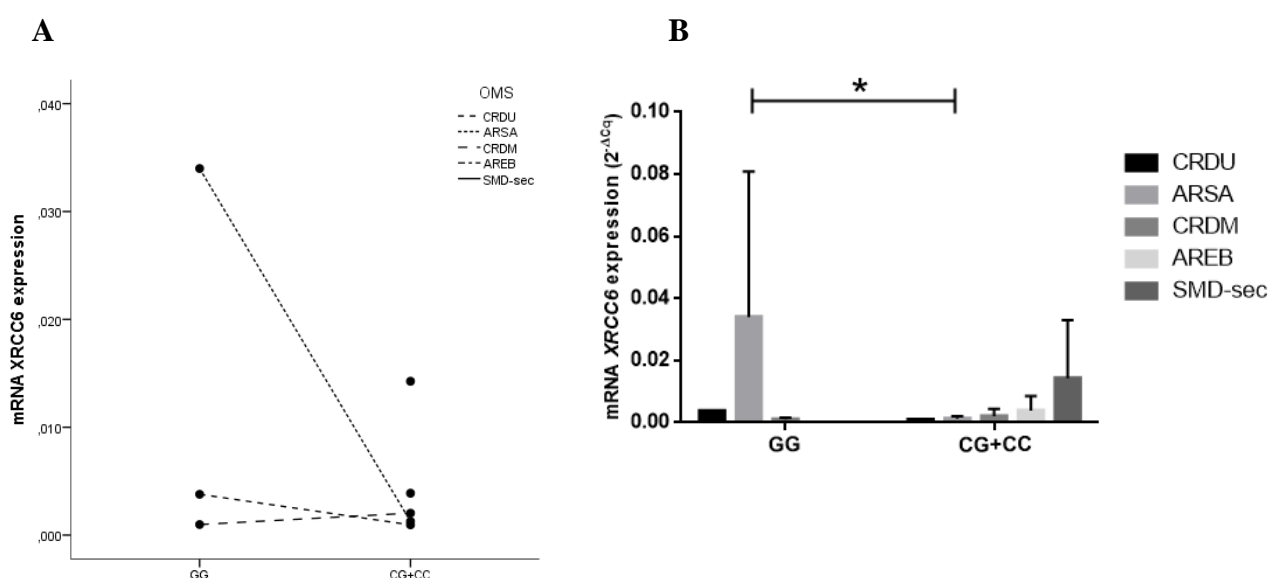
| Genótipos* | Variáveis** | N | Média | Desvio Padrão | Teste de efeito entre as variáveis *** | | | |
|------------|---------------|----|---------|---------------|--|-------------------|-----------|--------------|
| | | | | | Efeitos | Quadrado da Média | Teste F | p -valor |
| GG | Hipocelular | 2 | 0,00071 | 0,000226 | Genótipos | 0,000434 | 5,229933 | 0.028 |
| | Normocelular | - | - | - | | | | |
| | Hiper celular | 3 | 0,02409 | 0,037261 | | | | |
| CG+CC | Hipocelular | 10 | 0,00187 | 0,001048 | Celularidade | 0,000290 | 3,491531 | 0.041 |
| | Normocelular | 5 | 0,00159 | 0,000843 | | | | |
| | Hiper celular | 20 | 0,00227 | 0,002493 | Genótipos* Celularidade | 0,000537 | 6,468664 | 0.016 |

*Genótipos do polimorfismo rs2267437. ** Celularidade.

***Análise do teste de ANOVA two-way com diferença significativa quando o $p < 0.05$.

Por fim, em relação à análise do modelo genético recessivo, verificou-se que há um importante efeito dos genótipos do polimorfismo rs2267437 (Teste $F = 4,927$; $p = 0,032$) e da variável da classificação da OMS (Teste $F = 4,130$; $p = 0,007$), seja individualmente ou na interação de ambos (Teste $F = 5,761$; $p = 0,006$), sobre a expressão do gene *XRCC6*, indicando que a presença do genótipo polimórfico GG afeta de forma significativa o aumento do nível de expressão do gene *XRCC6* em pacientes diagnosticados como ARSA quando comparados a pacientes com variante selvagem CG+CC (Figura 48A e 48B).

Figura 48: Análises das comparações entre os genótipos do polimorfismo rs2267437, de acordo com o modelo genético recessivo (GG versus CG + CC), e a variável da classificação diagnóstica da OMS dos pacientes com SMD frente aos níveis de expressão do gene *XRCC6*.



| Genótipos* | Variáveis** | N | Média | Desvio Padrão | Teste de efeito entre as variáveis *** | | | | | | |
|------------|-------------|----|---------|---------------|--|-------------------|----------|--------------|----------|----------|--------------|
| | | | | | Efeitos | Quadrado da Média | Teste F | p-valor | | | |
| GG | CRDU | 1 | 0,00378 | - | Genótipos | 0,000443 | 4,927429 | 0.032 | | | |
| | ARSA | 2 | 0,03398 | 0,046830 | | | | | | | |
| | CRDM | 2 | 0,00098 | 0,000605 | | | | | | | |
| | AREB | - | - | - | OMS | | | | 0,000371 | 4,130267 | 0.007 |
| | SMD-sec | - | - | - | | | | | | | |
| CG+CC | CRDU | 2 | 0,00095 | 0,000171 | Genótipos* OMS | 0,000518 | 5,760763 | 0.006 | | | |
| | ARSA | 7 | 0,00126 | 0,000817 | | | | | | | |
| | CRDM | 22 | 0,00203 | 0,002385 | | | | | | | |
| | AREB | 7 | 0,00388 | 0,004696 | | | | | | | |
| | SMD-sec | 4 | 0,01426 | 0,018749 | | | | | | | |

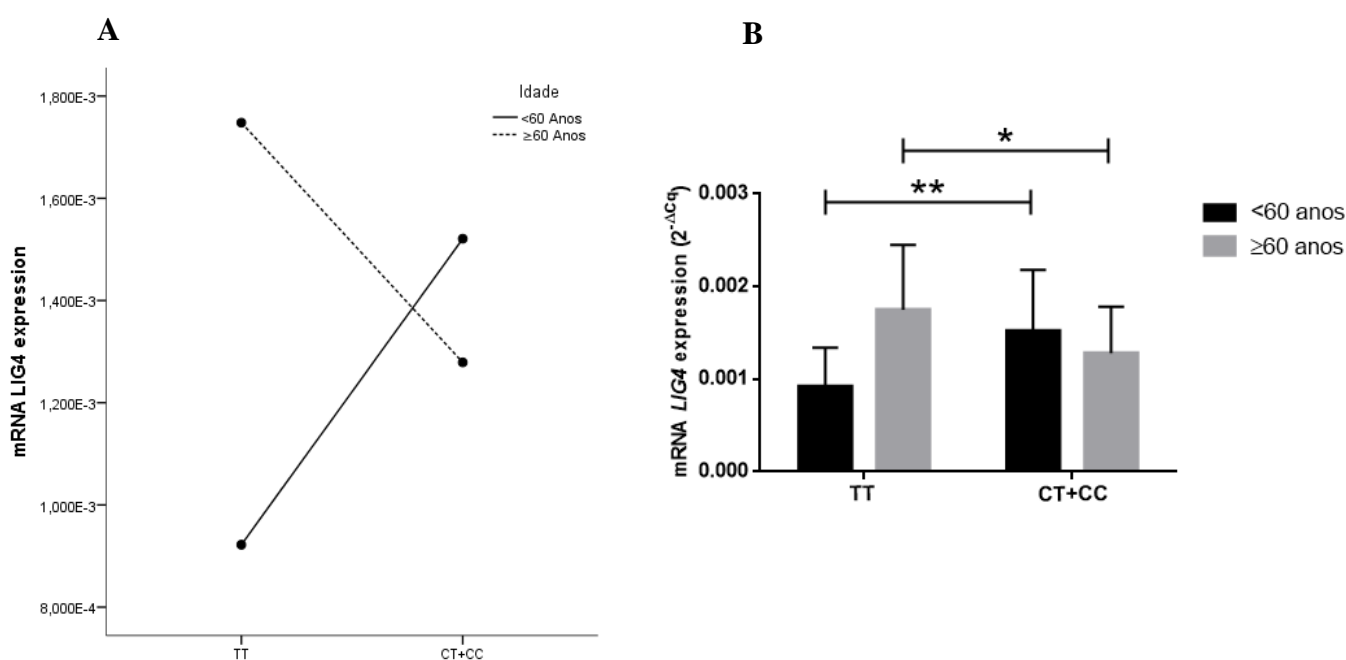
*Genótipos do polimorfismo rs2267437. ** Classificação OMS.

***Análise do teste de ANOVA two-way com diferença significativa quando o $p < 0.05$.

4.5.3 Análise do nível de expressão do gene *LIG4* associado ao polimorfismo rs1805388 e as variáveis sócio-demográficas e clínicas dos pacientes com SMD.

Nas análises para o gene *LIG4*, para o modelo genético recessivo, foi identificado que há uma forte interação entre a variável idade e os genótipos do polimorfismo rs1805388 em relação ao nível de expressão do gene *LIG4* em pacientes com SMD (F test= 8.726; $p=0.005$) (Figura 49). Graficamente, pode-se inferir que a presença da variante polimórfica TT para o polimorfismo rs1805388 causa um aumento do nível de expressão do gene *LIG4* em pacientes idosos (≥ 60 anos), diferentemente do observado em pacientes jovens (<60 anos), que se observa uma diminuição da expressão do gene *LIG4* (Figura 49).

Figura 49: Análises das comparações entre os genótipos do polimorfismo rs1805388, de acordo com o modelo genético recessivo (TT versus CT + CC), e a variável de idade frente aos níveis de expressão do gene *LIG4*.



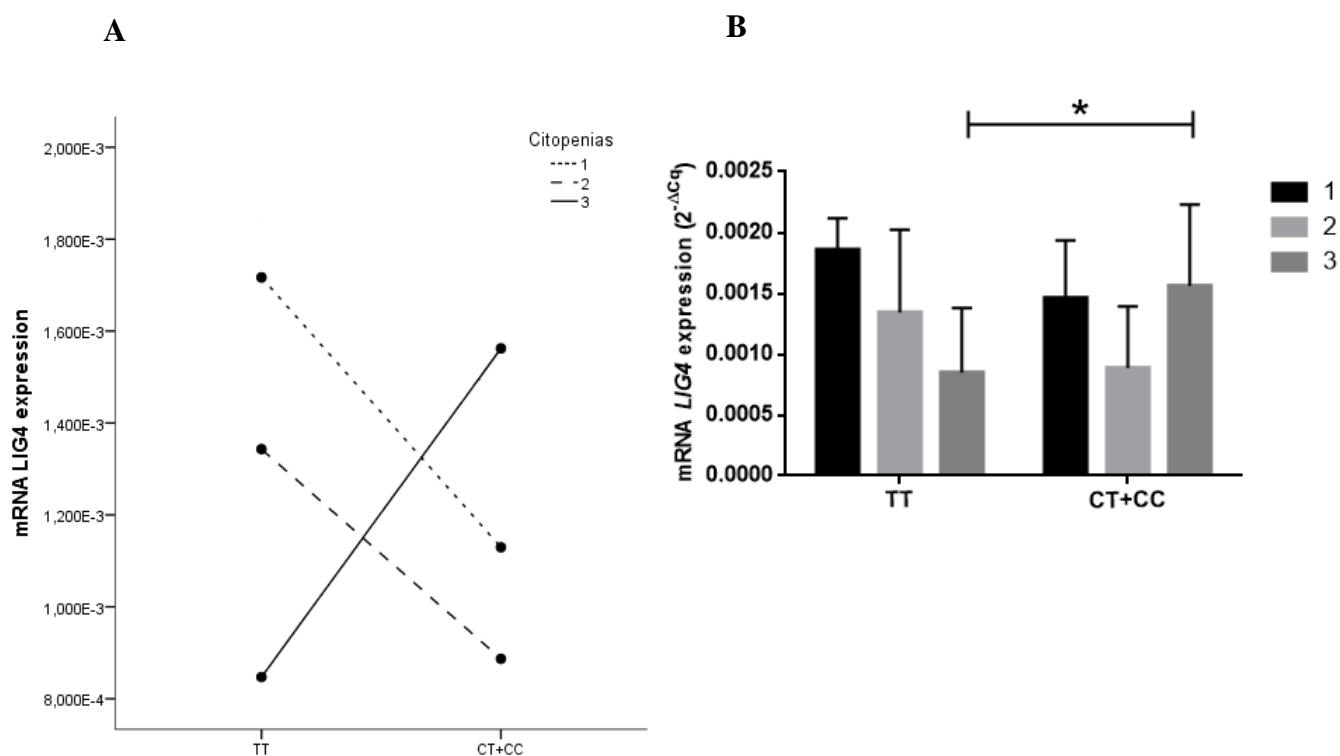
| Genotypes * | Variable** | N | Mean | Std. Deviation | Tests of Between-Subjects Effects*** | | | |
|-------------|----------------|----|----------|----------------|--------------------------------------|-------------|--------|--------------|
| | | | | | Source | Mean square | F test | p-value |
| TT | < 60 anos | 7 | 0,000922 | 0,000417 | Genotypes | <0,000 | 0,1289 | 0.721 |
| | ≥ 60 anos | 9 | 0,001748 | 0,000704 | | | | |
| CT+CC | < 60 anos | 11 | 0,001521 | 0,000661 | Idade | 0,000001 | 2,6091 | 0.114 |
| | ≥ 60 anos | 20 | 0,001279 | 0,000505 | | | | |
| | | | | | Genótipos*Idade | 0,000003 | 8,7262 | 0.005 |

*Genótipos do polimorfismo rs1805388. ** Idade.

***Análise do teste de ANOVA two-way com diferença significativa quando o $p < 0.05$.

Adicionalmente, também em relação ao modelo genético, foi encontrado que a presença dos genótipos do polimorfismo rs1805388 interagiu com a presença de citopenias enquanto modificador do nível de expressão do gene *LIG4* (F test= 3.078; $p=0.039$) (Figura 50). Estes resultados podem ser observados na análise da significativa diminuição da expressão do gene *LIG4* causada pela presença do genótipo polimórfico TT em pacientes com 3 citopenias (Figura 50A e 50B).

Figura 50: Análises das comparações entre os genótipos do polimorfismo rs1805388, de acordo com o modelo genético recessivo (TT versus CT + CC), e a presença de citopenias frente aos níveis de expressão do gene *LIG4*.



| Genotypes* | Variable** | N | Mean | Std. Deviation | Tests of Between-Subjects Effects*** | | | |
|------------|--------------|----|----------|----------------|--------------------------------------|-------------|--------|----------|
| | | | | | Source | Mean square | F test | p-value |
| TT | 1 citopenias | 4 | 0,001857 | 0,000260 | Genótipos | <0,000 | 0,9139 | 0,344968 |
| | 2 citopenias | 4 | 0,001343 | 0,000682 | | | | |
| | 3 citopenias | 5 | 0,000847 | 0,000533 | | | | |
| CT+CC | 1 citopenias | 14 | 0,001459 | 0,000475 | Citopenias | 0,000001 | 1,9921 | 0,131062 |
| | 2 citopenias | 5 | 0,000887 | 0,000503 | | | | |
| | 3 citopenias | 9 | 0,001562 | 0,000666 | | | | |

*Genótipos do polimorfismo rs1805388. ** Citopenias.

***Análise do teste de ANOVA two-way com diferença significativa quando o $p < 0.05$.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar o nível de expressão de 7 genes relacionados ao mecanismo de reparo de danos de fita dupla no DNA relacionando-os às frequências dos seus respectivos polimorfismos frente às variáveis sócio-demográficas e clínicas de 83 pacientes com SMD.

Inicialmente, quanto à caracterização dos pacientes, verificamos que a média de idade foi de 64,6 anos (mediana = 67 anos / mínimo de 22 anos e máximo de 91 anos) corroborando com o levantamento proposto no estudo de Magalhães et al. (2010) e com o estudo de Belli et al. (2015). Quanto à proporção de pacientes do sexo masculino e feminino, este estudo apresentou uma relação de 1,3. Estes dados podem ser confirmados por serem equivalentes aos achados observados nos registros epidemiológicos internacionais sobre SMD que apresentam uma razão masculino/feminino entre 1,1 e 2 (HAASE et al., 2007; BELLI et al., 2015).

Adicionalmente, foi possível identificar que houve um importante predomínio de casos de SMD diagnosticados em pacientes de origem rural, destacando-se que 95,8% (23/24) dos pacientes afirmam que tiveram exposição à tóxicos prévia ao diagnóstico de SMD. Este dado reafirma o exposto por Nisse et al. (2001) quando é citado que diferentes exposições a agentes genotóxicos, tais como os agrotóxicos, podem contribuir para o desenvolvimento de SMD (NISSE et al., 2001), mesmo salientando que o estado do Ceará representa um dos estados com menores taxas de uso de agrotóxico por hectares, correspondendo ao uso de 0,5 kg/ha (IBGE, 2015).

Quanto à estratificação diagnóstica dos pacientes pela classificação da OMS, observou-se um alto predomínio de casos de CRDM (44,6%), seguido por casos de AREB (15,6%), ARSA (14,5%) e CRDU (10,8%), coincidindo com o fato da maioria dos pacientes estarem inseridos no grupo de pacientes de baixo grau. Analisando-se 345 pacientes brasileiros, Belli e colaboradores (2015) demonstraram que a referida população apresenta predomínio de pacientes do grupo de CRDM (35,1%), também seguidos de casos de AREB (29,8%), CRDU (13,4%) e ARSA (10,4%), mostrando que a presente pesquisa está de acordo com os estudos internacionais. Estes dados também corroboram com o estudo de Haase et al. (2007) que apresentam que há uma predominância de SMD de baixo grau (76,7% dos casos neste estudo) nos países ocidentais tendo a prevalência, principalmente, dos subtipos de CRDU, ARSA e CRDM em aproximadamente 64% dos casos.

Em relação ao perfil de celularidade da medula óssea, foi possível observar um predomínio de pacientes com medula hiperclular, apresentando duas displasias, com predominância de achados medulares compatíveis com disgranulopose. Sabe-se que apesar dos recentes avanços genéticos, a morfologia medular permanece como principal ferramenta diagnóstica inicial da SMD (GOASGUEN et al., 2014; RAUH, 2014). Quanto ao perfil hiperclular da medula óssea destes pacientes, tais achados corroboram com os dados apresentados por Bernasconi et al. (2008) e Ishibashi, Tamura e Ogata (2011) que associam este resultado ao próprio perfil patogênico da doença, visto que a característica de apoptose excessiva dos estágios iniciais é equilibrado pelo aumento na proliferação das células progenitoras hematopoéticas (BERNASCONI et al., 2008; ISHIBASHI; TAMURA; OGATA, 2011).

Em relação à presença de displasias na morfologia medular do paciente com SMD, vê-se que este dado é característico da SMD cujo perfil, baseando-se no número de linhagens envolvidas - eritroide, granulocítica e megacariocítica - e o grau da displasia, compreende um fator importante para a classificação precisa da doença, sendo, nesse caso (presença de duas displasias), considerado um perfil mais agressivo e de pior prognóstico (BRUNNING et al., 2008; RAUH, 2014). Destaca-se, também, neste estudo, um importante achado clínico na análise das displasias granulocíticas (disgranulopose) em SMD que incluem a presença de hipolobação nuclear (pseudo células de Pelger-Hüet), uma hipersegmentação irregular ou um perfil de alta granularidade citoplasmática (GOASGUEN et al., 2014; RAUH, 2014). A classificação da OMS (BRUNNING et al, 2008) propõe que $\geq 10\%$ das células mielóides de pacientes com SMD apresentam disgranulopose. Adicionalmente, é importante ser salientado que a presença de disgranulopose é comumente associada à presença de deleções no cromossomo 17 (17p-, i17q) em pacientes com SMD (PINHEIRO et al., 2006a).

Quanto ao perfil citogenético dos pacientes com SMD, observamos que 42,9% de pacientes com SMD *de novo* apresentaram cariótipo alterado estando de acordo com os estudos internacionais estabelecidos por Dakshnamurthy e colaboradores (2005) e Haase e colaboradores (2007 e 2008). No entanto, predominou neste estudo casos de pacientes com resultados de cariótipo normal (57,1%). A alta frequência de alterações citogenéticas com deleção 5q isolada e de cariótipos normais no presente estudo corresponderam a fatores adicionais que corroboraram com a prevalência de 72,5% e 74,5% de pacientes inseridos na classificação de prognóstico favorável, respectivamente, para os índices estabelecidos pelo IPSS (GREENBERG et al.; 1997) e IPSS-R (GREENBERG et al. 2012), estando de acordo com o estudo de Magalhães et al. (2010).

Adicionalmente, conforme exposto por Solé e colaboradores (2005) e Haase e colaboradores (2008), as alterações mais comumente observadas no presente estudo compreenderam alterações não balanceadas relacionadas ao cromossomo 5 (-5/5q-), cromossomo 7 (-7/7q-) e cromossomo 11 (-11/11q-). Verifica-se que as variações nas frequências das alterações citogenéticas são relatadas na literatura com uma possível associação ao perfil étnico da população submetida ao estudo (CHEN et al., 2005). Por exemplo, pode ser citado 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).

Em relação aos achados hematológicos, houve um predomínio de pacientes com anemia (valores de Hb menores que 8g/dL), sem neutropenia (contagem superior a 800 por mm^3), sem plaquetopenia (contagem superior a 100.000/ mm^3) e dependentes transfusionais (utilizando-se o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (MALCOVATI et al., 2005)). Sabe-se que a SMD é caracterizada por um quadro de anemia grave podendo ser associada com o perfil clínico de neutropenia e/ou plaquetopenia (TEFFERI et al., 2009b; CERRANO et al., 2016). Caso o paciente com SMD apresente um quadro de anemia sem associação com outras citopenias (ex. neutropenia e plaquetopenia), a doença será considerada menos agressiva, conforme apresentado nos resultados deste estudo (BRUNNING et al., 2008).

Um importante achado foi a elevada taxa de óbito na população de pacientes avaliada (40,0%). A literatura demonstra que pacientes com SMD evoluem clinicamente com cursos muito heterogêneos de suas doenças, que vão desde um quadro de anemia leve e um prognóstico relativamente bom para um quadro clínico de citopenia grave, com o aumento percentual de blastos da medula e com perda significativa de expectativa de vida (NACHTKAMP et al., 2016). Sabe-se que o prognóstico dos pacientes com SMD é essencialmente dependente das características específicas da doença, tais como, por exemplo, a contagem de blastos medulares e os achados cromossômicos (NACHTKAMP et al., 2016). Além disso, a dependência transfusional (MALCOVATI et al., 2011), comorbidades (DELLA PORTA et al., 2012; ZIPPERER et al., 2014), bem como as contagens baixas de células (especialmente as do sistema imune) são parâmetros que predizem um curso desfavorável da doença.

O mais atual registro de causas de morte em SMD foi estabelecido por Nachtkamp et al., (2016) na avaliação de 2.877 pacientes alemães. Neste estudo foi apresentado que a principal causa de óbito consiste no processo de transformação para leucemia aguda, seguida

de infecções, falhas cardíacas, hemocromatose, presença de outros tumores e hemorragias (NACHTKAMP et al., 2016). Baseando-se nestes aspectos e sabendo-se que somente 10 (12,8%) pacientes com SMD evoluíram para LMA no presente estudo, entendemos que a alta taxa de óbitos observadas podem ser esclarecidas pela existência de outras comorbidades. No entanto, as informações sobre a causa morte não foram claramente apresentadas nos prontuários avaliados, inviabilizando esta análise.

Nesta pesquisa, realizamos o primeiro estudo de análise da expressão dos genes de reparo em DSBs (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4*), na associação com variáveis clínicas em pacientes com SMD. Os resultados deste estudo serão discutidos de acordo com a categorização dos níveis de expressão dos genes avaliados de acordo com o agrupamento das associações clínicas significantes apresentadas (Figuras 33 a 36).

Inicialmente, observamos importantes achados relacionados aos níveis de expressão dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* e *RAD51* e pacientes com SMD com medula hipocelular. Conforme demonstrado nas análises gráficas apresentadas nas figuras 12, 25, 27 e 30, tais genes apresentaram-se com um perfil de expressão significativamente diminuído em relação aos pacientes com medula normocelular e hiperclular.

Sabe-se que a celularidade da medula óssea em pacientes com SMD primária é normalmente do tipo normocelular ou hiperclular (YUE et al., 2008). No entanto, 10-15% dos pacientes podem apresentar medula hipocelular, correspondendo a uma particular entidade da SMD com distinto significado prognóstico (INVERNIZZI et al., 2015). De acordo com a classificação diagnóstica proposta pela OMS, verifica-se que pacientes com SMD com medula hipocelular são jovens, do sexo feminino e apresentam, frequentemente, quadro clínico associado a anormalidades imunes tais como vasculites e pioderma gangrenoso (BRUNNING et al., 2008; HEREDIA et al., 2014; SCHEMENAU et al., 2015).

Tais achados complementam-se com o fato de que acima de 50% dos pacientes com SMD possuem anormalidades cromossômicas associadas (JÄDERSTEN et al., 2009; ZHOU et al., 2015; BACHER et al., 2015) e, provavelmente, estas alterações citogenéticas estão associadas a danos no DNA nas células tronco hematopoéticas (ZHOU et al., 2015). No entanto, a literatura não mostra um consenso sobre o perfil de presença de anormalidades cromossômicas em pacientes com medula hipocelular. Marisavljević e colaboradores (2005) e Huang e colaboradores (2008) demonstram que a presença de anormalidades cromossômicas em pacientes com medula hipocelular é menor do que às observadas em pacientes com medula normo/hiperclular. Ao contrário, Yue e colaboradores (2008) sugerem

que não há diferenças na frequência de cariótipos alterados em pacientes com SMD seja com medula do tipo hipo, normo ou hiper celular.

Neste estudo, identificamos dois achados bastante interessantes: 1) Os pacientes com medula hipocelular são jovens, com 90,9% dos casos com idade inferior a 60 anos e com idade média de 44 (22-74) anos; 2) dentre os pacientes com resultado do exame de cariótipo, 75,0% (6/8) dos pacientes com medula óssea hipocelular apresentam alterações cromossômicas ao exame citogenético ao contrário que apenas 40,0% (2/5) e 34,6% (9/26) dos casos apresentaram alterações citogenéticas associadas à pacientes com medula normocelular e hiper celular, respectivamente (Tabelas 8 a 10).

A partir destas observações, hipotetizamos que a diminuição nos níveis de expressão do gene *ATM*, como responsável pelo sensoriamento das DSBs (ABRAHAM, 2004; RIBEIRO JR et al, 2013), e dos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *RAD51* (SIGURDSSON et al., 2002; RIBEIRO-JR et al, 2014), atuantes no processo de reparação por recombinação homóloga, pode caracterizar uma possível falha no reconhecimento e reparo do elevado número de lesões no DNA das células da medula óssea dos pacientes com SMD hipocelular, sendo caracterizado pelo maior índice de alterações cromossômicas encontradas nestes pacientes.

Sabendo-se que o processo de hematopoese ineficaz, característica da SMD, tem sido associada a um perfil elevado de taxa de apoptose em precursores mielóides (YOSHIDA, 2007), hipotetiza-se que o processo ineficiente de sensoriamento e de reparação das DSBs pelo gene *ATM* e dos genes atuantes no mecanismo de HR (*BRCA1*, *BRCA2* e *RAD51*) favoreceu a ativação do mecanismo de apoptose das linhagens celulares da medula, provavelmente, pela ativação das cascatas metabólicas envolvidas com a proteína p53 (SHIEH et al., 1997; SILICIANO et al., 1997), caracterizando o perfil de hipocelularidade dos pacientes com SMD avaliados. Este fato pode ser considerado pois entende-se que o gene *ATM* é o responsável por ativar a via de resposta ao dano do ciclo celular mediante fosforilação da proteína p53 (SHIEH et al., 1997; SILICIANO et al., 1997), estimando-se que os genes de reparo por HR (*BRCA1*, *BRCA2* e *RAD51*) podem ser os responsáveis por desencadear a redução no perfil de celularidade medular característica da SMD hipocelular.

Este fato pode ser corroborado quando se observa que esses genes se correlacionam positivamente, como é o caso da forte correlação identificada entre os genes *BRCA1* e *RAD51* (Figura 41) e moderada observada entre os genes *BRCA2* e *RAD51* (Figura 42) e *BRCA1* e *BRCA2* (Figura 33). Assim, tal diminuição do nível de expressão destes genes demonstra que o maquinário celular de reconhecimento e reparo do DNA provavelmente está inativo, apresentando falhas na identificação e na reparação das lesões em DSBs que acometeram as

células da medula óssea desses pacientes, mais especificamente as que acometeram a formação das anormalidades cromossômicas identificadas nos pacientes com SMD hipocelular. Assim, com estes resultados, acreditamos que os genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* e *RAD51* podem corresponder a possíveis novos marcadores moleculares, definindo melhor a compreensão sobre o processo de patogênese dos quadros de hipocelularidade na medula óssea de pacientes com SMD associados a presença de anormalidades cromossômicas.

Foi observado que o gene *ATM* apresentou-se com nível de expressão mais elevado em pacientes com a presença de uma displasia (perfil menos agressivo da doença) em relação a pacientes que apresentaram duas ou três displasias (perfil mais agressivo da doença) na medula óssea (Figura 13). Adicionalmente, verificou-se que o aumento de expressão do gene *ATM*, em relação ao *cutoff* de 0,003429 estabelecido pelo *Cutoff Finder*, esteve associado a uma maior sobrevida dos pacientes com SMD (Figura 37).

Quanto aos aspectos de displasias na medula óssea de pacientes com SMD, vê-se que a classificação diagnóstica proposta pela OMS requer o reconhecimento das características displásicas ao momento do diagnóstico da doença (BRUNNING et al., 2008). Destaca-se que a presença de 10% ou mais de displasia em uma única linhagem celular mielóide é necessária para o diagnóstico do subtipo clínico de CRDU (BRUNNING et al., 2008; ARBER et al., 2015). Enquanto que o diagnóstico de CRDM requer a presença de 10% ou mais de displasia em 2 ou mais linhagens celulares mielóides (BRUNNING et al., 2008; ARBER et al., 2015).

É importante salientar também que algumas mudanças displásicas são frequentemente associadas com certas anormalidades cromossômicas ou mutações genéticas (EISENMANN et al., 2009; POST et al., 2010). Por exemplo, destaca-se a associação de deleções no cromossomo 5 (5q) e a presença de megacariócitos mononucleares (EISENMANN et al., 2009; POST et al., 2010) e mutações em genes de *splicing*, tal como as identificadas no gene *SF3B1* associadas a presença de sideroblastos em anel na medula óssea de pacientes com SMD (PAPAEMMANUIL et al., 2011; MALCOVATI et al., 2015).

Neste estudo, verificou-se que os pacientes com uma displasia na medula óssea apresentaram 27,3% (3/11) de casos com cariótipo alterado (Tabelas 8 a 10). Em seguida, conforme esperado, verificou-se que 45,0% (7/20) dos casos de presença de cariótipo alterado foram identificados nos pacientes com presença de duas e três displasias na medula óssea dos pacientes com SMD (Tabelas 8 a 10).

Particularmente para o gene *ATM*, avaliamos que o aumento do nível de expressão em pacientes com uma displasia na medula óssea está associado com o número reduzido de anormalidades cromossômicas e, conseqüentemente, de um perfil menos elevado de

instabilidade genômica nesse grupo de pacientes (RIBEIRO JR et al., 2013), dado que, neste estudo, os pacientes com aumento de expressão deste gene também estão associados a uma maior sobrevida. Nosso grupo de pesquisa tem identificado que variantes polimórficas do gene *ATM* estiveram associadas a uma diminuição de chance de susceptibilidade para SMD como também a características de bom prognóstico para o paciente com SMD tais como a presença de 1 citopenia ao diagnóstico (RIBEIRO JR et al., 2013). Assim, entende-se que o gene *ATM* pode ser considerado possivelmente um marcador de bom prognóstico para a SMD (RIBEIRO JR et al., 2013), podendo ser definidor do processo de desenvolvimento displásico, caracterizando um perfil menos agressivo da doença.

Em seguida, foi identificada uma significativa associação entre os níveis de expressão do gene *XRCC5* (Figura 15) e a presença de sideroblastos em anel em pacientes com SMD. Nesta análise, observou-se que pacientes inseridos na faixa de 1% - 14% de sideroblastos em anel apresentam uma maior expressão do gene *XRCC5* em relação à pacientes com valores maiores que 50% de sideroblastos em anel na medula óssea.

Nesta discussão, torna-se importante ser conceituado que sideroblastos em anel correspondem a eritroblastos possuidores de mitocôndrias carregadas de ferro, com um anel perinuclear azul sendo visualizadas a partir de análise de coloração de azul de prússia ao diagnóstico (CAZZOLA; INVERNIZZI, 2011; PATNAIK, et al., 2015; PATNAIK, et al., 2016). Em SMD, a presença de sideroblastos em anel adicionado de mutações no gene *SF3B1* (ARBER; HASSERJIAN, 2015) caracteriza um subtipo de doença bastante particular, denominado de anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA) (BRUNNING et al, 2008; PAPAEMANNUIL et al, 2011; INVERNIZZI, 2011; ARBER.; HASSERJIAN, 2015; PATNAIK, et al., 2015; PATNAIK, et al., 2016).

A ARSA corresponde a um grupo de doença definida por um quadro de anemia isolada, com displasias somente em linhagens eritroides, com menos que 5% de blastos e com a presença de mais que 15% de sideroblastos em anel na medula óssea, ou menos estando associado a mutações no gene *SF3B1* (BRUNNING et al, 2008; ARBER.; HASSERJIAN, 2015; PATNAIK, et al., 2015; PATNAIK, et al., 2016), sem associação prévia a anormalidades cromossômicas (CAZZOLA; INVERNIZZI, 2011). No presente estudo, 28,6% (4/14) dos casos de pacientes com mais que 15% de sideroblastos em anel estiveram associados a cariótipo alterado. No entanto, especificamente em relação aos pacientes com até 14% de sideroblastos anel e com resultado citogenético, identificou-se que 66,6% (2/3) dos casos apresentaram alterações cromossômicas na análise do cariótipo.

Neste contexto, Van Gent e colaboradores (2001) afirmam que o processo de instabilidade cromossômica pode ser causada pela falha no reparo das DSBs. Em relação ao funcionamento do gene *XRCC5*, atuante no mecanismo de reparo por NHEJ, sabe-se que foram identificadas frequentes anormalidades cromossômicas em fibroblastos de ratos com deficiência deste gene (*XRCC5^{-/-}*) (LEE et al., 2007). Adicionalmente, Difilippantonio e colaboradores (2000) afirmam 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).

No entanto, a literatura ainda mostra-se controversa sobre o papel do gene *XRCC5* na patogênese da SMD. Economopoulou e colaboradores (2010) não encontraram associações na expressão da proteína Ku80 e o perfil clínico e prognóstico (citogenética, IPSS ou OMS) de pacientes com SMD. Entretanto, encontramos, em nosso estudo de coorte, que alterações polimórficas em heterozigose para o polimorfismo rs3835 do gene *XRCC5* estiveram fortemente associadas a uma redução de susceptibilidade para SMD (RIBEIRO JR. et al., 2014).

Neste estudo, inferimos que, provavelmente, o aumento no nível de expressão do gene *XRCC5* corresponde a um potencial marcador de prognóstico desfavorável em pacientes com a presença de 1-14% de sideroblastos em anel na medula, pois a superexpressão deste gene está relacionada a um aumento da reparação mediada por NHEJ, conseqüentemente, buscando reparar o elevado número de anormalidades cromossômicas (DIFILIPPANTONIO et al., 2000) identificadas nesse grupo de pacientes.

Neste estudo foram identificadas importantes associações entre os níveis de expressão dos genes *BRCA2*, *RAD51* e *LIG4* e as estratificações diagnósticas e prognósticas estabelecidas pela OMS (BRUNNING et al., 2008) e WPSS (MALCOVATI et al., 2005) como também quanto às variáveis de sobrevida global e evolução para LMA.

Inicialmente, foi possível observar que os genes *BRCA2* (Figura 28) e *RAD51* (Figura 31) apresentaram-se menos expressos em pacientes com SMD-sec quando comparado aos subtipos de CRDU e CRDM. Contrariamente, pacientes com SMD-sec apresentaram um aumento de expressão do gene *LIG4* também quando comparados a pacientes diagnosticados como CRDU e CRDM (Figura 22). Adicionalmente, pacientes diagnosticados como AREB I e AREB II e pacientes de alto e muito alto risco (Figura 21), de acordo com o escore prognóstico do WPSS, apresentaram uma diminuição na expressão do gene *LIG4* (Figura 22).

Além disto, sabendo-se que os pacientes com SMD-sec não estiveram associados à evolução clínica para LMA no presente estudo (Tabela 10), verifica-se que a diminuição da expressão do gene *LIG4*, identificada em pacientes que evoluíram para LMA (Figura 23), esteve associada aos pacientes diagnosticados como AREB. Por fim, foi identificado que pacientes com um perfil de expressão do gene *LIG4* inferior ao *cutoff* 0,000659, estabelecido pelo *Cutoff Finder*, apresentaram uma menor sobrevida (Figura 38).

Neste contexto, esclarece-se que a maioria dos casos de SMD-sec surgem após quimioterapia para outros tipos de cânceres, particularmente quanto ao uso de agentes de alquilação ou de inibidores da topoisomerase, e, também, após a tratamentos associados à radioterapia (SEKERES et al., 2008; SEKERES et al., 2010). As SMD-sec podem ser caracterizadas pela presença de alterações cromossômicas associadas a translocações não balanceadas envolvendo o cromossomo 5 ou o 7, translocações balanceadas envolvendo a região 11q23 e, até mesmo, com perfil de cariótipo complexo (com a presença de 3 ou mais alterações no cariótipo) (ROWLEY; OLNEY, 2002; SEKERES et al., 2010).

Destaca-se também que a AREB, unido-se os subtipos de AREB I e AREB II, corresponde ao subtipo de SMD que apresenta uma faixa entre 5 a 19% de blastos na medula óssea, normalmente estando associada a presença de cariótipos complexos (BRUNNING et al., 2008; SALIM et al., 2016). Tanto pacientes diagnosticados como AREB ou SMD-sec apresentam uma menor sobrevida no curso clínico da doença associada a um elevado risco de evolução para LMA pois apresentam cariótipo alterado em cerca de 80% dos casos (NAEIM; RAO; GRODY, 2008; LEE et al., 2015; SALIM et al., 2016).

Assim, em relação aos casos com resultados de cariótipo (excluindo-se as ausências de metáfase), podemos destacar que, neste estudo, os pacientes com CRDU apresentaram 28,6% (2/7) de cariótipo alterado; os pacientes com ARSA apresentaram 42,8% (3/7) de alterações citogenéticas; os pacientes com CRDM apresentaram 44,8% (13/29) de casos com anormalidades cromossômicas, 57,1% (4/7) dos pacientes diagnosticados como AREB (juntado-se os casos de AREB-I e AREB-II) e, por fim, 40,0% (2/5) de casos diagnosticados como SMD-sec apresentaram casos com cariótipo alterado (Tabela 10). Estes resultados apresentam que pacientes diagnosticados como subtipos clínicos de alto grau (AREB e SMD-sec) apresentam um maior número de casos com cariótipo alterado quando comparado a pacientes de baixo grau (CRDU, CRDM e ARSA).

Frente a estes achados, destaca-se que alguns autores demonstram que os genes de reparo, sejam os atuantes no mecanismo de HR ou de NHEJ, atuam diretamente nas lesões que acometem o desenvolvimento das alterações citogenéticas (BISHOP; SHIESTL, 2000;

ANDERSON et al., 2010). Knudson (2001) e Nolte e Hofmann (2008) corroboram com a hipótese de que não é um único fator que pode desencadear o processo de evolução clonal quanto à patogênese da SMD, seja primária ou secundária (KNUDSON, 2001; NOLTE; HOFMANN, 2008). Sabe-se que a patogênese da transformação da SMD em LMA é baseada principalmente no conceito do modelo de "two hits" de Knudson (KNUDSON, 2001).

Este modelo conceitua que somente uma alteração ou inativação em um alelo raramente é suficiente para o desenvolvimento de tumores ou evolução de um clone maligno (KNUDSON, 2001). No entanto, a perda do outro alelo correspondente ou alterações genômicas adicionais são necessárias para a consolidação da patogênese tumoral (KNUDSON, 2001). A partir deste conceito, entende-se que a evolução clonal da SMD consiste no acometimento de novas lesões genômicas a partir dos subtipos de melhor prognóstico (ex. CRDU, ARSA e CRDM) até os subtipos de pior prognóstico (ex. AREB-I, AREB-II e SMD-sec) e os casos de SMD que evoluíram para LMA (NOLTE; HOFMANN, 2008; SEKERES, 2010).

Diante disto, hipotetiza-se que a diminuição do nível de expressão dos genes *BRCA2* e *RAD51* em pacientes com SMD-sec e do *LIG4* em pacientes com AREB I, AREB II e de alto e muito alto risco podem corresponder a possíveis marcadores de pior prognóstico e de progressão clonal em casos de SMD de alto grau, estando associados a uma diminuição da sobrevida e a uma elevada chance de evolução para LMA, especialmente quanto à avaliação do gene *LIG4*. Em contrapartida, verifica-se a necessidade de maiores estudos que determinem o papel do gene *LIG4* em pacientes com SMD-sec já que este gene apresentou-se superexpressos nestes casos.

Foram observadas importantes associações entre o aumento do nível de expressão do gene *XRCC6* em pacientes com dependência transfusional (Figura 17). Também foi identificado que pacientes diagnosticados como CRDU, ARSA e CRDM (Figura 19) e pacientes com cariótipo alterado (Figura 18) apresentaram uma diminuição da expressão do gene *XRCC6*. Este possível paradoxo da expressão do *XRCC6* pode ser explicado através da identificação do perfil clínico do paciente com cariótipo alterado e que estiveram associados a um quadro de dependência transfusional neste estudo (Tabela 10).

Assim, dentre os 24 casos de pacientes com resultado citogenético apresentando alterações cromossômicas, observou-se que há um predomínio de 54,2% (13/24) de casos de CRDM seguidos de 16,6% (4/24) de pacientes diagnosticados como AREB nessa casuística (Tabela 10). Adicionalmente, frente aos 39 pacientes com dependência transfusional,

verificou-se que também há um predomínio de casos diagnosticados como CRDM (53,8%; 21/39) seguida de 23,1% (9/39) de casos classificados como AREB (Tabela 10).

Neste contexto, vê-se que a 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). Difilippantonio e colaboradores (2000) e Ferguson e Alt (2001) citam que deficiências na via de reparo por NHEJ podem levar ao aumento da instabilidade genômica e consequente processo de tumorigênese (DIFILIPPANTONIO et al., 2000; FERGUSON; ALT, 2001). Destaca-se que a proteína Ku70 (codificada pelo gene *XRCC6*) faz parte do dímero Ku70/Ku80 sendo responsável por um papel crucial na via de NHEJ, principalmente pelo fato de ser o primeiro complexo protéico que se liga a porção danificada terminal do DNA (LIEBER et al., 2008).

Assim, ao considerarmos que o perfil *downregulated* do gene *XRCC6* é um fator de prognóstico desfavorável para os pacientes de baixo risco, parece evidente que a diminuição da expressão deste gene é capaz de identificar um subgrupo desfavorável dentro dos pacientes de baixo risco que apresentariam menor dependência transfusional e maior instabilidade genômica (p.ex. na presença de alterações cromossômicas).

Os últimos resultados deste estudo foram identificados quanto às análises da influência dos polimorfismos rs228593, rs4793191, rs9567623, rs1801320, rs3835, rs2267437 e rs1805388 e das variáveis clínicas dos pacientes com SMD em relação aos níveis de expressão dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4*, respectivamente.

Inicialmente, neste estudo, foi identificado que pacientes com os genótipos polimórficos GG e TT apresentaram influência sobre o nível de expressão dos genes *XRCC6* e *LIG4*, respectivamente, em relação à idade dos pacientes com SMD. Inicialmente, em relação ao modelo genético recessivo, a presença do genótipo polimórfico GG aumentou o nível de expressão do gene *XRCC6* em pacientes com SMD mais jovens que 60 anos (Figura 46). Adicionalmente, no modelo genético recessivo, verificou-se que a presença do genótipo polimórfico TT altera o perfil de expressão do gene *LIG4* em duas situações distintas: aumentando o nível de expressão em pacientes idosos e diminuindo o perfil de expressão em pacientes com idade menor que 60 anos (Figura 49).

Estes achados tornam-se interessantes quando é compreendido que: 1) o gene *XRCC6*, sendo responsável por facilitar a resolução eficiente do mecanismo de reparo de NHEJ em DSBs, é essencial por evitar a ocorrência anormalidades cromossômicas (DIFILIPPANTONIO et al., 2000; FERGUSON; ALT, 2001; LIEBER et al., 2008); 2) para a

proteína DNA Ligase IV, responsável por realizar o rearranjo da junção final do DNA danificado pelo mecanismo de reparação por NHEJ (REID et al., 2015), verificou-se que polimorfismos neste gene foram associados com outros tipos de cânceres, mas não com SMD (RIBEIRO JR., 2014; KLEPIN, 2016). Adicionalmente, alguns autores consideram que a SMD é uma importante doença hematológica que afeta mais comumente pacientes idosos e que a SMD, neste grupo de pacientes, é completamente diferente da SMD pediátrica dado o envelhecimento da população (KLEPIN, 2016) e do elevado nível de exposição a agentes genotóxicos (BOWEN, 2013; MEHTA et al., 2014; MIKHED et al., 2015; ALIZADEH et al., 2015) durante a vida do paciente idoso.

Normalmente, os pacientes idosos são associados a um elevado número de comorbidades no processo de progressão da doença e com uma diminuição da sobrevida independentemente do risco da doença (BALLEARI et al., 2015). Neste sentido, sabendo-se que a patogênese da SMD em pacientes idosos é diferente da SMD em pacientes jovens, e que os genes *XRCC6* e *LIG4* são genes supressores tumorais essenciais para o pleno reparo de DSBs pelo mecanismo de NHEJ (LIEBER et al., 2008), infere-se que há um processo compensatório na expressão desses genes quanto ao maquinário celular de resposta ao reparo do DNA devido a um aumento da instabilidade genômica em pacientes com idade superior a 60 anos promovido pela presença das variantes polimórficas GG e TT dos polimorfismos rs2267437 e rs1805388, respectivamente.

O genótipo GG do polimorfismo rs2267437 também apresentou-se associado a um perfil de aumento expressão do gene *XRCC6* em pacientes com medula hiperclular (Figura 47) e diagnosticados como ARSA (Figura 48). Brunning e colaboradores (2008) definem que os pacientes com SMD diagnosticados clinicamente dentro do grupo das anemias refratárias (AR), seja com excesso de sideroblastos em anel (ARSA) ou não, estão associados predominantemente a um perfil de hiperclularidade da medula óssea. Assim, este resultado é interessante pois corrobora com o entendimento de que a SMD possui um perfil clínico diferenciado dependendo do perfil de clularidade da medula óssea apresentado ao diagnóstico da doença.

Adicionalmente, foi identificado que a variante polimórfica TT também esteve associada a uma diminuição da expressão do gene *LIG4* (Figura 50) em pacientes com três citopenias periféricas (perfil de doença mais agressiva) (GREENBERG et al., 2012). Greenberg e colaboradores (2012) definem que o perfil de citopenias periféricas correspondem a um importante marcador prognóstico para a SMD. Fu e colaboradores (2003) e Schemenau e colaboradores (2015) demonstram que os polimorfismos rs1805388 estiveram

associados com a patogênese de vários outros genes e, até mesmo, com SMD (RIBEIRO JR et al, 2014). Provavelmente, o genótipo TT está associado a um perfil de SMD de pior prognóstico.

Assim, todos estes resultados reforçam a ideia de que os polimorfismos rs2267437 e rs1805388 dos genes *XRCC6* e *LIG4*, respectivamente, são funcionais em SMD e importantes na distição de agressividade da SMD.

Outro dado que corrobora com a discussão deste estudo consiste no fato de que foi observado um efeito significativo da presença do genótipo polimórfico AA / GA+AA do polimorfismo rs228593, favorecendo a superexpressão do gene *ATM* quando associados com pacientes de alto risco, em relação à variável prognóstica estabelecida pelo IPSS-R (Figura 44 e 45). Ronen e Glickman (2001), Hopfner (2009) e Ribeiro Jr. e colaboradores (2013) afirmam que a proteína ATM tem um papel importante na sinalização e no reparo de danos em DSBs e alterações no gene codificante desta proteína são relacionadas ao aumento de risco de leucemias e de SMD.

Curiosamente, Ribeiro Jr. e colaboradores (2013) identificaram que o genótipo heterozigoto GA do polimorfismo rs228593 esteve associado com pacientes com SMD de bom prognóstico frente a estratificação prognóstica do IPSS (GREENBERG et al., 1997). Assim, verifica-se que a presença da variante homozigótica polimórfica AA pode ser considerada de pior prognóstico na patogênese da SMD. Este dado consiste em mais um ponto de confirmação de que o polimorfismo rs228593 é funcional para esta doença.

Resumidamente, os resultados das análises de influência dos polimorfismos funcionais na SMD realçam a importância dos polimorfismos rs228593, rs2267437 e rs1805388 na diferenciação dos níveis de expressão dos genes *ATM*, *XRCC6* e *LIG4*, respectivamente, frente às variáveis clínicas de pacientes com SMD, representando novos alvos para o estudo da patogênese desta doença.

Uma importante limitação deste estudo está associada a necessidade de validação funcional do perfil e do impacto da expressão dos genes de reparo avaliados neste estudo em uma causuística mais ampla de casos, seja, por exemplo, por análises proteômicas, análises de modelos murinos *knockout* para os referidos genes ou sequenciamento de última geração quanto à avaliação de novas mutações passíveis de impactarem o correto funcionamento desses genes em pacientes com SMD.

Outra abordagem interessante seria confirmar o papel dos genes de reparo em DSBs não somente em amostras do *pool* medular, mas, sim, em amostras de células tronco CD34+ a partir das mesmas metodologias apresentadas. Alguns autores já citam que a patogênese da

SMD envolve genes relacionados à apoptose (RAZA; GALILI, 2012), alterações epigenéticas (SHEN et al., 2010), *splicing* (PAPAEMMANUIL et al., 2011; ARBER et al., 2015) e genes relacionados ao bloqueio de diferenciação (GUELLER et al., 2010) das células tronco hematopoéticas isoladas.

Em síntese, demonstramos que os genes relacionados a DSB são também relacionados a patogênese da SMD. Estes resultados suportam a importância dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* como também de seus respectivos polimorfismos (rs228593, rs4793191, rs9567623, rs1801320, rs3835, rs2267437 e rs1805388) na manutenção da estabilidade genômica das células tronco hematopoiéticas promovendo um melhor entendimento da etiologia, estratificação diagnóstica, prognóstica e do processo de evolução clonal da Síndrome Mielodisplásica.

6 CONCLUSÕES

A partir do desenvolvimento deste estudo, podemos concluir que:

- Os genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* e *RAD51* podem corresponder a novos marcadores moleculares da patogênese da SMD hipocelular associada a presença de anormalidades cromossômicas.

- Especulamos que os pacientes com o percentual de 1-14% sideroblastos na medula óssea correspondem a uma entidade distinta da SMD, sendo o gene *XRCC5* um potencial marcador de pior prognóstico deste subgrupo de pacientes.

- Entende-se que o gene *ATM* pode ser considerado possivelmente um marcador de bom prognóstico para a SMD, podendo ser definidor do processo de desenvolvimento displásico caracterizando um perfil menos agressivo da doença.

- Hipotetiza-se que o funcionamento dos genes *BRCA2* e *RAD51*, em pacientes com SMD-sec, e do *LIG4* em pacientes com AREB I e II podem corresponder a possíveis marcadores de pior prognóstico e de progressão clonal em casos de SMD *de novo* de alto grau, estando associados a uma diminuição da sobrevida e a uma elevada chance de evolução para LMA, especialmente quanto à avaliação do gene *LIG4*.

- A baixa expressão do gene *XRCC6* é um fator de prognóstico desfavorável para os pacientes de baixo risco, sendo evidente que a diminuição da expressão deste gene é capaz de identificar um subgrupo desfavorável dentro dos pacientes de baixo risco que apresentariam maior dependência transfusional e maior instabilidade genômica (p.ex. na presença de alterações cromossômicas).

- Os resultados das análises de influência dos polimorfismos funcionais na SMD realçam a importância dos polimorfismos rs228593, rs2267437 e rs1805388 na diferenciação dos níveis de expressão dos genes *ATM*, *XRCC6* e *LIG4*, respectivamente, frente às variáveis clínicas de pacientes com SMD, representando novos alvos para o estudo da patogênese desta doença.

- Demonstramos que os genes relacionados a DSB são também relacionados a patogênese da SMD. Estes resultados suportam a importância dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* como também de seus respectivos polimorfismos (rs228593, rs4793191, rs9567623, rs1801320, rs3835, rs2267437 e rs1805388) na manutenção da instabilidade genômica das células tronco hematopoiéticas promovendo um melhor entendimento da etiologia, estratificação diagnóstica, prognóstica e do processo de evolução clonal da Síndrome Mielodisplásica.

REFERÊNCIAS

- ADÈS, L.; ITZYKSON, R.; FENAUX, P. Myelodysplastic syndromes. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2239 - 2252, 2014.
- 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.
- ALIZADEH, E.; ORLANDO, T.M; SANCHE, L. Biomolecular damage induced by ionizing radiation: the direct and indirect effects of low energy electrons on DNA. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, v. 66, 379-398, 2015.
- ALBERT, P.R. What is a functional genetic polymorphism? Defining classes of functionality. **J. Psychiatry Neurosci.**, v. 36, n. 6, 2011.
- ALEXANDER, A.; WALKER, C.L. Differential localization of ATM is correlated with activation of distinct downstream signaling pathways. **Cell Cycle**, v. 9, p. 3685–3686, 2010.
- ALLEN, C. Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining. **Mol. Cancer Res.**, v. 1, n. 12, p. 913-920, 2003.
- 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.
- 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.
- ARBER, D.A.; HASSERJIAN, R.P. Reclassifying myelodysplastic syndromes: what’s where in the new WHO and why. **Hematology**, p. 294–298, 2015.
- BACHER, U.; SCHANZ, J.; BRAULKE, F.; HAASE, D. Rare cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes. **Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.**, v. 7, n. 1, 2015.
- BALLEARI, E.; SALVETTI, C.; DEL CORSO, L.; et al. Age and comorbidities deeply impact on clinical outcome of patients with myelodysplastic syndromes. **Leuk Res.**, v. 39, n. 8, p. 846–52.
- BARTEK, J.; LUKAS, J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 19, p. 238–245, 2007.
- 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.

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.

BELLI, C.B.; PINHEIRO, R.F.; BESTACH, Y.; LARRIPA, I.B.; DA SILVA, TANIZAWA, R.S.; ALFONSO, G.; et al. Myelodysplastic syndromes in South America: a multinational study of 1080 patients. **Am J Hematol.**, v. 90, n. 10, p. 851-8, 2015.

BENNETT, J. M. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndrome. **Br. J. Hematol.**, v.51, p.189-199, 1982.

BENSIMON, A.; AEBERSOLD, R.; SHILOH, Y. Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response. **FEBS Lett.**, v. 585, n. 11, p.1625-39, 2011.

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.

BISHOP, A.J.R; SCHIESTL, R.H. Homologous recombination as a mechanism for genome rearrangements: environmental and genetic effects. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 16, p. 2427-2434.

BERNASCONI, P. et al. Validation of the new comprehensive cytogenetic scoring system (NCCSS) on 630 consecutive de novo MDS patients from a single institution. **Am J Hematol.**, v. 88, n. 2, p. 120-9, Feb 2013.

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.

BOHGAKI, T.; BOHGAKI, M.; HAKEM, R. DNA double-strand break signaling and human disorders. **Genome Integr.**, v. 1, n. 1, p. 15, 2010.

BOULEY, J.; SAAD, L.; GRALL, R.; SCHELLENBAUER, A.; BIARD, D.; PAGET, V.; et al. A new phosphorylated form of Ku70 identified in resistant leukemic cells confers fast but unfaithful DNA repair in cancer cell lines. **Oncotarget.**, v. 6, n. 29, p. 27980-8000, 2015.

BOWEN, DT. Occupational and environmental etiology of MDS. **Best Pract Res Clin Haematol.**, v. 26, n. 4, p 319-26, 2013.

BUDCZIES, J.; KLAUSCHEN, F.; SINN, B.V.; GYÖRFFY, B.; SCHMITT, W.D.; DARBESEFAHANI, S.; DENKERT, C. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51862, 2012.

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.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem.**, v. 55, n. 4, p. 611-22, 2009.

CAZZOLA, M.; INVERNIZZI, R. Ring sideroblasts and sideroblastic anemias. **Haematologica**, v. 96, n. 6, p. 789-792, 2011.

CERRANO, M.; CRISÀ, E.; GIAI, V.; BOCCADORO, M.; FERRERO, D. Anemia in the Elderly: not Always what it Seems. **Mediterr J Hematol Infect Dis.**, v. 8, n. 1, p. :e2016017, 2016.

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.

CLARKE, G.M; ANDERSON, C.A; PETTERSSON, F.H.; et al. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. **Nature protocols**, v. 6, n. 2, p. 121 - 133, 2011.

COGLE, C. R. Incidence and Burden of the Myelodysplastic Syndromes. **Curr Hematol Malig Rep**, v. 10, n. 3, p. 272-81, 2015.

CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria (Ed.). <http://www.r-project.org>. 2012.

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.

DELLA PORTA, M.G.; AMBAGLIO, I.; UBEZIO, M.; TRAVAGLINO, E.; PASCUTTO, C.; MALCOVATI, L. Clinical evaluation of extra-hematologic comorbidity in myelodysplastic syndromes: ready-to-wear versus made-to-measure tool. **Haematologica**, v. 97, n. 4, p. 631–632, 2012.

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.

ECONOMOPOULOU, P.; PAPPAS, V.; KONTSIOTI, F.; PAPAGEORGIOU, S.; FOUKAS, P.; LIAKATA, E.; ECONOMOPOULOU, C.; VASSILATOU, 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.

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.

EISENMANN K. M. 5q- myelodysplastic syndromes: chromosome 5q genes direct a tumor-suppression network sensing actin dynamics. **Oncogene**, v. 28, p. 3429–3441, 2009.

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, p. 197-206, 2002.

FLYNN, R.L.; ZOU, L. ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. **Trends Biochem. Sci.**, v. 36, p. 133–140, 2011.

FONT, P.; LOSCERTALES, J.; SOTO, C.; RICARD, P.; MUÑOZ-NOVAS, C.; MARTÍN-CLAVERO, E.; et al. Interobserver variance in myelodysplastic syndromes with less than 5 % bone marrow blasts: unilineage vs. multilineage dysplasia and reproducibility of the threshold of 2 % blasts. **Ann Hematol.**, v. 94, p. 565–573, 2015.

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

GILL, H.; LEUNG, A.Y.H.; KWONG, Y.L. Molecular and cellular mechanisms of Myelodysplastic Syndrome: implications on targeted therapy. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 4, p. 440.

GOASGUEN, J.E.; BENNETT, J.M.; BAIN, B.J.; BRUNNING, R.; VALLESP, M.T.; TOMONAGA, M.; ZINI, G.; RENAULT, A.; INTERNATIONAL WORKING GROUP ON MORPHOLOGY OF MDS (IWGM-MDS). Proposal for refining the definition of dysgranulopoiesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. **Leuk Res.**, v. 38, n. 4, p. 447-53, 2014.

GREENBERG, P.L.; ATTAR, E.; BENNETT, J.M.; BLOOMFIELD, C.D.; BORATE, U.; DE CASTRO, C.M., *et al.* NCCN Practice Guidelines for myelodysplastic syndromes, Version 1. 2014. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 480, n. 11, p. 838-874, 2013.

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, COX C, LEBEAU MM, FENAUX P, MOREL P, SANZ G, SANZ M, VALLESPI T, HAMBLIN T, OSCIER D, OHYASHIKI K, TOYAMA K, AUL C, MUFTI G, BENNETT J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 2079-88, 1997.

GUELLER, S.; KOMOR, M.; NOWAK, D.; et al. Identification of defects in the transcriptional program during lineage-specific in vitro differentiation of CD34(+) cells

selected from patients with both low- and high-risk myelodysplastic syndrome. **Exp Hematol.**, v. 38, n. 9, p. 718-32, 732, 2010.

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

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.

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, 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.

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.

HARTLERODE, A.J.; SCULLY, R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. **Biochem. J.**, p. 157-168, 2009.

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.; DE SOUSA, J.C.; RIBEIRO JUNIOR, H.L.; CARVALHO A.F.; MAGALHÃES, S.M.; PINHEIRO, R.F. Proteins related to the spindle and checkpoint mitotic emphasize the different pathogenesis of hypoplastic MDS. **Leuk Res.**, v. 38, n. 2, p. 218-24, 2014.

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.

HOEIJMAKERS, J. H. DNA damage, aging, and cancer. **N Engl J Med**, v. 361, n. 15, p. 1475-85, 2009.

HUANG, T.C.; KO, B. S.; TANG, J. L.; et al. Comparison of hypoplastic myelodysplastic syndrome (MDS) with normo- /hypercellular MDS by International Prognostic Scoring System, cytogenetic and genetic studies. **Leukemia**, v. 22, n. 3, p. 544–550, 2008.

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

IARMACOVAI G.; BONSAÍ, S.; BOTTA, A., *et al.* Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. **Mutat. Res.**, 658, 215-233, 2008.

IBGE. **Censo Demográfico de 2015**. Dados fornecidos em meio eletrônico.

INVERNIZZI, R.; QUAGLIA, F.; PORTA, M.G. Importance of classical morphology in the diagnosis of myelodysplastic syndrome. **Mediterr J Hematol Infect Dis.**, v. 7, n. 1, p.e2015035, 2015.

IRONS RD, KERZIC PJ. Cytogenetics in benzene-associated myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: new insights into a disease continuum. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1310, p. 84-82014.

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.

IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair (Amst)**, v. 12, n. 8, p. 620-36, 2013.

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.

JAZAYERI, A.; FALCK, J.; LUKAS, C.; BARTEK, J.; SMITH, G.C.; LUKAS, J.; JACKSON, S.P. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.*, v. 8, p. 37–45, 2006.

LANGIE, S. A. et al. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. **Carcinogenesis**, v. 36 Suppl 1, p. S61-88, 2015.

LEE, E. J. et al. The evolving field of prognostication and risk stratification in MDS: Recent developments and future directions. **Blood Rev.**, Jun 2015.

LEE, M.N.; TSENG, R.C.; HSU, H.S.; et al. Epigenetic inactivation of the chromosomal stability control genes BRCA1, BRCA2 and XRCC5 in non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res.**, v. 13., n. 2, p. 832, 2007.

LEMPIAINEN, H.; HALAZONETIS, T.D. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. **EMBO J.**, v. 28, pp. 3067–3073, 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.
- LIAO, P.Y.; LEE, K.H. From SNPs to functional polymorphisms: The insight into biotechnology. **Biochemical Engineering Journal.**, 49, 149-158, 2010.
- LIEBER, M. R. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 1-5, 2008.
- LIU, Q.; ZHU, H.; DONG, J. et al. Defective proliferative potential of MSCs from pediatric myelodysplastic syndrome patients is associated with cell senescence. **Int J Clin Exp Pathol.** v. 8, n. 10, p. 13059-13066, 2015.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) method. **Methods.**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOPEZ-CONTRERAS, A.J; FERNANDEZ-CAPETILLO, O. The ATR barrier to replication-born DNA damage. **DNA Repair (Amst.)**, v. 9, p. 1249–1255, 2010.
- LOOK, A. T. Molecular Pathogenesis of MDS. **Hematology**, p. 156-160, 2005.
- 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.
- KATARA, P. Single nucleotide polymorphism and its dynamics for pharmacogenomics. **Interdiscip Sci.**, v. 6, n. 2, p. 85-92, 2014.
- KEEN-KIM, D.; NOORAIE, F.; RAO, P. N. Cytogenetic biomarkers for human cancer. **Front. Biosci.**, v. 13, p. 5928-5949, 2008.
- KENYON, J.; GERSON, S. L. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells **Nucl. Acids Res.**, v. 35, n. 22, p. 7557-7565, 2007.
- 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.
- KLEPIN, H. D. Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia in the Elderly. **Clin Geriatr Med.**, v. 32, p. 155–173, 2016.
- KNUDSON, A. G. Two genetic hits (more or less) to cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, p. 157-162, 2001.
- 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.

MALCOVATI, L.; KARIMI, M.; PAPAEMMANUIL, E.; AMBAGLIO, I.; JÄDERSTEN, M.; JANSSON, M.; et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. **Blood**, v. 126, n. 2, p. 233-41, 2015.

MALCOVATI, L.; DELLA PORTA, M.G.; STRUPP, C.; AMBAGLIO, I.; KUENDGEN, A.; NACHTKAMP, K.; et al. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). **Haematologica**, v. 96, p. 1433-1440, 2011.

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

MALCOVATI L, PORTA MG, PASCUTTO C, et al. Prognostic factors and life expectancy in MDS classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. **J Clin Oncol**, v. 23, p. 7594-603, 2005.

MARISAVLJEVIC, D.; CEMERIKIC, V.; ROLOVIC, Z.; BOSKOVIC, D.; COLOVIC, M. Hypocellular myelodysplastic syndromes: clinical and biological significance. **Medical Oncology**, v. 22, n. 2, p.169–175, 2005.

MIKHED, Y.; GÖRLACH, A.; KNAUS, U.G; DAIBER, A. Redox regulation of genome stability by effects on gene expression, epigenetic pathways and DNA damage/repair. **Redox Biology**, v. 5, 275-289, 2015.

MEHTA, A.; HABER, J.E. Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 6, n. 9, 2014.

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.

MYERS, J.S.; CORTEZ, D. Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 9346–9350, 2006.

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, p. 129-154, 2008.

NACHTKAMP, K.; STARK, R.; STRUPP, C.; KÜNDGEN, A.; GIAGOUNIDIS, A.; AUL, C.; et al. Causes of death in 2877 patients with myelodysplastic syndromes. **Ann Hematol.** 2016.

NIEMEYER, C. M.; BAUMANN, I. Myelodysplastic syndrome in children and adolescents. **Semin Hematol.**, v. 45, n. 1, p. 60-70, 2008.

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.

NOLTE, F.; HOFMANN, W.K. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. **Ann Hematol.**, v. 87, n. 10, p. 777-95, 2008.

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.

OZTURK, S.; DEMIR, N. DNA repair mechanisms in mammalian germ cells. **Histol Histopathol**, v. 26, n. 4, p. 505-17, 2011.

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.

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

PAPAEMMANUIL, E.; CAZZOLA, M.; BOULTWOOD, J.; et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. **N Engl J Med**, v. 365, n. 15, p.1384-1395, 2011.

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

PATNAIK, M.M.; LASHO, T.L.; FINKE, C.M.; HANSON, C.A.; KING, R.L.; KETTERLING, R.P.; GANGAT, N.; TEFFERI, A. Predictors of survival in refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis (RARS-T) and the role of next-generation sequencing. **Am J Hematol.** 2016. [Epub ahead of print]

PATNAIK, M.M.; TEFFERI, A. Refractory anemia with ring sideroblasts and RARS with thrombocytosis. **Am J Hematol.**, v. 90, p. 549–559, 2015.

PATNAIK, M.M.; LASHO, T.L.; HODNEFIELD, J.M.; et al. SF3B1 mutations are prevalent in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts but do not hold independent prognostic value. **Blood**, v. 119, p. 569–572, 2012.

PATNAIK, M.M.; HANSON, C.A.; SULAI, N. H.; et al. Prognostic irrelevance of ring sideroblast percentage in World Health Organization–defined myelodysplastic syndromes without excess blasts. **Blood.**, v. 119, n. 24, 2012,

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.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 9, p.e45, 2001.

PFAFFL, M.W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol Lett.**, v. 26, n. 6, p. 509-15, 2004.

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.

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.; 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.

PUBMED database [base de dados na Internet]. **National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. National Institute of Health. USA.** - [acesso em 2016 Jan 10]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

POST S. M. & QUINTÁS-CARDAMA A. Closing in on the pathogenesis of the 5q-syndrome. **Expert Rev Anticancer Ther.**, v. 10, p. 655–658, 2010.

RAZA, A.; GALILI, N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. **Nat Rev Cancer.**, v. 12, n. 12, p. 849-59, 2012.

RAUH, M.J. Standardizing dysgranulopoiesis in MDS and AML: refining diagnostics and laying the foundation for novel morphological-genetic correlations. **Leuk Res.**, 2014 v. 38, n. 4, p. 428-9.

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.

RIBEIRO HL JUNIOR; DE OLIVEIRA, R.T.; MAIA, A.R.; PIRES FERREIRA FILHO, L.I.; DE SOUSA, J.C., HEREDIA, F.F.; MAGALHÃES, S.M.; PINHEIRO, R.F. Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. **Hematol Oncol.**, v. 33, n. 4, p. 220-228, 2015.

ROWLEY, J.D.; OLNEY, H.J. International workshop on the relationship of prior therapy to balanced chromosome aberrations in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: overview report. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 33, p. 331, 2002.

SCHANZ, J. et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. **J Clin Oncol.**, v. 30, n. 8, p. 820-9, 2012.

SCHEMENAU, J.; BALDUS, S.; ANLAUF, M.; et al. Cellularity, characteristics of hematopoietic parameters and prognosis in myelodysplastic syndromes. **Eur J Haematol.**, v. 95, n. 3, p. 181-9, 2015.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc.**, v. 3, n. 6, p. 1101-8, 2008.

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

SEKERES, M.A.; SCHOONEN, W.M.; KANTARJIAN, H.; et al. Characteristics of US patients with myelodysplastic syndromes: results of six cross-sectional physician surveys. **J Natl Cancer Inst.**, v. 100, p. 1542, 2008.

SEKERES, M. A. The epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am*, v. 24, n. 2, p. 287-94, Apr 2010.

SHEN, L.; KANTARJIAN, H.; GUO, Y.; et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. **J Clin Oncol.**, 2010: v. 28, n. 4, p. 605-13, 2010.

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

SHIEH, S.Y; IKEDA, M.; TAYA, Y.; PRIVES, C. DNA damage induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by NMD2. **Cell.**, v. 91, p. 325-334, 1997.

SIGURDSSON, S.; VAN KOMEN, S.; PETUKHOVA, G.; SUNG, P. Homologous DNA pairing by human recombination factors Rad51 and Rad54. **J Biol Chem.**, v. 277, n. 45, p. 42790-4, 2002.

SILICIANO, J.D; CANMAN, C.E.; TAYA, Y.; SAKAGUCHI, K.; APPELLA, E.; KASTAN, M.B. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. **Genes Dev.**, v. 11, p. 3471-3481, 1997.

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.

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

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, 2009a.

TEFFERI A.; VARDIMAN J. Myelodysplastic Syndromes. **N Engl J Med.**, v. 361, p. 1872-85, 2009b.

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

THERNEAU, T.; LUMLEY, T. **Survival: survival analysis, including penalised likelihood**. [http://cran.r-project.org/package = survival](http://cran.r-project.org/package=survival). 2011.

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

van GENT, D.C.; HOEJIMAKERS, J.H.; KANAAR, R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. **Nat Rev Genet.**, v. 2, p. 196-206, 2001.

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

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002.

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, J. et al. SNP web resources and their potential applications in personalized medicine. **Curr Drug Metab.**, v. 13, n. 7, p. 978-90, 2012.

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.

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.

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.

YUE, G.; HAO, S.; FADARE, O. et al. Hypocellularity in myelodysplastic syndrome is an independent factor which predicts a favorable outcome. **Leukemia Research**, vol.32, n.4, p.553–558, 2008.

ZIPPERER, E.; TANHA, N.; STRUPP, C.; KÜNDGEN, A.; NACHTKAMP, K.; NEUKIRCHEN, J.; et al. The myelodysplastic syndrome-comorbidity index provides additional prognostic information on patients stratified according to the revised international prognostic scoring system. **Haematologica**, v. 99, n. 3, p. e31–e32, 2014.

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.

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

ZHOU, T.; CHEN, P.; GU, J., et al. Potential relationship between inadequate response to DNA damage and development of myelodysplastic syndrome. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 5, n. 16, p. 966-89, 2015.

ZHOU, C.; TANG, H.; YU, J.; ZHUANG, D.; ZHANG, H. Blood-based DNA methylation of DNA repair genes in the non-homologous end-joining (NEHJ) pathway in patient with glioma. **Int J Clin Exp Pathol.**, v. 8, n. 8, p. 9463-7, 2015.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: ESTUDOS DE ALVOS MOLECULARES RELACIONADOS ÀS VIAS DE REPARO DE DANOS NO DNA EM PACIENTES COM 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 o material genético de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica gerando dados que favoreçam a uma melhor compreensão do surgimento e evolução clínica desta doença.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

A amostra biológica utilizada na presente pesquisa corresponde a medula óssea do indivíduo.

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

A coleta da medula óssea será realizada por médico hematologista experiente com agulha de mielograma mediante punção esternal. O osso do esterno é um osso chato, plano e

ímpar localizado no centro do tórax. O osso do esterno é um importante osso hematopoético, ou seja, de produção das células sanguíneas. É neste osso que é realizada a punção da medula óssea.

Serão coletadas somente 2mL de amostra de medula óssea com o uso de uma agulha específica para aspiração da medula óssea. Todo o procedimento de coleta da medula óssea é realizado mediante administração de anestésico local com duração máxima de 15 minutos.

Durante o procedimento de coleta esternal da medula óssea, pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxeadas) ao redor do local de onde foi retirado a medula óssea, desaparecendo em poucos dias, e poderá ocorrer dor discreta e de fácil alívio, podendo ser, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local. Raramente, pode ocorrer infecção local. Para pacientes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral. A coleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise.

Após o procedimento, serão coletados dados pessoais de sexo e idade, apresentação clínica e checagem 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.

É de sua responsabilidade: comparecer nas datas e horários informados e 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 ao pesquisador responsável ou a qualquer um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento nesta instituição.

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo, do não cumprimento das normas estabelecidas, de qualquer outro motivo que, a critério da pesquisadora, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes e, por fim, da suspensão do estudo como um todo.

O Laboratório de Citogenômica do Câncer o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

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

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

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja algum imprevisto ou dúvidas, você deverá entrar em contato solicitar contato direto com o pesquisador responsável pelo estudo: **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (85-81881972)** ou com o aluno de Doutorado Acadêmico **Howard Lopes Ribeiro Junior (85 – 87396142)**.

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

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

ASSINATURAS

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

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

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

_____/_____/_____
Data

Assinatura do participante da pesquisa

_____/_____/_____
Data

Assinatura do Pesquisador Responsável

_____/_____/_____
Data

Assinatura do Responsável pela aplicação do TCLE

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Voluntário**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

PROJETO: ESTUDOS DE ALVOS MOLECULARES RELACIONADOS ÀS VIAS DE REPARO DE DANOS NO DNA EM PACIENTES COM 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 o material genético de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica gerando dados que favoreçam a uma melhor compreensão do surgimento e evolução clínica desta doença. Para compreender melhor os pontos clínicos dos pacientes visualizados nesta pesquisa, precisamos comparar os achados clínicos destes pacientes com indivíduos sadios (voluntários). É devido a este contexto que necessitamos recrutar indivíduos saudáveis (voluntários) para participar da presente pesquisa.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

A amostra biológica utilizada na presente pesquisa corresponde a medula óssea do indivíduo.

A medula óssea corresponde a um tecido líquido-gelatinoso que ocupa o interior dos ossos, sendo conhecida popularmente por 'tutano'. Na medula óssea são produzidos os

componentes do sangue: as hemácias (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas.

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

Serão coletadas somente 2mL de amostra de medula óssea com o uso de uma agulha específica para aspiração da medula óssea. Todo o procedimento de coleta da medula óssea é realizado mediante administração de anestésico local com duração máxima de 15 minutos.

Durante o procedimento de coleta esternal da medula óssea, pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxeadas) ao redor do local de onde foi retirado a medula óssea, desaparecendo em poucos dias, e poderá ocorrer dor discreta e de fácil alívio, podendo ser, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local. Raramente, pode ocorrer infecção local. Para pacientes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral. A coleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise.

Após o procedimento, serão coletados dados pessoais de sexo e idade.

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

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 ao pesquisador responsável ou a qualquer um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento nesta instituição.

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo, do não cumprimento das normas estabelecidas, de qualquer outro motivo que, a critério da pesquisadora, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes e, por fim, da suspensão do estudo como um todo.

O Laboratório de Citogenômica do Câncer o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

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

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

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja algum imprevisto ou dúvidas, você deverá entrar em contato solicitar contato direto com o pesquisador responsável pelo estudo: **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (85-81881972)** ou com o aluno de Doutorado Acadêmico **Howard Lopes Ribeiro Junior (85 – 87396142)**.

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

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

ASSINATURAS

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

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

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

_____/_____/_____
Data

Assinatura do participante da pesquisa

_____/_____/_____
Data

Assinatura do Pesquisador Responsável

_____/_____/_____
Data

Assinatura do Responsável pela aplicação do TCLE

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDOS DE ALVOS MOLECULARES RELACIONADOS ÀS VIAS DE REPARO DE DANOS NO DNA EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Pesquisador: Howard Lopes Ribeiro Junior

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 45116415.8.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.292.509

Apresentação do Projeto:

Neste estudo serão incluídas 140 amostras de medula óssea (100 amostras encaminhadas para a separação de pool celular e 40 amostras encaminhadas para a separação de células tronco CD34+) de pacientes portadores de SMD diagnosticados, de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde, no Laboratório de Citogenômica do Câncer na Universidade Federal do Ceará (UFC), a serem diagnosticados no período de 2016 a 2019. Além das amostras de medula óssea de pacientes portadores de SMD, serão analisadas 10 amostras de medula óssea de pacientes voluntário sadios encaminhados ao Laboratório de Citogenômica do Câncer sem confirmação de ocorrência e histórico de doença hematológica. Obtenção de amostras de pool de células de medula óssea. Ao diagnóstico, 100 amostras de medula óssea serão coletadas em tubos de vidro Vacutainer® contendo EDTA e processadas conforme procedimento de rotina do Laboratório de Citogenômica do Câncer do HU/UFC. Obtenção de isolados de células-tronco (CD34+) de medula óssea Ao diagnóstico, 40 (quarenta) amostras de medula óssea foram coletadas em tubos de vidro Vacutainer® contendo EDTA e encaminhadas para a separação de células tronco CD34+ mediante uso de colunas imunomagnéticas conforme procedimento de rotina do Laboratório de Citogenômica do Câncer do HU/UFC. O mesmo procedimento foi realizado para as 10 amostras de indivíduos controles (doadores normais de medula óssea) Cariótipo por Banda G Os cariótipos

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
 Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3366-8344 Fax: (85)3223-2903 E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 1.292.509

serão realizados de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer, segundo a técnica descrita por. A citogenética clássica por banda G será realizada conforme procedimento de rotina do Laboratório de Citogenômica do Câncer do HU/UFC.

Critério de Inclusão:

Serão incluídos neste estudo pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica submetidos a diagnóstico no Laboratório de Citogenômica do Câncer, no período compreendido entre os anos de 2015 a 2019, e que autorizarem o uso de amostra de medula óssea, mediante compreensão e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para compor o grupo caso do estudo. Adicionalmente, serão incluídos no estudo indivíduos saudáveis que autorizarem o uso de amostra de medula óssea mediante compreensão e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para compor o grupo controle do estudo.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos deste estudo pacientes portadores de quaisquer outras doenças que não seja Síndrome Mielodisplásica, que não seja diagnosticado no Laboratório de Citogenômica do Câncer no período compreendido entre os anos de 2015 a 2019 e que autorizarem o uso de amostra de medula óssea, mediante compreensão e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para compor o grupo caso do estudo. Adicionalmente, será excluído do estudo o indivíduo saudável que não autoriza o uso de amostra de medula óssea ou que não compreenda e assine o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para compor o grupo controle do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a expressão do mRNA, de proteínas e o perfil de metilação dos genes atuantes no mecanismo de reparo em danos de fita simples e fita dupla no DNA associando os achados moleculares com as variáveis clínicas de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica.

Objetivo Secundário:

Detectar as alterações cromossômicas pelo estudo do cariótipo por banda G em cultura de curta duração in vitro da medula óssea de pacientes com

SMD. Estudar a expressão dos genes de reparo de danos de fita simples e fita dupla do DNA (Tabela 1) por PCR em Tempo Real (qPCR) em

células-tronco hematopoéticas no pool medular e em células CD34+ isoladas da medula óssea de

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
 Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3366-8344 Fax: (85)3223-2903 E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 1.292.509

pacientes com SMD. Avaliar o nível de expressão das proteínas atuantes nos mecanismos de reparo de danos de fita simples e fita dupla do DNA (Tabela 1) através da metodologia de Western Blot; Avaliar a presença de metilação das ilhas CPG dos genes de reparo de danos de fita simples e fita dupla do DNA (Tabela 1) em células-tronco hematopoéticas em células-tronco hematopoéticas no pool medular e em células CD34+ isoladas da medula óssea de pacientes com SMD através da técnica de MS-PCR (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction). Associar os achados moleculares com o perfil clínico dos pacientes com Síndrome Mielodisplásica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Analisamos como riscos ao paciente ou voluntário sadio participantes da presente pesquisa, durante o procedimento de coleta esternal da medula óssea, o fato de que pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxeadada) ao redor do local de onde foi retirado a medula óssea, desaparecendo em poucos dias, e poderá ocorrer dor discreta e de fácil alívio, podendo ser, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Vê-se que, excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local e, raramente, pode ocorrer infecção local. Para pacientes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral. É importante ser salientado que a recoleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise.

Benefícios:

Analisamos com benefícios a serem obtidos com a presente pesquisa o fato de que estudos que avaliem o perfil de expressão gênica, protéica e metilação dos genes de reparo do DNA em células de pacientes com SMD poderão identificar alvos moleculares que possam predizer um melhor tratamento epigenético para esta doença assim como uma melhor compreensão dos genes envolvidos na fisiopatologia da SMD.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e atende às normas relativas à pesquisas com seres humanos, em especial à Res. 466/12 do CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

| | | | |
|--|----------------------|-----------------------|--|
| Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000 | | | |
| Bairro: Rodolfo Teófilo | | CEP: 60.430-275 | |
| UF: CE | Município: FORTALEZA | | |
| Telefone: (85)3366-8344 | Fax: (85)3223-2903 | E-mail: comepe@ufc.br | |

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.292.509

Foram todos devidamente apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado, s.m.j. desse C.E.P.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|-----------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_512397.pdf | 21/09/2015 15:17:23 | | Aceito |
| Outros | Alteracoes_Parecer_CEP_UFC_Projeto_Doutorado_21092015.doc | 21/09/2015 15:18:07 | Howard Lopes Ribeiro Junior | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Reparo_Atualizado_21092015.doc | 21/09/2015 15:14:45 | Howard Lopes Ribeiro Junior | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEVoluntarioNovo.doc | 18/09/2015 15:49:14 | Howard Lopes Ribeiro Junior | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEPacienteNovo.doc | 18/09/2015 15:48:44 | Howard Lopes Ribeiro Junior | Aceito |
| Outros | Declaração de concordancia.pdf | 15/05/2015 12:28:32 | | Aceito |
| Outros | Lattes.pdf | 12/05/2015 12:43:08 | | Aceito |
| Outros | CARTA DE APRESENTAÇÃO DO PROTOCOLO.jpg | 08/05/2015 12:51:14 | | Aceito |
| Outros | TERMO DE CIENCIA DO MÉDICO RESPONSÁVEL.jpg | 08/05/2015 12:31:01 | | Aceito |
| Folha de Rosto | FOLHA DE ROSTO.jpg | 08/05/2015 12:28:39 | | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
 Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3366-8344 Fax: (85)3223-2903 E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.292.509

FORTALEZA, 22 de Outubro de 2015

Assinado por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 Fax: (85)3223-2903 E-mail: comepe@ufc.br

Página 06 de 06

ANEXO B: Artigo publicado na revista Hematological Oncology (FI: 3.084)

Hematological Oncology
 Hematol Oncol 2015; 33: 220–228
 Published online 13 October 2014 in Wiley Online Library
 (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/hon.2175

Original Research Article

Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome

Howard Lopes Ribeiro Junior^{1,3}, Roberta Taiane Germano de Oliveira³, Allan Rodrigo Soares Maia^{1,3},
 Luiz Ivando Pires Ferreira Filho^{1,3}, Juliana Cordeiro de Sousa^{1,3}, Fabiula Fernandes Heredia³,
 Sílvia Maria Meira Magalhães^{1,3} and Ronald Feitosa Pinheiro^{1,2,3*}

¹Post-Graduate Program in Medical Science, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

²Post-Graduate Program of Pathology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

³Cancer Cytogenomic Laboratory, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

*Correspondence to:

Ronald Feitosa Pinheiro, R. Pereira
 Valente, 738, Meireles, 60160250,
 Fortaleza, Ceará, Brazil.
 E-mail: ronalfpinheiro@pq.cnpq.
 br; ronalf@pinheiro@uol.com.br

Abstract

Some studies show that alterations in DNA repair genes polymorphisms are associated with the pathogenesis and susceptibility of Myelodysplastic Syndrome (MDS). We genotyped 60 MDS patients for six DNA repair gene polymorphisms: *BRCA1* rs4793191, *BRCA2* rs9567623, *RAD51* rs1801320, *XRCC5* rs3835, *XRCC6* rs2267437 and *LIG4* rs1805388. The *G/C* heterozygote genotype of rs1801320 polymorphism was associated with a decreased chance of developing MDS ($p = 0.05$). Additionally, the *G/G* homozygous genotype was associated with the presence of one cytopenia in whole blood. The genotype *CG* and *CG + GG* of the rs2267437 polymorphism was associated with normal karyotype ($p = 0.010$) and bone marrow cellularity normocellular + hypercellular ($p = 0.023$). We found that the *A/G* heterozygous genotype of the rs3835 polymorphism is associated with decreased chance of developing MDS ($p < 0.001$). These results support the importance of *RAD51*, *XRCC5* and *XRCC6* genes polymorphisms in the maintenance of genomic stability promoting a better understanding of the genesis and etiology of MDS. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: myelodysplastic syndrome; DNA repair; cytogenetics; homologous recombination mechanism; non-homologous end joining mechanism

Received 29 January 2014
 Revised 8 July 2014
 Accepted 9 September 2014

Introduction

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a clonal hematopoietic stem cell (HSC) disorder characterized by peripheral cytopenias caused by ineffective hematopoiesis [1,2]. MDS is considered a disease of the elderly, because approximately 80% of patients are older than 60 years at the time of diagnosis [1,2]. Cytogenetic abnormalities are detected in up to 50% of MDS patients; these abnormalities represent the most important marker of prognosis and predict the risk of transformation to acute leukemia [1,2]. The pathogenesis of MDS involves genomic alterations in HSCs [2]. DNA damage in HSCs can block off differentiation, leading to dysplasia, while subsequent defects affect proliferation, causing clonal expansion of aberrant cells and acute myeloid leukemia (AML) [3,4].

Double-strand breaks (DSB) consist in the most important DNA damage in HSCs and the non-homologous ends-joining (NHEJ) and homologous recombination (HR) repair mechanisms are essentials for ensuring the

genomic stability of stem cells [5]. DNA repair is an important mechanism for maintaining the integrity of multicellular organisms and for ensuring genomic stability [6]. DNA DSBs are one of the most toxic and mutagenic DNA lesions [5,7] and are considered to exert important biological effects on the formation of chromosomal aberrations, cell death and transformation [5,7], which are common features of MDS.

Among several protein complexes involved in HR repair pathways, *BRCA1/2*, which are members of the *BRCA* family, were initially identified as molecular markers of breast and ovarian cancer [8–10]. *BRCA1/2* interacts with proteins of the RAD complex in the control of genomic instability [8–10]. *RAD51* is a member of RAD protein family and is the key gene in the HR pathway [11].

The NHEJ repair mechanism is the main repair pathway in mammalian cells and contributes significantly to the maintenance of genome stability [12]. The NHEJ mechanism is dependent on the Ku70/Ku80 (*XRCC6/XRCC5*) heterodimer that binds to DNA ends at DSBs and to DNA Ligase IV for to join the damaged ends [13].

Polymorphisms of DNA repair genes may be associated with differences in the efficiency of DNA repair and may influence the risk of developing tumors [14]. The rs1801320 polymorphism is the most important alteration in the *RAD51* gene and has been associated with an increased chance of MDS and also with *RAD51* protein overexpression [15]. Polymorphisms in the *XRCC5/6* genes (i.e. rs3835 and rs2267437, respectively) have been linked to bladder, breast and lung cancers, but not to MDS [16–18]. Polymorphisms in the *LIG4* gene, such as rs1805388, are associated with increased susceptibility to cancer [19], but no associations were observed between polymorphism in this gene and MDS.

We recently demonstrated, for the first time, that the *ATM* rs28593 polymorphism, which is localized in the intron region, was associated with low MDS susceptibility [20]. *ATM* is considered to be critical in the recognition of DSBs.

The aim of this report is to evaluate polymorphisms in genes involved in HR (i.e. *BRCA1*, *BRCA2* and *RAD51*) and NHEJ (i.e. *XRCC5*, *XRCC6* and *LIG4*) in MDS patients.

Patients, materials and methods

Patients and DNA extraction

Sixty Brazilian patients were diagnosed and analyzed according to their WHO classifications and IPSS scores [21,22]. Based on IPSS scores, the patients were considered either low-risk/INT-1 or INT-2/high-risk [22] (Table 1).

The variables analyzed in this study included gender, age, origin, karyotype (i.e. good, intermediate and poor prognosis), karyotype (i.e. normal and abnormal), bone marrow cellularity (i.e. normocellular+Hypercellular and Hypocellular) and number of cytopenias (i.e. 0–1 and 2–3 cytopenias).

Genomic DNA was extracted from the bone marrow mononuclear cells of MDS patients diagnosed at the Federal University of Ceara, Brazil, using the Trizol Reagent® protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Eighty-two whole blood DNA samples obtained from sex and age-matched healthy elderly volunteers served as controls.

This study was approved by the research ethics committee of the Federal University of Ceara (CEP/HUWC/UFC) according to the protocol 027.04.12.

PCR-RFLP

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) procedures were performed to amplify fragments containing HR and NHEJ gene polymorphisms, as previously reported [10,17,18,23] (Table 2). Each 25- μ l PCR reaction contained 25 ng of genomic DNA, 12.5 μ l of 2X PCR Master Mix (50 units/ml of Taq DNA polymerase supplied in a proprietary reaction

buffer (pH 8.5), 400- μ M dATP, 400- μ M dGTP, 400- μ M dCTP, 400- μ M dTTP and 3 mM MgCl₂ (Promega corporation, Fitchburg, WI, USA) and 10 nM of each primer presented in Table 2.

The following thermal cycling conditions were used: an initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 45 s, a specific annealing temperature for 30 s and enzyme extension at 72 °C for 45 s. The final extension was performed at 72 °C for 10 min. PCR was performed using Mastercycler Pro Vapo Protect Technology (Eppendorf, Hamburg, Germany) (Table 2).

The PCR products were digested with restriction enzymes and visualized on Gel Red-stained 3% agarose gels (Figure 1 and Table 2).

Cytogenetic analysis

Conventional G-Band karyotype analysis was performed on bone marrow cells [24]. Briefly, cultures were established in RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) containing 30% fetal calf serum. For the 24-h culture, colcemid was added at a final concentration of 0.05 μ g/ml for the final 30 min of culture. After harvesting, the cells were exposed to a hypotonic KCl solution (0.068 mol/l) and fixed with Carnoy buffer (acetic acid/methanol in a 1:3 proportion). The slides were prepared and stained using Giemsa solution. A minimum of 20 metaphases were analyzed whenever possible. The karyotype was prepared using a CytoVision Automated Karyotyping System (Applied Imaging, San Jose, CA, USA) and described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013) (Table 1).

Statistical analysis

Hardy-Weinberg equilibrium was calculated for each polymorphism using the Pearson's chi-squared test. Differences in allele and genotype frequencies and comparisons of variables between the control and MDS groups were evaluated using the Pearson's chi-square test or Fisher's exact test. Odds ratios (O.R.) with 95% confidence intervals (C.I.) were calculated using multinomial logistic regression analysis. The multinomial logistic regression model is a regression model that generalizes the logistic regression by allowing more than two discrete outcomes. All tests were considered to be statistically significant when the *p*-value was ≤ 0.05 .

Results

Characteristics of MDS patients

The features of the included MDS patients are presented in Table 1. Approximately 51.7% of the patients were male,

Table 1. Clinical characteristics, cytogenetic, IPSS and WHO classification of the MDS patients

| Patients | Cytogenetic | Gender | Age | IPSS | WHO |
|----------|---|--------|-----|-------|----------|
| 1 | 47,XY,+8[6]47,XYdel(7)(q32),+8[7]46,XY[2] | M | 63 | HIGH | RAEB-II |
| 2 | 46,XY,-10,+mar[5]46,XY[1] | M | 45 | INT-1 | RCDM |
| 3 | 175,XOXXXXXX,-5,-6,-7,-8,-9,-11,-13,-14[4]46,XX,del(5)(q15q33)[8]46,XX[19] | F | 71 | | Sec. MDS |
| 4 | 47,XX,+mar[3]46,XX[17] | M | 45 | INT-1 | RCDM |
| 5 | No metaphase | M | 54 | | RCDM |
| 6 | 46,XY,del(5)(q15q33)[7]46,XY[11] | M | 69 | INT-1 | Sq del |
| 7 | 37,X,-1,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]46,XY,del(5)(q15q33)[5]46,XY[6] | M | 64 | INT-2 | RAEB-II |
| 8 | No metaphase | M | 85 | | RCDM |
| 9 | 46,XX[9] | F | 65 | | Sec. MDS |
| 10 | 46,XX[5] | F | 81 | LOW | RARS |
| 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] | F | 30 | HIGH | RAEB-II |
| 12 | 46,XY[11] | M | 74 | INT-1 | RCDM |
| 13 | 46,XY,del(5)(q22q33)[3]45,XY,del(5)(q22q33),-18[3]46,XY[14] | M | 83 | INT-1 | RARS |
| 14 | 46,XY[9] | M | 24 | INT-1 | RCDM |
| 15 | No metaphase | M | 86 | | RCDM |
| 16 | 46,XX[12] | F | 73 | LOW | RARS |
| 17 | 46,XX,del(5)(q15q33)[9]46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(q25)[7]46,XX[4] | F | 41 | INT-1 | RCDM |
| 18 | No metaphase | F | 66 | | RARS |
| 19 | 46,XX[20] | F | 81 | INT-1 | RCDM |
| 20 | 46,XX,del(5)(q15q33)[4]46,XX[18] | F | 23 | LOW | NR |
| 21 | No metaphase | F | 60 | | RCDM |
| 22 | 46,XX[7] | F | 67 | INT-1 | RCDM |
| 23 | No metaphase | F | 42 | | RARS |
| 24 | 46,XY[20] | M | 67 | INT-1 | RAEB-I |
| 25 | 89,XX,-20,-22,-Y[4]46,XY,del(16)(q22)[5]46,XY[11] | M | 79 | INT-1 | RCDM |
| 26 | 47,XY,+mar[5]46,XY[11] | M | 66 | INT-1 | RCDM |
| 27 | 46,XY,del(7)(q32)[2]46,XY[18] | M | 73 | INT-2 | RCDM |
| 28 | 46,XY[8] | M | 46 | INT-1 | RCDM |
| 29 | No metaphase | F | 74 | | Sec. MDS |
| 30 | No metaphase | F | 41 | | RCDM |
| 31 | 46,XY,del(5)(q15q33)[8]46,XY[12] | M | 59 | INT-1 | Sq del |
| 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] | M | 49 | INT-2 | RAEB-II |
| 33 | 46,XX[25] | F | 72 | INT-1 | RCDM |
| 34 | 46,XX,del(17)(p11.2)[3]46,XX[4] | F | 27 | | Sec. MDS |
| 35 | 46,XY[5] | M | 74 | INT-1 | RCDM |
| 36 | No metaphase | M | 72 | | RAEB-II |
| 37 | 46,XY,del(5)(q15q33)[7]46,XY[8] | M | 33 | INT-1 | RCDM |
| 38 | No metaphase | M | 82 | | RA |
| 39 | 46,XY,del(5)(q31q35)[6]46,XY[17] | M | 89 | INT-1 | RAEB-I |
| 40 | 46,XX[22] | F | 18 | | Sec. MDS |
| 41 | 46,XX[8] | F | 47 | LOW | RA |
| 42 | No metaphase | F | 64 | | RA |
| 43 | 46,XX[11] | F | 82 | | Sec. MDS |
| 44 | 46,XY,del(5)(q22q33)[5]46,XY[7] | M | 15 | LOW | NR |
| 45 | 46,XY,del(5)(q15q33),del(17)(p11.2)[7]46,XY[13] | M | 32 | INT-1 | RCDM |
| 46 | 46,X,-Y[4]46,XY[16] | M | 91 | LOW | RARS |
| 47 | 46,XX[20] | F | 61 | LOW | RCDM |
| 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] | M | 80 | INT-2 | RCDM |
| 49 | No metaphase | M | 69 | | RAEB-I |
| 50 | 47,XX,t(4;1)(q27;q32),+mar[4]46,XX[16] | F | 83 | INT-1 | RCDM |
| 51 | 46,XY[11] | M | 31 | LOW | RA |
| 52 | No metaphase | F | 86 | | RARS |

(Continues)

Table 1. (Continued)

| Patients | Cytogenetic | Gender | Age | IPSS | WHO |
|----------|--------------------------|--------|-----|-------|------|
| 53 | 46,XY[6] | F | 74 | LOW | RA |
| 54 | 46,XY[8] | F | 60 | INT-I | RCDM |
| 55 | 46,XY[6] | M | 76 | LOW | RARS |
| 56 | No metaphase | F | 86 | | RA |
| 57 | No metaphase | F | 79 | | RCDM |
| 58 | 47,XY,+8[4]46,XY[5] | M | 41 | INT-I | RCDM |
| 59 | 44,XX,-13,-17[4]46,XY[5] | F | 42 | INT-I | RCDM |
| 60 | No metaphase | F | 56 | | RCDM |

Gender (M: Male or F: Female).

Age in years old.

IPSS (International Prognosis Score System).

WHO (World Health Organization) RA (Refractory anemia).

RARS (Refractory anemia with ringed sideroblasts).

RAEB (Refractory anemia with excess blasts type I or type II).

RCDM (refractory cytopenia with multilineage dysplasia).

5q del (isolated 5q deletion).

Sec. MDS (Secondary MDS).

NR (neutropenia refractory).

LOW (good prognosis).

INT (prognosis intermediate type I or type II).

HIGH (poor prognosis).

with a median age of 66 years and a range of 15–91 years. According to IPSS scores, most of the cases were considered low-risk/INT-I (82.1%) [21,22] (Table 1).

Cytogenetic analysis

Cytogenetic analyses were performed for 60 patients. Of those patients, 26 (59.1%) exhibited a karyotype with a good prognosis, 10 (22.7%) exhibited a karyotype with an intermediate prognosis and 8 (18.2%) exhibited a karyotype with a poor prognosis [22]. In addition, 16 patients (26.6%) presented no metaphases (Table 1).

Genotype frequencies and allele distributions of DNA repair polymorphisms and associations of these factors with clinical variables

The distributions of allele and genotype frequencies of the *BRCA1* rs4793191, *BRCA2* rs9567623, *RAD51* rs1801320, *XRCC5* rs3835, *XRCC6* rs2267437 and *LIG4* rs1805388 polymorphisms in bone marrow from 60 MDS patients and in whole blood from 82 elderly volunteers are presented in Table 3 and Figure 1.

The genotype distributions for HR and NHEJ gene polymorphisms in MDS patients and controls were in Hardy–Weinberg's equilibrium, with $p > 0.05$, except for *LIG4* the gene.

Table 2. PCR primers and RFLP conditions used in this study

| Gene | Primers | T _m (°C) | PCR size, pb | Restriction enzyme | RFLP size, pb | References |
|------------------------|--|---------------------|--------------|--------------------|--------------------------|---------------------|
| <i>BRCA1</i> rs4793191 | 3'ACTGCACTGCCTCTCCACT 5' 5'TTGCACTGCCCACACTGTT 3' | 64.6 °C | 401pb | <i>Pst</i> I | 232pb, 129pb | WANG et al. (2010) |
| <i>BRCA2</i> rs9567623 | 3'GGCTT TAGAATCGTGGCACT 5' 5'CTGGATTCAAGCGATTCTCC 3' | 54.2 °C | 265pb | <i>Hha</i> I | 198pb, 67pb | WANG et al. (2010) |
| <i>RAD51</i> rs1801320 | 3'TGGGAAGTGCACACTCATCTGG 5' 5'GCGCTCCTCTCTCCAGCAG 3' | 52 °C | 157pb | <i>Mva</i> I | 86pb, 71pb | LI et al. (2011) |
| <i>XRCC5</i> rs3835 | 3'ATGATGAGGAGTGATATGTGGAAAGAG 5' 5'AGTGCTAAGTATCGTCTGCACTGAT 3' | 52 °C | 151pb | <i>Alu</i> I | 78pb, 73pb | TSENG et al. (2008) |
| <i>XRCC6</i> rs2267437 | 3'TCTCCACTCGGCTTTCTTCCA 5' 5'TCTCCCTCCGCTTCGCACTC 5' | 63 °C | 320pb | <i>Ban</i> I | 262pb, 182pb, 80pb, 58pb | WANG et al. (2008) |
| <i>LIG4</i> rs1805388 | 3'TCTGTATTGGTTCTAAGTTGAMCA 5' 5'TGCTTTACTAGTTAAAGGAGAAGAT 3' | 52 °C | 121pb | <i>HpyGH</i> II | 65pb, 56pb | TSENG et al. (2008) |

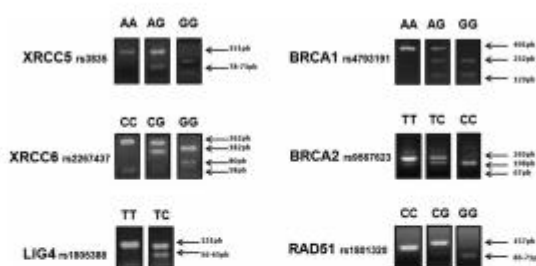


Figure 1. Representative blots of PCR-RFLP of the *XRCC5* rs3835, *XRCC6* rs2267437, *LIG4* rs1805388, *BRCA1* rs4793191, *BRCA2* rs9567623 and *RAD51* rs1801320 polymorphisms. C indicates cytosine; G, guanine; A, adenine; T, thymine; pb, base pairs

Analysis of HR gene polymorphisms

RAD51 polymorphism

The genotype frequencies of the *RAD51* rs1801320 polymorphism were different between MDS patients and controls ($p=0.05$) (Table 3). The *GC* heterozygote genotype of the *RAD51* rs1801320 polymorphism was associated with a reduced chance of developing MDS when compared to the control group ($p=0.05$; OR 0.453; CI 0.203–1.009) (Table 4). The *GG* homozygous wild-type genotype was highly associated with the presence of one cytopenia in whole blood, which indicates less aggressive disease [22] ($p < 0.001$; OR 16.099; CI 3.129–82.808) (Table 4).

BRCA1 and *BRCA2* polymorphisms

No significant differences in allele and genotype frequencies of the *BRCA1* rs4793191 and *BRCA2* rs9567623 polymorphisms were observed between MDS patients and controls ($p > 0.05$) (Table 3). We detected no associations of these polymorphisms with the variables gender, cytogenetics, bone marrow cellularity, cytopenias, IPSS score [22] and WHO classification [21] ($p > 0.05$) (data not presented).

Analysis of NHEJ gene polymorphisms

XRCC6 and *XRCC5* polymorphisms

The mutant genotypes *CG* and *CG + GG* of the *XRCC6* rs2267437 polymorphism were associated with a normal karyotype ($p=0.010$; OR 7.259; CI 1.616–32.600) (Table 4). This association was also observed for the bone marrow cellularity status normocellular + hypercellular ($p=0.023$; OR 5.556; CI 1.270–24.239).

Additionally, we found that the *AG* heterozygous genotype of the *XRCC5* rs3835 gene polymorphism was highly

associated with a reduced chance of developing MDS ($p < 0.001$; OR 0.100; CI 0.035–0.289) (Table 3).

LIG4 polymorphisms

No significant differences in allele and genotype frequencies of the *LIG4* rs1805388 polymorphism were observed between MDS patients and controls ($p > 0.05$) (Table 3). We detected no associations of this polymorphism with the variables gender, cytogenetics, bone marrow cellularity, cytopenias, IPSS score [22] and WHO classification [21] ($p > 0.05$) (data not presented).

Figure 2 summarizes the significant associations detected concerning HR and NHEJ gene polymorphisms in MDS patients.

Discussion

To the best of our knowledge, we evaluated for the first time the association of DNA repair gene polymorphisms with MDS susceptibility in Brazilian patients.

XRCC5/XRCC6 are important components of the NHEJ repair mechanism, and NHEJ is the main repair pathway in mammalian cells, contributing significantly to the maintenance of genome stability [25]. *XRCC5* and *XRCC6* are the first proteins to bind the DNA ends of a DSBs and the *XRCC5/6*-DNA complex recruits and activates *XRCC7* [25]. With respect to NHEJ gene polymorphisms, we demonstrated that the *AG* heterozygous genotype of the *XRCC5* rs3835 polymorphism is associated with a reduced chance of developing MDS. Additionally, we observed that the mutant *CG* and *CG + GG* genotypes of the *XRCC6* rs2267437 polymorphism were associated with a normal karyotype.

Interestingly, *XRCC5*- or *XRCC6*-deficient mice are viable, but their cells have defects in DNA end joining, which manifest as irradiation sensitivity, growth defects and premature senescence [26]. These defects occur because these genes are normally related to the maintenance of genomic

Table 3. Distribution of genotypes in MDS patient and health controls

| Genotype | Controls n* (%) | MDS n* (%) | p-value* | Multinomial logistic regression** | |
|--------------------------|-----------------|------------|-------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| | | | | p-value | OR (95% CI) |
| XRCC6 rs2267437 | | | | | |
| C allele | 109 (66.5) | 83 (69.2) | 0.700 | | |
| G allele | 55 (33.5) | 37 (30.8) | | | |
| C/C | 40 (48.8) | 27 (45.0) | 0.704 | | |
| C/G | 33 (40.2) | 28 (46.7) | | | |
| G/G | 9 (11.0) | 5 (8.3) | | | |
| XRCC5 rs3835 | | | | | |
| A allele | 86 (52.4) | 74 (61.7) | 0.146 | | |
| G allele | 78 (47.6) | 46 (38.3) | | | |
| AA | 5 (6.1) | 21 (35.0) | <0.0001 | 0.665 | 0.600 (0.059–6.052) |
| AG | 76 (92.7) | 32 (53.0) | | <0.0001 | 0.100 (0.035–0.289) |
| GG | 1 (1.2) | 7 (12.0) | | 0.665 | 1.667 (0.165–16.810) |
| LIG4 rs1805388 | | | | | |
| T allele | 107 (65.2) | 81 (67.5) | 0.705 | | |
| C allele | 57 (34.8) | 39 (32.5) | | | |
| T/T | 25 (30.5) | 21 (35.0) | 0.590 | | |
| T/C | 57 (69.5) | 39 (65.0) | | | |
| C/C | 0 (0.0) | 0 (0.0) | | | |
| BRCA1 rs473191*** | | | | | |
| A allele | 106 (65.4) | 81 (72.3) | 0.542 | | |
| G allele | 56 (34.6) | 31 (27.7) | | | |
| AA | 33 (40.7) | 27 (48.2) | 0.327 | | |
| AG | 40 (49.4) | 27 (48.2) | | | |
| GG | 8 (9.9) | 2 (3.6) | | | |
| BRCA2 rs9567623 | | | | | |
| C allele | 132 (80.5) | 94 (78.3) | 0.0583 | | |
| T allele | 32 (19.5) | 26 (21.7) | | | |
| C/C | 51 (62.2) | 35 (58.3) | 0.866 | | |
| C/T | 30 (36.6) | 24 (40.0) | | | |
| T/T | 1 (1.2) | 1 (1.7) | | | |
| RAD51 rs1801320 | | | | | |
| G allele | 134 (81.7) | 103 (85.8) | 0.420 | | |
| C allele | 30 (18.3) | 17 (14.2) | | | |
| G/G | 53 (64.6) | 46 (76.7) | 0.05 | 0.290 | 0.289 (0.029–2.878) |
| G/C | 28 (34.2) | 11 (18.3) | | 0.05 | 0.453 (0.203–1.009) |
| C/C | 1 (1.21) | 3 (5.0) | | | |

*The differences between the allelic and genotypes frequencies were performed using the Pearson's chi-square test. p-value was considered to be statistically significant with a p-value of ≤ 0.05 .

**The odds-ratio (OR) and confidence interval (CI) were performed using the multinomial logistic regression model to identify the genotype association with MDS susceptibility. p-value was considered to be statistically significant with a p-value of ≤ 0.05 .

***In the analysis of genotype frequencies for BRCA1 rs473191 polymorphism, five DNA samples were degraded (four for the MDS group and one for the control group).

The marking in bold highlights the statistically significant results.

stability via a mechanism that involves the reduction of chromosomal rearrangements [26]. Chromosomal abnormalities are detected in up to 60% of primary MDS patients. Among the patients subjected to cytogenetic analysis in this study (eliminating cases without metaphases), 43% presented a normal karyotype and 56% presented chromosomal abnormalities. The finding that the majority of the cases reported here exhibited cytogenetic abnormalities confirms that our

results did not occur by chance. The presence of a normal karyotype in an MDS patient is related to a good prognosis, and these polymorphisms can exert protective effects against chromosomal abnormalities. These results suggest that these genes likely exert a protective effect in MDS patients and are important for preventing genomic instability in HSCs.

HR is an error free repair due to the use of sister chromatid. The RAD51 rs1801320 polymorphism is

Table 4. Associations of polymorphisms and clinical variables in MDS patients

| Polymorphism/variables | Genotype | Genotype frequencies (%) | Multinomial logistic regression* | | | |
|--|----------|--------------------------|----------------------------------|---------------|--------------|---------------|
| | | | p-value | OR | 95% CI | |
| XRCC6 rs2267437 | | | | | | |
| Karyotype Normal | CC | 3 (6.8) | 0.194 | 0.214 | 0.021 | 2.187 |
| | CG | 14 (31.8) | 0.010 | 7.259 | 1.616 | 32.600 |
| | GG | 2 (4.5) | 0.194 | 4.667 | 0.457 | 47.629 |
| Non-normal | CG + GG | 16 (36.4) | 0.010 | 6.788 | 1.570 | 29.354 |
| | CC | 14 (31.8) | | | | |
| | CG | 9 (20.5) | | | | |
| Bone marrow cellularity Normocellular + hypercellular | CG | 2 (4.5) | 0.457 | 0.400 | 0.036 | 4.470 |
| | CG | 20 (40.8) | 0.023 | 5.556 | 1.270 | 24.239 |
| | GG | 3 (6.1) | 0.457 | 2.500 | 0.224 | 27.904 |
| Hypocellular | CG + GG | 23 (46.9) | 0.023 | 4.792 | 1.238 | 18.546 |
| | CC | 10 (20.4) | | | | |
| | CG | 3 (6.1) | | | | |
| RAD51 rs1801320 Cytopenias 0-1 | GG | 22 (36.7) | 0.000 | 16.099 | 3.129 | 82.808 |
| | GC | 2 (3.3) | 0.090 | 0.242 | 0.047 | 1.247 |
| | CC | 0 (0.0) | | | | |
| 2-3 | GC + CC | 2 (3.3) | | | | |
| | GG | 24 (40.0) | | | | |
| | GC | 9 (15.0) | | | | |
| | CC | 3 (5.0) | | | | |
| | GC + CC | 12 (20.0) | | | | |

*The odds-ratio (OR) and confidence interval (CI) were performed using the multinomial logistic regression model to identify the genotype association with MDS susceptibility. p-value was considered to be statistically significant with a p-value of ≤ 0.05 . The marking in bold highlights the statistically significant results.

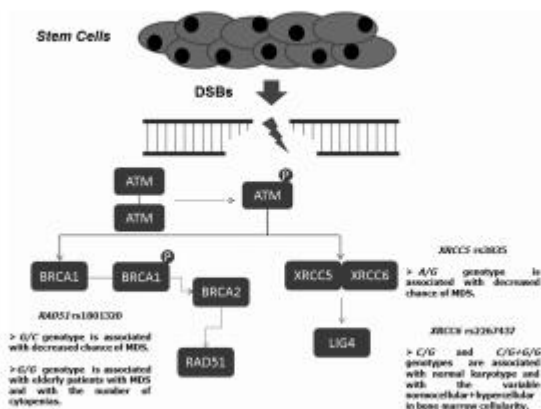


Figure 2. Representative diagram of the significant associations detected in HR and NHEJ genes polymorphisms in MDS patients

associated with the overexpression of the RAD protein and with increased of DNA repair [15]. With respect to the HR gene polymorphisms, our results demonstrated that the G/G wild genotype of the *RAD51* rs1801320 polymorphism was highly associated with the presence of one cytopenia, which indicates less aggressive disease in the whole cohort [22]. The majority of MDS patients present at least one cytopenia, and the presence of two or three cytopenias is associated with an unfavorable prognosis [22], reflecting more aggressive bone marrow failure.

We found an association of the G/C heterozygote *RAD51* rs1801320 polymorphism with a reduced chance of developing MDS. In contrast to our results, Li et al. reported that this polymorphism was associated with MDS in 275 Chinese patients. In addition, those authors reported that the C/C homozygous genotype of *RAD51* gene was associated with an increased chance of MDS ($p=0.001$; OR 4.13; CI 1.83–9.53) [23]. Baumann et al. studied 292 North American patients and detected no associations of this polymorphism with MDS [27]. Fabiani et al. reported similar results in a study of 160 Italian MDS patients [28]. These results may represent the heterogeneous pathogenesis of MDS. According to the Brazilian National MDS Register, Magalhães et al. [29] observed significant differences between American, European and Asian reports, as well as between Brazilian geographical regions, indicating that racial miscegenation might play a role in MDS pathogenesis [29]. We believe that the pathogenic profile of MDS is different in different regions of the world and in different regions of the same continent.

One important limitation of this study is that the number of cases evaluated may not be representative of all Brazilian cases. We cannot exclude the possibility that the absence of associations related to *LIG4*, *BRCA1* and *BRCA2* in our report is related to the number of cases evaluated. One important question addresses the manner in which these polymorphisms influence the expression of these genes in patients with MDS. We did not evaluate of protein or RNA expression.

The majority of reports studying the pathogenesis of MDS involve genes related to apoptosis, epigenetic alterations and blocked differentiation of HSCs [30–32]. Belickova et al. [33] recently identified nine candidate genetic polymorphisms associated with susceptibility to MDS. Those authors demonstrated that four oxidative and DNA damage genes (i.e. *LIG1*, *RAD52*, *MSH3* and *GPX3*) were associated with a possible role in the pathophysiology of MDS [34]. We demonstrate in this study that genes related to DSBs in DNA are also related to the pathogenesis of MDS. We previously demonstrated that the A/G heterozygote genotype of the *ATM* rs228593 polymorphism was associated with a reduced chance of developing MDS and with the variables IPSS score (i.e. low-risk subgroup) and number of cytopenias (i.e. 0–1 cytopenia) among MDS patients [20].

Thus, these results highlight the importance of the *RAD51*, *XRCC5* and *XRCC6* genes in the maintenance of

genomic stability and promote an improved understanding of the genesis of MDS. The NHEJ and HR repair mechanisms are important for chromosomal stability and represent a new area of study for MDS pathogenesis.

Conflict of interest

The authors have no competing interest.

Acknowledgement

This work was conducted with support from CAPES, CNPq and FUNCAP.

The authors would like to thank Dr. Manoel Martins for his assistance with statistical analysis.

Author contributions

HLRJ, SMMM and RFP designed the research study. HLRJ, JCS and RTGO performed the cytogenetic for G-Banding. RFP and LIPFF performed the bone marrow collection. HLRJ and ARSM performed the RFLP analysis. HLRJ, FFH, JCS and RTGO performed the research. HLRJ and FFH analyzed the data. HLRJ, FFH, SMMM and RFP wrote the paper.

References

1. Cazzola M, Della Porta MG, Travaglio E, et al. Classification and prognostic evaluation of myelodysplastic syndromes. *Semin Oncol* 2011; 38(5): 627–34.
2. Jädersten M, Hällström-Lindberg E. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. *J Intern Med* 2009; 265(3): 307–28. Epub 2008 Dec 17.
3. Pinheiro RF, Moreira E de S, Silva MR, et al. FLT3 mutation and AML/ETO in a case of Myelodysplastic syndrome in transformation corroborates the two hit model of leukemogenesis. *Leuk Res* 2007; 31(7): 1015–8. Epub 2006 Oct 31.
4. Strom SS, Vêlez-Bravo V, Estey EH. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* 2008; 45(1): 8–13.
5. Hopfner KP. DNA Double-Strand Breaks Come into Focus. *Cell* 2009; 139: 25–27.
6. Durocher D, Jackson SP. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 225–231.
7. Helleday T, Lo J, van Gent DCD, Engelwaerd BPC. DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair* 2007; 6(7): 923–935.
8. Friedenson B. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC Cancer* 2007; 7(6): 7–152.
9. Scardocci A, Guidi F, D'Alou F, et al. Reduced BRCA1 expression due to promoter hypermethylation in therapy-related acute myeloid leukaemia. *Brit J Cancer* 2006; 95: 1108–13.
10. Wang K, Yee Y, Xu Z, et al. Interaction between BRCA1/BRCA2 and ATM/ATR associate with breast cancer susceptibility in a Chinese Han population. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 200(1): 40–6.

11. Sigurdsson S, Van Komen S, Petukhova G, Sung P. Homologous DNA pairing by human recombination factors Rad51 and Rad54. *J Biol Chem* 2002; 277(45): 42790–4. Epub 2002 Aug 29.
12. Burma S. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* 2006; 5 (9–10): 1042–8.
13. Economopoulou P, Pappa V, Kotsioti F, et al. 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* 2010; 89(3): 233–9. Epub 2009 Sep 2.
14. Iarmacovai G, Bonsi S, Botta A, et al. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. *Mutat Res* 2008; 658: 215–233.
15. Richardson C, Stark JM, Ormudsen M, Jasin M. Rad51 over-expression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene* 2004; 23: 546–53.
16. Fu YP, Yu JC, Cheng TC, et al. Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the nonhomologous end-joining genes: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res* 2003; 63: 2440–6.
17. Wang SH, Peng L, Li CP, et al. Genetic variants of the XRCC7 gene involved in DNA repair and risk of human bladder cancer. *Int J Urol* 2008; 15: 534–539.
18. Tseng RC, Hsieh FJ, Shih CM, et al. Lung Cancer Susceptibility and Prognosis Associated with Polymorphisms in the Nonhomologous End-joining Pathway Genes A Multiple Genotype-Phenotype Study. *Cancer* 2009; 115(13): 2939–48.
19. Riballo E, Critchlow SE, Teo SH, et al. Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr Biol* 1999; 9: 699–702.
20. Ribeiro HL Jr, De Oliveira RT, Maia AR, et al. ATM polymorphism is associated with low risk myelodysplastic syndrome. *DNA Repair (Amst)* 2013; 12(2): 87–9.
21. Bunnings RD, Ozai A, Gemming U. Myelodysplastic syndromes/leukaemias, overview. In WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Swendlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (eds). IARC Press: Lyon, 2008; 88–93.
22. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079–88.
23. Li L, Yang L, Zhang Y, et al. Detoxification and DNA repair genes polymorphisms and susceptibility of primary myelodysplastic syndromes in Chinese population. *Leuk Res* 2011; 35(6): 762–5. Epub (2010) Dec 19.
24. Pinheiro RF, Chauffaille ML. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42(11): 1110–2.
25. Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 2008; 283: 1–5.
26. DiFilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, et al. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature* 2000; 404(6777): 510–4.
27. Baumann Kreuziger LM, Steensma DP. RAD51 and XRCC3 polymorphism frequency and risk of myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol* 2008; 83(10): 822–3.
28. Fabiani E, D'Adda F, Scardocci A, et al. Polymorphisms of detoxification and DNA repair enzymes in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2009; 33(8): 1068–71.
29. Magalhães SMM, Heredia FF, Fernandes LC, et al. Beyond race-related disparities - is myelodysplastic syndrome the same everywhere? *Leuk Lymphoma* 2012; 14(547): 1564–6.
30. Raza A, Galili N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(12): 849–59.
31. Shen L, Kantarjian H, Guo Y, et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2010; 28(4): 605–13.
32. Gueller S, Komor M, Nowak D, et al. Identification of defects in the transcriptional program during lineage-specific in vitro differentiation of CD34(+) cells selected from patients with both low- and high-risk myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol* 2010; 38 (9): 718–32. 732.e1–6.
33. Belickova M, Merkerova MD, Stara E, et al. DNA repair gene variants are associated with an increased risk of myelodysplastic syndromes in a Czech population. *J Hematol Oncol* 2013; 6(1): 6–9.