



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

ANACÉLIA GOMES DE MATOS MOTA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE INTERLEUCINA – 8 E ATIVAÇÃO DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO NUCLEAR NF – κ B EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROMES
MIELODISPLÁSICAS**

FORTALEZA

2016

ANACÉLIA GOMES DE MATOS MOTA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE INTERLEUCINA – 8 E ATIVAÇÃO DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO NUCLEAR NF – κ B EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROMES
MIELODISPLÁSICAS**

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

Orientador: Profa. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães

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)

- M871a Mota, Anacélia Gomes de Matos.
Avaliação dos níveis de interleucina IL-8 e a ativação do fator de transcrição nuclear NF-kB em pacientes portadores de Síndromes Mielodisplásicas. : Síndromes Mielodisplásicas / Anacélia Gomes de Matos Mota. – 2016.
75 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Silvia Maria Meira Magalhães.
1. Síndromes Mielodisplásicas. 2. Neoplasias. 3. Inflamação. 4. Citocinas. 5. Fatores de Transcrição. I. Título.

CDD 610

ANACÉLIA GOMES DE MATOS MOTA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE INTERLEUCINA – 8 E ATIVAÇÃO DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO NUCLEAR NF – κ B EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROMES
MIELODISPLÁSICAS**

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

Defesa em: 30 / 08 / 2016

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Juliana Cordeiro de Sousa
Faculdade Tecnologia Intensiva - FATECI

*À Deus,
À minha mãe e irmãos,
Ao meu filho,
Ao meu pai (in memoriam).
Sem eles nada disso seria possível.*

AGRADECIMENTOS

- À **Deus** por sempre iluminar meu caminho e nunca me deixar desistir diante das derrotas, pois acredito que tudo tem seu momento para acontecer.
- À minha mãe **Ofélia**, que sempre foi exemplo de mãe, mulher e profissional, a minha maior incentivadora dos meus estudos. Sempre me ensinou a ser forte e nunca desistir dos meus ideais.
- Aos meus irmãos, **Narcélio, Carlos Alberto e Nárlia**, que sempre me apoiam e estão ao meu lado em todos momentos importantes e decisivos em minha vida.
- Ao meu filho **Gabriel**, por ser meu estímulo para que eu sempre possa dar o meu melhor.
- Ao meu namorado **George**, por suas demonstrações de companheirismo, paciência e compreensão. Obrigada por poder compartilhar com você esse momento tão delicado de minha vida.
- À **Dra Silvia Magalhães**, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pela confiança em mim depositada. Sou grata pelos seus ensinamentos e pelas horas gastas junto à mim durante o desenvolvimento desse trabalho. Terás sempre o meu respeito e admiração por ser um exemplo de profissional, mulher e acima de tudo, HUMANA.
- Ao **Dr. Ronald Feitosa**, por toda sua dedicação e palavras de incentivo aos seus alunos. Sua participação foi fundamental durante todo esse percurso. Obrigada pelas suas contribuições técnicas, laboratoriais, e de estatística.
- À **Juliana Cordeiro**, por estar sempre presente, atenciosa e incentivadora do meu crescimento intelectual.
- À **Profa. Romélia Pinheiro**, pela sua inestimável disponibilidade em nos ajudar e colaborar com seus conhecimentos técnicos e laboratoriais.
- Às amigas **Maritza e Marilena**, pela amizade, paciência e grande contribuição na prática-laboratorial.
- A cada um que compõe o **Laboratório de Citogenômica do Câncer**, em especial:
- À amiga **Daniela Borges**, pela sua amizade, dedicação, preocupação e disponibilidade sempre em ajudar;
- À amiga **Roberta**, por me receber tão bem no laboratório desde o início e sempre mostrou-se disponível em ajudar no que fosse preciso;
- À amiga **Mirele**, pela sua amizade, e por estar sempre disponível para ajudar ou mesmo me incentivando com suas palavras de otimismo e determinação;

- Ao amigo **Howard**, pela sua amizade e por seus conhecimentos e contribuições que tanto fizeram importante para o enriquecimento do meu trabalho;
- Aos amigos **Wesley, Izabele, Marília, Mayumi, Rhina, Kézia**, por sempre me ajudaram em todos os momentos com suas palavras de apoio e incentivo;
- Ao meu amigo **Bruno**, pela amizade e parceria ao longo dessa árdua caminhada;
- A todos do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas**, em especial a **Ivone** e a **Rita**, por sempre acolher e atender com muita educação, paciência e dedicação aos alunos.
- Ao **Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Infantil Albert Sabin**, em especial à **Dra. Vânia Feijó**, pela compreensão e paciência em minha ausência, e suas palavras de apoio e incentivo; também aos colegas de trabalho, **Maria Júlia, Thiago, Anquises e Paulo**, o meu muito obrigada pelas palavras de apoio e força.
- Ao **Hemoce**, em especial à **Enfa. Verônica Almeida**, que sempre me incentivou e por me fazer acreditar no meu potencial.
- À **Agência Transfusional do Hospital Infantil Albert Sabin**, em especial à **Dra. Márcia Lima Verde** pela compreensão, e paciência durante todo esse projeto. Obrigada por sempre estimular meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço também ao corpo técnico que compõe a agência em nome da **Daniele Pereira**.
- À minha amiga **Dra. Luiza Lins**, por eu ter o privilégio de tê-la como amiga. Incentivadora e apoiadora das mais importantes decisões em minha vida.

“O Valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade em que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

A patogênese da síndrome mielodisplásica (SMD) é complexa e multifatorial e depende da interação entre células hematopoéticas e seu microambiente. Os mecanismos patogênicos envolvidos ainda não são totalmente compreendidos. **Objetivos:** (a) Avaliar níveis plasmáticos de interleucina-8 (CXCL8 ou IL-8) e a ativação do Fator Nuclear de Transcrição kappa B (NF-kB) em pacientes com SMD e as possíveis associações com variáveis clínico-patológicas. (b) Analisar possível correlação entre a IL-8 e NF-kB. **Pacientes e métodos:** Um total de 25 pacientes adultos portadores de SMD *de novo* (4 ARSA, 16 CRDM, 1 AREB-I, 4 AREB-II) foram analisados de acordo com a classificação da OMS e IPSS-R. Voluntários idosos saudáveis pareados por sexo e idade foram incluídos como controles. A análise da IL-8 foi realizada por reação imunoenzimática de acordo com o kit BD OptEIA e a ativação do NF-kB foi medida por quimioluminescência utilizando kit TransAM NF-kB p65. **Resultados:** Os pacientes com SMD apresentaram maior nível de IL-8 quando comparados aos controles ($p=0,0068$) e, dentre os pacientes, aqueles com 75 anos ou mais apresentaram níveis significativamente maiores ($p=0,0357$). Não foram encontradas associações significativas entre o nível de IL-8 e as variáveis analisadas. Nos pacientes com SMD, a ativação do NF-kB foi significativamente maior quando comparada aos controles ($p<0,0001$) e maior em pacientes com 75 anos ou mais ($p=0,0475$). Foi encontrada associação significativa entre a atividade de NF-kB e níveis elevados de ferritina sérica ($p=0,042$) e maior percentual de blastos ($p=0,0282$). O estudo da correlação entre IL8 e NF-kB mostrou uma correlação moderada, positiva e significativa ($r = 0,480$; $p = 0,015$). **Discussão e conclusões:** Estudos recentes sobre a fisiopatologia complexa da SMD incluem a desregulação de citocinas e suas vias de sinalização. Neste estudo, níveis significativamente elevados de IL-8 e NF-kB foram demonstrados e uma associação de maior ativação de NF-kB foi detectada em pacientes com sobrecarga de ferro e excesso de blastos, dois marcadores de pior prognóstico na doença. Uma correlação positiva entre IL-8 e NF-kB foi observada, corroborando o conceito emergente do papel relevante do microambiente e da sinalização inflamatória aberrante na patogênese da doença. A melhor compreensão desses mecanismos favorece a identificação de novos alvos terapêuticos.

Palavras-chaves: IL – 8 (Interleucina – 8), Fator de Transcrição Nuclear NF-kB, Citocinas pró-inflamatórias, Inflamação, Síndrome Mielodisplásica.

ABSTRACT

The pathogenesis of myelodysplastic syndromes (MDS) is complex and multifactorial and depends on the interaction between hematopoietic cells and their microenvironment. The definite pathogenetic mechanisms are still not fully understood. **Objectives:** (a) To evaluate CXCL8 chemokine ligand 8 (CXCL8 or IL-8) plasma levels and nuclear transcription factor kappa B activation (NF- κ B) in patients with MDS and the possible associations with clinicopathologic variables. (b) To test possible correlation between IL-8 and NF- κ B. **Patients and methods:** A total of 25 adults *de novo* MDS patients (4 RARS, 16 RCDM, 1 RAEB-I, 4 RAEB-II) were analyzed according to WHO classification and IPSS-R. Sex and age-matched healthy elderly volunteers were included as controls. IL-8 analysis was performed by Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay kit BD OptEIA and DNA binding activity of NF- κ B p65 was measured using TransAM NF- κ B p65 kits®. **Results:** MDS patients showed higher level of IL-8 when compared to controls ($p=0,0068$). Patients aged 75 and above also showed significant higher levels ($p=0,0357$). No significant associations were found between level of IL-8 and the variables analyzed. NF- κ B activity was significantly elevated in MDS patients when compared to controls ($p<0,0001$) and higher in patients older than 75 years ($p=0,0475$). NF- κ B activity was significantly associated with higher serum ferritin ($p=0,042$) and higher percentage of blasts ($p=0,0282$). The study of correlation between IL8 and NF- κ B showed a significant positive correlation ($r=0.480$; $p=0.015$). **Discussion and conclusions:** Many unraveled specific pathways involved in the complex pathophysiology of MDS have been recently described, including aberrations in cytokines and their signaling pathways. In this study elevated levels of IL-8 and NF- κ B were demonstrated and an elevated NF- κ B activity was significantly associated with higher serum ferritin and with blast excess, two markers of bad prognosis. A significant positive correlation between IL-8 and NF- κ B was detected, corroborating the emerging concept of the important role of the niche and deregulated inflammatory signaling in MDS phenotype. The best comprehension of these mechanisms favors defining new targets for therapy.

Key-words: IL – 8 (Interleukin – 8), NF- κ B, Proinflammatory cytokine, Inflammation, Myelodysplastic syndrome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da gênese da Síndrome Mielodisplásica.	17
Figura 2: Representação esquemática do papel da inflamação na patogênese da SMD.	18
Figura 3: Representação do papel da IL-8 no desenvolvimento do tumor.	29
Figura 4: Representação dos indutores de ativação do NF-kB e os genes regulados pelo NF-kB	31
Figura 5: Representação dos componentes da via ativação do NF-kB.	32
Figura 6: Representação das vias de ativação do NF-kB.	33
Figura 7: Diagrama esquemático ilustrando expressão de genes associados com a regulação da apoptose e metabolismo celular através da ativação NF-kB pela IL-8.	35
Figura 8: Representação esquemática dos procedimentos da dosagem de IL-8 e a análise da ativação do NF-kB.	38
Figura 9: Representação esquemática dos procedimentos da dosagem de IL – 8.	40
Figura 10: Representação esquemática dos procedimentos da análise da ativação do NF-kB.	43
Figura 11: Análise de IL-8 em pacientes com SMD versus grupo controle.	48
Figura 12: Dosagem de IL-8 em pacientes com SMD frente a variável idade.	49
Figura 13: Análise da ativação do NF-kB em pacientes com SMD.	50
Figura 14: Análise comparativa da ativação de NF-kB quanto à idade dos pacientes com SMD.	50
Figura 15: Análise comparativa da ativação do NF-kB quanto ao nível de ferritina.	51
Figura 16: Análise comparativa da ativação do NF-kB quanto ao percentual de blastos.	52
Figura 17: Análise comparativa da ativação do NF-kB e estratificação de risco pelo IPSS-R.	52
Figura 18: Correlação de <i>Spearman's</i> entre os níveis de IL-8 e a ativação de NF-kB.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Evolução na classificação da Síndrome Mielodisplásica	21
Tabela 2: Classificação da OMS: critérios e evolução.	22
Tabela 3: Variáveis para IPSS.	23
Tabela 4: Variáveis para IPSS-R.	24
Tabela 5: Quimiocinas: CXC, receptores e função imunológica.	27
Tabela 6: Caracterização descritiva dos pacientes com SMD	45
Tabela 7: Caracterização descritiva das variáveis laboratoriais do hemograma em pacientes com SMD.	46
Tabela 8: Estratificação dos pacientes com SMD quanto à classificação OMS.	46
Tabela 9: Caracterização descritiva das variáveis clínicas relacionadas aos achados da medula óssea em pacientes com SMD.	47
Tabela 10: Estratificação dos pacientes com SMD quanto ao grupo de risco pelo IPSS-R.	47
Tabela 11: Estratificação dos pacientes SMD quanto à dosagem de ferritina sérica.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

- AREB-1** – Anemia refratária com excesso de blastos -1
AREB-2 - Anemia refratária com excesso de blastos -2
ARSA – Anemia refratária com sideroblastos em anel
CH – Concentrado de Hemácias
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média
CRC – Citopenia refratária da criança
CRDU – Citopenia refratária com displasia em uma linhagem
CXCR1 – Receptores CXC
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática
FAB – Franco Americano Britânica
Glu-Leu-Arg – Glutamato, Leucina, Arginina
Hb – Hemoglobina
IFN – γ – Interferon γ
I κ B – Proteína inibitória
IKK – Proteína quinase
IL-8 – Interleucina-8
IPSS – *International Prognostic Score System*
IPSS-R - *International Prognostic Score System Revised*
LPS - Lipopolissacarídeo
LMA – Leucemia mielóide aguda
MDSC – Células supressoras derivadas mielóides
MO – Medula óssea
NF- κ B – Fator Transcrição Nuclear Kappa B
NK – Células *Natural Killer*
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – *Phosphate – Bufferid saline*
RH – *Rel homology*
SAV-HRP – *Streptavidin horseradish peroxidase conjugate*
SF – Sobrecarga de Ferro
SMD – Síndrome mielodisplásica

SMD-5q - Síndrome mielodisplásica associada com del(5q)

SMD-N - Síndrome Mielodisplásica não classificável

SMD-t - Síndrome Mielodisplásica relacionada à terapia

TAD – *Transcriptional Activation Domains*

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TMB - Tetrametilbenzidina

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Síndrome mielodisplásica (SMD)	15
1.2	Patogênese e inflamação	16
1.3	Diagnóstico	19
1.4	Classificação e fatores de prognóstico na SMD	21
1.5	Sobrecarga de ferro	24
1.6	Interleucina 8	26
1.7	Fator de transcrição nuclear NF-kB	29
1.8	Associação de IL-8 e NF-kB em SMD	34
2	OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo geral	36
2.2	Objetivos específicos	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Casuística	37
3.2	Aspectos éticos	37
3.3	Critérios de Inclusão	37
3.4	Critérios de Exclusão	37
3.5	Coleta e Processamento de amostras	38
3.5.1	<i>Coleta de amostras</i>	38
3.5.2	<i>Determinação de IL-8 por ELISA</i>	39
3.5.3	<i>Determinação NF-kB</i>	41
3.6	Variáveis Analisadas	44
3.7	Análises Estatísticas	44
4	RESULTADOS	45
5	DISCUSSÃO	54

6	CONCLUSÕES	58
7	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente	68
	APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Voluntário	71
	ANEXO A: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome mielodisplásica (SMD)

A Síndrome mielodisplásica (SMD) representa um grupo heterogêneo de doenças hematopoéticas clonais, caracterizado por distúrbios na proliferação e diferenciação da célula-tronco. Uma sequência de alterações genéticas adquiridas resulta na geração de um clone anômalo e geneticamente instável com potencial para evolução para leucemia mielóide aguda (GANGAT, 2016). A idade média dos indivíduos acometidos varia entre 65 e 80 anos, é incomum em indivíduos com menos de 50 anos e sua incidência é crescente com a idade, variando de 4,1 a 12,6 novos casos/100.000 habitantes/ano, com aumento para cerca de 90 novos casos/100.000 habitantes/ano na população com idade superior a 80 anos (RAZA *et al.*, 2012; MA, 2012; GERMING *et al.*, 2013; MALCOVATI *et al.*, 2013). É, atualmente, considerada a doença onco-hematológica mais comum em idosos, superando as leucemias agudas e crônicas mielóides e linfóides.

Embora a doença afete ambos os sexos, assim como outras leucemias, a SMD é mais comum em homens, devido provavelmente à maior exposição a fatores ocupacionais, ambientais e ao estilo de vida (MA 2012; BELLI *et al.*, 2015). As diferentes propostas de classificação, a falta de registros de base populacional e a resistência em indicar procedimentos diagnósticos invasivos em idosos dificultam o conhecimento da incidência e pressupõe sub-diagnóstico e sub-notificação (MA 2012; BELLI *et al.*, 2015).

A incidência e características clínicas da SMD variam de acordo com a área geográfica, questões étnicas e genéticas, bem como seu estilo de vida (BELLI *et al.*, 2015). No Brasil, não existem estudos epidemiológicos que deem o dimensionamento do problema ou forneçam um suporte para um planejamento de ações. Magalhães e cols (2010) realizaram o primeiro levantamento de SMD no Brasil, um estudo retrospectivo em 12 centros de atenção terciária de referência, em que se avaliaram dados demográficos, clínico-patológicos e terapêuticos. A idade mediana ao diagnóstico nos 476 casos avaliados foi 68,3 anos, inferior ao que se observa em estudos americanos ou europeus (MAGALHÃES, 2010). Dados de um único centro do nordeste brasileiro foram publicados, e a idade mediana ao diagnóstico foi 67 anos (variação 15 a 88 anos), similar ao encontrado no estudo multicêntrico brasileiro, embora se acredite que variações regionais ocorram (MAGALHÃES, 2013).

Mais recentemente um estudo do perfil epidemiológico realizado em países da América Latina (Chile – Brasil – Argentina) foi realizado por BELLI *et al.*, em 2015. Nesse estudo, foram avaliados retrospectivamente um total de 1.080 pacientes, sendo 635 argentinos, 345 brasileiros e 100 chilenos. Nesse estudo a mediana de idade foi 69 anos, com valores ainda inferiores para os pacientes chilenos e com leve predomínio do sexo feminino (BELLI, 2015).

As causas da SMD não são conhecidas (ADÈS *et al.*, 2014). A idade é considerada o mais fator de risco isolado mais importante para o desenvolvimento da SMD, seguida pelo sexo masculino e pela exposição prévia à quimio ou radioterapia (INVERNIZZI *et al.*, 2015). Esse último grupo é considerado doença secundária ou SMD relacionada à terapia (SMD-t) e constitui de 10% a 15% de todos os casos.

1.2 Patogênese e a Inflamação

As neoplasias são, geralmente, oriundas de uma predisposição genética constitucional seguida de mutações somáticas adquiridas ou de um acúmulo de mutações somáticas que levam ao desenvolvimento do fenótipo neoplásico (CHAUFFAULLE 2006; BEJAR *et al.*, 2011).

A patogênese da SMD é complexa e pode envolver mecanismos genéticos, epigenéticos e imunomediados. Os passos iniciais da patogênese das SMD envolvem danos no DNA das células tronco hematopoéticas pluripotentes, com o desenvolvimento de um clone mielodisplásico que apresenta vantagem de proliferação e excesso de apoptose, resultando nas citopenias que caracterizam a apresentação da doença, conforme figura 1 (CHAUFFAULLE 2006; KERBAUY *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2009).

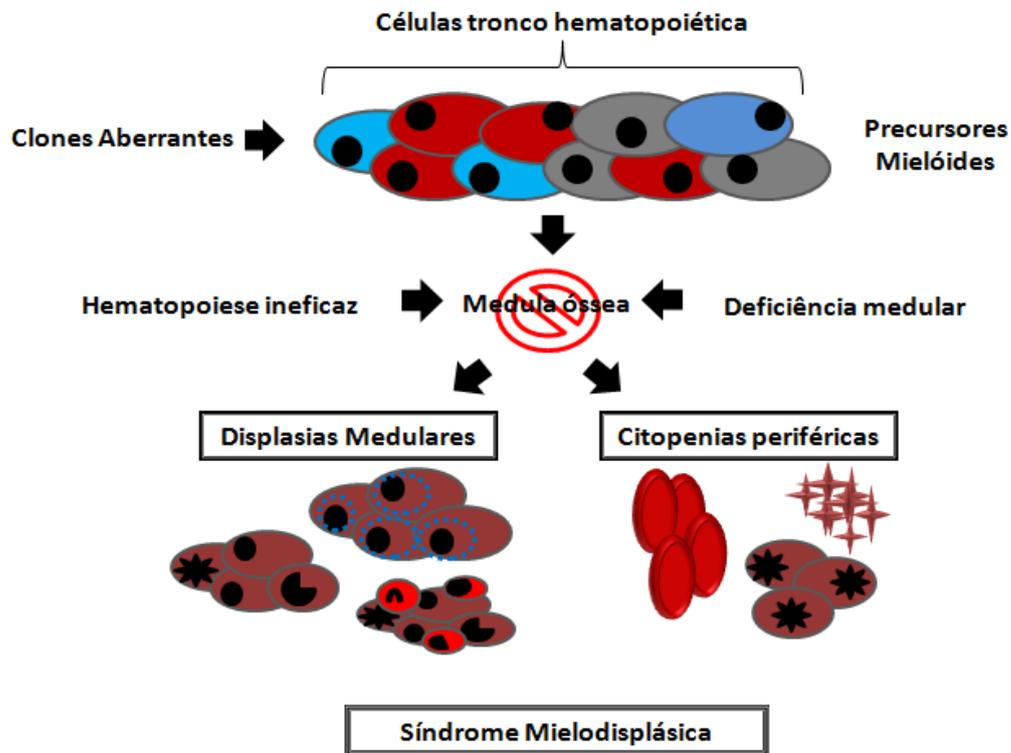


Figura 1: Representação esquemática da patogênese da Síndrome Mielodisplásica. Adaptado de Hellstrom-Lindberg (2008) e Economopoulou (2008).

Nos últimos anos têm-se descoberto várias mutações importantes na SMD, sendo a maioria anormalidades genéticas em progenitores mielóides, alterações epigenéticas e alterações extrínsecas no microambiente da medula óssea, gerando uma patogênese bastante complexa da SMD (OLNES et al., 2011; GLENTHØJ *et al.*, 2016). (Figura 2)

As causas fisiopatológicas dessa doença são diversas, mas sabe-se que dependem muito da interação entre as células hematopoiéticas aberrantes e o seu microambiente. Além disso, as anormalidades na função imunológica apesar de não serem completamente esclarecido, ultimamente têm sido relatado como a causa da apoptose e das citopenias observadas na SMD.

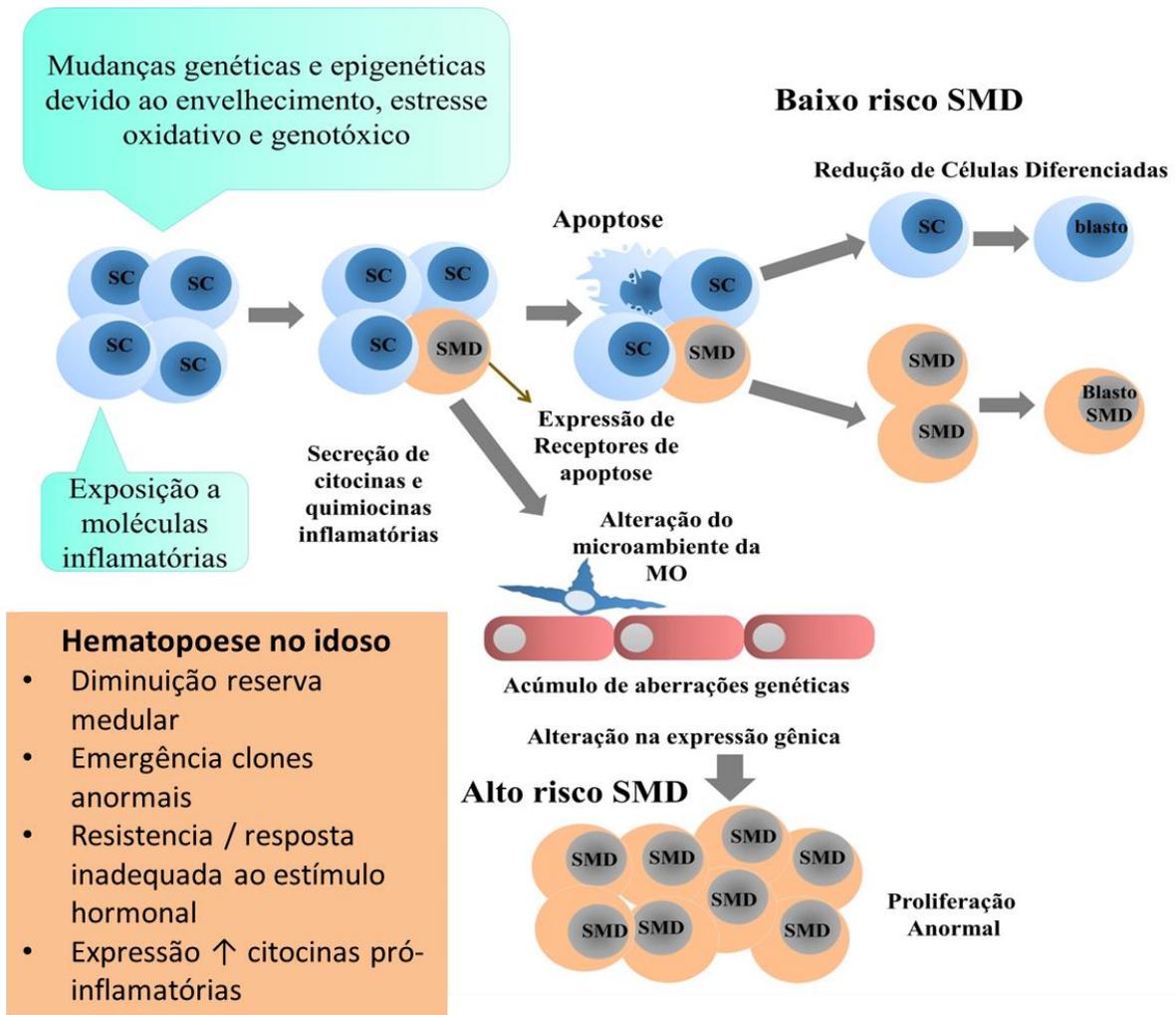


Figura 2. Papel da inflamação na patogênese da SMD. Adaptado de GÓMEZ et al. 2015.

Uma característica fundamental presente nos pacientes de SMD de baixo risco é o aumento da apoptose de precursores hematopoiéticos (GÓMEZ *et al.*, 2015; WOLACH *et al.*, 2016).

A participação da apoptose na fisiopatologia da SMD é um fator determinante (KERBAUY *et al.*, 2007). Na SMD inicial ocorre uma excessiva apoptose intramedular devido a uma maior liberação de citocinas pró-inflamatórias através da ativação das células T citotóxicas (OLNES *et al.*, 2011). À medida que a taxa de apoptose diminui ocorre progressão da doença e evolução para leucemia aguda (MARCONDES, 2008; HE, 2016). Pacientes com altas taxas de apoptose apresentam maior sobrevida do que pacientes com baixas taxas, em média de 66 meses x 30 meses o que está de acordo com o conceito de que a progressão da doença está relacionada diretamente com a redução da apoptose (KERBAUY *et al.*, 2007).

Portanto, tem-se que o aumento dos níveis de expressão de proteínas pró-apoptóticas, está relacionado diretamente com a expectativa de vida e a diminuição do risco de transformação leucêmica (KERBAUY *et al.*, 2007).

A homeostase é mantida pelo equilíbrio das ações de várias citocinas inflamatórias (BACHEGOWDA *et al.*, 2013; HE Q *et al.*, 2016).

A SMD caracteriza-se pela ativação de células que compõem o sistema imune tais como células natural *killer*; células T que secretam diversas citocinas; e células supressoras derivadas mielóides (MDSC). Estudos recentes mostram que essas MDSC podem representar um marcador fundamental na inefetividade da hematopoese por produzirem intermédios inflamatórios gerando instabilidade no DNA (YANG *et al.*, 2015; RIVIERA *et al.*, 2016).

Na SMD, níveis de algumas citocinas, tais como: IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ) estão aumentados (CALADO 2011; GÓMEZ, 2015). Essas citocinas são essenciais na regulação da inflamação e da apoptose intramedular de doenças hematológicas (PARKER *et al.*, 2000; KERBAUY *et al.*, 2007; MARCONDES *et al.*, 2008; MORAES *et al.*, 2009; BACHEGOWDA *et al.*, 2013).

Vários mecanismos estão implicados na regulação da resposta inflamatória, na proliferação celular, na apoptose e defesa, os quais estão parcialmente regulados pelo fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB). (BARNES, 1997; AHN, 2007; UWE, 2008; LOUNNAS, 2009) O NF-kB pode ser ativado por uma variedade de sinais como infecções, estresse oxidativo, carcinógenos, citocinas, fatores de necrose (TNF- α), interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), irradiação ultravioleta, produtos provenientes de vírus e bactérias (lipopolissacarídeos – LPS) (GLEZER *et al.*, 2000; VAN DEN BERG *et al.*, 2001; CARLSEN *et al.*, 2004).

Mesmo sabendo que a inflamação pode ser induzida na ausência da ativação do NF-kB, apesar de ser uma via fisiologicamente rara, mostra a necessidade da ativação do NF-kB não apenas para a amplificação mas na manutenção da inflamação. Existe uma controvérsia no mecanismo de ação do NF-kB pois sabe-se também que o mesmo contribui para a redução da inflamação, preservando a função do tecido (BEN-NERIAH, 2011).

1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da SMD é baseado nos achados do hemograma, na identificação de alterações morfológicas em células hematopoéticas (displasias) do aspirado da medula óssea e

biópsia óssea e na presença de alterações citogenéticas recorrentes. (METZE *et al.*, 2006; WEINMANN 2014; BEJAR *et al.*, 2014). Os sintomas iniciais se relacionam à gravidade das citopenias, em especial da anemia, a citopenia mais comum. O diagnóstico pode ser dificultado em pacientes com percentagem <5% de blastos na medula óssea, com ausência de anormalidades cromossômicas recorrentes ou de excesso de blastos (GRIVICICH *et al.*, 2007; MALCOVATI *et al.*, 2013). Nesses casos, um protocolo de exclusão de causas não clonais está indicado (MAGALHÃES, 2006). São critérios de exclusão as deficiências nutricionais, como a de vitamina B12 e ácido fólico, a exposição recente a agentes tóxicos, disfunções metabólicas e hormonais, doenças infecciosas, auto-imunes e etilismo (MAGALHÃES 2006; STEENSMA, 2015).

Na SMD, as alterações cromossômicas são importantes para o diagnóstico, classificação, estratificação de risco e decisão terapêutica (MORAES *et al.*, 2009). Correlacionam-se com o curso clínico da doença e com a sua progressão. (KITAMURA *et al.*, 2014) De 50% a 60% dos pacientes com SMD *de novo* apresentam cariótipo anormal ao diagnóstico (AGGARWAL 2004) e uma porcentagem desses casos adquirem anomalias subsequentes, caracterizando a evolução clonal e pior prognóstico (OLNEY; LE BEAU, 2002).

Nas SMD secundárias estas alterações são observadas em cerca de 80% dos casos (NAEIM; RAO; GRODY, 2008; LEE *et al.*, 2015). Não existem alterações patognômicas desta doença (MALCOVATI; NIMER, 2008). À exceção da deleção 5q-, a anormalidade cromossômica mais comumente observada, nenhuma outra alteração está especificamente associada a qualquer subtipo de SMD (NAEIM; RAO; GRODY, 2008; KASI LOKNATH KUMAR *et al.*, 2016).

As deleções cromossômicas são as alterações recorrentes mais comuns na SMD primária ou secundária. 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 casos. As monossomias mais comuns envolvem os cromossomos 5, 7 e a nulissomia do Y. 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).

1.4 Classificação e fatores de prognóstico na SMD

Vários sistemas de classificação têm sido propostos com o objetivo de estimar a sobrevida e o risco de transformação para LMA ao diagnóstico. A primeira classificação da SMD foi proposta pelo grupo FAB (Francês - Americano – Britânico) e baseou-se na morfologia celular e na percentagem de células blásticas presentes no sangue periférico e na medula óssea (BENNETT, 1982).

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			
	U	SMD/NMP-U			

Legenda: AR (Anemia Refratária), ARSA (AR com sideroblastos em anel), AREB (AR 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).

A classificação atualmente usada foi proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2001 e revisada em 2008 e associa a citogenética às alterações morfológicas. É considerado o número de linhagens hematopoéticas acometidas (uma ou múltiplas linhagens), reconhece-se a síndrome 5q-, reduz-se para um percentual igual ou superior a 20% a definição

de leucemia aguda e excluem-se os subtipos anemia refratária com excesso de blastos em transformação e a leucemia mielomonocítica crônica (MALCOVATI *et al.*, 2013; GERMING *et al.*, 2013). A tabela 1 representa a evolução nas classificações da SMD. O objetivo da revisão da classificação OMS foi reduzir o número de pacientes não classificados e agrupar categorias mais homogêneas. Oito subtipos formam então propostos, a saber: Citopenia refratária com displasia em uma linhagem (CRDU), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), citopenia refratária com displasia em múltiplas linhagens (CRDM), anemia refratária com excesso de blastos -1 (AREB-1), anemia refratária com excesso de blastos -2 (AREB-2), síndrome mielodisplásica não classificável (SMD-N), SMD associada com del(5q) isolada (SMD-5q) e citopenia refratária da criança (CRC; provisório) (OMS 2008). A tabela 2 mostra os critérios para a classificação da OMS 2008.

Mais recentemente, a classificação da OMS foi novamente atualizada em 2016 e algumas modificações propostas. Os subgrupos anemia refratária, neutropenia refratária e trombocitopenia refratária foram abolidos e uma nova nomenclatura foi proposta: SMD com displasia de única linhagem; SMD com sideroblastos em anel (com sideroblastos em anel e displasia de única linhagem e com sideroblastos em anel e displasia de múltiplas linhagens), SMD com displasia de múltiplas linhagens, SMD com excesso de blastos, SMD com del(5q) isolada, SMD não classificada, citopenia refratária da infância e neoplasia mielóide com predisposição da linhagem germinativa. Além disso, um marcador molecular foi, pela primeira vez, utilizado para o subgrupo com sideroblastos em anel, que ficou definido através da presença de $\geq 15\%$ de sideroblastos em anel ou quando esse percentual for $\geq 5\%$, desde que na presença de mutação SF3B1 (ARBER, 2016).

Tabela 2: Classificação da OMS 2008: critérios e evolução

Tipo	SP	MO	Sobrevida (meses)
AR	Anemia / nenhum ou raros blastos	Diseritropoese isolada. <5% blastos, < 15% SA	>60
ARSA	Anemia / nenhum ou raros blastos	Diseritropoese isolada. <5% blastos, $\geq 15\%$ SA	>60
CRDM	Citopenias / nenhum ou raros blastos sem bastonete de Auer / <1.000 monócitos/mm ³	Displasia > 2 linhagens <5% blastos, < 15% AS sem bastonete Auer	31
CRDM-ARSA	Citopenias / nenhum ou raros blastos sem bastonete de Auer / <1.000 monócitos/mm ³	Displasia > 2 linhagens <5% blastos, $\geq 15\%$ AS sem bastonete Auer	28
AREB I	Citopenias < 5% blastos / < 1.000 monócitos / sem bastonete Auer	Displasia em 1 ou múltiplas linhagens. 5-9% blastos sem bastonete Auer	27
AREB II	Citopenias 5-19% blastos/ <1.000 monócitos / pode ter bastonete Auer	Displasia em 1 ou múltiplas linhagens. 10-19% blastos	12

Síndrome 5q	Anemia <5% blastos / n° plaquetas normais ou aumentadas	pode ter bastonete Auer Série megacariocítica hiper ou normo. Megacariócitos hipolobulados. <5% blastos sem bastonete Auer. 5q- isolado em citogenética	40
SMD inclassificável	Citopenias/ nenhum ou raros blastos sem bastonete Auer	Displasia única (série granulocítica ou megacariocítica) . <5% blastos sem bastonete Auer	-

Adaptado de: OMS 2008

GREENBERG *et al.*, desenvolveram em 1997, um sistema de escore prognóstico, o *International Prognostic Score System – IPSS*, conforme tabela 3. Esse sistema é baseado no número de blastos na medula óssea, o grupo de risco citogenético e a presença de citopenias. A estratificação de risco estima a sobrevida global e o risco de evolução para leucemia aguda, orientando a escolha terapêutica (GREENBERG, 1997).

Tabela 3- Variáveis para IPSS

Variável	Estratificação de risco / Valor dos escores					
	Baixo 0	Intermediário I 0.5	1.0	Intermediário II 1.5	2.0	Alto ≥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).

Em 2012, o índice prognóstico do IPSS foi revisado, surgindo o IPSS-R (revisado) (GREENBERG *et al.*, 2012) (Tabela 4). Nesta nova revisão, o IPSS-R permaneceu possuindo como variáveis clínicas laboratoriais para auxiliar no 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 – Variáveis para 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 (x10³/mm³)	≥100	50-100	<50	-	-	-	-
Neutrófilos (x10³/mm³)	≥0.8	<0.8	-	-	-	-	-
	Estratificação de risco						
	Muito baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Muito Alto		
Escores Sobrevida (anos)	≤1.5	>1.5 - 3	>3 - 4.5	>4.5-6	>6		
Média de tempo de evolução para LMA, 25%, ano	8.8	5.3	3.0	1.6	0.8		
	-	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).

1.5 Sobrecarga de ferro na SMD

O ferro é um metal essencial na síntese da hemoglobina, em reações de oxi-redução e na proliferação celular. (KOGHO et al., 2008). A quantidade total de ferro corporal é aproximadamente 3-4 g, sendo que dois terços da quantidade de ferro fazem parte da composição dos eritrócitos e a quantidade restante é armazenada sob forma de ferritina intracelular. (KOGHO et al., 2008; MITCHELL et al., 2013) Somente 1-2 mg de ferro são

absorvidos pelo trato gastrointestinal e encontram-se circulando no sangue (KOGHO *et al.*, 2008).

A anemia resulta em dependência transfusional na maioria dos pacientes (MITCHELL *et al.*, 2013; SHENOY *et al.*, 2014; TSANG *et al.*, 2016). Cada unidade de concentrado de hemácias (CH) contém 200 a 250mg de ferro (SHENOY *et al.*, 2014; CARREAU *et al.*, 2016). Como o organismo não dispõe de um mecanismo fisiológico de eliminação do excesso de ferro, a dependência transfusional resulta em sobrecarga de ferro (TSANG *et al.*, 2016).

A SF (Sobrecarga de ferro) na SMD é, portanto, decorrente de múltiplas transfusões e é agravada pela presença de eritropoese ineficaz. (KOGHO *et al.*, 2008; MITCHELL *et al.*, 2013) A partir de cerca de 20 unidades de CH transfundidos observa-se excesso de ferro e toxicidade pela geração de espécies reativas de oxigênio em órgãos-alvo como coração, fígado e pâncreas (KOGHO *et al.*, 2008; BADAWI *et al.*, 2010; CUI R, et al 2014; REMACHA *et al.*, 2015). É importante salientar que essa dependência transfusional pode aumentar a susceptibilidade a infecções e hemorragias (GREENBERG *et al.*, 1997; MALCOVATI *et al.*, 2011; GREENBERG *et al.*, 2012; GREENBERG *et al.*, 2013).

Os níveis séricos de ferritina são usados frequentemente para avaliar a sobrecarga de ferro (JACOBS A, BEAMISH MR, ALLISON M; 1972; JACOBS A, MILLER F; 1972). É um teste simples e de baixo custo, porém deve ser interpretado com cautela tendo em vista que é um reagente de fase aguda, portanto também elevado em doenças inflamatórias e infecciosas (MITCHELL *et al.*, 2013). Assume-se o valor de ferritina sérica superior a 1.000ng/mL para definir a sobrecarga de ferro transfusional.

De acordo com dados relatados por Shenoy *et al.*, 2014, pacientes com sobrecarga de ferro menor que 500 ng/mL têm uma maior expectativa de vida do que pacientes com sobrecarga de ferro maior que 500ng/mL (118,8 versus 10,2 meses) e, conseqüentemente, apresentam um menor risco de evolução para leucemia mielóide aguda (LMA).

A sobrecarga de ferro em pacientes com SMD de baixo risco foi repetidamente associada a mau prognóstico e posteriormente incorporada a outros escores prognósticos (MALCOVATI *et al.*, 2005; MALCOVATI *et al.* 2006; MITCHELL *et al.*, 2013; CARREAU *et al.* 2016).

1.6 Interleucina – 8 (IL – 8)

As quimiocinas são formadas por um grupo de citocinas, geralmente de baixo peso molecular, variando entre 7 e 12kDa e com média de 75 aminoácidos de comprimento (GUERREIRO, 2011; PALOMINO, 2015). Algumas quimiocinas são consideradas pró-inflamatórias e sua liberação é regulada durante uma resposta imune em um sítio de infecção, enquanto outras são consideradas homeostáticas e estão envolvidas no controle da migração celular durante o desenvolvimento ou a manutenção dos tecidos. A sua especificidade está relacionada com seu mecanismo de ação. Os membros da família das quimiocinas induzem ao recrutamento de subtipos bem definidos de leucócitos (PALOMINO, 2015).

Há quatro famílias de citocinas com base no primeiro resíduo de cisteína; a primeira família é chamada de quimiocinas CC, também conhecidas como beta-quimiocinas. Os genes que codificam as quimiocinas CC estão localizados no cromossomo 17 (GUERREIRO *et al.*, 2011; PALOMINO *et al.*, 2015). As quimiocinas CC estimulam principalmente os monócitos, mas também os basófilos, eosinófilos, linfócitos-T e as células *natural killer* (NK) (PALOMINO *et al.*, 2015). Existe também a família CX3C com um único membro que é a fractalcina ou neurotactina sendo esta, quimiotática para as células mononucleadas do sangue periférico (GUERREIRO *et al.*, 2011). A outra é chamada de família C, sendo representada pela linfotactina, estimulando a quimiotaxia nos linfócitos (GUERREIRO *et al.*, 2011). Porém, a sua atividade está ligada às células efectoras (células NK e linfócitos T CD8+) e aos linfócitos T-*helper* (linfócitos T CD4+), podendo ter alguma ação na inibição de tumores. (KOCH *et al.*, 1992; GUERREIRO *et al.*, 2011).

Por fim, a família das quimiocinas CXC (Tabela 5), conhecidas como as alfa-quimiocinas, que são caracterizadas por um aminoácido, chamado X, localizado entre as duas primeiras cisteínas (SINGH *et al.*, 2013). Essas quimiocinas, que estimulam principalmente a quimiotaxia de neutrófilos, contêm uma sequência de aminoácidos Glu-Leu-Arg (Glutamato-Leucina-Arginina) na posição N-terminal, sendo essencial para a ligação de receptores (SINGH *et al.*, 2013; PALOMINO *et al.*, 2015). Dentre as 20 quimiocinas descritas na literatura, destacamos o papel imunológico da IL8 em pacientes com SMD.

Tabela 5. Quimiocinas: CXC, receptores e função imunológica

Quimiocina	Outros nomes	Receptor	Função imunológica
CXCL1	GRO α	CXCR2	Recrutamento de neutrófilos
CXCL2	GRO β	CXCR2	Recrutamento de neutrófilos
CXCL3	GRO γ	CXCR2	Recrutamento de neutrófilos
CXCL4	PF4	?	Pró-coagulante
CXCL5	ENA78	CXCR2	Recrutamento de neutrófilos
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	Recrutamento de neutrófilos
CXCL7	NAP-2	CXCR2	Recrutamento de neutrófilos
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	Recrutamento de neutrófilos
CXCL9	MIG	CXCR3	Resposta Th1, tráfego de Th1, CD8 e NK
CXCL10	IP-10	CXCR3	Resposta Th1, tráfego de Th1, CD8 e NK
CXCL11	I-TAC	CXCR3	Resposta Th1, tráfego de Th1, CD8 e NK
CXCL12	SDF-1	CXCR4	Homing (endereçamento) para medula óssea
CXCL13	BLC	CXCR5	Posicionamento de célula B e Tfh no linfonodo
CXCL14	BRAK	?	Homing (endereçamento) de macrófago para a pele
CXCL15	Lungkin	?	?
CXCL16	5R-PSOX	CXCR6	Migração e sobrevivência de NKT e ILC
CXCL17	DMC	?	?
XCL1	SCM-1 α	XCR1	Apresentação cruzada por CD8+ DC
XCL2	SCM-1 β	XCR2	Apresentação cruzada por CD8+ DC
CX3CL1	Fractalquina	CX3CR1	Migração de NK, monócito e célula T

Fonte: Adaptado de Palomino & Marti (2015) e Murphy *et al.*, (2000).

A IL – 8, chamada também de CXCL8, é uma quimiocina pró-inflamatória originalmente identificada como quimioatratante de neutrófilos (WAUGH *et al.*, 2008; CAMPBELL *et al.*, 2013). A IL-8 é usada como marcador para várias condições clínicas. Destaca-se seu mecanismo de ação em condições patogênicas de muitas doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide assim como em ações de angiogênese, promoção e progressão de tumores (WAUGH *et al.*, 2008; SHAHZAD *et al.*, 2010; TODOROVIC-RAKOVIĆ *et al.*, 2013; CAMPBELL *et al.*, 2013). Sua produção é regulada pelo polimorfismo de genes de regiões promotoras (ZHANG M.; FANG T. *et al.*, 2016).

A ativação de IL-8 dá-se por meio de sinais inflamatórios como TNF- α , espécies reativas de oxigênio, hormônios e também como resultado de um microambiente tumoral através da hipóxia, acidose, quimioterapias citotóxicas e radiações (CAMPBELL *et al.*, 2013). A IL-8 pode existir em sua forma monomérica ou dimérica, tendo a capacidade de diferenciação e regulação de seus dois receptores de superfície (CAMPBELL *et al.*, 2013). Ele passa por uma clivagem proteolítica do amino-terminal, resultando em vários produtos diferentes. Sendo assim, tem-se a IL-8 como um potente quimiotático para os neutrófilos (SHAHZAD *et al.*, 2010).

A IL-8 regula seus efeitos através da ligação de dois receptores acoplados à proteína G, CXCR1 e CXCR2 (FUHLER *et al.*, 2005). Esses receptores geralmente são encontrados na membrana de células como os neutrófilos, basófilos, monócitos, linfócitos T e células endoteliais. Porém, CXCR1 e CXCR2 também são encontrados nas membranas de células tumorais (TODOROVIĆ-RAKOVIĆ *et al.*, 2013; CAMPBELL *et al.*, 2013). A IL-8 tem uma maior especificidade com o ligante CXCR1 (TODOROVIĆ-RAKOVIĆ *et al.*, 2013). Long e colaboradores (2016) demonstraram o potencial dos antagonistas para as moléculas de CXCR1 e CXCR2 na terapia do câncer.

A figura 3 representa esquematicamente o mecanismo de ação da IL8 na patogênese inflamatória do câncer (CAMPBELL *et al.*, 2013). Mostrando que a IL-8 ativa as células endoteliais da vasculatura do tumor para promover angiogênese e induzir uma infiltração quimiotática de neutrófilos para o local do tumor. Embora a IL-8 possa promover a invasão celular e migração, a capacidade de IL-8 para induzir macrófagos associados a tumores que segregam fatores de crescimento adicionais vai aumentar ainda mais a taxa de proliferação celular e a invasão de células malignas no local do tumor (CAMPBELL *et al.*, 2013). Os múltiplos efeitos da IL-8 de sinalização sobre diferentes tipos de células presentes no microambiente do tumor sugere que a IL-8 pode ter implicações importantes na progressão da doença e auxiliar na sensibilização de tumores à quimioterapêutico e agentes biológicos (CAMPBELL *et al.*, 2013).

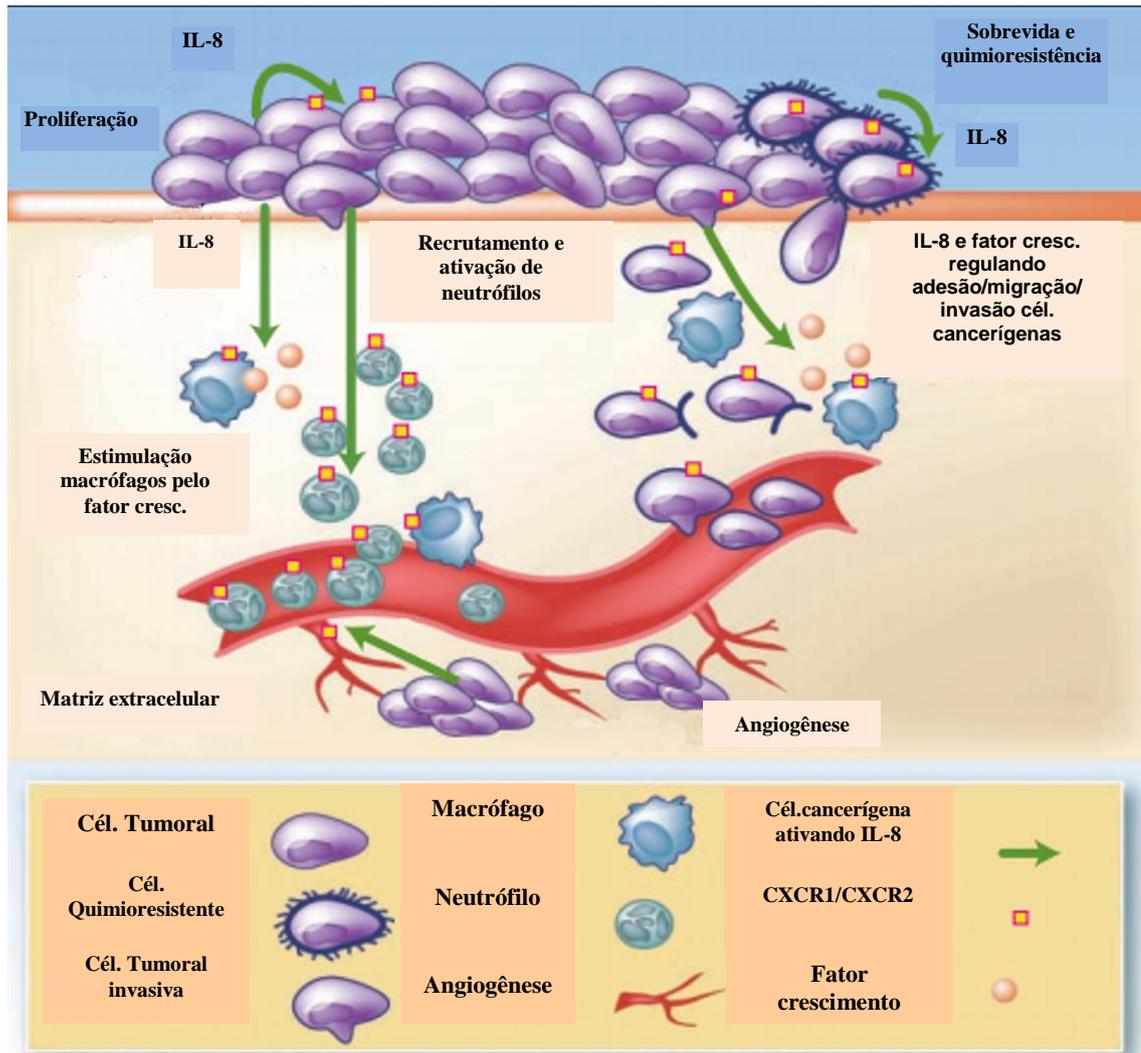


Figura 3: O papel da IL-8 no desenvolvimento do tumor . Adaptado de David J.J.Waugh et al., 2008.

Singh *et al.*, 2013 relataram que a associação entre a inflamação e o câncer é bem estabelecida e há uma expressão desregulada de inúmeras citocinas, incluindo a IL-8. Devido ao fato de que diversos sinais são induzidos por receptores de IL-8, comprova-se assim seu complexo papel nas condições fisiológicas e na progressão do câncer (LONG *et. al.*, 2016).

1.7 Fator de Tanscrição Nuclear NFκ-B

Descoberto em 1986 por Sem e Baltimore, o NF-κB é um fator nuclear que interage com 11 pares de base na cadeia leve da imunoglobulina kappa de células B ativadas (AGGARWAL 2004; GILMORE 2006; HOESEL *et al.*, 2013). Contudo, o NF-κB foi descrito como uma proteína reguladora que está envolvida no controle de inúmeros processos

celulares pela regulação da expressão gênica, de enzimas e citocinas, gerando respostas inflamatórias, processos de desenvolvimento, crescimento celular e apoptose (VAN DEN BERG *et al.*, 2001; CILLONI *et al.*, 2006; LOUNNAS *et al.*, 2009). (Figura 4) Além disso, este fator de transcrição está ativamente envolvido em doenças como o câncer, artrite, doença cardiovascular, diabetes, inflamação crônica, asma, e AIDS (GILMORE 1999; TAK *et al.*, 2001; BLANCO *et al.*, 2003; CARLSEN *et al.*, 2004).

A família do fator de transcrição NF- κ B, também conhecida como *Rel proteins*, é composta por dois grupos de proteínas diferindo entre si pela estrutura, função e síntese (THANOS *et al.*, 1995; TAK *et al.*, 2001; AHN *et al.*, 2007; UWE *et al.*, 2008). Um grupo, formado pelas proteínas p105 e p100 que não tem atividade transcricional, mas ao serem transformadas proteoliticamente gerando as formas ativas p50 e p52, respectivamente, tornam-se aptas a exercerem a transcrição (GILMORE 2006; HOESEL *et al.*, 2013). O outro grupo de proteínas que não é sintetizada como precursora, inclui a c-Rel (Rel), RelB, e RelA (p65), que além de apresentarem o domínio *Rel Homology* (RH) possuem o domínio *Transcriptional Activation Domains* (TAD). Esses domínios que medeiam a interação com os inibidores específicos, translocação para núcleo formando homo e heterodímeros, promovendo assim a transcrição gênica (THANOS *et al.*, 1995; PRIGENT *et al.*, 2000; LI; STARK 2002).

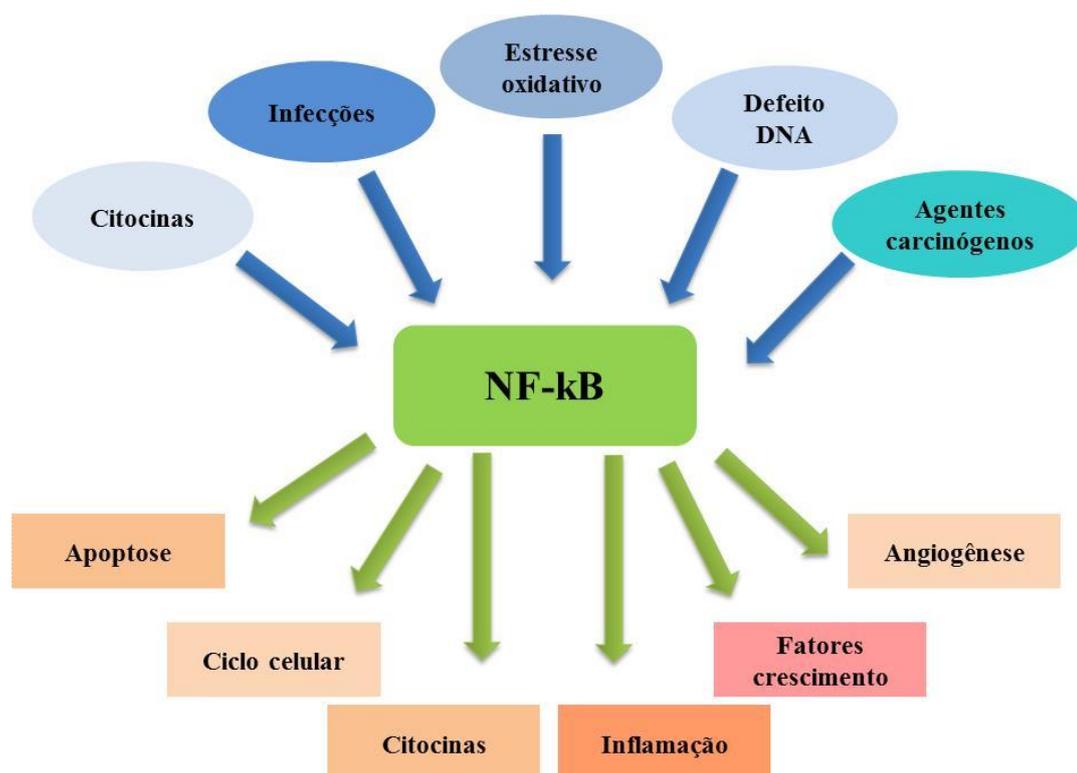


Figura 4: Indutores da ativação do NF-kB e os genes regulados pela ativação do NF-kB. Adaptado de Aggarwal, 2004.

O NF-kB encontra-se no citoplasma em sua forma inativa através da ligação com uma proteína inibitória IκB. A família IκB é composta por oito membros: IκBα, IκBβ, IκBε, IκBξ, bcl-3, IκBNS, p100, e p105. A formação do complexo NF-kB/IκB impede a sua entrada no núcleo e sua ligação a regiões específicas dos genes-alvo, evitando assim a transcrição gênica e tradução de proteínas (GILMORE 1999; GLEZER *et al.*, 2000; GILMORE 2006). O processo de ativação do NF-kB dá-se, inicialmente, por diversos estímulos extracelulares, tais como: neurotransmissores, neurotrofinas, citocinas (IL-1, IL-2; IL-8, IL-12; IL-17; IL-18, Fator Necrose tumoral - TNF), endotoxinas (lipopolissacarídeos – LPS), agentes carcinógenos (DMBA – 7,12 dimetilbenzenoantraceno), agentes quimioterapêuticos, irradiação ultravioleta, estresse (GLEZER *et al.*, 2000; PRIGENT *et al.*, 2000; CAAMAÑO *et al.*, 2002; AGGARWAL 2004; AHN *et al.*, 2007; UWE *et al.*, 2008; HOESEL *et al.*, 2013).

A figura 5 representa os componentes das vias de ativação do NF-kB. A família de proteínas é constituída de 5 membros: p65 (RelA), RelB, c-Rel (Rel), e o precursor de proteínas p100 (NF-kB2) e p105 (NF-kB1), a última dando origem a p52 e p50, respectivamente (VALLABHAPURAPU *et al.*, 2009; HAYDEN *et al.*, 2012). Já a família

das proteínas inibitórias I κ B's consiste de 8 membros: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B ζ , bcl-3, I κ BNS, p100, e p105. O complexo das proteínas quinase IKK é formado por IKK α (IKK1 or CHUK), IKK β (IKK2), e NEMO (IKK γ). (VALLABHAPURAPU *et al.*, 2009; HAYDEN *et al.*, 2012)

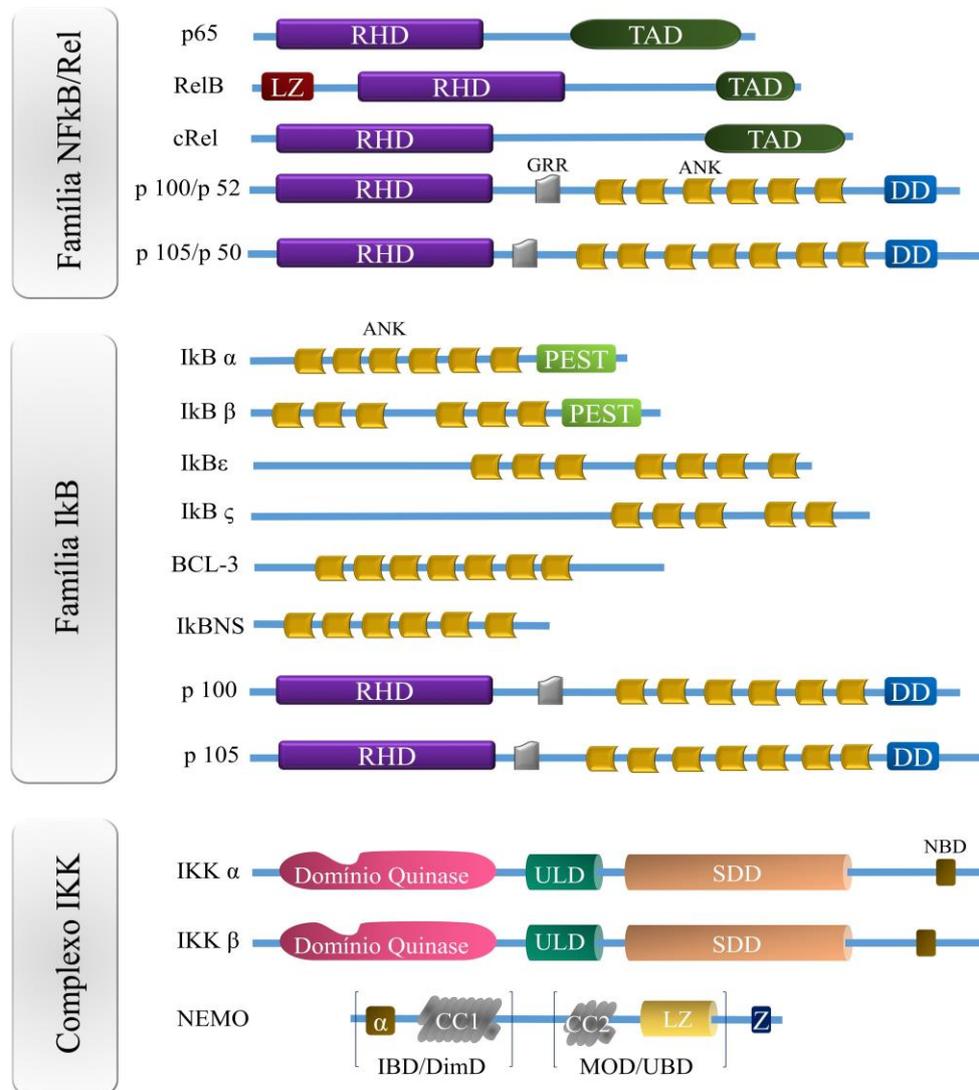


Figura 5: Componentes da via ativação do NF- κ B. Adaptado de HAYDEN, 2012.

A ativação do Nf- κ B e o processo inflamatório são mecanismos que possuem um duplo papel na patogênese do câncer. O papel do NF- κ B na patogênese de diversos tipos de câncer, inclusive na SMD é descrito por vários autores (MESSA, 2010; BRAUN, 2006).

A ativação do NF- κ B ocorre geralmente por duas vias, a via canônica (clássica) ou a via não – canônica (alternativa) (GILMORE 2006). A figura 6 ilustra as vias de ativação do NF- κ B.

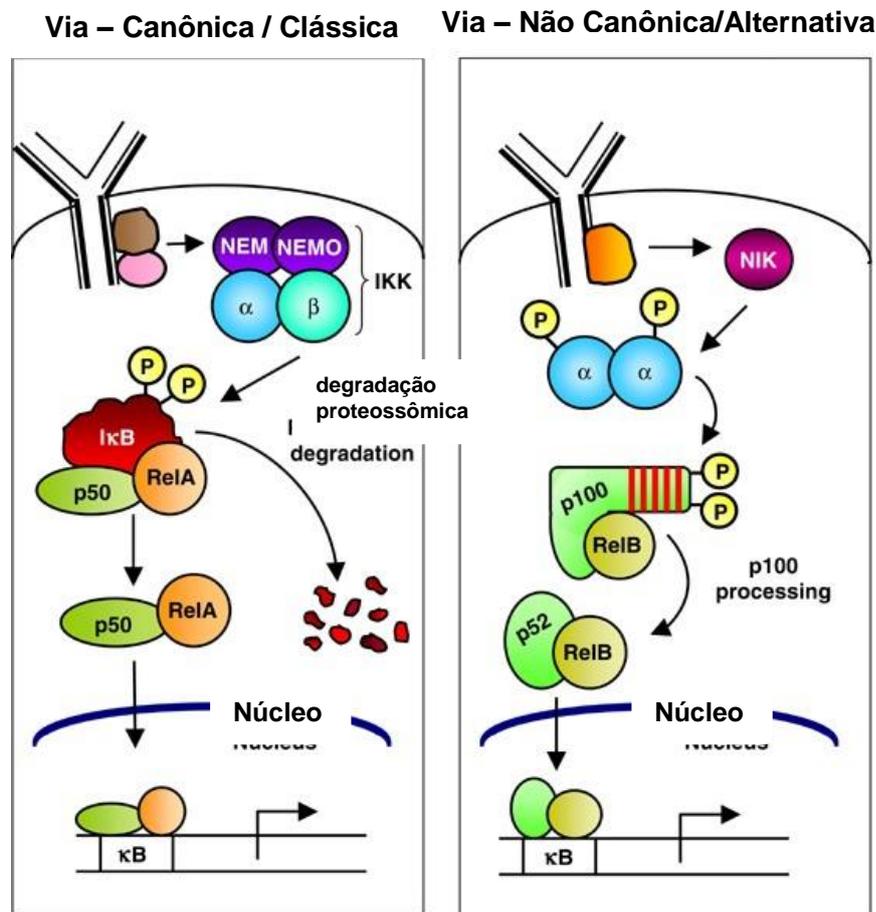


Figura 6: Vias de Ativação do NF-κB. Adaptado de GILMORE 2006.

A via clássica é a mais comum e está associada à expressão de genes relacionados à inflamação, à resposta imunológica inata, à anti-apoptose e à sobrevivência celular. Já a via alternativa está associada à expressão de genes que atuam no desenvolvimento e manutenção de órgãos linfóides secundários (linfonodos, baço, tonsilas e placas de Peyer) (HOESEL *et al.*, 2013). Para que as proteínas do NF-κB liguem-se ao DNA, estas precisam ser submetidas ao processo de translocação para o núcleo. Para isto, faz-se necessário que uma molécula de serinotreonino-quinase específica, chamada de IκB quinase (IKK) realize a fosforilação da proteína inibitória IκB a qual está firmemente ligada aos dímeros de NF-κB, mantendo-os inativos (CHANG *et al.*, 2003; DOLCET *et al.*, 2005; BEN-NERIAH *et al.*, 2011). Vale ressaltar que após a fosforilação, as proteínas IκB sofrem um processo chamado de ubiquitinação e, posteriormente, a molécula passará por uma degradação proteossomal. Conseqüentemente, após a degradação, há um sinal indutor de localização nuclear,

translocando assim, dímero do NF-kB para o núcleo, ligando-se à região promotora de genes que contêm sítios kB (SCHWARTZ *et al.*, 1999).

Mesmo que não estejam completamente definidos as vias de ativação da IKK, que é composta por um complexo de proteínas IKK $\alpha\beta\gamma$, sabe-se que esta molécula é fundamental para a ativação de NF-kB. Da família das IKK, a proteína IKK β é mais prevalente na fosforilação das I κ B (DOLCET *et al.*, 2005).

1.8 Relação entre IL-8 e NF-kB na SMD

A hematopoese na SMD é caracterizada pela excessiva apoptose dos precursores hematopoéticos, resultando em citopenias periféricas (BANERJEE *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015). A apoptose juntamente com a desregulação do sistema imune representam um importante mediador da evolução patogênica da SMD (CHEN *et al.*, 2013).

A relação entre IL-8 e NF-kB tem sido, ultimamente, alvo de estudo por desempenharem um importante papel na patogênese da SMD. Vários autores estudaram a expressão de de inúmeras citocinas em pacientes com SMD, incluindo a IL-8 (CAAMAÑO, 2002, KORNBLAU, 2010; SCHINKE, 2015).

São vários os estímulos que induzem a produção de IL-8 e que, conseqüentemente, ativam inúmeras proteínas quinases (IKK) sendo esta, a principal via de ativação do fator de transcrição NF-kB (GILMORE 2006). Porém, a ativação do NF-kB também pode promover a transcrição do gene IL-8 (CAMPBELL *et al.*, 2013). A figura 7 demonstra os mecanismos envolvidos na ativação do NF-kB pela IL-8.

Portanto, estudos mais aprofundados sobre os mecanismos que envolvem IL-8 e NF-kB na SMD são necessários, para melhor compreensão sobre a patogênese e identificação de possíveis novos alvos terapêuticos.

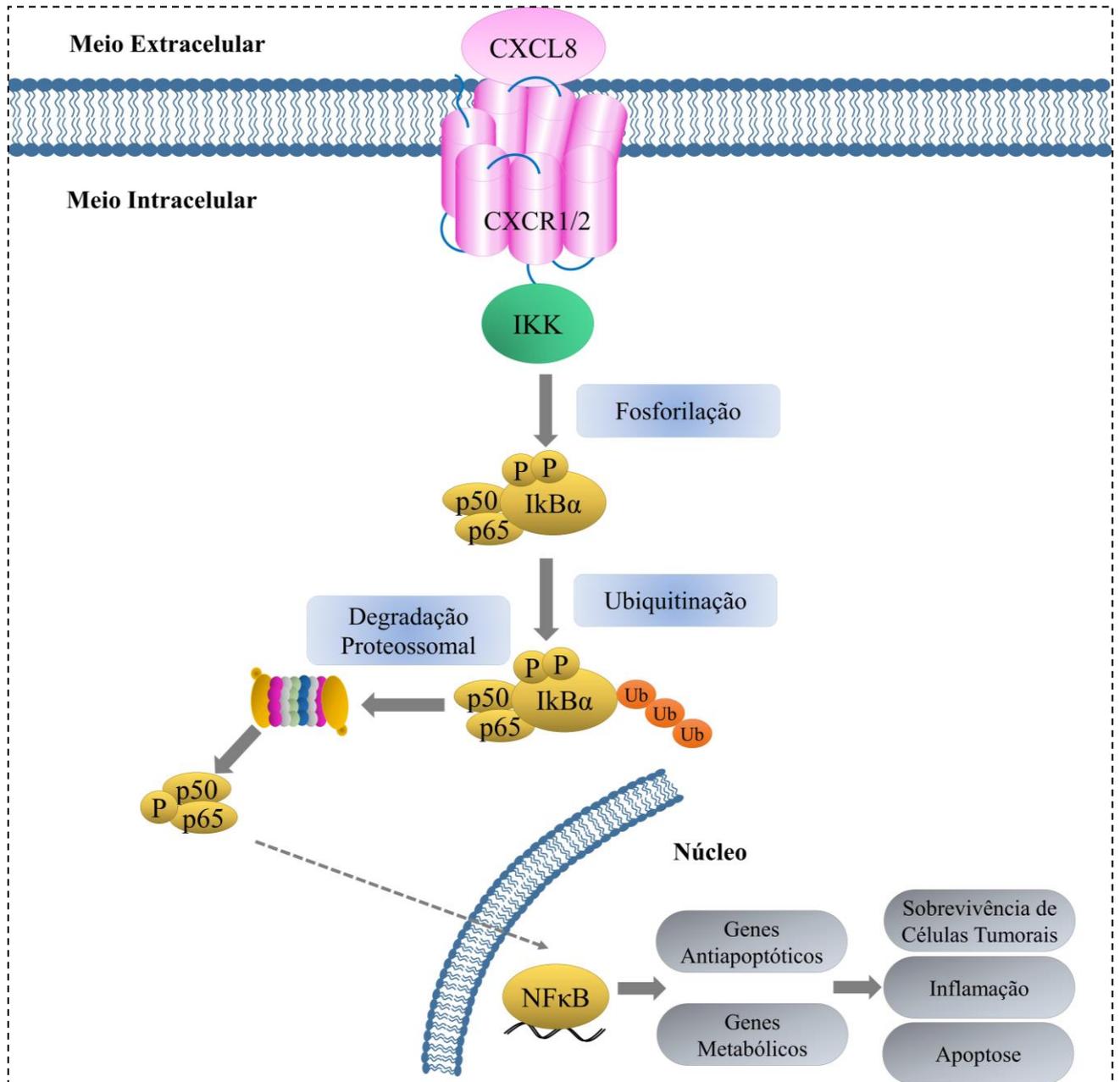


Figura 7: Diagrama esquemático ilustrando expressão de genes associados com a regulação da apoptose e metabolismo celular através da ativação NF-κB pela IL-8. Adaptado de Campbell et al., 2013.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o nível de ativação do NF-kB e IL – 8 em pacientes com Síndrome Mielodisplásica e testar associação com variáveis clínico-laboratoriais.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar características clínico-laboratoriais de pacientes portadores de SMD;
2. Determinar a concentração de IL-8 nos pacientes analisados;
3. Determinar a ativação de NF-kB nos pacientes analisados;
4. Testar a associação destas variáveis com aspectos clínico-laboratoriais
5. Comparar os níveis de NF-kB e IL – 8 em pacientes de SMD com e sem sobrecarga de ferro;
6. Correlacionar os níveis de IL-8 versus NF-kB nesses pacientes

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Trata-se de um estudo observacional transversal realizado no período de 2014 a 2016 que incluiu pacientes adultos com diagnóstico confirmado de SMD acompanhados no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e indivíduos voluntários sadios como grupo controle.

3.2. Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Walter Cantídio, através do sistema da Plataforma Brasil (Número do processo: 1.233.743). (ANEXO A)

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.

3.3. Critérios de inclusão

Pacientes com SMD

Foram incluídos pacientes com diagnóstico confirmado de SMD, acompanhados em ambulatório especializado de SMD no HUWC que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentado no APÊNDICE A.

Grupo controle

Foram incluídos indivíduos saudáveis na faixa etária acima de 45 anos, saudáveis que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa e assinaram o TCLE.

3.4. Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo pacientes com diagnóstico de SMD secundária.

3.5. Coleta e processamento de amostras

3.5.1 Coleta de amostras

Foram coletados de cada indivíduo três tubos de 5 mL de sangue periférico, sendo dois deles tubo Vacutainer contendo EDTA (1,8mg/mL) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e um com gel separador. Após a coleta, as amostras foram mantidas sob refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Citogenômica do Câncer e Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas, ambos da Universidade Federal do Ceará, onde foram processadas. A figura 8 é uma representação dos procedimentos da dosagem de IL-8 e da ativação do NF-kB.

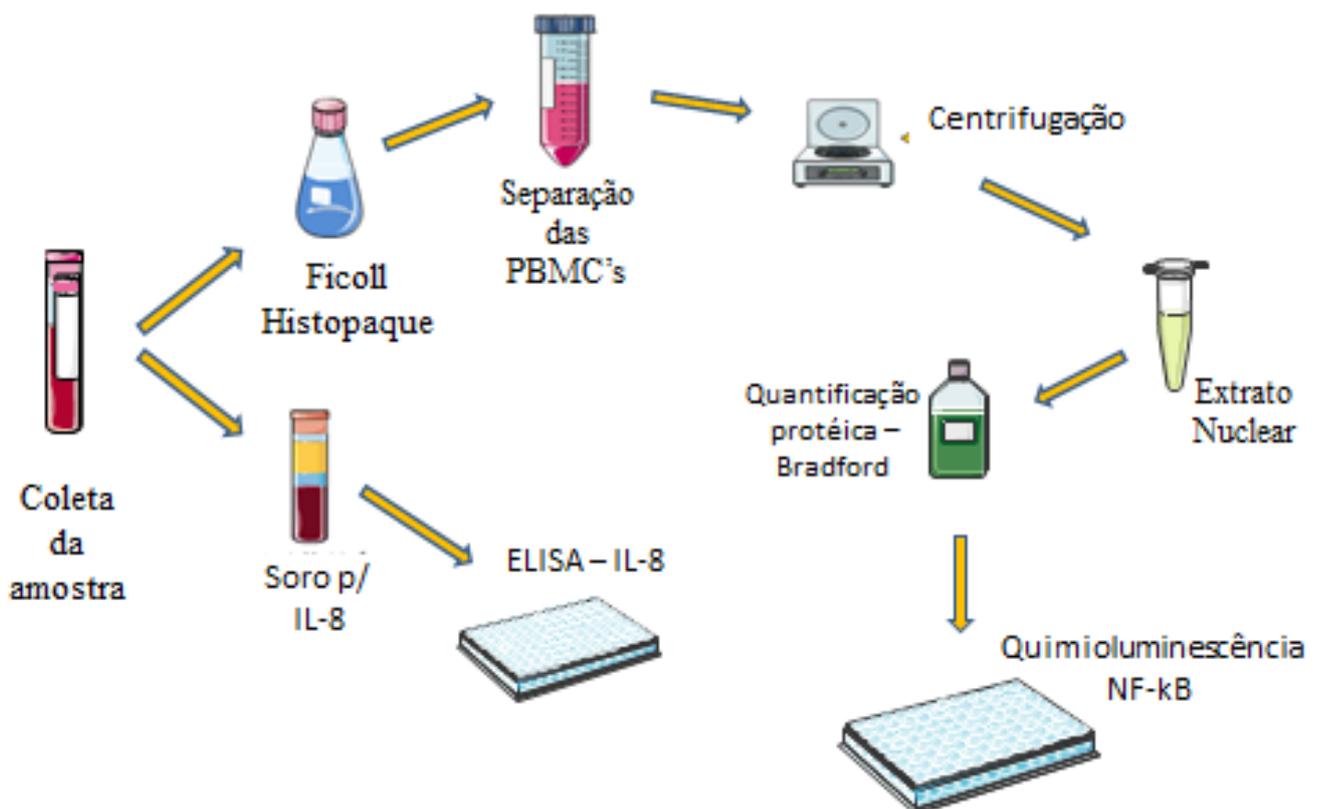


Figura 8: Representação esquemática dos procedimentos da dosagem de IL-8 e a análise da ativação do NF-kB.

3.5.2 Determinação de IL – 8 por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para a determinação de IL-8 por ELISA o soro foi obtido por meio da coleta em tubo vacutainer contendo gel separador. Após a coleta as amostras foram centrifugadas a 3200 rpm por 10 minutos, aliquotadas e armazenadas a -80°C até a realização do teste.

Teste ELISA

As amostras de soro foram descongeladas até atingirem temperatura ambiente. Para a determinação da IL-8 foi utilizado o kit BD OptEIA e o teste foi realizado de acordo com as normas empregadas pelo fabricante. A representação esquemática encontra-se na Figura 9. Foi utilizada placa de poliestireno com 96 poços, a qual foi sensibilizada *overnight* a 4°C com anticorpo de captura monoclonal anti- IL-8, diluído em PBS (*Phosphate – Bufferid saline*). Após esse período os poços foram lavados 3 vezes com $300\mu\text{L}$ do tampão de lavagem e secas vertendo em papel absorvente.

Posteriormente for realizado o bloqueio da placa por meio de adição $200\mu\text{L}$, em cada poço, de diluente de ensaio, seguido de incubação à temperatura ambiente por 1 hora. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito anteriormente.

O padrão de IL-8 foi preparado por meio de diluições seriadas nas concentrações de $200\mu\text{L}$, $100\mu\text{L}$, $50\mu\text{L}$, $25\mu\text{L}$, $12,5\mu\text{L}$, $6,3\mu\text{L}$ e $3,1\mu\text{L}$ para obtenção da curva de calibração.

Foram adicionados a diferentes poços da placa $100\mu\text{L}$ de cada concentração do padrão, do soro dos pacientes e grupo controle e incubados por 2h à temperatura ambiente. Após este período, foram realizadas 5 lavagens e em seguida adicionados $100\mu\text{L}$ do anticorpo de detecção com SA_v-HRP (Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate). A placa foi selada e incubada por 1h à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi novamente aspirada e lavada por 7 vezes com intervalo de 30 a 60 segundos entre uma lavagem e outra.

Em seguida, foram adicionados $100\mu\text{L}$ do substrato enzimático, constituído por soluções estabilizadoras de peróxido de hidrogênio e de tetrametilbenzidina (TMB). A placa foi incubada no escuro à temperatura ambiente por 30 min e então adicionaram-se $50\mu\text{L}$ de solução de parada a cada poço. A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA utilizando filtro de comprimento de onda igual a 450 nm .

ELISA - IL-8

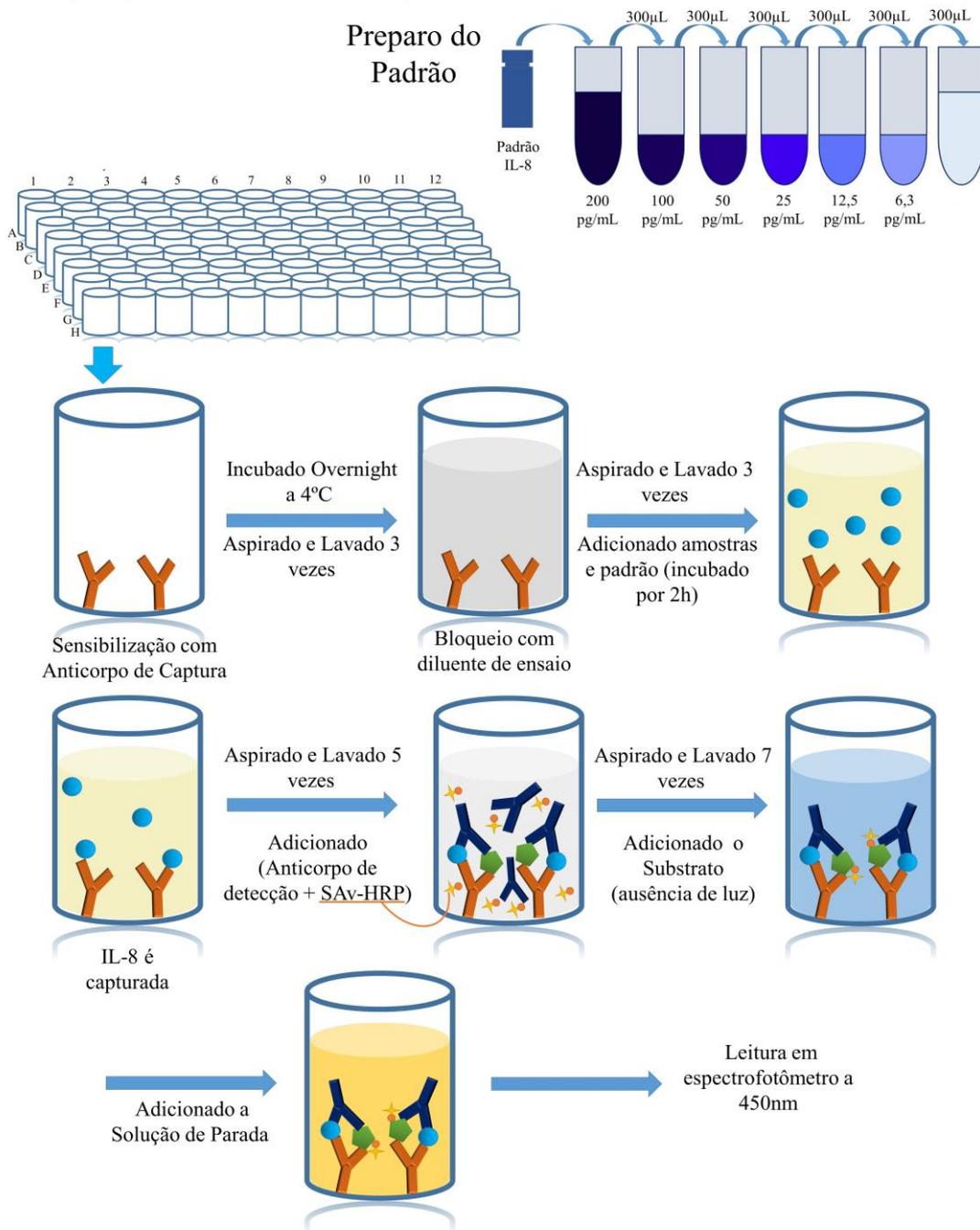


Figura 9: Representação esquemática dos procedimentos da dosagem de IL - 8.

3.5.3 Determinação NF-kB

Para a **separação das células mononucleares**, foram utilizados os 10mL de sangue venoso periférico coletados em tubo vacutainer contendo EDTA. A fração mononuclear foi isolada por centrifugação através da diferença de gradiente de densidade utilizando o Ficoll-Histopaque (d=1,077) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

A adição de tampão PBS 1X às amostras foi realizada de forma lenta e seguida da adição de 3mL de Histopaque em tubos Falcon de 15mL, a fim de não ocorrer a sedimentação. As amostras foram centrifugadas em uma rotação de 400xg durante 30min em temperatura ambiente para evitar a aglutinação e conseqüente baixa qualidade da amostra que podem ocorrer em baixas temperaturas.

Após a centrifugação, obteve-se o anel de células mononucleares localizado na interface do Ficoll-Histopaque e plasma sanguíneo. O anel de células foi coletado com auxílio de pipeta Pasteur, submetido a três lavagens com solução salina 0,9% estéril e o *pellet* obtido foi ressuspensão em salina 0,9%. As células foram então submetidas à extração nuclear.

A **extração nuclear** foi realizada a partir da utilização do kit da Active Motif® (Carlsbad, Califórnia 92008, USA) conforme protocolo do fabricante. As células mononucleares obtidas permaneceram incubadas no gelo enquanto preparavam-se os reagentes. Foram adicionados às células 3mL Inibidor de Fosfatase, em seguida centrifugadas por 5 minutos numa rotação de 200xg e à uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com 250µL tampão hipotônico 1x. As amostras permaneceram no gelo por 15 minutos. Foram adicionados às amostras, 25µL de detergente e estas agitadas no vortex. As amostras foram centrifugadas numa rotação de 14000 rpm durante 1 minuto em uma temperatura de 4°C. O sobrenadante (fração citoplasmática) foi descartado e o pellet foi ressuspensão com 25µL tampão Lysis. As amostras permaneceram incubadas no gelo por 30 minutos em uma placa agitadora a 150rpm.

Logo após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos em uma rotação de 14000 rpm. A fração nuclear obtida é o sobrenadante, sendo posteriormente transferido para um Eppendorf pré- refrigerado e congelado a -80°C. A concentração proteica foi dosado pelo método de Bradford (BRADFORD 1976).

Para a determinação da **ativação do NF-kB** foi utilizado o teste de quimioluminescência, através do kit Active Motif® TransAM NFkB Chemi p65/p50/p52 e de

acordo com as normas recomendadas pelo fabricante. A figura 10 representa esquematicamente esse teste.

As amostras de fração nuclear foram descongeladas no gelo enquanto os reagentes foram preparados, a fim de evitar a perda da atividade proteica. Uma placa já sensibilizada pelo fabricante foi utilizada para a realização do experimento. Nesta placa foram adicionados 30 μ L do tampão completo *Binding* para cada poço a ser usado. A placa foi utilizada para determinação das amostras, realizar o branco e controle positivo. Para as amostras foram adicionados 20 μ L da amostra diluída no Tampão Lysis Completo por poço. Foram utilizados 2 μ L de extrato nuclear diluído no tampão Lysis completo, conforme protocolo do fabricante. Para o controle positivo foram adicionados 1,25 μ g de extrato nuclear Jurkat diluídos em 20 μ L tampão Lysis completo por poço. Para o branco foram utilizados 20 μ L do Tampão Lysis completo para cada poço. A placa foi selada com papel adesivo fornecido pelo próprio kit e incubada por 1h em temperatura ambiente em placa agitadora (100rpm). Após a incubação, a placa foi lavada 3x com 200 μ L tampão de lavagem 1X em cada poço. Ao final de cada lavagem, a placa foi invertida e secada com leves batidas com objetivo de esvaziar completamente os poços.

Em seguida foram adicionados à placa 50 μ L de anticorpo NF-kB diluído (1:1000 diluído em 1X tampão anticorpo) para cada poço utilizado, incluindo os brancos. Após esse procedimento, a placa foi novamente coberta e incubada por 1h em temperatura ambiente sem agitação. Após a incubação, a placa foi lavada novamente 3x com 200 μ L tampão lavagem 1X. Ao final de cada lavagem, a placa foi invertida e secada com leves batidas com objetivo de esvaziar completamente os poços. Em seguida, foram adicionados 50 μ L anticorpo conjugado HRP diluídos (1:10000 diluído em tampão binding anticorpo 1X) para todos poços a serem utilizados. A placa foi coberta com papel adesivo e incubada por 1h em temperatura ambiente sem agitação. Durante a incubação, foi adicionada a Solução Developing em temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada 4x com 200 μ L tampão lavagem 1X. Ao final de cada lavagem, a placa foi invertida e secada com leves batidas com objetivo de esvaziar completamente os poços.

Após a lavagem, foram adicionados 50 μ L de solução quimioluminescente, em temperatura ambiente, para todos os poços. Evitou-se a exposição à luz. A leitura da placa foi realizada logo em seguida em espectrofotômetro com detector quimioluminescente.

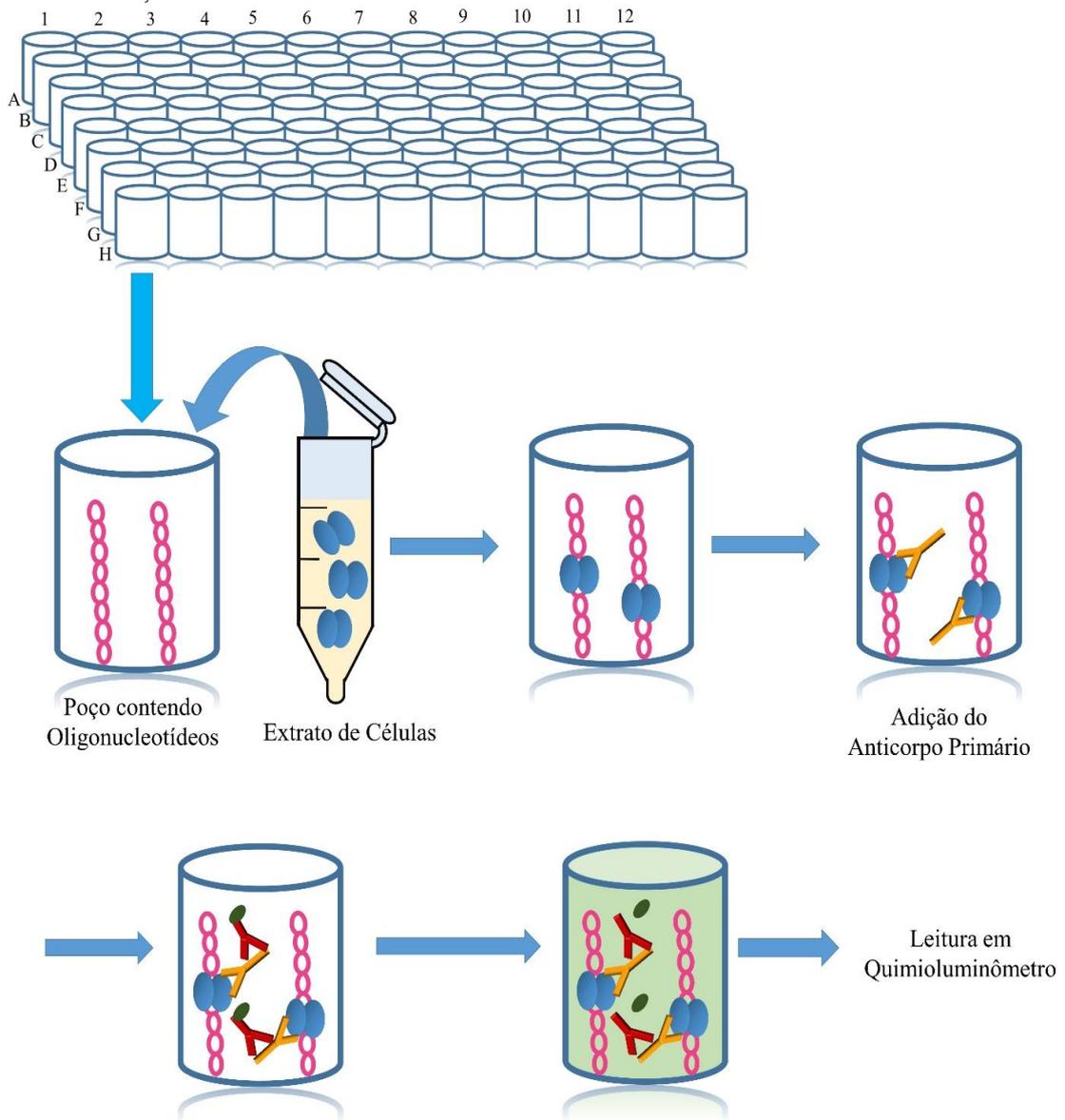


Figura 10: Representação esquemática dos procedimentos da análise da ativação do NF- κ B.

3.6 Variáveis analisadas

As variáveis analisadas neste estudo foram assim subdivididas:

- Sexo: masculino e feminino;
- Idade (categorizada de acordo com o IPSS-R): <75 anos e ≥75 anos;
- Classificação OMS (2008)
- Celularidade da medula óssea: hipocelular, normocelular ou hiperclular;
- Níveis séricos de ferritina: <500ng/mL e ≥500ng/mL
- Percentual de blastos: <5% (normal) e ≥5% (excesso de blastos).
- Sobrecarga de ferro: sim ou não;
- Cariótipo: normal ou alterado;
- Concentração de hemoglobina (Hb) de acordo com o IPSS-R: >10g/dL, 8-≤10g/dL e ≤8g/dL;
- Contagem de neutrófilos de acordo com o IPSS-R: ≥800/mm³ e <800/mm³;
- Contagem de plaquetas de acordo com o IPSS-R: ≥100.000/ mm³, ≥50.000 - <100.000/ mm³ e <50.000 /mm³;
- Número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS-R: 1 citopenia, 2 citopenias e 3 citopenias;
- Grupo de risco de acordo com o IPSS-R: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- Grupo de risco de acordo com o IPSS-R (categorizado): muito baixo e baixo versus intermediário, alto e muito alto;

3.7 Análises Estatísticas

Os níveis de IL8 e a quantificação de NF-kB foram expressos como mediana e variação (mínimo e máximo). O teste Many-Whitney foi utilizado para analisar a influência de IL8 e NFkB nas variáveis clínico-patológicas avaliadas. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para obtenção dos valores de r-quadrado (r²). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5 (software GraphPad Prism, La Jolla, CA, EUA) e SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) O nível de probabilidade (valor-p) <0,05 foi adotado como critério de significância.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos pacientes

Foram incluídos nesse estudo 25 pacientes portadores de SMD e 19 voluntários sadios para o grupo controle. Dentre os pacientes, observou-se que 44% eram do sexo masculino e 56% do sexo feminino (Tabela 7). A média de idade nesse grupo foi de 78,4 anos (mediana = 78 anos / mínimo 56 anos e máximo 99 anos) com predomínio de pacientes com idade ≥ 75 anos em 68% (17/25) dos casos avaliados (Tabela 6).

Tabela 6: Caracterização descritiva dos pacientes com SMD.

Variáveis		Nº	%
Grupo SMD	Caso	25	100
Sexo	Feminino	14	56
	Masculino	11	44
Idade (categorizada)	<75 anos	8	32
	≥ 75 anos	17	68

Quanto aos achados no sangue periférico dos pacientes com SMD, foi observado que 8 pacientes (32%) apresentaram Hb ≤ 8 g/dL, que 10 pacientes (40%) apresentaram valores de Hb entre 8 e 10g/dL, e 7 pacientes (28%) Hb >10g/dL. Com relação à contagem de neutrófilos, 16 pacientes (64%) tiveram contagem $\geq 800/\text{mm}^3$, e 9 pacientes (36%) $< 800/\text{mm}^3$. A contagem de plaquetas foi superior a $100.000/\text{mm}^3$ em 13 pacientes (52%), entre 50.000 e $100.000/\text{mm}^3$ em 10 pacientes (40%) e inferior a $50.000/\text{mm}^3$ em 2 pacientes (8%).(Tabela 7). Houve predomínio de pacientes com a presença de três citopenias ao hemograma: 40% dos casos avaliados.

Tabela 7: Caracterização das variáveis laboratoriais do hemograma em pacientes com SMD.

Variáveis	Nº	%
Concentração de hemoglobina (Hb)	>10g/dL	7 28%
	>8 - ≤10g/dL	10 40%
	≤8 g/dL	8 32%
Contagem de neutrófilos	≥800/mm ³	16 64%
	<800/mm ³	9 36%
Contagem de plaquetas	>100.000/mm ³	13 52%
	>50.000 -	10 40%
	≤100.000/mm ³	
	≤50.000/mm ³	2 8%
Número de citopenias de acordo com o IPSS-R	1	8 32%
	2	7 28%
	3	10 40%

De acordo com a classificação OMS foram incluídos 16 pacientes (64%) com CRDM, 4 (16%) pacientes com ARSA, 1 (4%) paciente com AREB I e 4 (16%) pacientes com AREB II, (Tabela 8).

Tabela 8: Estratificação dos pacientes com SMD quanto à classificação OMS.

Variáveis	Nº	%
Classificação OMS, 2008	ARSA	4 16
	CRDM	16 64
	AREB I	1 4
	AREB II	4 16

Ao mielograma identificou-se que 19 pacientes (82%) apresentaram percentagem menor ou que 5% de blastos na medula óssea ao diagnóstico, seguido de 4 (18%) pacientes com percentagem maior ou igual que 5%.

À biópsia da medula óssea foi observado que 11,7% dos pacientes apresentaram medula óssea normocelular, 5,8% medula óssea hipocelular e 82,5% medula hiperclular.

Dentre os 17 pacientes com resultado citogenético, identificou-se que 8 pacientes (47%) apresentaram cariótipo normal e 9 (53%) apresentaram cariótipo alterado (Tabela 9).

Tabela 9: Caracterização descritiva das variáveis clínicas relacionadas aos achados da medula óssea em pacientes com SMD.

	Variáveis	Nº	%
Celularidade da medula óssea	Hipocelular	1	5,8%
	Normocelular	2	11,7%
	Hiper celular	14	82,5%
Percentagens de blastos	≥5%	19	82%
	<5%	4	18%

Quanto à estratificação de risco de acordo com o IPSS-R, verificou-se que 4 pacientes (23,5%) foram classificados como de muito bom prognóstico; 7 (41,2%) como bom prognóstico; 4 pacientes (23,5%) como prognóstico intermediário e 2 (11,8%) como alto risco. Nenhum paciente com muito alto risco foi incluído. (Tabela 10)

Tabela 10: Estratificação dos pacientes com SMD quanto ao grupo de risco pelo IPSS-R

	Variáveis	Nº	%
Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R	Muito baixo (≤ 1.5)	4	23,5%
	Baixo ($>1.5-3$)	7	41,2%
	Intermediário ($>3-4.5$)	4	23,5%
	Alto ($>4.5-6$)	2	11,8%
	Muito alto (>6)	0	0
Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R (categorizada)	Muito baixo+baixo	11	64,7%
	Intermediário+alto+muito alto	6	35,3%

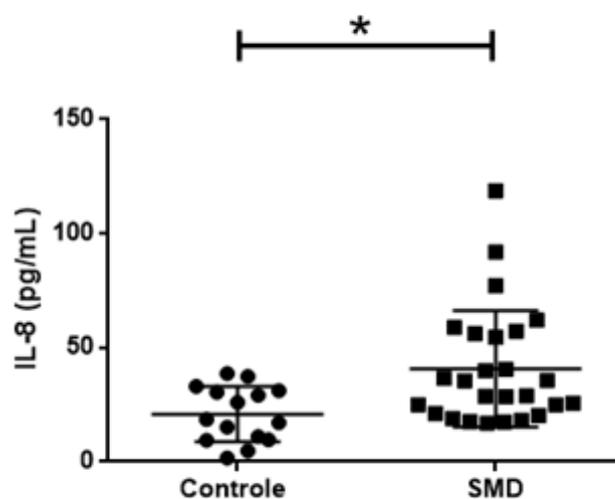
Em 14 pacientes (56%) foi observada ferritina sérica maior ou igual a 500ng/mL enquanto que 11 (44%) apresentaram uma dosagem inferior a 500ng/mL. A sobrecarga de ferro, definida como ferritina sérica maior ou igual 1.000ng/mL foi observada em 10 casos (40%).(Tabela 11).

Tabela 11: Estratificação dos pacientes quanto à dosagem de ferritina sérica

	Variáveis	Nº	%
Ferritina	<500ng/mL	11	44%
	≥500ng/mL	14	56%
Sobrecarga de Ferro	Sim	10	40%
	Não	15	60%

4.2 Análise da IL-8

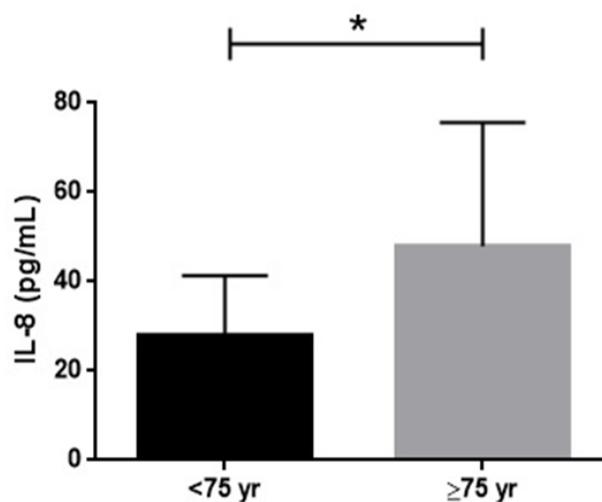
Em nosso estudo os pacientes com SMD mostraram níveis séricos de IL-8 significativamente mais elevados quando comparados ao grupo controle ($p=0,0068$). (Figura 11)

Figura 11: Análise de IL-8 em pacientes com SMD *versus* grupo controle

*O asterisco representa a significância estatística ($p=0,0068$)

Quanto à análise da idade, pacientes com idade ≥ 75 anos apresentaram níveis mais elevados de IL-8 quando comparados ao grupo de pacientes com idade < 75 anos. ($p=0,0357$) (Figura 12).

Figura 12: Dosagem de IL-8 em pacientes com SMD frente a variável idade.



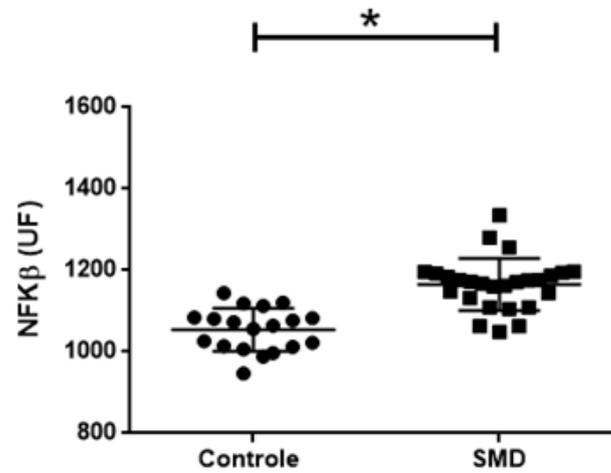
*O asterisco representa a significância estatística (p=0,0357)

Não foram observadas associações significativas entre os níveis de IL-8 e ferritina sérica, concentração de hemoglobina, sobrecarga de ferro, dependência transfusional, eritropoetina sérica, número de citopenias, percentual de blastos, cariótipo, classificação OMS ou estratificação de risco pelo IPSS-r (p>0,05)

4.3 Análise da ativação do NF-kB

Uma maior ativação do NF-kB foi observada em pacientes com SMD quando comparados ao grupo controle. (p<0,0001) (Figura 13)

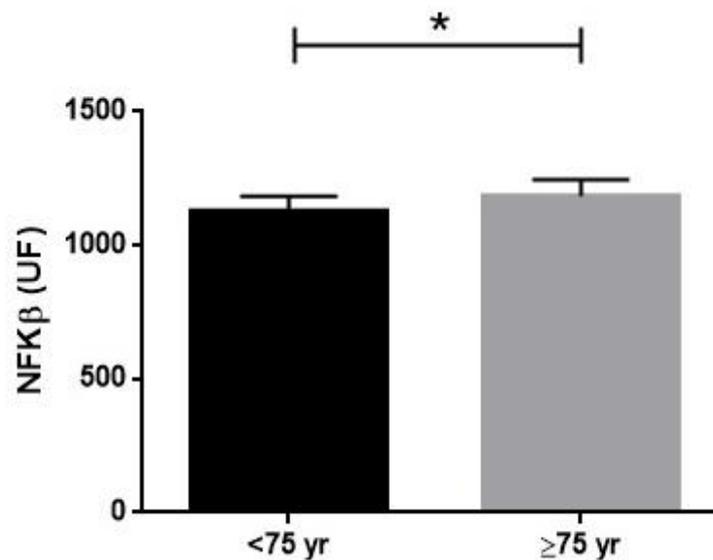
Figura 13: Ativação do NF-kB em pacientes com SMD.



*O asterisco representa a significância estatística ($p \leq 0,05$)

Pacientes portadores de SMD com idade maior ou igual a 75 anos têm significativamente maior ativação de NF-kB quando comparados ao grupo de pacientes com idade inferior a 75 anos. ($p=0,0476$) (Figura 14).

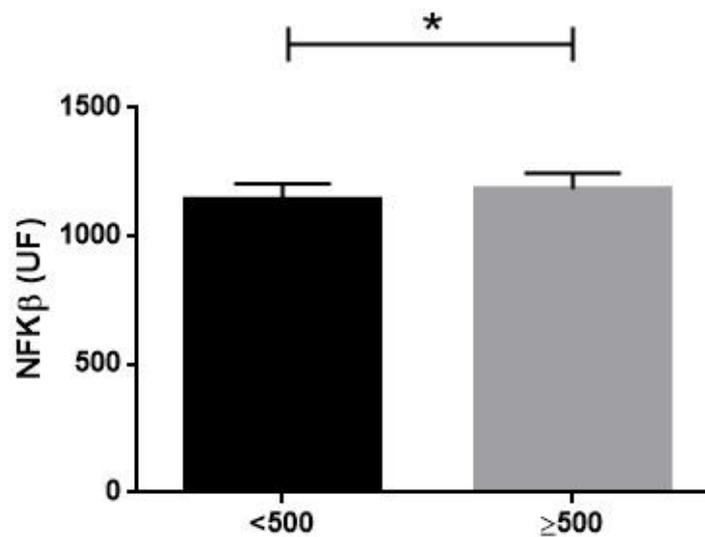
Figura 14: Análise comparativa da ativação de NF-kB quanto à idade dos pacientes com SMD.



*O asterisco representa a significância estatística ($p \leq 0,05$)

Na análise comparativa dos níveis de ferritina, observou-se que a ativação de NF- κ B é maior em grupo de pacientes de SMD com a dosagem de ferritina superior a 500ng/mL quando comparados ao grupo de pacientes de SMD com dosagem de ferritina inferior a 500ng/mL. ($p=0,032$) (Figura 15)

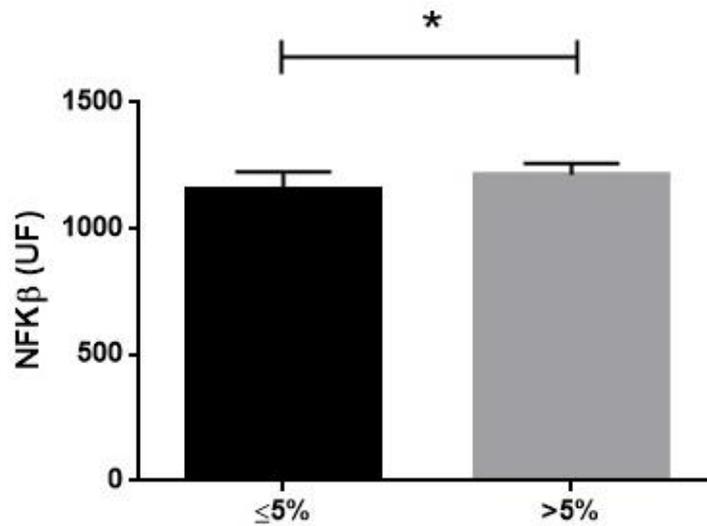
Figura 15: Análise comparativa da ativação de NF- κ B quanto ao nível de ferritina



*O asterisco representa a significância estatística ($p\leq 0,05$)

Quando se testou a associação com o percentual de blastos na medula óssea observou-se que pacientes com SMD e percentual de blastos $\geq 5\%$ de blastos apresentaram maior ativação de NF- κ B quando comparados ao grupo de pacientes com percentual de blastos $< 5\%$ ($p=0,042$). (Figura 16)

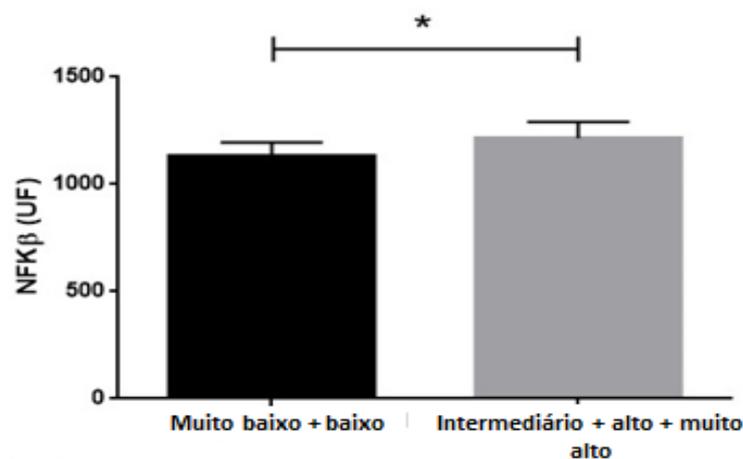
Figura 16: Análise comparativa da ativação de NF-kB quanto ao percentual de blastos.



*O asterisco representa a significância estatística ($p \leq 0,05$)

Na análise do índice de *score* prognóstico estabelecido pelo IPSS-r (GREENBERG *et al.*, 2012), verificou-se que pacientes inseridos no grupo de prognóstico intermediário –alto – muito alto apresentaram uma ativação do NF-kB maior do que pacientes inseridos no grupo de prognóstico muito baixo – baixo. ($p=0,0282$) (Figura 17)

Figura 17: Análise da associação entre ativação de NF-kB e estratificação de risco pelo IPSS-R

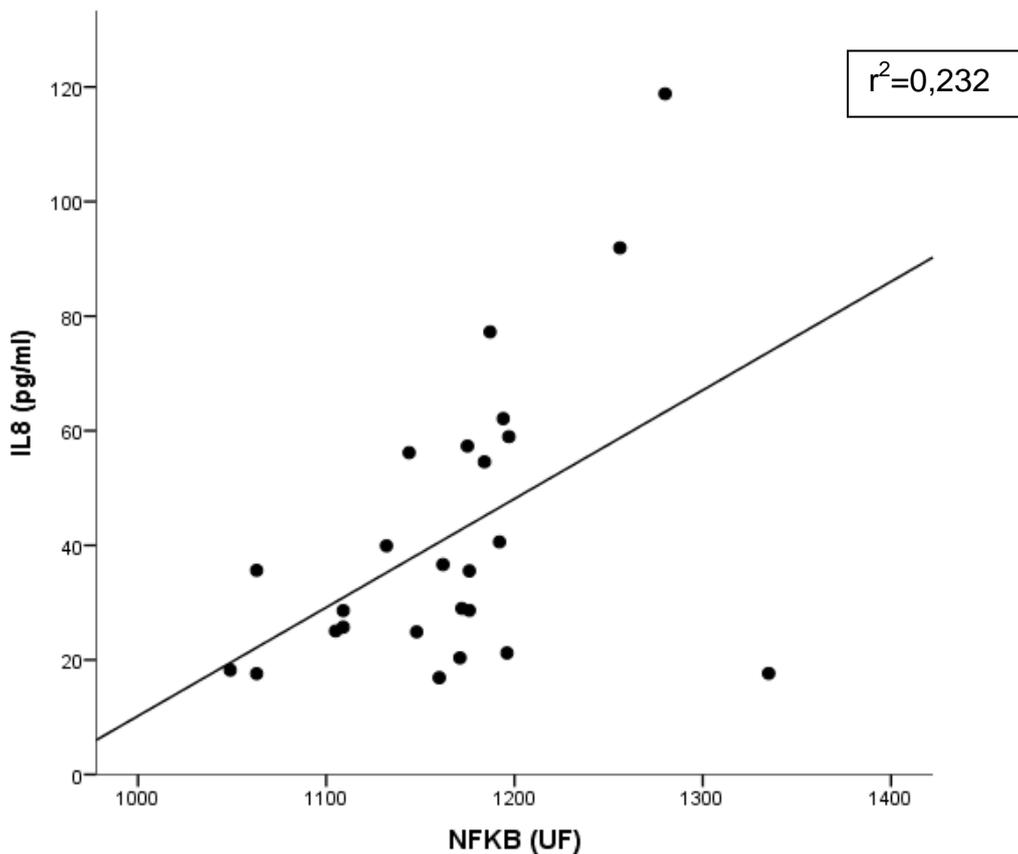


Não se observaram valores significativos entre a ativação de NF-kB e concentração de hemoglobina, sobrecarga de ferro, dependência transfusional, eritropoetina sérica, número de citopenias, cariótipo ou classificação OMS ($p>0,05$).

4.4 Análise da correlação entre níveis de IL-8 e ativação do NF-kB

Utilizando a correlação de *Spearman's*, observou-se que há uma correlação moderada, positiva e significativa entre a IL-8 e a ativação do NF-kB ($r=0.480$; $p=0.015$). A IL-8 é responsável por 23,2% ($r^2=0,232$) da ativação do NF-kB no grupo analisado (Figura 18).

Figura 18: Correlação de *Spearman's* entre os níveis de IL-8 e a ativação de NF-kB



5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o nível sérico de IL-8 e a ativação do NF-kB em pacientes portadores de SMD, associando-os às suas variáveis clínico-patológicas.

A média de idade ao diagnóstico foi de 78 anos (variação 56 a 99 anos) corroborando com dados brasileiros e latino-americanos recentemente publicados (MAGALHÃES *et al.*, 2012; BELLI *et al.*, 2015). A relação masculino- feminino foi de 0,8, semelhante à observada em estudos brasileiros que mostraram um predomínio de 58% de pacientes do sexo feminino, provavelmente devido, entre outros fatores, à crescente exposição de mulheres a agentes ocupacionais tais como pesticidas agrícolas após sua inserção na agricultura de subsistência. (MAGALHÃES *et al.*, 2013).

Na SMD, 70% a 90% dos pacientes desenvolvem anemia em alguma fase da evolução da doença, sendo esta, a citopenia mais comum, associada ou não à neutropenia e/ou plaquetopenia (SHENOY *et al.*, 2014; TSANG, LEITCH 2016). Nesse estudo, ao diagnóstico, houve um predomínio de pacientes com anemia e em 72% dos casos se observou concentração de Hb igual ou inferior 10g/dL.

Dentre os pacientes com SMD *de novo* e estudo citogenético disponível, 53% apresentaram cariótipo alterado, percentual semelhante ao observado em estudos internacionais multicêntricos (HAASE *et al.*, 2008; SCHANZ *et al.*, 2012).

Quanto à classificação da SMD segundo a OMS, observou-se um predomínio de casos de CRDM (64%), seguido por AREB (20%) e ARSA (16%). A maioria dos pacientes pertencia a subtipos de mais baixo grau. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Belli e cols (2015) que analisaram 345 pacientes brasileiros observaram predomínio de doença dos subtipos CRDM (35,1%), AREB (29,8%) e ARSA (10,4%). Também Haase *et al* (2008), em estudo multicêntrico de 598 pacientes, observou predomínio dos subtipos de mais baixo risco, com predomínio de CRDM.

De acordo com a estratificação de risco pelo IPSS-R, 64% foram estratificados como muito baixo ou baixo risco, percentual aproximado àquele relatado por Greenberg *et al* (2012) em estudo multicêntrico de 7012 pacientes.

A dosagem de ferritina sérica é usada para definir a sobrecarga de ferro nos pacientes dependentes de transfusão. Níveis de ferritina superiores a 1.000 ng/mL estão associados à toxicidade hepática, renal e cardíaca e são considerados fator de mau prognóstico que impactam negativamente a sobrevida global (MITCHELL *et al.*, 2013; SHENOY *et al.*, 2014).

Recentemente tem sido demonstrado que mesmo ferritina inferior a 1.000 ng/dL tem impacto negativo significativo (HARTMANN *et al*, 2013; CUI *et al*, 2015). Na série aqui estudada observou-se que 56% dos pacientes apresentaram ferritina ≥ 500 ng/mL em alguma fase da evolução da doença.

A patogênese da SMD é complexa, multifatorial e ainda pouco compreendida, mas sabe-se ser decorrente de um processo de múltiplas etapas que envolvem a célula progenitora e o microambiente medular (HE *et al* 2016). A sinalização inflamatória, através de células inflamatórias e secreção de citocinas, é um importante regulador da célula progenitora em resposta à infecção. Excessiva sinalização, entretanto, pode exercer impacto negativo na regulação e função da *stem cell* (HE *et al*, 2016). Na SMD, o processo inflamatório tem sido freqüente e recentemente implicado na patogênese da doença. Alterações em citocinas tais como de TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-4, IL-6, IL7 e IL-8 e suas vias de sinalização têm sido descritas e associadas com resposta inflamatória prolongada e aberrante. (MEYERS *et al*, 2005; KORNBLAU *et al*, 2010; GAÑÁN-GÓMEZ *et al*, 2015). Citocinas e mediadores inflamatórios resultam em desequilíbrio do sistema imune e inflamação. Esses processos têm sido implicados com a regulação da proliferação celular e apoptose de progenitores hematopoéticos na SMD. A desregulação do sistema imune, notadamente da imunidade celular, tem sido considerada um evento fisiopatológico primário que induz a evolução para SMD. A resposta inflamatória anormal e a ativação do sistema imune levam leucócitos imaturos, células dendríticas, macrófagos a se expandir rapidamente na medula óssea. A disfunção imune parece, portanto, ser um fator permissivo que precede e favorece a evolução clonal e contribui para a progressão (GLENTHØJ *et al*, 2016; YANG *et al*, 2015).

A interleucina-8 tem sido considerada um potente marcador em tumores sólidos, relacionada à angiogênese, crescimento tumoral, progressão e disseminação, sendo, por alguns, proposta como um marcador universal (SHAHZAD *et al.*, 2010). Em tumores sólidos, níveis elevados de IL-8 se associaram a pior prognóstico (TODOROVIC-RAKOVIC, 2013; CAMPBELL *et al.*, 2013). Poucos estudos se dedicaram à interação da IL-8 com tumores hematológicos, muito embora uma terapia baseada na inibição de receptores dessa citocina tenha sido proposta para pacientes portadores de LMA e SMD (SCHINKE *et al*, 2015). Nessa série de 25 pacientes, foram observados níveis significativamente mais elevados de IL-8 quando comparados com indivíduos saudáveis, confirmando estudos prévios em que se dosou essa citocina (MEYERS *et al*, 2005; KORNBLAU *et al*, 2010; GAÑÁN-GÓMEZ *et al*,

2015). É provável que o aumento dos níveis séricos de IL-8 seja parte do processo inflamatório/imunológico que tem efeito deletério na hematopoese normal.

O NF- κ B está envolvido em diversos mecanismos celulares através da regulação da transcrição de genes que codificam moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias e proteínas anti-apoptóticas, interferindo em vários processos relacionados à diferenciação, maturação e proliferação celulares (VAN DEN BERG *et al.*, 2001; CILLONI *et al.*, 2006; LOUNNAS *et al.*, 2009). No câncer, exerce dupla função. Sua ativação é parte da defesa imune, contribuindo para a eliminação de células transformadas. No entanto, está ativado em muitos tipos de tumores onde pode exercer uma variedade de funções pró-tumorigênicas: angiogênese, promoção, proliferação, anti-apoptose e disseminação (AGGARWAL, 2004; HOESEL 2013). Para alguns autores é o NF- κ B o elo principal entre inflamação e cancer (BEN-NERIAH, 2011).

Na SMD, o NF- κ B tem um papel importante na patogênese, induzindo a expressão de citocinas inflamatórias e fatores anti-apoptóticos e contribuindo para a desregulação da hematopoese. Uma maior ativação de NF- κ B é observada nos estágios mais avançados da doença e se correlaciona com a contagem de blastos, com alterações citogenéticas e supressão de apoptose (BRAUN *et al.* 2006). No presente estudo, uma maior ativação do NF- κ B foi observada em pacientes com SMD quando comparados aos controles. Interessantemente, a ativação foi significativamente maior em pacientes mais idosos, com idade ≥ 75 anos. Não foram encontrados dados na literatura sobre a influência da idade nesse achado. Foi observada uma associação significativa entre ativação do NF- κ B e níveis séricos de ferritina ≥ 500 ng/mL, um outro marcador de mau prognóstico na SMD. É sabido que o excesso de ferro no meio intra-celular induz a produção de espécies reativas de oxigênio que têm efeito genotóxico que resulta em instabilidade genômica e, entre outros efeitos, promove a ativação do, fatores que favorecem a progressão (PORTER, 2014).

A ativação do NF- κ B está significativamente mais elevada em subtipos de maior risco e tem sido correlacionada com a progressão da doença. Também nesse estudo foi observada uma associação significativa da maior ativação do NF- κ B com excesso de blastos na medula óssea ($\geq 5\%$) e com os subtipos de mais alto risco, estratificados pelo IPSS-R. Nos subtipos de baixo risco, em que não se observa ativação do NF- κ B, um aumento da apoptose é descrito na medula óssea. Contrariamente, nos subtipos de alto risco, em que uma maior ativação de NF- κ B é descrita, há diminuição significativa da apoptose. Essa relação inversão pressupõe importante papel desse fator de transcrição na regulação da apoptose e progressão da doença

(BRAUN et al, 2006). A inibição do NF-kB tem sido considerada uma estratégia potencial de tratamento da LMA e SMD (BRECCIA, 2010).

Diversos são os fatores que, potencialmente, induzem a ativação do NF-kB. Observou-se nesse estudo, através da correlação de *Spearman's*, uma correlação positiva, moderada e significativa entre IL-8 e a ativação de NF-kB. De acordo com essa análise, a IL-8 é responsável por 23% da ativação do NF-kB. Poucos estudos envolvendo essa via de ativação foram feitos em doenças hematológicas malignas (WAUGH *et al*, 2008). Esses dados favorecem a hipótese de estreita cooperação de IL-8 e NF-kB não apenas nos processos inflamatórios mas também na promoção e progressão do câncer.

6. CONCLUSÕES

- A média de idade dos pacientes, distribuição quanto ao gênero, apresentação ao diagnóstico, classificação pela OMS e estratificação de risco pelo IPSS-R foram semelhantes a outros estudos brasileiros e internacionais
- Um aumento significativo do nível de ativação do NF-kB e do nível sérico de IL – 8 foi observado na população de portadores de SMD estudada, quando comparada aos controles
- Um aumento significativo de ambos, nível de ativação do NF-kB e nível sérico de IL – 8, foi evidenciado em pacientes mais idosos, com idade ≥ 75 anos
- A ativação de NF-kB foi maior nos pacientes de SMD com sobrecarga e ferro e naqueles com doença de mais alto risco, quando avaliada pelo excesso de blastos e pelo IPSS-R
- Uma correlação significativa, positiva e moderada foi observada entre a ativação do NF-kB e o nível sérico de IL – 8 na população estudada
- É provável que o NF-kB e a IL – 8 colaborem no processo inflamatório como parte da patogênese da doença e possam constituir futuros alvos terapêuticos

7. REFERÊNCIAS

- ADÈS, L.; TZYKSON, R.; FENAUX, P. Myelodysplastic syndromes. **Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2239 - 2252, 2014.
- AGGARWAL B B. Nuclear factor – kB: The enemy within. **Cancer Cell**. 6: 203-208, 2004.
- AHN KS, SETHI G, AGGARWAL BB. Nuclear factor-kappa B: From clone to clinic. **Curr Mol Med**;7(7):619-637. 2007.
- ARBER DA., *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**; May 19;127(20):2391-405. 2016.
- BACHEGOWDA L, GLIGICH O, *et al.* Signal transduction inhibitors in treatment of myelodysplastic syndromes. **J. Hematol. Oncol**; 6:50. 2013.
- BADAWI, M. Vickars, L. M. Chase, J. Red Blood Cell Transfusion independence following the initiation of iron chelation therapy in myelodysplastic syndrome. **Adv. in Hematol.** Article ID 164045, 5 pages doi:10.1155/2010/164045. 2010.
- BANERJEE A, *et al.* The oral iron chelator deferasirox inhibits NF-kB mediated gene expression without impacting on proximal activation: implications for myelodysplasia and aplastic anemia. **Br. J. Haematol.**;168: 576-582. 2015.
- BARNES PJ, LARIN M. Mechanisms of disease - Nuclear factor-kappa B - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New England J. Med.**;336(15):1066-1071.1997.
- BEJAR R, STEENSMA D P. Recent developments in myelodysplastic syndromes. **Blood.**; 124(18): 2793-2803. 2014.
- BEJAR R. LEVINE R. EBERT B. L. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. **J. Clin. Oncol.**; 29: 504-515. 2011.
- BELLI C B, *et al.* Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients. **Amer. J. Hematol.**; vol 90, n° 10, 2015.
- 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.
- BEN-NERIAH Y., KARIN M. Inflammation meets cancer, with NF-kB as the matchmaker. **Nature Immunology**, 12: 715-723. 2011.
- BENNETT, J. M. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndrome. **Br. J. Haematol.**, v.51, p.189-199, 1982.

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.

BLANCO M L, CONDINO A. O Fator Nuclear Kappa B: uma nova perspectiva para o estudo de drogas antiinflamatórias. **Rev. Cienc. Med. Campinas**, 12(4): 341-349, 2003.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, (72): 248-254. 1976.

BRAUN T, *et al.* NF- κ B constitutes a potential therapeutic target in high-risk myelodysplastic syndrome. **Blood**; 107(3); 1156-1165. 2006.

BRECCIA, M.; ALIMENA, G. NF- κ B as a potential therapeutic target in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **Expert Opin. Ther. Targets**; 14(11):1157-1176. 2010.

CAAMÃNO, J. HUNTER, C. NF κ B Family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. **Clin. Microb.**; 414-429. 2002.

CALADO R T. Immunological aspects of hypoplastic myelodysplastic syndrome. **Semin Oncol**; 38(5): 667-672. 2011.

CAMPBELL LM, MAXWELL PJ., WAUGH DJJ. Rationale and means to target pro-inflammatory Interleukin-8 (CXCL8) Signaling in Cancer. **Pharmaceuticals**, 6, 929-959. 2013.

CARLSEN H, ALEXANDER G, AUSTENAA LM, EBIHARA K, BLOMHOFF R. Molecular imaging of the transcription factor NF- κ B, a primary regulation of stress response. **Mutat Res.**; 551 (1-2): 199-211. 2004.

CARREAU N., *et al.* Ironing out the details of iron overload in myelofibrosis: Lessons from Myelodysplastic Syndromes. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2016.04.003>. 2016.

CHANG F, LEE JT, NAVOLANIC PM, *et al.* Involvement of PI3k/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. **Leukemia**; 17(3):590-603. 2003.

CHAUFFAILLE, MLLF. Alterações moleculares em síndrome mielodisplásica. **Rev Bras. Hematol. Hemoter.**; 28(3): 188-193. 2006.

CHAUFFAILLE L., F. Alterações cromossômicas em síndrome mielodisplásica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**; 28(3): 182-187. 2006.

CHEN X *et al.* Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. **J Clin Invest** 123(11):4595–4611. 2013.

- CILLONI, D.; MESSA, F.; DEFILIPPI, I. The NFkB pathway blockade by the IKK inhibitor OS 1145 can overcome Imatinib resistance. **Leukemia**; (20): 61-67. 2006.
- CUI R, *et al.* Serum Iron metabolism and erythropoiesis in patients with myelodysplastic syndrome not receiving RBC transfusions. **Leuk Res.**; 38(5):545-550. 2014.
- DOLCET X, LLBET D, PALLARES J, MATIAS-GUIU X. NF-kB in development and progression of human cancer. **Virchows Arch**; 446(5): 475-482. 2005.
- ECONOMOPOULOU, C.; PAPPA, V.; KONTSIOTI, F.; *et al.* Analysis of apoptosis regulatory genes expression in the bone marrow of adult de novo myelodysplastic syndromes. **Leuk. Res.**, v.32, n.1, p. 61-69, 2008.
- FUHLER GM., KNOL GJ., DRAYER AL., VELLENGA E. Impaired interleukin-8 and GRO- α induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase result in decreased migration of neutrophils from patients with myelodysplasia. **J. Leuk. Biol.**, (77): 257-266. 2005.
- GANGAT N; PATNAIK M.M.; TEFFERI A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. **Am. J. Hematol.** 91:76–89, 2016.
- GERMING U., KOBBE G., *et al.* Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis, Prognosis, and Treatment. **Deutsches Arzteblatt International**; 110(46): 783-790. 2013.
- GILMORE TD. Introduction to NF-kB: players, pathways, perspectives. **Oncogene**; (25): 6680-6684. 2006.
- GLEZER I, MARCOURAKIS T, AVELLAR MCW, *et al.* O Fator de transcrição NF-kB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Rev Bras Psiquiat.**; 22(1): 26-30. 2000.
- GLENTHØJ A., DUE ØRSKOV A., HANSEN J. W.; *et al.* Immune Mechanisms in Myelodysplastic Syndrome. **Int. J. Mol. Sci.**, 17, 944. 2016.
- GÓMEZ G., WEI Y., COLLA S. Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**; (29):1458-1469. 2015.
- GREENBERG P L, TUECHLER H, SCAHNZ J, *et al.* Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**; vol 120 (12): 2454-2465. 2012.
- GREENBERG P, COX C, LEBEAU MM.; *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood** 89:2079-88, 1997.
- GREENBERG, P.L.; ATTAR, E.; BENNETT, J.M.; *et al.* NCCN Practice Guidelines for myelodysplastic syndromes. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 480, n. 11, p. 838-874, 2013.
- GRIVICICH, I., REGNER, A., ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. Canc.** 53(3) 335-343. 2007.

GUERREIRO R., SANTOS-COSTA Q., AZEVEDO-PEREIRA J.M. As Quimiocinas e os seus receptores: características e funções fisiológicas. **Acta Med Port**; 24: 967-976. 2011.

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

HARTMANN, J.; et al. Iron overload impairs proliferation of erythroid progenitors cells (BFU-E) from patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia Research.** (37): 327–332. 2013.

HAYDEN M.S.; GHOSH S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding. **Genes & Development** 26: 203-234. 2012

HE Q. LIU F. Unexpected role of inflammatory signaling in hematopoietic stem cell development: its role beyond inflammation. **Curr Opin Hematol.**, 23:18-22. 2016.

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

HOESEL B., SCHMID JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molec. Cancer.**;(12):86. 2013.

INVERNIZZI R, QUAGLIA F *et al.* Importance of classical morphology in the diagnosis of Myelodysplastic Syndrome. **Mediterr J Hematol Infect Dis.**; 7(1). 2015.

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.

JACOBS A, BEAMISH MR, ALLISON M. The measurement of circulating ferritin. **J. Clin. Pathol.**;(25):1003. 1972.

JACOBS A, MILLER F, WORWOOD M, BEAMISH MR, WARDROP CA. Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. **Br Med J.**; 4: 206-208. 1972.

KASI LOKNATH KUMAR A.; WECKBAUGH B.; SIRRIDGE C.; *et al.* Myelodysplastic Syndrome with concomitant t(5;21)(q15;q22) and del(5q)(q13q33): case report and review of literature. **Stem Cell Investig**; 3:3. 2016.

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

KERBAUY, D. B. DEEG, J. Apoptosis and anti-apoptotic mechanisms in the progression of MDS. **NIH.**, 35(11): 1739-1746. 2007.

KITAMURA T, INQUE D, *et al.* The molecular basis of myeloid malignancies. **Proc. Jpn. Acad.**: 389-404. 2014.

KOCH AE., POLVERINI PJ., *et al.* Interleukin-8 as a Macrophage derived mediator of angiogenesis. **Science** 1992 (258).

KOHGO Y, IKUTA K, OHTAKE T, TORIMOTO Y. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. **Int. J. Hematol**: 88: 7-15. 2008.

KORNBLAU SM., McCUE D. *et al.* Recurrent expression signatures of cytokines and chemokines are present and are independently prognostic in acute myelogenous leukemia and myelodysplasia. **Blood**.; 116(20): 4251-4261. 2010.

LEE, E. J. *et al.* The evolving field of prognostication and risk stratification in MDS: Recent developments and future directions. **Blood**.; 30(1):1-10.2015.

LI X, STARK GR. NF-kappa B- depend signaling pathways. **Ex Hematol**; 30(4):285-296. 2002.

LONG XINXIN, YE Y., ZHANG L., LIU P., *et al.* IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (Review). **International Journal of Oncology** 48: 5-12, 2016.

LOUNNAS, N. FRELIN, C. GONTHIER, N. COLOSETTI, P. SIRVENT, A. NfκB inhibition triggers death of imatinib-sensitive and imatinib – resistant chronic myeloid leukemia cells including T3151 Bcr- Abl mutants. **Int. J. Cancer**: 125, 308-317. 2009.

MA X. Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. **The Amer. J. Med.**: 125, S2-S5. 2012.

MAGALHÃES S M M, HEREDIA F F, FERNANDES L C M, *et al.* Beyond race-related disparities: is myelodysplastic syndrome the same everywhere? **Leukemia & Lymphoma**; 54(7): 1564-1566. 2013.

MAGALHÃES S. M. M. Síndromes Mielodisplásias – diagnóstico de exclusão. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**; 28(3): 175-177. 2006.

MAGALHÃES, S. M. M.; MADEIRA, T. S.; BITTENCOURT, R.; *et al.* 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, DELLA PORTA G, CAZZOLA M. Predicting survival and leukemic evolution in patients with myelodysplastic syndrome. **Haematologica**, 91(12):1588–1590. 2006.

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.

MALCOVATI L. LINDBERG E. H. BOWEN D. ADES L., CERMAK J. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the Europe LeukemiaNet. **Blood**, (17): 122. 2013.

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

MARCONDES A. M. MHYRE A. J. STIREWALT D L. *et al.* Dysregulation of IL – 32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia modulates apoptosis and impairs NK function. **Pnas**; (105); 8: 2865-2870. 2008.

MESSA E. CARTURAN S. MAFFE C. PAUTASSO M. Deferasirox is a powerful NFkB inhibitor in myelodysplastic cells and in leukemia cell lines acting independently from cell iron deprivation by chelation and reactive oxygen species scavenging. **Haematologica**., 95(8). 2010.

METZE IL. Contribuição da citometria de fluxo para o diagnóstico e prognóstico das síndromes mielodisplásicas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**; 28(3): 178-181. 2006.

MITCHELL M, D GORE A, *et al.* Iron chelation therapy in myelodysplastic syndromes: where do we stand? **Expert Rev. Hematol.**; 6(4): 397-410. 2013.

MORAES AC, LICINIO M, PAGNUSSAT L, MORAL JAG, SILVA MCS. Síndromes mielodisplásicas: aspectos moleculares, laboratoriais e a classificação OMS 2008. **Rev Bras Hematol Hemoter**; vol.31, n.6, pp. 463-470. 2009.

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

NERIAH-BEN Y., KARIN M. Inflammation meets cancer, with NF-kB as the matchmarker. **Nature Immunology**; 12 (8), 2011.

OLNES M.J.; SLOAND E.M. Targeting Immune Dysregulation in Myelodysplastic Syndromes. **JAMA**.,; 305(8): 814-819. 2011.

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**., p. 49-86. 2002.

PALOMINO D.C.T., MARTI L. C. Quimiocinas e Imunidade. **Einstein**.,13(3):469-73.2015.

PARKER J. E. MUFTI, G. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2 related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. **Blood**.,; 96:3932-3938. 2000.

PORTER J.B.; GARBOWSKI M. The Pathophysiology of Transfusional Iron Overload. **Hematol Oncol Clin N Am.** (28) 683–701. 2014.

PRIGENT M, BARLAT I, LANGEN H, DARGEMONT C. I kappa B alpha and I kappa B alpha/NF-kappa B complexes are retained in the cytoplasm through interaction with a novel partner, RasGAP SH3-binding protein 2. **J. Biol. Chem.**; 275(46):36441-36449. 2000.

RAZA, A.; GALILI, N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in Myelodysplastic Syndromes. **Cancer**, v. 113, n. 12, p. 3331-3340. 2008.

REMACHA AF, ARRIZABALAGA B, VILLEGAS A, et al. Evolution of iron overload in patients with low-risk myelodysplastic syndrome: iron chelation therapy and organ complications. **Ann Hematol**; 94(5): 779-787. 2015.

SCHINKE C., GIRICZ O., et al. IL8-CXCR2 pathway inhibition as a therapeutic strategy against MDS and AML stem cells. **Blood**. 125 (20): 3144-3152. 2015.

SHAHZAD A.; KNAPP M.; KÖHLER G. Interleukin 8 (IL-8) – a universal biomarker? **Int. Arch. Med.**; 3:11. 2010.

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.**; 30(8): 820-9. 2012.

SHENOY N, VALLUMSETLA N, et al. Impact of iron overload and potential benefit from iron chelation in low-risk myelodysplastic syndrome. **Blood.**; 124: 873-881. 2014.

SINGH J., SIMÕES BM., HOWELL SJ.; et al. Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. **Breast Cancer Research**, 15:210. 2013.

STEENSMA D P. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment. **Mayo Clinic**; 90(7): 969-983. 2015.

TAK PP, FIRESTEIN GS. NF-kappa B: a key role in inflammatory diseases. **J. Clin. Invest.**;107(1):7-11. 40. 2001.

THANOS, D. MANIATIS, T. NFkB: A lesson in Family Values. **Cell**, vol 80, 529-532. 1995.

TODOROVIĆ-RAKOVIĆ N, MILOVANOVIĆ J. Interleukin – 8 in Breast Cancer Progression. **J. Interferon & Cytokine Res.**; 33(10): 563-570. 2013.

TSANG E., LEITCH HA., Pre- and post treatment serum ferritin levels in patients with higher risk myelodysplastic syndromes receiving azacitidine. **Leukemia & Lymphoma** 2016.

UWE S. Anti-inflammatory interventions of NF-kappa B signaling: Potential applications and risks. **Biochemical Pharmacology**;75(8):1567-1579. 2008.

VALLABHAPURAPU, S & KARIN M. Regulation and function of NF-kB transcription factors in the immune system. **Annual Review of Immunology**; 27: 693-733. 2009.

VAN DEN BERG, R., HAENEN, M. The transcription factor NFkB as a potential biomarker for oxidate stress. **B. J. Nut.**. 86: 121-127. 2001.

WANG Y.H. LIU Y.J. Thymic stromal lymphopoietin, OX 40 ligand, and interleukin-25 in allergic responses. **Clin Exp Allergy** 39(6): 7798-806. 2009.

WAUGH D. J.J; WILSON C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clin Cancer Res.**; 6735 14(21) 6735-6741. 2008.

WEINMANN. Imunofenotipagem nas síndromes mielodisplásicas. Disponível em <<http://www.publicacoesweinmann.com.br/2009/04/imunofenotipagem-nas-sindromes.html>> acessado em 02 de dezembro de 2014.

WOLACH O., STONE R. Autoimmunity and inflammation in Myelodysplastic Syndromes. **Acta Haematol**; 136: 108-117. 2016.

ZHANG M.; FANG T.; WANG K.; MEI, H. et al. Association of polymorphisms in interleukin – 8 gene with cancer risk: a meta-analysis of 22 case-control studies. **OncoTargets and Therapy**:9: 3727-3737. 2016.

YANG L., QIAN Y., EKSIIOGLU E., et al. The inflammatory microenvironment in MDS. **Cell. Mol. Life. Sci.**, 72:1959-1966. 2015.

ANEXOS

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: ASSOCIAÇÃO DOS NÍVEIS DE INTERLEUCINA – 8 E A ATIVAÇÃO DE FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR NF –kB EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS

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, _____, RG nº _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do pesquisador Profa Dra.,Silvia Maria Meira Magalhães / Anacélia Gomes de Matos. 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 da doença e sua evolução.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

A amostra biológica utilizada na presente pesquisa corresponde a sangue periférico do indivíduo. A coleta é realizada por um técnico de laboratório através de uma punção venosa no indivíduo. Serão coletados somente 10mL de amostra de sangue periférico.

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) órgão(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: **Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães (85-9.99818108)** ou com a aluna de Mestrado Acadêmico **Anacélia Gomes de Matos Mota (85-9.96674443)**

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: ASSOCIAÇÃO DOS NÍVEIS DE INTERLEUCINA – 8 E A ATIVAÇÃO DE FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR NF –kB EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS

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 da pesquisadora Profa. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães / Anacélia Gomes de Matos Mota. O abaixo assinado está ciente de que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é estudar citocinas inflamatórias 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 sangue periférico do indivíduo.

A coleta é realizada por um técnico de laboratório através de uma punção venosa no indivíduo. Serão coletadas somente 10mL de amostra de sangue periférico

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) órgão(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: **Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães (85-9.99818108)** ou com a aluna de Mestrado Acadêmico **Anacélia Gomes de Matos Mota (85-9.96674443)**

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

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FATOR NUCLEAR DE TRANSCRIÇÃO KAPPA B E TNF-alfa EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS COM E SEM SOBRECARGA DE FERRO TRANSFUSIONAL

Pesquisador: anacella gomes de matos mota

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 47505115.6.3001.5045

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.359.984

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa apresentado para seleção de mestrado em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará na linha de pesquisa Farmacologia Clínica a ser orientado pela Profa. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães. O estudo será do tipo transversal analítico com a finalidade de investigar laboratorialmente os portadores de síndrome mielodisplásica – SMD com e sem sobrecarga de ferro transfusional e comparar os resultados com um grupo de idosos saudáveis. Será realizado em 60 participantes assim distribuídos: um grupo controle com 20 pacientes idosos saudáveis recrutados na CASA DE REPOUSO DO PARQUE HAVAI, localizada no centro da cidade de Eusébio; um grupo de estudo com 20 pacientes com SMD e sobrecarga de ferro e um grupo de estudo com 20 pacientes com SMD sem sobrecarga de ferro. Haverá coleta de sangue para análise de ferro e NFkB, e TNF alfa nos três grupos. Apresenta um cronograma de execução de 16 meses com previsão de finalização em 01/08/2016 e um orçamento de R\$ 4.009,00, declarado como recursos próprios da pesquisadora.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS:

- Avaliar a ativação do fator de transcrição NF-kB e fator de necrose tumoral TNF- nos pacientes portadores de síndromes mielodisplásicas – SMD com e sem sobrecarga de ferro;

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1200
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-370
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8613 **Fax:** (85)3281-4061 **E-mail:** cephuwc@huwc.ufc.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 1.359.984

- Comparar os resultados obtidos com indivíduos idosos saudáveis;
- Correlacionar a ativação do NF-κB e os níveis séricos de TNF- com a sobrecarga de ferro transfusional em pacientes portadores de SMD;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisadora assim descreve:

Riscos: Ao participar da pesquisa, ficará exposto(a) risco mínimo, como desconforto ou/e constrangimento, que é minimizado pela decisão de não querer participar ou a retirada do seu consentimento em qualquer momento da pesquisa, além do sigilo das informações prestadas, sem prejuízo de sua assistência médica.

Benefícios: A sobrecarga de ferro é um fator prognóstico negativo independente. É possível que a ativação do NF-κB e os níveis elevados de TNF- tenham papel nessa condição, o que abriria novas possibilidades terapêuticas associadas à quelação.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é factível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos foram apresentados e estão adequados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo se encontra adequado do ponto de vista ético.

Considerações Finais a critério do CEP:

A pesquisadora deverá apresentar a este CEP/HUWC, um relatório parcial decorrido um ano de estudo e um relatório final após o término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_298575.pdf	23/07/2015 08:55:54		Aceito
Outros	INSTRUMENTO-FICHA-ROTEIRO DE COLETA.pdf	23/07/2015 08:55:29		Aceito
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	15/07/2015		Aceito

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1200

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 40.490-370

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 1.359.984

Básicas do Projeto	ETO_298575.pdf	14:42:46		Aceito
Outros	curriculo lattes.pdf	15/07/2015 14:42:17		Aceito
Outros	termo de anuência do laboratorio.pdf	15/07/2015 14:39:43		Aceito
Outros	termo de anuência hospitalar.jpg	15/07/2015 14:38:36		Aceito
Outros	Anuência da casa de repouso.jpg	15/07/2015 14:37:47		Aceito
Outros	Termo de concordancia dos pesquisadores.jpg	15/07/2015 14:37:03		Aceito
Outros	TERMO DE FIEL DEPOSITARIO.jpg	15/07/2015 14:36:11		Aceito
Outros	carta de apresentação.jpg	15/07/2015 14:35:14		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.pdf	15/07/2015 14:34:28		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO CONTROLE.pdf	15/07/2015 14:34:17		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto - Plataforma.pdf	15/07/2015 14:33:44		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto assinada -com alteração feita pela plataforma.pdf	15/07/2015 14:32:30		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_298575.pdf	30/06/2015 15:51:44		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_298575.pdf	23/04/2015 07:12:04		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_298575.pdf	02/04/2015 17:29:59		Aceito
Outros	INSTRUMENTO DE COLETA.pdf	02/04/2015 17:28:32		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 1.359.984

FORTALEZA, 10 de Dezembro de 2015

Assinado por:
Maria de Fatima de Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1200
Bairro: Rodolfo Tedfio CEP: 60.430-370
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3281-8813 Fax: (85)3281-4061 E-mail: oephuwc@huwc.ufc.br