



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

ALLAN RODRIGO SOARES MAIA

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS ÀS VIAS DE REPARO DE DANOS
EM FITA SIMPLES (*ERCC8*, *ERCC6*, *ERCC5*, *XPA* e *XPC*) NO DNA EM
PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

FORTALEZA

2016

ALLAN RODRIGO SOARES MAIA

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS ÀS VIAS DE REPARO DE DANOS
EM FITA SIMPLES (*ERCC8*, *ERCC6*, *ERCC5*, *XPA* e *XPC*) NO DNA EM
PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA

2016

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

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

- M1e MAIA, ALLAN RODRIGO SOARES.
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS ÀS VIAS DE REPARO DE DANOS EM FITA SIMPLES (ERCC8, ERCC6, ERCC5, XPA e XPC) NO DNA EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA : Estudo de coorte / ALLAN RODRIGO SOARES MAIA. – 2016.
148 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.
Coorientação: Prof. Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior.
1. Síndrome Mielodisplásica (SMD). 2. Reparo de fita simples de DNA. 3. Reparo por excisão de nucleotídeo (NER). 4. ERCC8(CSA), ERCC6(CSB), ERCC5(XPG). 5. XPA, XPC. I. Título.
-

CDD 610

Ao “Chefia” que nos rege do alto.

AGRADECIMENTOS

Ao “Chefia”, por me ensinar a cada dia a arte de viver com fé.

Aos meus pais Francisco Canindé Maia Rocha e Francisca Soares Maia e aos meus irmãos Ana Rafaela Soares Maia, Anthony Rafael Soares Maia e Ana Rebeca Soares Maia, a todos os Familiares e Amigos pela compreensão da minha ausência neste período de minha formação acadêmica, como também eterno amor e afeto.

A minha amada companheira Ana Lúcia de Paula Hanemann pela paciência, carinho e amor em todos os momentos destes nossos mais de 90 anos de companheirismo.

Ao Dr. Ronald Feitosa Pinheiro, meu orientador que, com todo respeito, agradeço por ter aceitado minha orientação, por todo empenho, sabedoria, compreensão, exigência e grande pesquisador que o é. Deus o abençoe sempre. Muito obrigado.

À Profa. Dra. Silvia Maria Meira Magalhães, que com sua grandeza me atendeu com gentileza e atenção, tornando ainda maior minha admiração como pessoa, brilhante profissional e grande pesquisadora na área de onco-hematologia.

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

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

À Howard Lopes Ribeiro Júnior, meus mais sinceros agradecimentos por seu profissionalismo, incentivo, empenho, e acima de tudo, amizade, que me ajudou em todos os momentos, desde antes do Doutorado, minha eterna gratidão por me ajudar e participar da banca de avaliação. Meu grande amigo e irmão meu eterno obrigado. Serei sempre agradecido hoje e sempre. Obrigado.

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

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

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

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

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

In saucula saeculorum.

RESUMO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é um grupo de doenças clonais das células progenitoras hematopoiéticas, caracterizadas por citopenia(s) periférica(s), displasia de uma ou mais linhagens celulares mielóides e aumento do risco de desenvolvimento de leucemia mielóide aguda. A SMD é considerada uma doença de pessoas idosas, pois aproximadamente 80% dos pacientes acima de 60 anos são diagnosticados com a doença. As causas da SMD são conhecidas em apenas 15% dos casos. Em relação aos fatores ambientais como desencadeadores da SMD, podem ser incluídos o uso de quimioterapia prévia, especialmente de agentes alquilantes e análogos da purina e radioterapia. A patogênese da SMD envolve danos no DNA nas células tronco hematopoéticas, oriundas também pelos danos de fita simples (SSB) no DNA tendo três mecanismos: reparo por excisão de bases (BER), reparo de erros de emparelhamento de bases (MMR) e reparo por excisão de nucleotídeo (NER), como processos de reparo necessários para garantir a estabilidade genômica das células-tronco. Este estudo de coorte propôs avaliar o nível de expressão do mRNA dos genes atuantes no mecanismo de reparo em danos de fita simples no DNA, *ERCC8 (CSA)*, *ERCC6(CSB)* atuantes no mecanismo de reparo de excisão de nucleotídeos ligado a transcrição (TC-NER), *XPC* atuante no mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos ligado ao genoma global (GG-NER), *ERCC5(XPG)* e *XPA* atuantes na confluência das subvias GG-NER e TC-NER, associando os achados moleculares com variáveis clínicas e sócio-demográficas de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica. Esta análise baseou-se na metodologia de qPCR, entre amostras de medula óssea de 74 pacientes com SMD e 10 amostras de medula óssea de idosos voluntários saudáveis. Os pacientes com SMD foram diagnosticados de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde e estratificados de acordo com os critérios prognósticos estabelecidos pelo Índice de Escore Prognóstico Internacional revisado. Com este estudo foi possível identificar que: 1. pacientes diagnosticados com SMD hipocelular apresentaram aumento nos níveis de expressão dos genes *XPA* e *XPC* e reduzido nível de expressão do gene *ERCC8(CSA)*; 2. identificou-se que níveis de expressão aumentados do gene *ERCC8(CSA)*, *ERCC5(XPG)* e *XPA* em variáveis de pior prognóstico para SMD; 3. foi observado um aumento de expressão dos genes *ERCC6(CSB)*, *ERCC5(XPG)* e *XPA* em perfis de citopenias representativas de um quadro de doença mais agressiva; 4. pacientes com SMD apresentando níveis de expressão aumentados do gene *ERCC8(CSA)* exibiram maior sobrevida e quando apresentando níveis de expressão aumentados dos genes *ERCC5(XPG)*, *XPA* e *XPC* exibiram menor sobrevida; 5. nas análises de correlações verificou-se que a expressão do gene *XPA* apresentou correlação de 26,8% com a expressão do gene *ERCC5(XPG)*, bem como, a expressão do gene *XPA* exibiu correlação 70,5% com a expressão do gene *XPC* e, por fim, foi verificado que a expressão do gene *XPC* exibiu correlação de 36,7% com a expressão do gene *ERCC5(XPG)*.

PALAVRAS CHAVE: SMD, Reparo de fita simples de DNA (SSB), reparo por excisão de nucleotídeo (NER), gene *ERCC8*, gene *ERCC6*, gene *ERCC5*, gene *XPA*, gene *XPC*.

ABSTRACT

Myelodysplastic Syndrome (MDS) is a group of clonal diseases of hematopoietic progenitor cells, characterized by peripheral cytopenia (s), dysplasia of one or more myeloid cell lines and increased risk of developing acute myeloid leukemia. SMD is considered a disease of the elderly, as approximately 80% of patients over 60 years are diagnosed with the disease. The causes of MDS are known in only 15% of cases. Regarding environmental factors as triggers of MDS, the use of prior chemotherapy, especially of alkylating agents and purine analogs and radiotherapy may be included. The pathogenesis of SMD involves DNA damage in hematopoietic stem cells, also resulting from single stranded DNA damage (SSB) in the DNA having three mechanisms: base excision repair (BER), base pair mismatch repair (MMR), and repair By nucleotide excision (NER), as repair processes necessary to ensure the genomic stability of stem cells. This cohort study aimed to evaluate the mRNA expression level of the single-stranded DNA repair mechanism, ERCC8 (CSA), ERCC6 (CSB) acting on the transcription-linked nucleotide excision repair mechanism (TC (XPG) and XPA acting at the confluence of the GG-NER and TC-NER subunits, associating the molecular findings with clinical variables (NER), XPC acting on the nucleotide excision repair mechanism linked to the global genome (GG-NER), ERCC5 And socio-demographic characteristics of patients with Myelodysplastic Syndrome. This analysis was based on the qPCR methodology, between bone marrow samples from 74 patients with MDS and 10 bone marrow samples from healthy elderly volunteers. Patients with MDS were diagnosed according to the criteria proposed by the World Health Organization and stratified according to the prognostic criteria established by the revised International Prognostic Score Index. With this study, it was possible to identify that: 1. patients diagnosed with hypocellular MDS presented increased levels of XPA and XPC gene expression and reduced ERCC8 (CSA) gene expression level; 2. Increased levels of ERCC8 (CSA), ERCC5 (XPG) and XPA gene were identified in poorer prognostic variables for MDS; 3. increased expression of the ERCC6 (CSB), ERCC5 (XPG) and XPA genes in cytopenic profiles representative of a more aggressive disease picture was observed; 4. MDS patients with increased ERCC8 (CSA) gene expression levels exhibited longer survival, and when increased expression levels of the ERCC5 (XPG), XPA and XPC genes exhibited lower survival; 5. In the analysis of correlations, the expression of the XPA gene showed a correlation of 26.8% with the expression of the ERCC5 gene (XPG), as well as, the expression of the XPA gene showed a 70.5% correlation with the expression of the XPC gene and, finally, XPC gene expression was found to have a 36.7% correlation with ERCC5 (XPG) gene expression.

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

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da gênese das Síndromes Mielodisplásica 22
- Figura 2:** Representação esquemática da patogênese das Síndromes Mielodisplásica. 30
- Figura 3:** Apresentação esquemática da exposição genotóxica que leva ao desenvolvimento de danos no DNA nas células tronco e contribuem no desencadeamento do processo neoplásico. 34
- Figura 4:** Representação esquemática das vias do reparo por excisão de nucleotídeo (*Nucleotide excision repair pathways – NER*). 40
- Figura 5:** : Representação do cromossomo 5 e a indicação (seta amarela) da localização do gene ERCC8. 41
- Figura 6:** Representação do cromossomo 10 e a indicação (seta amarela) da localização do gene ERCC6 45
- Figura 7:** Representação do cromossomo 13 e a indicação (seta amarela) da localização do gene ERCC5. 43
- Figura 8:** Representação do cromossomo 9 e a indicação (seta amarela) da localização do gene XPA 44
- Figura 9:** Representação do cromossomo 3 e a indicação (seta amarela) da localização do gene XPC 45
- Figura 10:** Organograma resumo das metodologias utilizadas neste estudo. 51
- Figura 11:** Representação esquemática dos procedimentos da citogenética por banda G. 52
- Figura 12:** Representação esquemática de resultados citogenéticos a partir de amostras de medula óssea de pacientes com SMD. 70
- Figura 13:** Variáveis de análises com significância estatística e sem significância estatística para o gene ERCC8 (CSA). 74
- Figura 14:** Nível de expressão do gene ERCC8 em pacientes com SMD frente a variável Celularidade.. 75
- Figura 15:** Nível de expressão do gene ERCC8 em pacientes com SMD frente à variável de celularidade da medula óssea (categorizada) em pacientes com SMD. 76

Figura 16: Nível de expressão do gene ERCC8 em pacientes com SMD frente à variável presença de diseritropoese na medula óssea em pacientes com SMD.	77
Figura 17: Nível de expressão do gene ERCC8 em pacientes com SMD frente à variável percentagem de blastos na medula óssea em pacientes com SMD.	78
Figura 18: Nível de expressão do gene ERCC8 em pacientes com SMD frente à variável percentagem de blastos (categorizada) na medula óssea em pacientes com SMD.	79
Figura 19: Nível de expressão do gene ERCC8 em pacientes com SMD frente a variável cariótipo normal versus cariótipo alterado.	80
Figura 20: Nível de expressão do gene ERCC8 em pacientes com SMD frente a variável Cariótipo (Presença de alteração no 11q): normal, alterado com 11q e alterado sem 11q.	81
Figura 21: Nível de expressão do gene ERCC8 em pacientes com SMD frente a classificação diagnóstica da doença.	82
Figura 22: Nível de expressão do gene ERCC8 em pacientes com SMD frente a classificação das formas de SMD.	83
Figura 23: Variáveis de análises com significância estatística e sem significância estatística para o gene ERCC6 (CSB).	84
Figura 24: Nível de expressão do gene ERCC6 em pacientes com SMD frente a idade categorizada pelo IPSS revisado.	85
Figura 25: Nível de expressão do gene ERCC6 em pacientes com SMD frente a variável Displasia na MO.	86
Figura 26: Nível de expressão do gene ERCC6 em pacientes com SMD frente a variável número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS revisado.	87
Figura 27: Variáveis de análises com significância estatística e sem significância estatística para o gene ERCC5 (XPG).	88
Figura 28: Nível de expressão do gene ERCC5 em pacientes com SMD frente a variável origem.	89
Figura 29: Nível de expressão do gene ERCC5 em pacientes com SMD frente a variável classificação dos valores de hemoglobina (HB) categorizada	90

Figura 30: Nível de expressão do gene ERCC5 em pacientes com SMD frente a variável classificação dos valores de plaquetas de acordo com o IPSS-2012.	91
Figura 31: Nível de expressão do gene ERCC5 em pacientes com SMD frente a variável classificação dos valores de plaquetas de acordo com o IPSS-2012 categorizado.	92
Figura 32: Nível de expressão do gene ERCC5 em pacientes com SMD frente a variável número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS revisado.	93
Figura 33: Nível de expressão do gene ERCC5 em pacientes com SMD frente a classificação da OMS..	94
Figura 34: Nível de expressão do gene ERCC5 em pacientes com SMD frente a classificação das formas de SMD.	95
Figura 35: Nível de expressão do gene ERCC5 em pacientes com SMD frente ao perfil de dependência transfusional.	96
Figura 36: Nível de expressão do gene ERCC5 em pacientes com SMD frente à variável de evolução para LMA.	97
Figura 37: Variáveis de análises com significância estatística e sem significância estatística para o gene XPA.	98
Figura 38: Nível de expressão do gene XPA em pacientes com SMD frente à variável Grupo.	99
Figura 39: Nível de expressão do gene XPA em pacientes com SMD frente a idade categorizada pelo IPSS revisado.	100
Figura 40: Nível de expressão do gene XPA em pacientes com SMD frente a idade pelo IPSS categorizado.	101
Figura 41: Nível de expressão do gene XPA em pacientes com SMD frente a variável origem.	102
Figura 42: Nível de expressão do gene XPA em pacientes com SMD frente a variável Celularidade da MO.	103
Figura 43: Nível de expressão do gene XPA em pacientes com SMD frente à variável de celularidade da medula óssea em pacientes com SMD.	104
Figura 44: Nível de expressão do gene XPA em pacientes com SMD frente à variável classificação	105

dos valores de neutrófilos (ANC) de acordo com o IPSS revisado em pacientes com SMD.

Figura 45: Nível de expressão do gene XPA em pacientes com SMD frente a variável número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS revisado. 106

Figura 46: Nível de expressão do gene XPA em pacientes com SMD que evoluíram para LMA. 107

Figura 47: Variáveis de análises com significância estatística e sem significância estatística para o gene XPC. 108

Figura 48: Nível de expressão do gene XPC em pacientes com SMD frente a idade categorizada pelo IPSS revisado. 109

Figura 49: Nível de expressão do gene XPC em pacientes com SMD frente à variável de celularidade da medula óssea em pacientes com SMD. 110

Figura 50: Nível de expressão do gene XPC em pacientes com SMD frente à presença de Sideroblastos em anel na MO. 111

Figura 51: Resultados dos níveis de expressão dos genes ERCC8, XPA e XPC em pacientes com SMD hipocelular 112

Figura 52: : Resultados dos níveis de expressão dos genes ERCC8, XPA e XPC em pacientes com com faixas de percentagens de blastos entre 5%-10%, cariótipo alterado, AREB, formas avançadas, dependência transfusional e evolução para LMA. 112

Figura 53: : Resultado dos níveis de expressão dos genes ERCC6, ERCC5 e XPA em pacientes com número de citopenias (duas e três citopenias), valores de neutrófilos menor que 800/mm³, hemoglobina menor que 8g/dL e plaquetas menor que 50000/mm³. 113

Figura 54: Resultado dos níveis de expressão dos genes ERCC6, XPA e XPC em pacientes com SMD e idade menor/igual a 70 anos. 114

Figura 55: Resultado do nível de expressão do gene XPC em pacientes com SMD quanto a percentagem de sideroblastos em anel entre 1% e 15%. 114

Figura 56: Análises de associação entre o nível de expressão do gene ERCC8 e a sobrevida dos pacientes com SMD. A. Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). B. Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida. 116

Figura 57: Análises de associação entre o nível de expressão do gene ERCC5 e a sobrevida dos pacientes com SMD. A. Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). B. Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida. 117

Figura 58: Análises de associação entre o nível de expressão do gene XPA e a sobrevida dos pacientes com SMD. A. Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). B. Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida. 118

Figura 59: Análises de associação entre o nível de expressão do gene XPC e a sobrevida dos pacientes com SMD. A. Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). B. Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida. 119

Figura 60: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes XPA e ERCC5 em pacientes com SMD. 120

Figura 61: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes XPA e XPC em pacientes com SMD. 121

Figura 62: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes XPC e ERCC5 em pacientes com SMD. 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Evolução na classificação da Síndrome Mielodisplásica.	24
Tabela 2: Representação das variáveis estabelecidas no IPSS.	25
Tabela 3: Representação das variáveis estabelecidas no WPSS.	26
Tabela 4: Representação das variáveis estabelecidas no IPSS-R.	26
Tabela 5: Genes avaliados por qPCR envolvidos nos mecanismos de reparo em SSBs no DNA	55
Tabela 6: Caracterização descritiva das variáveis sócio-demográficas dos pacientes com SMD.	62
Tabela 7: Estratificação descritiva diagnóstica dos pacientes pela classificação da WHO (2001/2008).	63
Tabela 8: Caracterização descritiva das variáveis clínicas relacionadas aos achados da medula óssea em pacientes com SMD.	64
Tabela 9: Caracterização descritiva dos resultados dos cariótipos e seu impacto prognóstico em pacientes com SMD ao diagnóstico.	65
Tabela 10: Descrição clínica dos pacientes com SMD.	67
Tabela 11: Caracterização descritiva das variáveis clínicas relacionadas aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD.	71
Tabela 12: Estratificação descritiva das variáveis associadas ao risco prognóstico dos pacientes com SMD ao diagnóstico.	72
Tabela 13: Caracterização descritiva das escolhas terapêuticas e evolução clínica dos pacientes com SMD.	72
Tabela 14: Caracterização dos <i>cutoffs</i> na análise de associação entre os níveis de expressão dos genes de reparo em SSBs e a sobrevida dos pacientes com SMD.	115

LISTA DE ABREVIATURAS

SMD	<i>Síndrome Mielodisplásica</i>
CPDs	<i>Cyclobutane Pyrimidine Dimmers</i>
6-4PPs	<i>6-4 Pyrimidine Pyrimidone Photoproducts</i>
MO	<i>Medula Óssea</i>
DNA	<i>Ácido desoxrrribonucléico</i>
cDNA	<i>DNA Complementar</i>
RNA	<i>Ácido ribonucléico</i>
C	<i>Citosina</i>
G	<i>Guanina</i>
T	<i>Timina</i>
A	<i>Adenina</i>
SEERS	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
LMA	<i>Leucemia Mielóide Aguda</i>
LMC	<i>Leucemia Mielóide Crônica</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
FAB	<i>Grupo Francês-Americano-Britânico</i>
OMS	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
IPSS	<i>International Prognostic Score Systems</i>
5q-	<i>Síndrome de deleção do braço longo do cromossomo 5</i>
AREB I	<i>Anemia Refratária com Excesso de Blastos tipo I</i>
AREB II	<i>Anemia Refratária com Excesso de Blastos tipo II</i>
CRDM	<i>Citopenia refratária com displasia multilinear</i>
AR	<i>Anemia Refratária</i>
ARSA	<i>Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel</i>
SSB	<i>Single Strand Break</i>
DSB	<i>Double Strand-Break</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End-Join</i>
HR	<i>Homologous Recombination</i>
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
BER	<i>Base Excision Repair</i>
MMR	<i>Mismatch Repair</i>

GG-NER	<i>Global Genome NER</i>
TC-NER	<i>Transcription Coupled NER</i>
ERCC1	<i>Excision Repair Complementation group 1</i>
ERCC8	<i>Excision Repair Cross-Complementation Group 8</i>
ERCC6	<i>Excision Repair Cross-Complementation Group 6</i>
ERCC5	<i>Excision Repair Cross-Complementation Group 5</i>
XPG	<i>Xeroderma Pigmentosum Complementation Group G</i>
XPA	<i>Xeroderma Pigmentosum Complementation Group A</i>
XPC	<i>Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C</i>
CSA	<i>Cockayne Syndrome A</i>
CSB	<i>Cockayne Syndrome B</i>
RPA	<i>Replication Protein A</i>
TFIIH	<i>Transcription Factor IIIH</i>
RNA Pol II	<i>RNA polimerase II</i>
UV-DDB	<i>Ultraviolet – UV – radiation DNA Damage Binding Protein</i>
UV-SSA	<i>UV Stimulated scaffold protein A</i>
USP7	<i>Ubiquitin Specific processing Protease 7</i>
CAK	<i>CDK activating kinase</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
NaOH	<i>Hidróxido de sódio</i>
KCl	<i>Cloreto de Potássio</i>
MgCl	<i>Cloreto de Magnésio</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
UV	<i>Luz Ultravioleta</i>
RI	<i>Radiação Infravermelho</i>
RPM	<i>Rotações por minuto</i>
M	<i>Molar</i>
OR	<i>Odds-Ratio</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Aspectos Gerais das Síndromes Mielodisplásicas (SMDs)	21
1.2	Classificação Clínica e Prognóstica da SMD	23
1.3	Incidência da SMD	27
1.4	Etiologia da Síndrome Mielodisplásica	28
1.5	Patogênese da Síndrome Mielodisplásica	29
1.6	Citogenética e Síndrome Mielodisplásica	31
1.7	Lesões no DNA	33
1.8	Mecanismos de reparo ao dano no DNA	35
1.8.1	Mecanismo de reparo de fita dupla de DNA	35
1.8.2	Mecanismo de reparo de fita simples de DNA	36
1.8.2.1	Reparo por excisão de base	36
1.8.2.2	Reparo de erros por emparelhamento de bases	36
1.8.2.3	Reparo por excisão de nucleotídeo	37
1.8.3	Genes de reparo por excisão de nucleotídeo - NER	41
1.8.3.1	Gene <i>ERCC8</i> (<i>CSA</i>)	41
1.8.3.2	Gene <i>ERCC6</i> (<i>CSB</i>)	42
1.8.3.3	Gene <i>ERCC5</i> (<i>XPG</i>)	43
1.8.3.4	Gene <i>XPA</i>	44
1.8.3.5	Gene <i>XPC</i>	45
1.8.4	Patologias relacionadas a mutações nos mecanismos de reparo do DNA	46
1.8.4.1	Xeroderma pigmentoso	46
1.8.4.2	Síndrome de Cockayne	47

1.8.4.3	Tricotiodistrofia	47
1.9	Importância do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo – NER	48
2	OBJETIVOS	49
2.1	Objetivo geral	49
2.2	Objetivos específicos	49
3	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1	Casuística	50
3.2	Aspectos éticos	50
3.3	Cariótipo por Banda G	52
3.4	Análise da Expressão do mRNA por qPCR	53
3.4.1	Obtenção de amostras de células da medula óssea	53
3.4.2	Extração de RNA Total	53
3.4.3	Síntese de cDNA	54
3.4.4	qPCR (PCR quantitativa em tempo real)	54
3.4.5	Validação e definição dos genes endógenos utilizados nas análises dos dados de qPCR	56
3.4.6	Validação da qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras de cDNA dos pacientes avaliados	57
3.5	Variáveis analisadas	57
3.6	Análises estatísticas	59
3.6.1	Análises estatísticas para a análise dos dados de expressão gênica	59
3.6.2	Análises estatísticas para a avaliação da associação dos dados de expressão dos genes avaliados e a sobrevida dos pacientes com SMD baseado no software <i>Cutoff Finder</i> .	60
4	RESULTADOS	61
4.1	Caracterização dos pacientes	61

4.2	Análise do nível de expressão gênica por qPCR em amostras de <i>pool</i> celular da medula de pacientes com SMD	73
4.2.1	Análise do nível de expressão do gene <i>ERCC8 (CSA)</i>	74
4.2.2	Análise do nível de expressão do gene <i>ERCC6 (CSB)</i>	84
4.2.3	Análise do nível de expressão do gene <i>ERCC5 (XPG)</i>	88
4.2.4	Análise do nível de expressão do gene <i>XPA</i>	98
4.2.5	Análise do nível de expressão do gene <i>XPC</i>	108
4.3	Análises de sobrevida dos pacientes com SMD em relação aos níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de reparo em danos de fita simples do DNA	115
4.4	Análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de reparo em danos de fita simples de DNA	120
5	DISCUSSÃO	123
6	CONCLUSÕES	129
	REFERÊNCIAS	130
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente	137
	APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Voluntário	141
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC	145

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais das Síndromes Mielodisplásicas (SMDs)

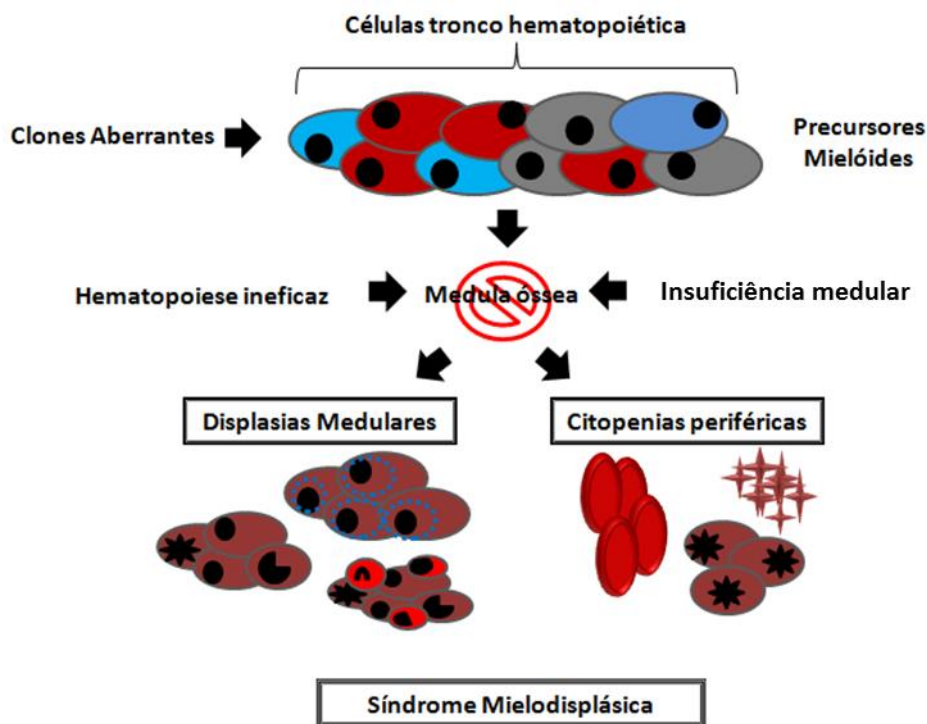
A Síndrome Mielodisplásica é definida como uma doença clonal (de um mesmo patrimônio genético) das células precursoras hematopoéticas (conhecidas como *stem cells*), sendo caracterizada por citopenias (ou pancitopenias), mielodisplasia, hematopoese ineficaz e aumento do risco de progressão para leucemia mielóide aguda (LMA), segundo a classificação de tumores de tecidos hematopoéticos e linfóides da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization - WHO*) (SWERDLOW, 2008), configurando, uma neoplasia primária de medula óssea, de ocorrência comum no mundo ocidental em indivíduos com idade superior a 60 anos (MUFTI, 2008; ADES, 2014).

Em função de anormalidades na proliferação, maturação e processo de apoptose das células tronco hemetopoéticas tem-se o quadro de hematopoese ineficaz, fazendo com que a medula óssea (MO) seja incapaz de produzir e liberar uma quantidade adequada de células maduras para o sangue periférico (YOSHIDA, 2007; HELLSTROM-LINDBERG, 2008) (Figura 1). A hematopoese torna-se ineficaz na SMD em função do aumento da susceptibilidade das linhagens progenitoras mielóides clonais ao processo de apoptose e a limitada capacidade de resposta dessas células aos fatores de crescimento, resultando em citopenias, mesmo que o paciente possua uma medula hiperclular (TEFFERI, VARDIMAN, 2009^a; ADES, 2014) (Figura 1). Na maioria de vezes, a evolução para LMA é oligoclonal, ao invés de monoclonal, bem como, a transformação para LMA é oriunda da expansão de subclones (ADES, 2014) (Figura 1).

O quadro de insuficiência medular acarreta as citopenias periféricas, podendo ser também uma pancitopenia, quando envolve as três linhagens celulares sanguíneas (a eritróide, a granulocítica e a megacariocítica) e origina graus variados de anemia, neutropenia e trombocitopenia (ECNOMOPOULOU, 2008), onde, citopenias de sangue periférico aliado a uma MO hiperclular e displasia são elementos característicos das SMD (HOFMANN, NOLTE, 2007). Tais citopenias podem tornar o paciente dependente de transfusões e elevar a susceptibilidade deste à infecções e hemorragias

(GREENBERG, 1997; MALCOVATI, 2011; GREENBERG, 2012; GREENBERG, 2013).

Figura 1: Representação esquemática da gênese das Síndromes Mielodisplásica



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

A identificação dos fatores causadores da SMD só ocorre em apenas 15% dos casos diagnosticados (ADES, 2014). Em relação aos elementos intrínsecos, em pacientes crianças, o fator genético é identificado em um terço dos casos, mesmo em crianças acometidas com síndrome de Down, anemia de Falconi e neurofibromatose (NIEMEWEER; BAUMANN, 2008; ADES, 2014). Entretanto, o fator genético para o paciente adulto tem menor incidência, mas não abstando de investigação o paciente adulto jovem ou de família com outro(s) caso(s) de SMD, LMA ou anemia aplástica (NIEMEWEER; BAUMANN, 2008; ADES, 2014).

Em relação aos fatores extrínsecos, categorizando como ambientais, causadores da SMD, pode-se incluir a quimioterapia prévia para neoplasia, em especial quando emprega agentes alquilantes e agentes análogos da purina, bem como a radioterapia (STROM, VELEZ-BRAVO, ESTEY, 2008; BOWEN, 2013; IRONS, KERZIC, 2014;

ADES, 2014). Para com os fatores ocupacionais, pode-se relatar a exposição ao benzeno e seus derivados, dados estes corroborados com o acometimento de SMD em trabalhadores agrícolas e industriais (BOWEN, 2013; ADES, 2014). Estas SMDs secundárias, em especial pós quimioterapia, muitas vezes são de mau prognóstico, tendo a presença de achados citogenéticos complexos (STROM, VELEZ-BRAVO, ESTEY, 2008; BOWEN, 2013; IRONS, KERZIC, 2014; ADES, 2014).

1.2 Classificação Clínica e Prognóstica da SMD

Atualmente, já foram elaborados sistemas de classificação objetivando estimar a sobrevida e o grau de risco de progressão para LMA, quando do diagnóstico de SMD (Tabela 1). A primeira estratificação para classificar as SMDs foi a classificação FAB (Franco-Americana-Britânica), de 1982 (BENNETT, 1982). Segundo esta classificação, pacientes eram diagnosticados com SMD quando apresentavam uma MO displásica e/ou com 5 a 30% de mieloblastos (BENNETT, 1982).

Esta classificação teve como referenciais o percentual de blastos no sangue periférico (SP) e MO, a existência de sideroblastos em anel na MO e na quantidade de monócitos em SP, resultando em cinco subgrupos: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) (BENNETT, 1982). O sistema FAB foi bem aceito, servindo como padrão de classificação da SMD por mais de duas décadas, mesmo tendo casos que não podiam ser classificados dentro dos parâmetros por ela estipulados, pois o prognóstico de pacientes categorizados em um mesmo subgrupo tinha variações para prever sobrevida ou o risco de transformação para LMA (MUFTI, 2008).

No ano de 1999, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs a dição de parâmetros biológicos e genéticos à então classificação FAB visando melhorias de estimativa para o prognóstico da SMD (JAFFE, 2001) (Tabela 1). Dentre as modificações, a porcentagem de blastos na MO foi reduzida de 30% para 20% e a exclusão dos subgrupos AREB-t e LMMC, este último por ter característica clínicas e biológicas próprias, foi excluído da classificação de SMD e inserido na classificação de

doenças mieloproliferativas crônicas, juntamente, com a leucemia mielomonocítica juvenil e a leucemia mielóide crônica atípica (JAFPE, 2001).

Na classificação de 2016 tem-se uma revisão da classificação anterior que incorporou novas características clínicas, prognósticas, morfológicas, imunofenotípicas e dados genéticos que surgiram desde a edição anterior (ARBER, 2016). Além das mudanças na nomenclatura, empregando o termo “síndrome mielodisplásica” em vez de “anemia refratária” ou “citopenia refratária”, mas seguido pelos modificadores apropriados, como: displasia simples ou de múltiplas linhagens, sideroblastos em anel, excesso de blastos ou anormalidade citogenética del(5q) (ARBER, 2016). Nesta revisão, uma das maiores mudanças foi separar as causas de citopenias e displasias. Embora que o limiar que defina displasia permaneça em 10% para qualquer linhagem hematopoiética, reconhece-se que pode ocorrer um aumento desse valor de 10% nos achados de displasia em indivíduos normais e mais frequentemente, em casos não-neoplásicos de citopenia (ARBER, 2016).

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	CRDM	Eritróide + outra	< 5	< 1
			del 5q isolada	Eritróide + mega	< 5	< 1
	SMD-U	SMD-U	Unilinhagem + pancito ou CRDM/CRDU com 1% de blastos no SP	< 5	< 1	
ARSA	ARSA	ARSA	Eritróide*	< 5	< 1	
	CRDM-SA		*>15% sideroblastos em anel	< 5	< 1	
AREB	AREB-I	AREB-I	≥ 1 linhagem	5-9	2-4	
	AREB-II	AREB-II	≥ 1 linhagem	10-19	5-19	
AREB-t	LMA	LMA	Mielóide + outra	≥20		
LMMC	SMD/DMP	SMD/NMP	Variável (monocitose >1 x 10 ⁹ /L)	<20		
	LMMC	LMMC				
	LMMJ	LMMJ				
	LMCa	LMC BCR/abl				
	SMD/DMP-U	neg	SMD/NMP-U			

Legenda: AR (Anemia Refratária), ARSA (Anemia refratária com sideroblastos em anel), AREB (Anemia refratária com excesso de blastos), AREB-t (AREB em transformação), LMMC (Leucemia Mielomonocítica Crônica), SMD-U (SMD inclassificável), CRDM (citopenia refratária com

displasia de multilinhagem), del 5q (deleção 5q isolada), CRDM-AS (CRDM com sideroblastos em anel), LMA (Leucemia mielóide aguda), SMD/DMP (SMD/doenças mieloproliferativas), LMMJ (Leucemia mielomonocítica juvenil), LMCa (Leucemia mielóide crônica atípica), SMD/DMP-U (SMD/doenças mieloproliferativas inclassificáveis), CRDU (citopenias refratárias com displasia unilinhagem), NR (neutropenia refratária), TR (trombocitopenia refratária), SMD/NMP (SMD/neoplasias mieloproliferativas), SMD/NMP-U (SMD/neoplasias mieloproliferativas inclassificáveis).

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

Posteriormente, o Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS), desenvolvido em 1997, resultou em um sistema prognóstico, baseado em sete estudos prévios com um total de 816 pacientes diagnosticados com SMD primária. Este sistema estipulou uma pontuação que considera as variáveis de número de blastos em MO, grupo de risco citogenético de três categorias e número de citopenias em sangue periférico. Tendo por base estas variáveis e a pontuação decorrente das mesmas obteve-se a categorização de quatro grupos de risco: baixo (pontuação 0), intermediário-I (pontuação de 0,5 a 1,0), intermediário-II (pontuação de 1,5 a 2,0) e elevado (pontuação acima de 2,5) (Tabela 2). A categorização destes grupos exibiu significativa diferença na sobrevida global e no risco de progressão para LMA, onde a sobrevida média teve variação de 5,7 anos para pacientes de baixo risco a 0,4 anos para pacientes de risco elevado (GREENBERG, 1997).

Tabela 2: Representação das variáveis estabelecidas no IPSS.

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

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

** Citopenias: contagem de neutrófilos < 100.000/uL, hemoglobina < 10 g/dL.

Fonte: Adaptado de Greenberg et al (1997).

Outro sistema de prognóstico foi proposto por Malcovati et al (2011) no American Society of Hematology 2005 (ASH 2005), o WPSS (*WHO Classification Based Prognostic Scoring System*) (Tabela 3). Neste sistema teve-se a inclusão de variáveis de classificação WHO (BRUNNING, 2008), as categorias de grupos de risco citogenéticos do IPSS (GREENBERG, 1997) e presença ou não de dependência

transfusional, resultando na estratificação de quatro grupos de risco: muito baixo (0 ponto), baixo (1 ponto), intermediário (2 pontos) e alto (3 pontos) (Tabela 3).

Tabela 3: Representação das variáveis estabelecidas no WPSS.

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

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

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

Fonte: Adaptado de Malcovati et al (2005).

Em seguida, o IPSS foi submetido a uma reformulação, originando o IPSS-R (revisado), conservando as variáveis de citogenética, percentagem de blastos e citopenias em SP para aferir o prognóstico de pacientes diagnosticados com SMD (GREENBERG, 2012) (Tabela 4). As alterações se deram pelo aumento de subgrupos citogenéticos de três para cinco subgrupos de estratificação de risco: muito baixo (até 1,5 pontos), baixo (de 1,5 a 3,0 pontos), intermediário (de 3,0 a 4,5 pontos), alto (de 4,5 a 6,0 pontos) e muito alto (acima de 6 pontos), juntamente, com a idade do paciente ao diagnóstico, a dosagem de ferritina sérica e quantificação de lactato desidrogenase (GREENBERG, 2012), tornando o IPSS-R um índice prognóstico mais preciso que o antecessor IPSS (GREENBERG, 1997; GREENBERG, 2012) (Tabela 4).

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

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

Evolução para LMA,
25%, ano

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

1.3 Incidência da SMD

A SMD é considerada uma doença que se evidencia na senescência, acometendo, principalmente, pessoas idosas, onde, aproximadamente, 80% dos pacientes diagnosticados com SMD apresentam idade superior a 60 anos à época do diagnóstico (STROM; VELEZ-BRAVO; ESTEY, 2008). Esta enfermidade apresenta-se rara na infância e sendo incidente, entre as neoplasias hematológicas, em menos de 5% dos pacientes diagnosticados com SMD com idade inferior a 14 anos, e nestes, conferindo, boa apresentação clínica (HASLE, 2003; NIEMEYER, BAUMANN, 2008).

Embora a SMD seja uma doença hematológica comum em indivíduos idosos, onde a verificação da incidência sofre dificuldades em função das classificações em atualização, bem como, a não inclusão nos registros populacionais e a diminuta coleta de MO de idosos para o diagnóstico, acarretando, comprometimento dos dados epidemiológicos, por conseguinte, a verificação da incidência da SMD local, e também, a comparar com outras regiões do mundo (GERMING, 2008; STROM, VELEZ-BRAVO, ESTEY, 2008), onde, mesmo com tais dificuldades, observa-se uma incidência anual de, um pouca mais de 25 casos por 100.000 pessoas, e esta proporção aumenta com com a idade (HELLSTROM-LINDBERG, 2008).

Em 2007, nos Estados Unidos, pesquisadores constataram uma incidência anual de 5,4 a 36,2 por 100.00 indivíduos, com faixa etária de 60 a 84 anos, onde, 86,4% dos pacientes diagnosticados apresentavam mais de 60 anos e 6% tinham menos de 50 anos (MA, 2007). Segundo dados do SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) são diagnosticados anualmente nos Estados Unidos e Comunidade Européia, aproximadamente 12.000 e 20.000 pacientes com SMD, respectivamente, conferindo, assim, um número significativamente maior de casos de SMD do que de leucemias agudas e de doenças mieloproliferativas (GERMING, 2008; STROM, VELEZ-BRAVO, ESTEY, 2008).

Posteriormente, dados mais atuais do SEER, baseados em valores entre os anos de 2007 e 2011, resultaram em uma taxa de incidência global de 4,9 casos por 100.000 indivíduos (COGLE, 2015), onde, a taxa de incidência apresentou-se menor entre indivíduos com idade inferior a 40 anos, com 0,14 casos por 100.000, por outro lado, a taxa de incidência aumenta progressivamente com a idade, configurando, 36 casos por 100.000 indivíduos, em pacientes com idade superior a 80 anos (SEKERES, 2010).

No Brasil, o primeiro trabalho com dados de incidência da SMD, foi realizado por Magalhães et al. (2010) resultando, no Registro de Síndromes Mielodisplásicas – Aspectos demográficos, clínico-patológicos e terapêuticos em centros de atenção terciária, tendo por base, estudo realizado com 476 pacientes diagnosticados com SMD e em tratamento, no período de 1º de janeiro de 2003 a 32 de dezembro de 2007, em 12 centros de atenção localizados nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil (MAGALHÃES, 2010), constatando, uma idade mediana de 68,3 anos nos pacientes diagnosticados com SMD. Este valor, sendo menor que o observado nos Estados Unidos e Europa, e equivalente ao encontrado no Japão e Coreia, onde 50,8% deste, eram mulheres e 86,6% residiam em zona urbana (MAGALHÃES, 2010).

Um estudo mais fidedigno foi realizado por Belli et al. (2015), efetuando um levantamento epidemiológico da SMD na América do Sul, incluindo o Brasil. Este estudo retrospectivo avaliou 1080 pacientes, destes, 635 eram argentinos, 345 brasileiros e 100 chilenos. Dentre os achados, na amostra brasileira foram encontrados uma predominância de pacientes do sexo masculino (193 de 345, com razão de 1,3), uma média de idade de 65 ± 17 anos, uma prevalência de casos de CRDM (105 de 345), seguida de uma segunda prevalência de casos de AREB (89 de 345), exibindo uma prevalência de casos de baixo risco (34% destes), seguidos por casos de risco intermediário (23% destes), segundo o índice prognóstico IPSS (BELLI, 2015).

1.4 Etiologia da Síndrome Mielodisplásica

A SMD é categorizada como primária ou *de novo* e secundário ou relacionada a terapia antineoplásica prévia (t-SMD). A maioria dos casos diagnosticados com SMD está ligada a primária e sem definição da causa, tendo a a idade avançada como fator de risco preponderante, já a SMD secundária está relacionada a evento neoplásico prévio

(LI, 2009; SEKERES, 2010). Esta pode ocorrer em qualquer faixa etária, resultante pós quimioterapia ou pós radioterapia em 4 a 5 anos (NAEIM, RAO, GRODY, 2008).

As t-SMDs concentram a maior parte de anormalidades citogenéticas e maior risco de transformação para leucemia aguda do que as SMDs primárias (NAEIM, RAO, GRODY, 2008). Pacientes diagnosticados com SMD, numa porcentagem de 4% a 5%, podem exibir transformação blástica extramedulares (sarcoma granulocítico), em especial, na pele, associando-se a um ruim prognóstico (NAEIM, RAO, GRODY, 2008).

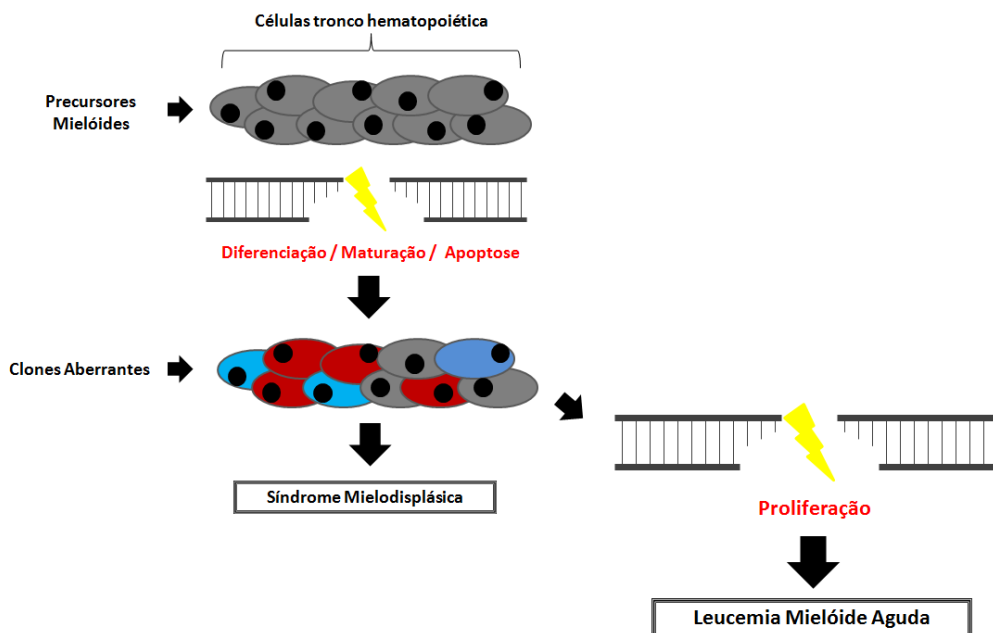
Outras variáveis de risco para SMD foram identificadas por meio de estudos de caráter epidemiológico, por exemplo o tabagismo, exposição a benzeno e outros solventes orgânicos, defensivos e fertilizantes agrícolas, radiações ionizantes, ser do sexo masculino e apresentar histórico familiar de doença hematológica (JÄDERSTEN, HELLSTRÖM-LINDBERG, 2008; BRUNNING, 2008).

Outros fatores de risco para SMD estão relacionados, como a anemia de Falconi, disqueratose congênita, síndrome de Shwachmann-Diamond e síndrome de Diamond-Blackfan (BRUNNING, 2008), bem como, exposição a drogas citotóxicas (por exemplo, agentes alquilantes e inibidores de topoisomerase II) ou a radiações de ordem terapêutica aumentando o risco para t-SMD (JÄDERSTEN, HELLSTRÖM-LINDBERG, 2008).

1.5 Patogênese da Síndrome Mielodisplásica

A SMD apresenta uma complexa patogênese que pode envolver elementos genéticos, epigenéticos e imunomediadores, caracterizando, uma doença clonal de precursores hematopoiéticos (JÄDERSTEN, HELLSTRÖM-LINDBERG, 2008). Esta patogênese pode envolver múltiplos passos, iniciados, certamente, por lesão genética em células tronco, originando, um clone anormal de células hematopoiéticas com disfuncionalidades e morfologia displásica (NAEIM, RAO, GRODY, 2008) (Figura 2).

Figura 2: Representação esquemática da patogênese das Síndromes Mielodisplásicas.



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

A síndrome mielodisplásica é uma patologia paradoxal por apresentar, concomitantemente, citopenias periféricas das três linhagens celulares (a granulocítica, a eritróide e a megacariocítica) e medula óssea hiper celular (OLNEY, LE BEAU, 2002) que prepondera ao final o caráter de citopenia periférica em função do aumento do processo de apoptose das células progenitoras hematopoiéticas (JÄDERSTEN, HELLSTRÖM-LINDBERG, 2008). Na gênese da doença tem-se que as células tronco hematopoiéticas pluripotentes, que são as precursoras mielóides, sofrem injúria em seu DNA, originando um clone mielodisplásico com proliferação exacerbada frente ao clone não aberrante, condizendo, com o quadro de citopenia característico da doença (Figura 2).

A patogênese da síndrome mielodisplásica é iniciada com alterações no material genético de uma célula tronco hematopoiética que sofre transformação maligna consequente, expansão clonal (LOOK, 2005) (Figura 2). Tais alterações podem acarretar interrupção do processo de diferenciação celular levando à displasia, posteriormente, interferindo na proliferação celular e tornando a célula mais sensível à apoptose, favorecendo a expansão clonal do clone aberrante e transformação para LMA (LOOK, 2005; BRUNNING, 2008) (Figura 2).

A SMD relaciona-se muitas vezes com alterações cromossômicas não equilibradas, que podem gerar perda de material genético e inativação de genes supressores tumorais, e por outro lado, outras neoplasias hematológicas com alterações cromossômicas equilibradas, como translocações recíprocas e inversões ocorridas na LMA, geram mutações dominantes e ativação de oncogenes (FEARON, 2002). Um determinado gene pode perder sua função prévia em função de deleção deste, mutação pontual ou pelo silenciamento gênico, via metilação das ilhas CPGs (regiões ricas em citosinas e guaninas) (OLNEY, LE BEAU, 2002). As deleções cromossômicas de caráter terminal ocorrem na maioria das vezes em doenças hematológicas, com perfil variado em patologias oncohematológicas e muito frequentes na Síndrome Mielodisplásica (PINHEIRO, CHAUFFAILLE, SILVA, 2006a).

Atualmente, a citogenética é uma importante ferramenta para determinar de modo heterogêneo, o prognóstico da SMD (BERNASCONI, 2013). Onde, em um cariótipo convencional, cerca de 50% dos pacientes diagnosticados com SMD *de novo* e até 80% dos pacientes com t-SMD apresentam alterações citogenéticas (LEE, 2015). A maior parte destas alterações são eventos genéticos secundários oriundos de instabilidade genômica, e não, integrando uma patogênese primária, exceto a del5q (LEE, 2015). Empregando um estudo de coorte com 2902 pacientes diagnosticados com SMD *de novo*, Schana et al. estipulou um novo escore com 5 grupos de prognóstico citogenético, que foi adicionado ao IPSS-R (SCHANZ, 2012).

1.6 Citogenética e Síndrome Mielodisplásica

As neoplasias podem ter o surgimento facilitado em função de uma predisposição genética constitutiva, juntamente, com mutações somáticas adquiridas ou o acúmulo destas, que somados originam um fenótipo neoplásico, concomitantemente, as alterações cromossômicas fornecem dados para o diagnóstico, prognóstico e/ou tratamento para muitas neoplasias, configurando biomarcadores para processos neoplásicos (KEEN-KIM, NOORAIE, RAO, 2008). Em SMD tem-se descrito diversas alterações citogenéticas recorrentes, passíveis de detecção que agilizam o diagnóstico, o prognóstico e o tratamento dos pacientes, no entanto, não se pode estipular que uma determinada anomalia cromossômica seja, estritamente, relacionada a uma determinada doença hematológica (MALCOVATI, NIMER, 2008).

As aberrações cromossômicas apresentam-se, aproximadamente, em metade dos casos de SMD *de novo* (entre 30% e 50%) e em SMD secundária, esta porcentagem atinge 80% dos casos diagnosticados (NAEIM, RAO, GRODY, 2008; LEE, 2015), excetuando-se, a deleção do 5q (NAEIM, RAO, GRODY, 2008). Ressaltando, que a gravidade e o risco de transformação para LMA, na SMD, sofrem incremento em função da alta frequência de anomalias citogenéticas, sendo de 15% a 20% para subtipos AR e ARSA e de 75% nos subtipos AREB e AREB-t (OLNEY, LE BEAU, 2002).

Um importante achado citogenético foi obtido por Pinheiro, Chauffaile e Silva (2006a), demonstrando, de modo inédito, a correlação do isocromossomo 17q com a deleção do 7q32, indicando, que o achado de i(17) em pacientes diagnosticados com SMD exibem um quadro clínico diferenciado aliado a um perfil prognóstico desfavorável (PINEIRO, CHAUFFAILE, SILVA, 2006a). Posteriormente, Pinheiro, Chauffaile e Silva (2006b) comprovaram que pacientes com t(1,19) no decorrer da progressão de SMD para leucemia mielóide aguda (PINEIRO, CHAUFFAILE, SILVA, 2006b) e um quinto caso de SMD com 9q- relacionadas com outras aberrações cromossômicas detectadas por banda G (PINHEIRO, 2004), verificando, que a translocação entre o cromossomo 1 e 19 ocorre mais, frequentemente, em crianças portadoras de leucemia linfóide aguda, apresentando um prognóstico desfavorável (PINHEIRO, CHAUFFAILE, SILVA, 2006) e somente 4 casos de t(1,19)(p12,p11) tinham sido descritos no mundo à época (ANDO, 2002; TCHINDA, 2002).

Em SMD primária ou secundária, as deleções cromossômicas são as aberrações mais, comumente, evidenciadas em aproximadamente, 50% dos casos diagnosticados (KEEN-KIM; NOORAIE; RAO, 2008; HAASE, 2008). As deleções, geralmente, são intersticiais e apresentam-se, frequentemente, nos cromossomos 5q, 7q, 20q, 11q, 13q, 12p e 17p (KEEN-KIM; NOORAIE; RAO, 2008; HAASE, 2008). Posteriormente, as monossomias, trissomias e translocações desequilibradas são as anomalias cromossômicas mais evidenciadas, em 15% dos pacientes. As monossomias frequentes em SMD são relativas aos cromossomos 5, 7 e a nulissomia do Y (KEEN-KIM; NOORAIE; RAO, 2008; HAASE, 2008), mesmo que as translocações equilibradas sejam aberrações cromossômicas, relativamente, comuns em doenças mielóides, em

especial na LMA, possuem achados raros em SMD (KEEN-KIM; NOORAIE; RAO, 2008; HAASE, 2008).

1.7 Lesões no DNA

O genoma de seres eucariontes, em especial dos seres humanos, são, constantemente, modificados por agentes endógenos resultantes do metabolismo celular, e, primariamente, por metabólitos da via de respiração mitocondrial, bem como, por agentes exógenos, sejam ambientais, físicos, químicos e biológicos, como por exemplo, temperatura alta, luz ultravioleta, radiação ionizante, metais pesados, poluentes do ar e quimioterápicos (LINDAHL, 1993). Pode-se estimar que, diariamente, ocorram mais de 10.000 lesões ao DNA / dia (HOEIJMAKERS, 2009) (Figura 3).

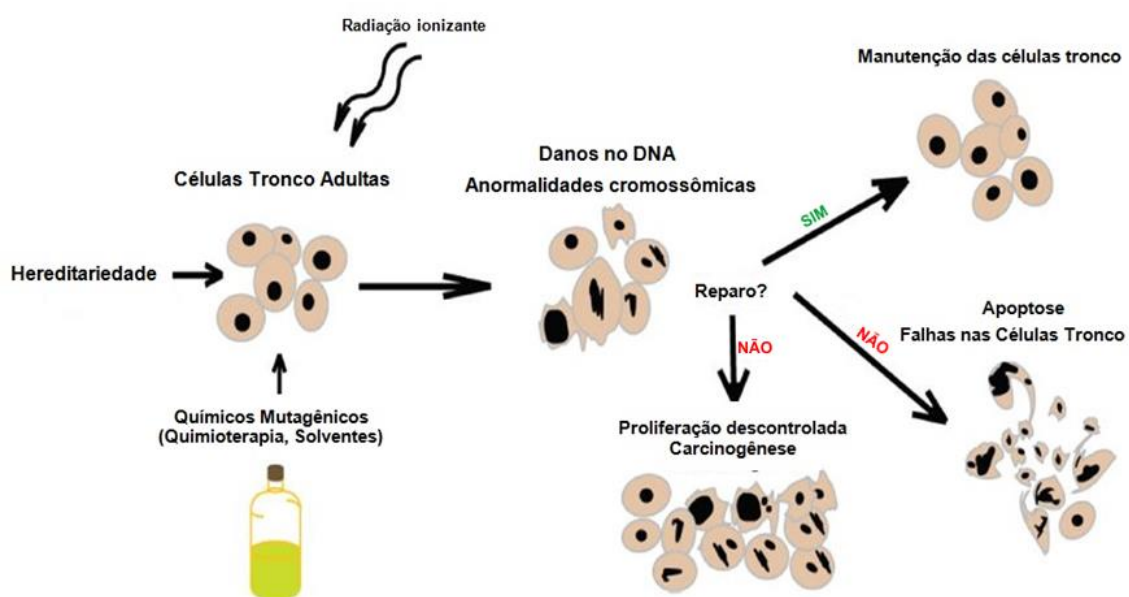
Tais lesões ao DNA, quando não corretamente corrigidas, podem originar mutações cumulativas em genes importantes para o metabolismo e crescimento celular normal, podendo contribuir para o surgimento de doenças. Sendo assim, a manutenção da integridade do material genético é de fundamental importância para a viabilidade de células saudáveis, onde estas apresentam uma maquinaria de reparo eficaz contra as lesões do DNA, muitas vezes, eficiente no reparo de quase todas as injúrias ao genoma (HOEIJMAKERS, 2009).

Quando as lesões geram danos que não foram, devidamente reparados, ocorrem mudanças biológicas funcionais e/ou estruturais, como por exemplo, alterações de transcrição gênica, falha em processo de reprodução, mutações herdáveis ou não herdáveis, morte celular adiantada ou tardia e doenças, como o câncer (OZTURK e DEMIR, 2011), podendo contribuir para o envelhecimento precoce, doenças relacionadas à senescência e neurodegeneração (IYAMA e WILSON, 2013). Tais mudanças são oriundas da instabilidade genômica, que se instalou por falha na manutenção e replicação do genoma ou massiva exposição a agentes carcinogênicos (LANGIE, 2015).

A resposta ao estresse genotóxico que ocorre por meio de uma cascata de sinalização, onde a lesão ao DNA, atua como um iniciador do processo de reparo, é detectada por proteínas de reconhecimento e prossegue para os efetores, por meio de proteínas membranares e/ou citosólicas (DUROCHER; JACKSON, 2001).

Em organismos complexos existem algumas linhas de defesa contra o dano e conservação deste, ao DNA celular. Primeiramente, os agentes protetivos contra a formação do dano genético, por exemplo, peptídeos detoxificantes e os antioxidantes, vitamina C e E (OZTURK e DEMIR, 2011). Secundariamente, tem-se as vias de reparo ao DNA que removem o erro existente, reduzindo assim, a probabilidade de mutações. Por final, tem-se a atuação da apoptose, morte celular, quando a lesão gênica persiste pós atuação do mecanismo de reparo ao DNA. Independentemente, da linha de defesa da integridade do DNA, a manutenção da integridade do genoma é de suma importância à célula (KENYON; GERSON, 2007; ORTURK e DEMIR, 2011), sendo elemento imprescindível à viabilidade e manutenção de um organismo saudável (KENYON; GERSON, 2007; IYAMA e WILSON, 2013).

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



Fonte: Adaptado de Kenyon (2007).

1.8 Mecanismos de reparo ao dano no DNA

Os mecanismos de reparo do DNA são divididos, inicialmente, em mecanismo de reparo de fita dupla de DNA e mecanismo de reparo de fita simples de DNA. O reparo de fita dupla de DNA (*Double Strand Breaks - DSBs*) é composto pelo reparo de junções por extremidades não homólogas (*Non-Homologous End-Joining - NHEJ*) e a recombinação homóloga (*Homologous Recombination - HR*). E o reparo de fita simples de DNA (*Single Strand Breaks - SSBs*) é composto pelo reparo de excisão de base (*Base Excision Repair - BER*), reparo de erros de emparelhamento de bases (*Mismatch Repair - MMR*) e reparo por excisão de nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair - NER*) (IYAMA e WILSON, 2013).

1.8.1 Mecanismo de reparo de fita dupla de DNA

As lesões de fita dupla acarretam danos mais severos ao DNA, ativando o mecanismo de morte celular, caso não ocorra pareamento da falha, e promovendo instabilidade ao genoma (BOHGAKI, BOHGAKI e HAKEM, 2010), tais lesões podem ser originadas pela ação deletéria de radicais livres endógenos que foram produzidos ou induzidos por fontes exógenas como as drogas antineoplásicas (IYAMA e WILSON, 2013).

Dentro deste mecanismo central existe a via de reparo por recombinação homóloga (HR) que requer uma cromátide-irmã homóloga para ser executado o reparo do DNA e a via de reparo de junções por extremidades não homólogas (NHEJ), que pode atuar em células que estejam ou não em divisão celular, não necessitando de uma sequência homóloga de controle, acarretando a esta via uma maior chance de erro do reparo (OZTURK e DEMIR, 2011). Várias doenças são originadas da deficiência funcional das vias HR e NHEJ, conferindo defeitos no desenvolvimento imunológico e neurológico, bem como sensibilidade a radiação, fenótipos de envelhecimento precoce e predisposição ao câncer (IYAMA e WILSON, 2013).

1.8.2 Mecanismo de reparo de fita simples de DNA

1.8.2.1 Reparo por excisão de base

O mecanismo de reparo por excisão de base (BER) foi descrito pela primeira vez por Tomas Lindahl (LINDAHL, 1974) como sendo a via de reparo de DNA para a maioria das lesões advindas de processos endógenos ou induzidos por exposição a agentes químicos exógenos ou radiação (DIANOV e HUBSCHER, 2013). Este mecanismo objetiva remover nucleotídeos danificados e, geralmente, é recrutado por uma das várias DNA glicosilases substrato-seletivas que reconhecem e retiram alterações de bases (WILSON, 2010). As lesões removidas do DNA pelo mecanismo BER são: uracil incorporados, pirimidinas fragmentadas, purinas N-alkiladas (7-metilguanina, 3-metiladenina, 3-metilguanina, 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-OxoG), timinaglicol e outros (WILSON, 2010).

Os sítiosapurínicos (perda de Adenina ou Guanina) ou apirimidínicos (perda de Timina ou Citosina), também denominados de regiões abásicas (DIANOV e HUBSCHER, 2013), são originados após a remoção de bases errôneas e as bases corretas são sintetizadas por uma polimerase, ao final, as extremidades livres são conectadas por ligases. Onde o mecanismo BER é composto por duas subvias: uma curta (*Short-Patch Repair - SRP*) e uma longa (*Long-Patch Repair - LRP*) (OSTURK e DEMIR, 2011). Na via curta, somente um nucleotídeo é retirado pela DNA-glicosilase, seguida da atuação de uma AP endonuclease (APE1) que forma as extremidades de DNA necessárias ao início da resíntese. Por conseguinte, uma DNA polimerase β efetua a inserção do nucleotídeo correto ao sítio abásico. Por final, a ligação é realizada por uma DNA ligase III. Na via longa, uma quantidade de 2 a 10 nucleotídeos são retirados e as bases corretas são inseridas pelas enzimas polimerase δ e ϵ , juntamente, com a atuação do fator de replicação C (RPC) e o antígeno nuclear de proliferação nuclear (PCNA). Ao final, as extremidades livres são unidas pela DNA ligase I (DIZDAROGLU, 2015).

1.8.2.2 Reparo de erros por emparelhamento de bases

O mecanismo de reparo de erros por emparelhamento de bases (MMR) atua na remoção de bases mal pareadas formadas por agentes exógenos e endógenos, que acarretam deaminação oxidação e metilação de bases, bem como, erros de pareamento

oriundos de inserções, deleções e erros de replicação (OSTURK e DEMIR, 2011). Os erros de replicação do DNA fazem incorporações de nucleotídeos errados a cada 10^7 adições, onde, aproximadamente, 0,1% destes erros não podem ser reparados pelo sistema MMR e acarretam mutações (FISHEL, 2015). O mecanismo MMR possui procedimentos simples de reconhecimento da lesão no DNA, discriminação da fita, excisão e reparo do erro (RICHMAN, 2015). Em mamíferos, as proteínas homólogas MutS (MSH1-6, MLH1 e MLH3) MutL (PMS1 e PMS2) efetuam o reconhecimento dos sítios com erros de pareamento. Em seguida, as bases mal pareadas são retiradas pela enzima exonuclease I e novos nucleotídeos são sintetizados pela polimerase δ (OSTURK e DEMIR, 2011). Defeitos na via MMR acarretam instabilidade de microssatélites, ocorrendo em 15% dos cânceres colorretais, estando também envolvidos de câncer de endométrio, câncer de ovário, câncer de estômago e melanoma (RICHMAN, 2015).

1.8.2.3 Reparo por excisão de nucleotídeo

O reparo por excisão de nucleotídeo (*Nucleotide Excision Repair - NER*) é um mecanismo que efetua reparos em longos segmentos de fita simples de DNA, compreendidos entre 22 a 30 nucleotídeos, que geram uma distorção da dupla hélice (ROUILLION e WHITE, 2010). Este sistema faz o reparo de danos causados por diversos agentes, dentre eles, os dímeros de pirimidina ciclobutano (*Cyclobutane Pyrimidine Dimers - CPDs*), os fotoprodutos da 6-4 pirimidina pirimidona (*6-4 Pyrimidine Pyrimidone Photoproducts - 6-4PPs*), lesões induzidas por radiação ultravioleta (UV), agentes químicos exógenos (benzenos e outros solventes orgânicos), quimioterápicos (como a cisplatina) e ciclopurinas geradas por espécies reativas de oxigênio (MARTEIJN, 2014). Em organismos eucarióticos, tem-se a atividade de, em média, 30 proteínas no NER, configurando três grandes processos internos: (1) a detecção do erro, (2) a verificação do dano causado e (3) remoção do erro, seguindo da ressíntese de um novo segmento (KUPER e KISKER, 2012).

No mecanismo NER atuam proteínas com atividades principais na via, as proteínas do *Xeroderma Complementation Group*, de XPA a XPG; a proteína *Excision Repair Complementation group 1 (ERCC1)*, homólogo B da proteína de reparo RAD23 (RAD23B), a *Replication Protein A (RPA)*, as subunidades *Transcription Factor*

(TFIIH) e as proteínas *Cockayne Syndrome A (CSA)* e *Cockayne Syndrome (CSB)* (BARAKAT, GAJEWSKI, TUSZYNSKI, 2012).

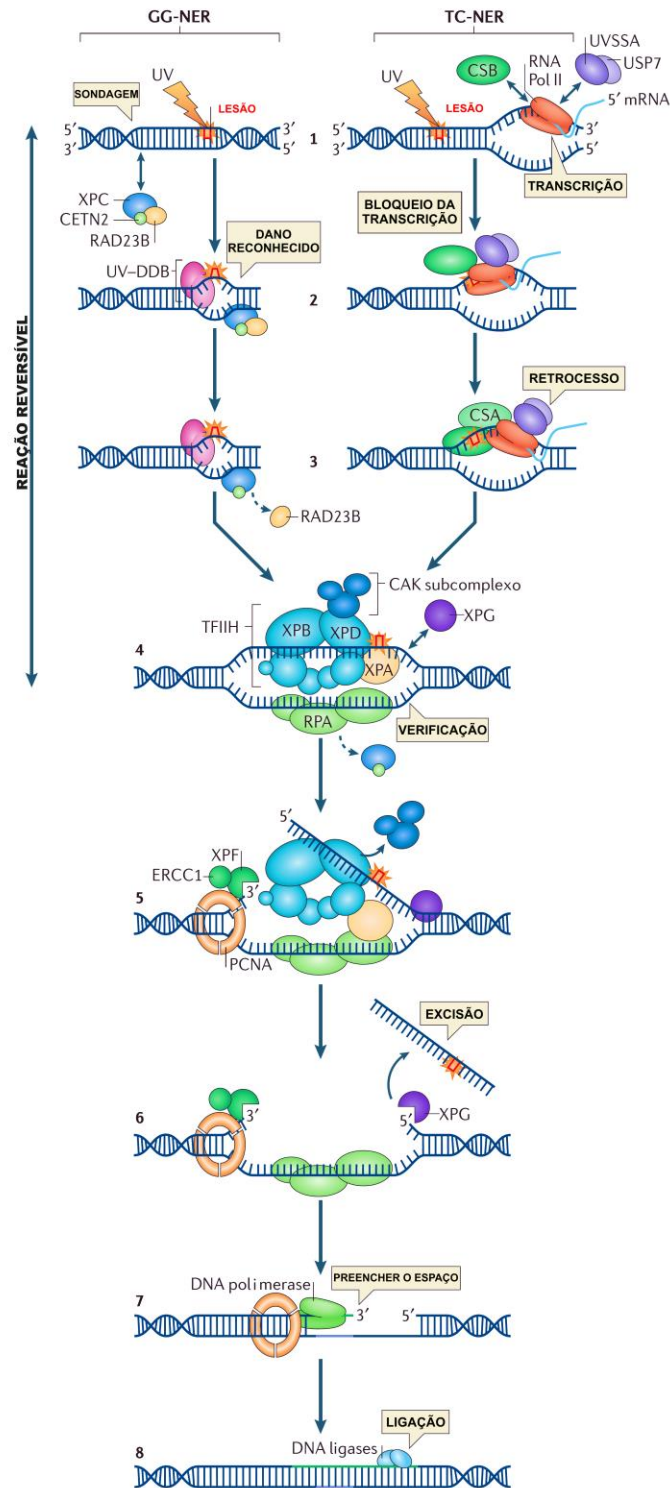
A gênese do mecanismo NER é dividida em duas subvias, NER do genoma global (*Global Genome NER – GG-NER*) e NER acoplado a transcrição (*Transcription Coupled NER – TC-NER*) que, posteriormente se confluem. O GG-NER efetua a remoção de lesões em qualquer parte do genoma, sendo iniciado por distorções da dupla hélice, e o TC-NER, que faz reparo de erro em fita molde para transcrição, sendo iniciado quando ocorre a parada da elongação da enzima RNA polimerase II (RNA Pol II), quando esta efetua o processo de transcrição (ALEKSEEV e COIN, 2015) (Figura 4).

O processo GG-NER é iniciado pelo XPC na sondagem de lesões de distorção da hélice de DNA, que ao detectar algum erro (Passo 1 – Figura 4), recruta o complexo UV-DDB (*Ultraviolet – UV – radiation DNA Damage Binding Protein*) para anelar ao erro na fita, fazer a eversão do erro e em seguida, tem-se o anelamento do complexo XPC, RAD23B e centrina 2 (CETN2) (Passo 2 – Figura 4), posteriormente, tem-se a dissociação do proteína RAD23B do complexo, que marca a entrada do GG-NER na via central do NER (Passo 3 – Figura 4). Em relação da subvia TC-NER, o reconhecimento do erro ocorre durante o processo de transcrição (Passo 1 – Figura 4), quando tem-se a parada da elongação da RNA polimerase II na lesão e ligação do complexo proteico UVSSA (*UV Stimulated scaffold protein A*) e USP7 (*Ubiquitin Specific processing Protease 7*), imediatamente, seguido também, da proteína CSB à RNA Pol II (Passo 2 – Figura 4). Posteriormente, a proteína CSA liga-se a proteína CSB (que já está dentro do complexo UVSSA+USP7) fazendo com que ocorra o início do retrocesso de transcrição para tornar a lesão acessível (Passo 3 – Figura 4), isto marca a entrada do TC-NER na via central do NER.

A via central do NER (confluência do GG-NER e TC-NER) é iniciada com o recrutamento complexo TFIIH (*Transcription Initiation Factor IIH*), que é formado por um subcomplexo da CAK (*CDK activating kinase*), XPB, XPD e XPA, ERCC5 (XPG), na fita que contém a lesão, e pelas proteínas RPA na fita que não contém erro para estabilizar (Passo 4 – Figura 4). O complexo TFIIH efetua a abertura da dupla hélice (TFIIH tem atividade helicase), XPD faz a verificação da lesão e recruta XPA para fazer

a eversão da lesão, em seguida XPG anela-se a fita com erro na porção 3' e pela porção 5', XPA recruta o complexo PCNA (que faz a contenção da dupla hélice), ERCC1 e XPF, estes dois últimos fazem a clivagem no segmento 5' da lesão e tem-se a abertura a fita com lesão e libera o subcomplexo CAK (Passo 5 – Figura 4). Após a atuação do complexo PCNA, ERCC1 e XPF, o complexo TTFIIH desconecta-se da fita com lesão e a proteína XPG (que tem atividade endonuclease) secciona o segmento que contém a lesão (Passo 6 – Figura 4). Com esta abertura, permanece a proteína PCNA, desconecta-se deste o subcomplexo ERCC1 e XPF (que recrutam DNA polimerases), desconectam-se as proteínas RPAs da fita sem erro (RPA faz a contenção estérica da fita sem erro), e na proteína PCNA tem-se a ligação da DNA Pol δ , DNA Pol κ ou DNA Pol ϵ , efetuando a confecção de uma nova fita sem erros (Passo 7 – Figura 4). Ao final da elongação da nova fita a união das extremidades é feita pela DNA ligase 1 ou DNA ligase 3 (Passo 8 – Figura 4) (MARTEIJN, 2014).

Figura 4: Representação esquemática das vias do reparo por excisão de nucleotídeo (Nucleotide excision repair pathways – NER).



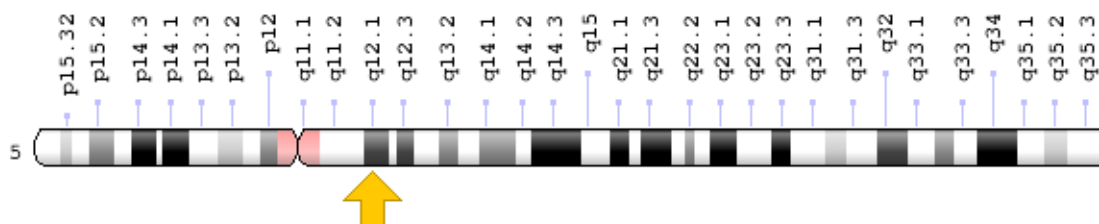
LEGENDA: Duas vias do NER em mamíferos: GG-NER (*Genome Global Repair*) e TC-NER (*Transcription-Coupled Repair*). Em GG-NER: (1) Sondagem e reconhecimento da lesão pelo complexo XPC-RAD23B-CETN2, (2) Anelamento da UV-DDB com eversão da lesão e anelamento do complexo XPC-RAD23B-CETN2, (3) dissociação da proteína RAD23B. EM TC-NER: (1) o reconhecimento do erro ocorre durante o processo de transcrição, (2) parada da elongação da RNA polimerase II, (3) proteína CSA liga-se a proteína CSB (+UVSSA+USP7). Na via central do NER: (4) recrutamento complexo TFIIH (CAK, XPB, XPD e XPA) e anelamento de XPG e RPA, (5) anelamento do complexo PCNA, ERCC1 e XPF, abertura da fita por TFIIH e saída de CAK, (6) excisão por XPG do segmento com lesão, (7) anelamento de DNA polimerase e (8) finalização da elongação pela DNA ligase. (FONTE: Adaptado de MARTEIJN, 2014)

1.8.3 Genes de reparo por excisão de nucleotídeo - NER

1.8.3.1 Gene *ERCC8* (*CSA*)

O gene *ERCC8*(*CSA*) possui, aproximadamente, 2kb, organizando-se em 12 exons no braço longo do cromossomo 5, posição 5q12.1, e codifica um polipeptídeo de 396 aminoácidos, totalizando, 44kDa. A nomenclatura do gene *ERCC8* (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 8) também compartilha o nome *CSA*, em função da patologia Cockayne syndrome A configurar anomalia na subvia de reparo TC-NER (SAIJO, 2013; LANZAFAME, 2013). (Figura 5).

Figura 5: Representação do cromossomo 5 e a indicação (seta amarela) da localização do gene *ERCC8*.



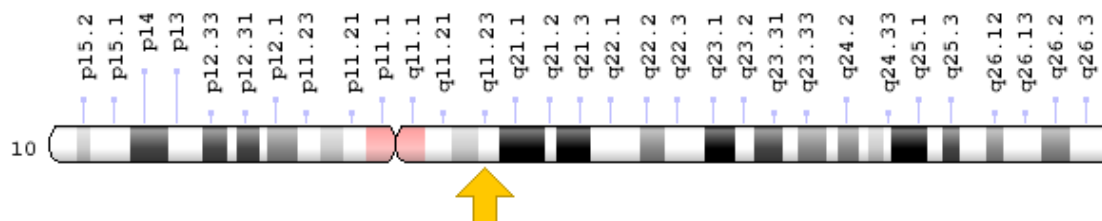
<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ERCC8#location>

A proteína *CSA* atua, conjuntamente, com a proteína *CSB* por interação direta, onde *CSA* efetua o retrocesso da RNA polimerase II quando ocorre a parada do processo de transcrição gênica efetuada pela proteína *CSB* na subvia de reparo de DNA TC-NER. *CSA* é crítica não somente para a transcrição pela RNA polimerase II, como também é para a RNA polimerase I e a biogênese ribossomal que ocorre no núcleo celular, pois experimentos indicaram que a síndrome de Cockayne configura-se por uma ribossomopatia. (KOCH, 2014). O polipeptídeo *CSA* também atua no controle de ubiquinização das proteínas *CSB* e *p53* no sistema proteassomo, com função de controle de atuação do *p53* (AAMANN, 2013)

1.8.3.2 Gene *ERCC6* (*CSB*)

O gene *ERCC6*(*CSB*) possui, aproximadamente, 7kb, no braço longo do cromossomo 10, posição 10q11.23, e codifica um polipeptídeo de 1493 aminoácidos, totalizando, 168kDa (TROELSTRA, 1992). A nomenclatura do gene *ERCC6* (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6) também compartilha o nome *CSB*, em função da patologia Cockayne syndrome B configurar uma anomalia na subvia de reparo TC-NER (TROELSTRA, 1992) (Figura 6).

Figura 6: Representação do cromossomo 10 e a indicação (seta amarela) da localização do gene *ERCC6*.



<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ERCC6#location>

A proteína CSB atua na parada da elongação da RNA polimerase II quando esta atinge uma lesão de DNA, conseqüentemente, forma um complexo com CSA, UVSSA e USP7, para iniciar o retrocesso da RNA polimerase II e o reparo da lesão (MARTEIJN, 2014).

Fora do mecanismo de reparo de fita simples de DNA, o peptídeo CSB atua como modulador da p53 efetuando, a ubiquitinação do p53 quando fosforilado, juntamente com CSA, a manter em níveis basais de p53 para a homeostase celular (LATINI, 2011), bem como a proteína CSB é promotora de autofagia mitocondrial quando ocorre acúmulo de lesões no DNA da mitocôndria (SCHEIBYE-KNUDSEN, 2012).

Células CS-B (Cockayne syndrome – B cells) são hipersensíveis aos danos de origem oxidativa e por radiação ionizante (CRAMERS, 2011). Bem como, a proteína CSB interage com a proteína p53 por meio de modulação recíproca em diferentes mecanismos, evidenciando que células CS (Cockayne syndrome cells) possuem altos

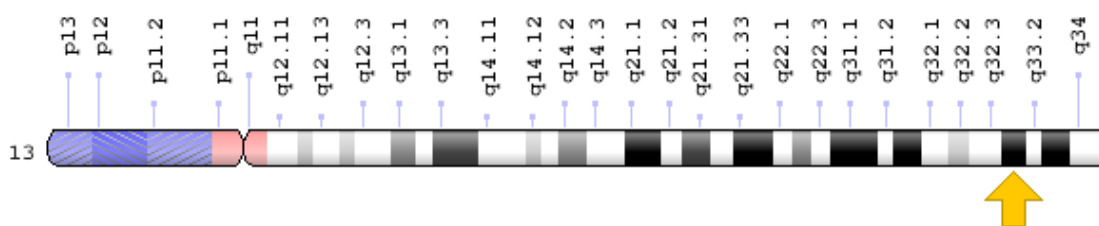
níveis basais de proteína p53 quando comparadas com células normais (LATINI, 2011; VELEZ-CRUZ, 2013).

Pacientes acometidos pela síndrome de Cockayne, geralmente, não desenvolvem câncer e sim fenótipo de envelhecimento precoce com outras comorbidades, em função das altas taxas de proteína p53, que atua, justamente, como fator protetivo (VELEZ-CRUZ, 2013; KEIZER, 2010; MAIER, 2004; TYNER, 2002). Defeitos de processo de transcrição acarretam forte resposta do processo de apoptose em células CS-A e CS-B, contribuindo com fenótipo de neurodegeneração e proteção contra câncer (LANFAZAME, 2013).

1.8.3.3 Gene *ERCC5* (*XPG*)

O gene *ERCC5*(*XPG*) possui, aproximadamente, 30,2kb, organizado em 15 exons, no braço longo do cromossomo 13, posição 13q33.1 e codifica um polipeptídeo de 1186 aminoácidos, totalizando, 133,1kDa. A nomenclatura do gene *ERCC5* (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5) também compartilha o nome *XPG*, em função da patologia Xeroderma Pigmentosum group G configurar uma anomalia da via de reparo NER (JIANG, 2015). (Figura 7).

Figura 7: Representação do cromossomo 13 e a indicação (seta amarela) da localização do gene *ERCC5*.



<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ERCC5#location>

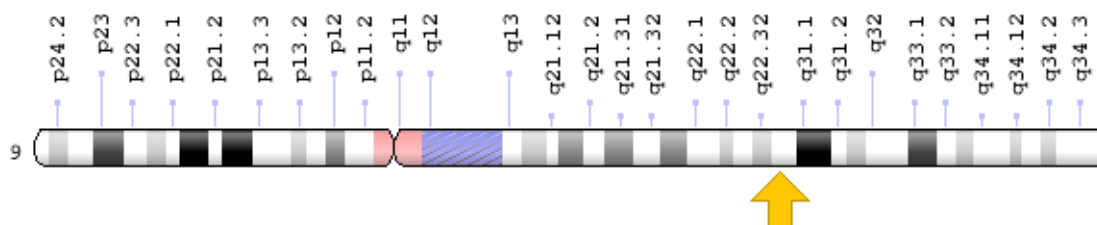
O gene *ERCC5* (*XPG*) tem função de endonuclease, cortando o DNA na porção 3' durante o processo de reparo de fita simples de DNA pelo NER (TSE, 2008; MACHADO, 2014; McCULLUGH, 2014), juntamente com a proteína XPF efetuam a excisão do fragmento de DNA, entre 22 e 32 nucleotídeos (ZENG, 2015; ZOU, 2015).

Polimorfismos no gene *ERCC5(XPG)* estão associados a maior risco de câncer de cabeça e pescoço na população Asiática (JIANG, 2015), ao câncer de mama em fumante (NA, 2015; DING, 2011) e ao câncer de estômago (DUAN, 2012). Bem como, polimorfismo simples de nucleotídeo (Single nucleotide polymorphisms - SNP), no caso o rs17655, está associado ao desenvolvimento de câncer colorretal (ZENG, 2015). Onde desordens no mecanismo de reparo de fita simples de DNA, em função de anomalias do gene *ERCC5(XPG)* conferem com instabilidade genômica (ZENG, 2015).

1.8.3.4 Gene *XPA*

O gene *XPA* possui, aproximadamente, 43kb, organizado em 10 exons, está localizado no braço longo do cromossomo 9 na posição 9q22.3 e codifica um polipeptídeo de 273 aminoácidos, totalizando, 31,4kDa. A nomenclatura do gene *XPA* compartilha essa denominação em função da patologia Xeroderma Pigmentosum group A, configurada por uma anomalia da via de reparo NER (FU, 2015). (Figura 8).

Figura 8: Representação do cromossomo 9 e a indicação (seta amarela) da localização do gene *XPA*.



<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/XPA#location>

A proteína *XPA* tem função de verificador da lesão de DNA, atuando em conjunto com o complexo TFIIH (que tem atividade helicase), a proteína *RPA* (para estabilização da fita oposta), o complexo *XPF-ERCC1* e *ERCC5(XPG)*, os dois últimos com atividade endonuclease (MARTEIJN, 2014). Mutações do gene *XPA* inviabilizam o reparo de DNA via NER e direcionam para o reparo via BER (Base excision repair) das lesões por estresse oxidativo e tal mutação caracteriza a Síndrome de De Sanctis-Cacchione (MARTEIJN, 2014).

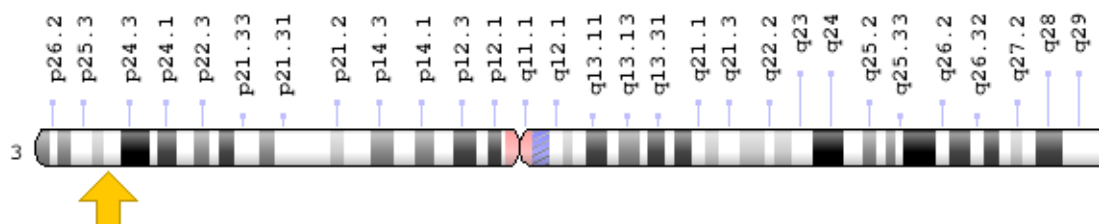
Baixos níveis de expressão do gene *XPA* induzidos por radiação ionizante acarretam aberrações cromossômicas, ressaltando a importância da atuação do gene

XPA no mecanismo de reparo de fita simples de DNA pelo NER (SASSA, 2015; ZHANG, 2009).

1.8.3.5 Gene *XPC*

O gene *XPC* possui, aproximadamente, 33,6kb, organizado em 16 exons, está localizado no braço curto do cromossomo 3 na posição 3p25.1 e codifica um polipeptídeo de 940 aminoácidos, totalizando, 105kDa. A nomenclatura do gene *XPC* compartilha essa denominação em função da patologia Xeroderma Pigmentosum group C, configurada por uma anomalia da subvia de reparo GG-NER (JIANG, 2015). (Figura 9).

Figura 9: Representação do cromossomo 3 e a indicação (seta amarela) da localização do gene *XPC*.



<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/XPC#location>

A proteína XPC tem função de sensoriamento de lesão em fita simples de DNA, juntamente com as proteínas RAD23B e CETN2, formando um trímero que anela a fita simples de DNA não lesionada, bem como, possui outros sítios de ligação (domínios de interação) para as proteínas XPA, p62, OGG1, DDB2 e XPB, que atuam na central do NER (PUUMALAINEN, 2016). A ação da proteína XPC ocorre pelo reconhecendo de nucleotídeos não pareados por causa da lesão acarretar uma deformação na dupla hélice de DNA (MARTEIJN, 2014; PUUMALAINEN, 2016).

As lesões são induzidas por radiação UV natural ou artificial, acarretando fotoprodutos como os dímeros de pirimidina ciclobutano (Cyclobutane pyrimidine dimers - CPDs) e 6-4- pirimidina pirimidona (6-4-pyrimidine pyrimidone photoproducts – 6-4PPs), que consequentemente, geram distorções na fita dupla de DNA (MARTEIJN, 2014; PUUMALAINEN, 2016).

Em resposta a exposição da luz UV, radiação ionizante ou agentes alquilantes, o gene *XPC* tem sua atuação modulada pelo gene *p53* (supressor tumoral) (PUUMALAINEN, 2016). Um outro modulador do gene *XPC*, o transcrito do gene *BRCA1*, que está relacionado ao câncer de mama e ovário, pode interferir na atuação do *XPC*, conseqüentemente, na subvia GG-NER, levando a acúmulos de lesões no DNA e mutações do *p53*, acarretando defeitos no sistema NER e instabilidade genômica (PUUMALAINEN, 2016; HARTMAN, 2002).

1.8.4 Patologias relacionadas a mutações nos mecanismos de reparo do DNA

1.8.4.1 Xeroderma pigmentoso

O xeroderma pigmentoso (*Xeroderma pigmentosum* - XP) é uma doença genética rara, de caráter autossômica recessiva, que caracteriza-se por ter risco aumentado para câncer de pele e de mucosa, induzidos por radiação UV, bem como, para tumores cerebrais, leucemias, carcinomas gástricos e pulmonares (DIGIOVANNA e KRAEMER, 2012).

A patologia apresenta manifestações de hipersensibilidade a radiação UV, queimaduras de pele a UV, eritema persistente a mínima exposição ao Sol, fotofobia, keratinose severa (com progressão para opacificação da córnea), perda auditiva progressiva, botões de atrofia de pele e aumento de risco para neoplasia de pele a partir da segunda década de vida (carcinoma de células basais, carcinoma de células escamosas e melanoma) (MARTEIJN, 2014).

Epidemiologicamente, aproximadamente, 25% dos pacientes com XP desenvolvem sintomas neurológicos, como: microcefalia, deterioração mental, ataxia cerebelar, surdez neurossensorial e neuropatia periférica, em suspeita de envolvimento de atrofia cerebral.

A disfunção do sistema de reparo de DNA relaciona-se com as proteínas de XPA e XPG, que são componentes da via de reparo NER. A disfunção destas proteínas acarreta o acúmulo de lesões ao DNA, disfunção da replicação e/ou mutação nas células em divisão celular (IYAMA e WILSON, 2013).

1.8.4.2 Síndrome de Cockayne

A síndrome de Cockayne (Cockayne syndrome - CS) é uma enfermidade genética autossômica recessiva acarretada por mutações nos genes *CSA* e *CSB*, que são genes intrínsecos da via TC-NER. Apresenta manifestações neurológicas (retardo do desenvolvimento neuropsíquico e cognitivo, microcefalia, alterações da motricidade, convulsões e cefaléia), oftalmológicas (redução da lacrimação, catarata, hipoplasia óptica, retinopatia pigmentosa, presbiopia, nistagmo, microcórnea), otorrinolaringológicas (diminuição da audição, atrofia da mucosa nasal, tonsilas hipotróficas e fenda palatina) e anormalidades dentárias (cáries, retardo da erupção dentária, má oclusão e dentes hipoplásicos) (GUARDIOLA, 1999). A forma juvenil caracteriza-se por ser a mais grave com fotossensibilidade, microcefalia, retardo de desenvolvimento, surdez sensorial, nanismo e envelhecimento precoce (NATALE, 2011).

Na síndrome de Cockayne (SC) a atuação das proteínas *CSA* e *CSB* é regida por interação direta entre si e com a proteína p53 (que também interfere diretamente, na modulação da proteína *CSB*) (VELEZ-CRUZ, 2013), onde elevadas taxas de p53 interferem na biogênese ribossomal, contribuindo, com degeneração e envelhecimento precoce na síndrome de Cockayne (KOCH, 2014). A patologia não exibe incidência aumentada para câncer, como ocorre no XP, denotando defeitos moleculares diferentes e, conservando a via GG-NER (KRAEMER, 2007).

1.8.4.3 Tricotiodistrofia

A tricotiodistrofia (Trichothiodystrophy - TTD) configura-se por ser uma patologia genética de caráter autossômico recessivo que manifesta-se com pele seca de aspecto ictiosiforme, alterações em pêlos e unhas, alopecia, retardo do crescimento, desmielinização, imaturidade sexual e cáries dentárias, sendo alterações que compartilham a mesma origem neuroectodérmica com características de transcrição (MARTEIJN, 2014; PUYA, 2007). Em manifestações mais avançadas com características de defeito do sistema NER tem-se fotossensibilidade (cerca de 50% dos casos), lesões pigmentadas na pele, degeneração neural e câncer de pele (PUYA, 2007). Podendo compartilhar manifestações clínicas da síndrome de Cockayne e do xeroderma pigmentoso (KRAEMER, 2007).

Associa-se a defeitos na subvia de reparo da via central do NER, por meio de mutações nos genes XPB, XPD e TTDA (que integram complexo TFIIH) (MARTEIJN, 2014). A TTD interfere no processo de transcrição celular durante os estágios finais de diferenciação de cabelos, unhas e pele, tendo baixas concentrações enxofre tissular (THEIL, 2013; PUYA, 2007).

1.9 Importância do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo – NER

A integridade do genoma humano é vital para a homeostase celular, e consequentemente, para o organismo. Diariamente o DNA humano é submetido a 10^4 a 10^5 injúrias, sejam endógenas ou exógenas (HOEIJMAKERS, 2009). O que mostra a necessidade de manutenção da integridade do material genético, função esta desempenhada pelos mecanismos de reparo de DNA, que em eucariotos, existem os sistemas de reparos de fita dupla de DNA e de reparos de fita simples de DNA (IYAMA, 2013).

Quando os mecanismos de reparos não atuam corretamente, tem-se a formação de lesões de DNA, podendo originar modificações biológicas como alterações na transcrição gênica, falhas de reprodução, desenvolvimento ineficaz, mutações, morte celular e neoplasias (OZTURK e DEMIR, 2011).

Alterações nos mecanismos de reparo de fita simples de DNA podem reproduzir doenças com muitas manifestações. A observação da diversidade clínica e a especificidade do acometimento fenotípico dessas doenças, podem inferir que defeitos relacionados ao GG-NER relacionam-se com mutações e neoplasias, e ao TC-NER relacionam-se com mal funcionamento e morte celular, e envelhecimento precoce (IYAMA, 2013).

Atualmente, tem-se um progressivo conhecimento sobre a etiologia da SMD, quanto a mutações e alterações cromossômicas que desencadeiam a doença, por outro lado existe a necessidade de angariar conhecimento quanto a lesões de fita simples de DNA relacionadas a doença (ARBER, 2016). Motivo pelo qual o corrente estudo efetuou a avaliação da expressão dos genes *ERCC8 (CSA)*, *ERCC6(CSB)*, *ERCC5(XPG)*, *XPA* e *XPC*, em *pool* de medula óssea, relacionando com variáveis clínico-laboratoriais de pacientes diagnosticados com síndrome mielodisplásica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

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

2.2 Objetivos específicos

1. Detectar as alterações cromossômicas pelo estudo do cariótipo por banda G em cultura de curta duração *in vitro* da medula óssea de pacientes com SMD;
2. Avaliar o papel da expressão dos genes *ERCC8 (CSA)*, *ERCC6 (CSB)*, *ERCC5 (XPG)*, *XPA* e *XPC* quanto às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD;
3. Mensurar as correlações de expressão entre os genes *ERCC8 (CSA)*, *ERCC6 (CSB)*, *ERCC5 (XPG)*, *XPA* e *XPC*;
4. Averiguar a expressão dos genes *ERCC8 (CSA)*, *ERCC6 (CSB)*, *ERCC5 (XPG)*, *XPA* e *XPC* quanto a análise de sobrevida global.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Neste estudo foram incluídas 84 amostras de *pool* celular de medula óssea de pacientes portadores de SMD diagnosticados de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde (BRUNNING, 2008), e seguidos no Ambulatório de Síndrome Mielodisplásica do Hospital Universitário Walter Cantídio na Universidade de Federal do Ceará (HUWC/UFC), no período de 2007 a 2015. Além das amostras de medula óssea de pacientes portadores de SMD, foram analisadas 10 amostras de *pool* medular oriundas de indivíduos saudáveis doadores voluntários de medula óssea.

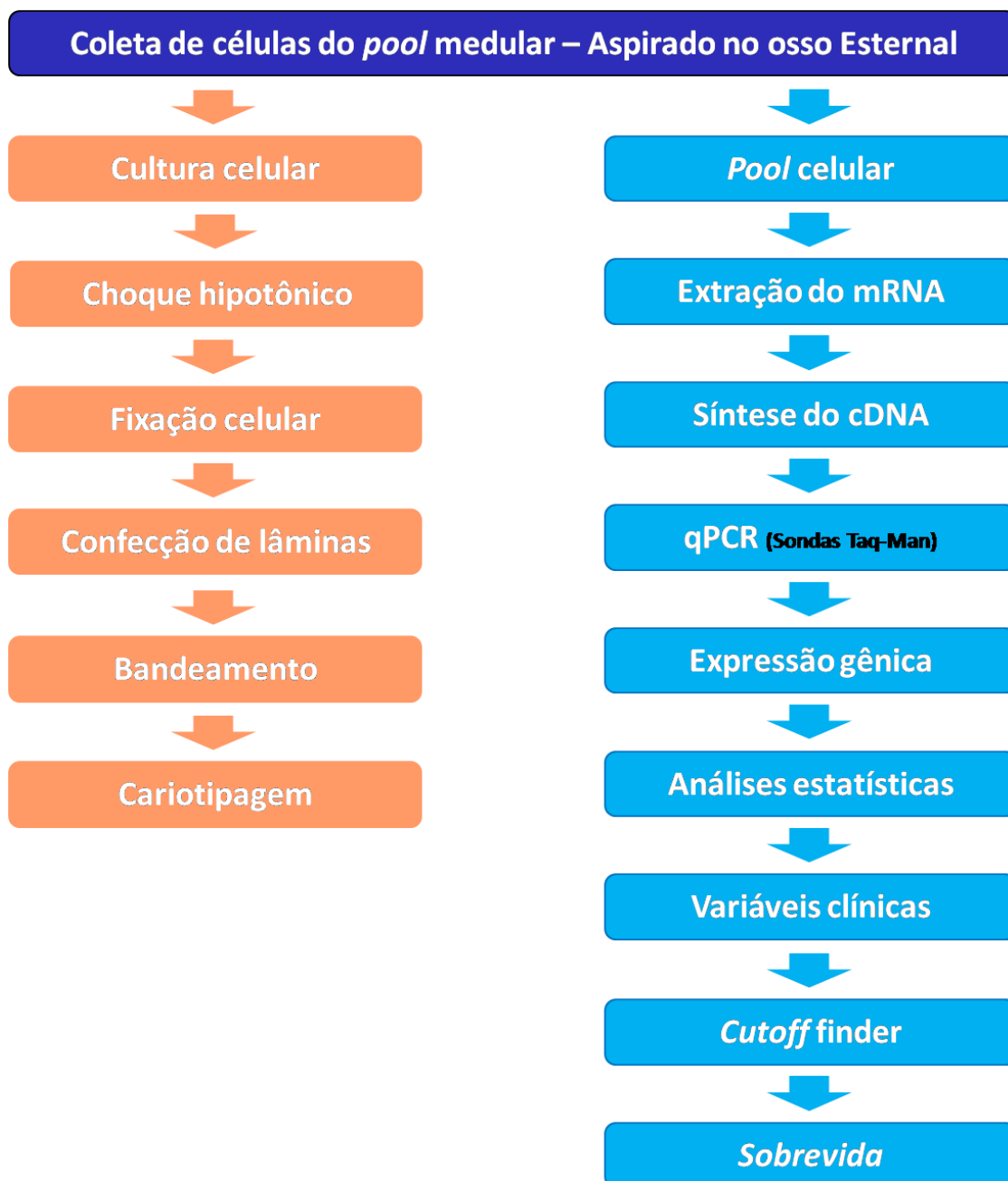
Foram excluídos deste estudo pacientes portadores de quaisquer outras doenças que não fossem Síndrome Mielodisplásica, que não foram diagnosticados no Laboratório de Citogenômica do Câncer no período compreendido entre os anos de 2007 a 2015 ou que a amostra não tivesse qualidade suficiente para a obtenção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

3.2 Aspectos éticos

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

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

A representação esquemática da metodologia a ser utilizada neste projeto encontra-se apresentada na figura 5.

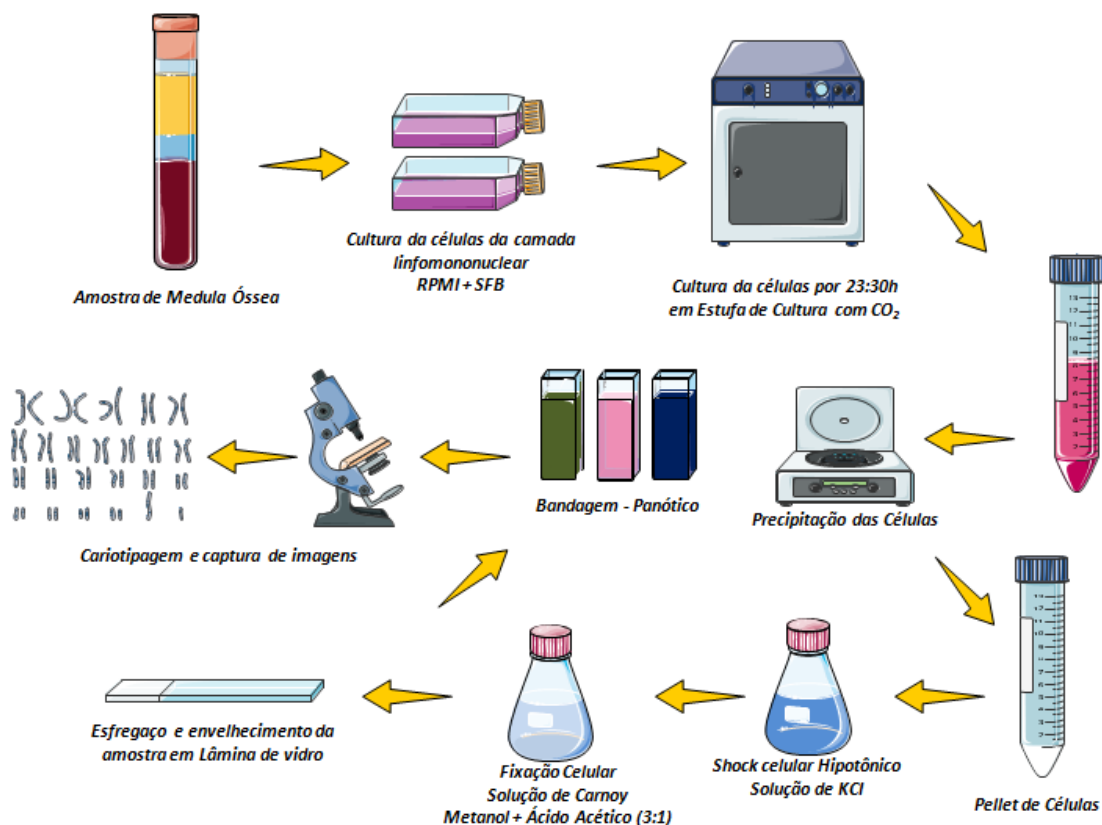
Figura 10: Organograma resumo das metodologias utilizadas neste estudo.

3.3 Cariótipo por Banda G

Os cariótipos foram realizados de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer, segundo a técnica descrita por Chauffaille adaptado por Pinheiro (PINHEIRO et al, 2009) (Figura 11). A medula óssea foi colhida em heparina e de forma estéril foi dividida em dois frascos contendo 7 mL de meio RPMI 1640 (pH 7,0), 3 mL de soro fetal bovino e 100µl de L-glutamina. Este material foi cultivado por 24 horas em estufa a 37°C. Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 50 uL de colchicina (Colcemid®), por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspenso em solução hipotônica de KCl 0,075 M e fixado em solução de metanol e ácido acético (3:1), por 4 vezes.

Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia e secado ao ar. As bandas foram feitas pela técnica de tripsina-Giemsa (GTG), sendo analisadas pelo menos 20 metáfases, sempre que possível, e os cromossomos classificados de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana - ISCN 2013. As metáfases foram capturadas em sistema computadorizado (Cytovision) com software para cariotipagem e o cariótipo foi digitalizado e impresso em impressora a laser.

Figura 11: Representação esquemática dos procedimentos da citogenética por banda G.



3.4 Análise da Expressão do mRNA por qPCR

3.4.1 Obtenção de amostras de células da medula óssea

Ao diagnóstico, as 84 amostras de medula óssea (sendo 74 amostras de pacientes com SMD e 10 amostras de indivíduos saudáveis) foram coletadas em tubos de vidro Vacutainer® contendo EDTA e processadas conforme procedimento de rotina do Laboratório de Citogenômica do Câncer do HUWC/UFC.

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

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

3.4.2 Extração de RNA Total

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

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

Foram realizadas leituras espectrofotométricas nos comprimentos de ondas de 230, 260 e 280 nm, obtendo-se suas relações para posterior aferição de contaminação das amostras. A qualidade das amostras de RNA foi confirmada por eletroforese em gel

de agarose 2% corado com brometo de etídio e as bandas de RNA 18S e 28S foram visualizadas em luz ultravioleta.

3.4.3 Síntese de cDNA

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

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

A quantidade citada de cada reagente foi multiplicada pelo número de amostras de RNA total para a confecção de um “Mix” de reação. Posteriormente, 6,8µL deste Mix foi adicionado a cada microtubo de PCR de 0,2 mL. Em seguida foram adicionados as quantidades otimizadas de RNA total para cada amostra nos microtubos devidamente identificados em um volume final de 3,2µL. Por fim, o volume final de 10µL de cada reação foram submetidos ao termociclador onde foram realizados os seguintes ciclos de termociclagem para a síntese de cDNA: 25°C por 10 minutos e 37°C por 120 minutos.

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

3.4.4 qPCR (PCR quantitativa em tempo real)

A quantificação da expressão gênica dos cinco genes avaliados neste estudo (*ERCC8*, *ERCC6*, *ERCC5*, *XPA* e *XPC*) e dos genes endógenos (β 2-Microglobulina e Ubiquitina C) (Tabela 5) foi realizada a partir da análise da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) realizadas no aparelho *7500 Real-Time PCR System*® (*Applied Biosystems*, Inc., Foster City, CA, USA) disponível no Laboratório de Citogenômica do Câncer. As reações foram preparadas utilizando-se do *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, Inc., Foster City, CA, USA) otimizado para reações com sonda *TaqMan assay*® (Tabela 5) e contendo a *AmpliTaq Gold* DNA polimerase, os dNTPs e tampão otimizados.

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

GeneBank	Símbolo	Nomenclatura	Mecanismo de reparo	TaqMan Assay
NC_000005.10	<i>ERCC8</i> (<i>CSA</i>)	Excision repair cross-complementation group 8	Complexo de ligação Ubiquitina ligase –CSA (transcription coupled repair, TC-NER)	Hs01122124_m1
NC_000010.11	<i>ERCC6</i> (<i>CSB</i>)	Excision repair cross-complementation group 6	Fator de remodelação da cromatina (transcription coupled repair, TC-NER)	Hs00972920_m1
NC_000013 NC_000009.12	<i>ERCC5(XPG)</i> <i>XPA</i>	excision repair 5 Xeroderma pigmentosum, complementation group A	Endonuclease Reparo por NER	Hs01557031_m1 Hs00166045_m1
NC_000003.12	<i>XPC</i>	Xeroderma pigmentosum, complementation group C	Reparo por NER (global genomic repair, GG-NER)	Hs00897854_m1
NM_004048.2	<i>B2M</i>	Beta-2-Microglobulin	Gene Endógeno	Hs99999907_m1
NM_021009.5	<i>UBC</i>	Ubiquitin C	Gene Endógeno	Hs00824723_m1

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

As condições para a reação de PCR foram as seguintes: pré-aquecimento a 50° C por 2 minutos, ativação da polimerase a 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação (15 segundos a 95° C) e anelamento e extensão (60 segundos a 60°C). Na preparação das reações foram utilizadas placas de polipropileno para 96 reações (*MicroAmp 96-well Plates, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*) cobertas

com adesivos para microplacas ópticas resistentes a álcool e a altas temperaturas (*Optical Adhesive film, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*). Todas as etapas do procedimento descrito foram realizadas com as amostras imersas em gelo com pouca exposição à luz.

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

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

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

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

Para este estudo, os genes endógenos mais estáveis nas amostras de cDNA obtidas a partir do mRNA da medula óssea de pacientes com SMD submetidos a

presente pesquisa foram a $\beta 2$ -microglobulina e *Ubiquitina*, segundo RIBEIRO, H.J, 2016.

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

Sabe-se que a ocorrência de dados classificados como *outliers*, frente às amostras avaliadas em um dado estudo, pode interferir na precisão da estimativa correta das análises realizadas. Assim, inicialmente, antes de qualquer validação dos dados para realização de análises estatísticas, a fim de determinar a qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras dos pacientes avaliados, utilizou-se, neste estudo, o software *Best Keeper* (PFAFFL, 2004).

Com este aplicativo em Excel, pode-se calcular o desvio padrão de cada amostra para cada gene alvo avaliado com base em valores brutos de *Cq*, independentemente da eficiência da amostra (PFAFFL, 2004). As amostras de cada gene com o menor SD é considerada a mais estável. Neste sentido, iniciamos este estudo com um total de 112 amostras de cDNA oriundas de medula óssea de pacientes SMD, mantendo-se, somente o total de 84 amostras para prosseguimento das análises estatísticas.

3.5 Variáveis analisadas

As variáveis analisadas neste estudo foram assim subdivididas:

- Sexo: masculino e feminino;
- Idade (Categorizada de acordo como IPSS-R): ≤ 60 anos, $>60 - \leq 70$ anos, $>70 - \leq 80$ anos e >80 anos;
- Origem: urbano e rural;
- Quanto à classificação OMS (2001/2008) (JAFFE et al., 2001; BRUNNING et al., 2008), os pacientes foram divididos em oito classificações distintas: CRDU (Citopenia Refratária com Displasia de Única Linhagem), ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel), CRDM (Citopenia Refratária com Displasia de Múltiplas Linhagens), AREB I (Anemia Refratária com Excesso de Blastos I), AREB II (Anemia Refratária com Excesso de Blastos II), t-SMD (SMD Secundária ao tratamento), LMMC (Leucemia Mielomonocítica Crônica) e CRDM-SA (Citopenia Refratária com Displasia de Múltiplas Linhagens com presença de Sideroblastos em anel);

- Forma da SMD: os pacientes foram estratificados quanto a forma da doença, sendo definida, de acordo com a classificação OMS em **baixo grau**, correspondendo aos casos de AR, CRDM e ARSA, e **alto grau**, sendo definida pelos casos de AREB I, AREB II e t-SMD (GILL et al., 2016);
- Celularidade da medula óssea: Hipocelular, Normocelular e Hipercelular;
- Celularidade da medula óssea (Categorizada): Normo+Hipercelular (Celularidade normal e hipercelular) e Hipocelular;
- Presença de Fibrose na medula óssea: Presença e Ausência;
- Presença de Displasias na medula óssea: 0, 1 displasia, 2 displasias e 3 displasias;
- Presença de Diseritropoese: Sim e Não;
- Presença de Dismegacariopoese: Sim e Não;
- Presença de Micromegacariócito: Sim e Não;
- Presença de Sideroblastos em anel: $\geq 1\%$ - $< 15\%$, $\geq 15\%$ - $< 50\%$ e $\geq 50\%$;
- Faixas de percentagens de Blastos: $< 5\%$, $\geq 5\%$ - $< 10\%$ e $\geq 10\%$;
- Faixas de percentagem de Blastos (categorizada): $< 5\%$ e $\geq 5\%$
- Cariótipo:
 - Quanto a alteração: normal e alterado;
 - Cariótipo (Aneuploidia): normal, alterado não aneuploide, aneuploide;
 - Cariótipo (Presença de alteração no 5q): normal, alterado com 5q e alterado sem 5q;
 - Cariótipo (Presença de alteração no 7q): normal, alterado com 7q e alterado sem 7q;
 - Cariótipo (Presença de alteração no 11q): normal, alterado com 11q e alterado sem 11q;
 - Cariótipo (Complexo - alterações no mesmo clone): normal, 1 alteração, 2 alterações e 3 ou mais alterações;
 - Cariótipo (presença de alterações estruturais): 1 alteração, 2 alterações, 3 ou mais alterações;
- Quanto ao prognóstico (IPSS-R): muito favorável, favorável, intermediário, desfavorável e muito desfavorável;
- Classificação dos valores de hemoglobina (HB) de acordo com o IPSS-R: $\geq 10\text{g/dL}$, $8\text{--}10\text{g/dL}$ e $< 8\text{g/dL}$;
- Classificação dos valores de hemoglobina (HB) (categorizada): $\geq 8\text{g/dL}$ e $< 8\text{g/dL}$;
- Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) de acordo com o IPSS-R: ≥ 800 por mm^3 e < 800 por mm^3 ;

- Classificação dos valores de plaquetas de acordo com o IPSS-R: ≥ 100.000 por mm^3 , ≥ 50.000 - < 100.000 por mm^3 e < 50.000 por mm^3 ;
- Classificação do número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS-R: 1 citopenia, 2 citopenias e 3 citopenias;
- Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R (categorizada): muito baixo e baixo versus intermediário, alto e muito alto;
- Classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS (MALCOVATI et al., 2011): muito baixo e baixo versus intermediário, alto e muito alto;
- Dependência Transfusional: sim e não (utilizando-se o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (MALCOVATI et al., 2005));
- Óbito: sim e não;
- Evolução para LMA: sim e não.

3.6 Análises estatísticas

3.6.1 Análises estatísticas para a avaliação dos dados de expressão gênica

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

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

Os dados paramétricos foram analisados através do teste t de Student, para a comparação da média entre dois grupos, e do teste de ANOVA, para a comparação das

médias em variáveis com mais de dois grupos. O pós-teste (*post-hoc*) para a ANOVA foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Caso houvesse homogeneidade de variâncias ($p\text{-valor} \geq 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Tukey. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados ($p\text{-valor} < 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Games-Howell.

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

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

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

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

O *Cutoff Finder* é uma ferramenta on-line disponível gratuitamente (<http://molpath.charite.de/cutoff>) que disponibiliza um conjunto de métodos de otimização e visualização de pontos de *cut-off* para avaliação de novos potenciais biomarcadores de dados moleculares (BUDCZIES et al., 2012), tais como os dados provenientes de análises de expressão gênica e protéica, utilizando-se da estatística R como suporte para a visualização e computação estatística (CORE TEAM, 2012). Para

as análises de sobrevida, foi utilizada a ferramenta de análise de significância de correlação com a variável de sobrevivência pelo teste de *log-rank* proveniente do software *Cutoff Finder* (BUDCZIES et al., 2012).

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

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos pacientes

O número amostral deste estudo (n) foi igual a 84, sendo 74 pacientes para o grupo SMD e 10 voluntários para o grupo controle (Tabela 6). Quanto às variáveis sócio-demográfica dos pacientes com SMD, observou-se que, frente à variável SEXO, foram incluídos neste estudo 36 indivíduos (48,6%) do sexo masculino e 38 (51,4%) do sexo feminino para o grupo SMD (Tabela 6).

Frente a variável IDADE, esta foi dividida em duas faixas: IDADE CATEGORIZADA (≤ 60 anos, > 60 anos) e IDADE CATEGORIZADA PELO IPSS 2012 (GREENBERG et al, 2012) (≤ 60 anos, $> 60 - \leq 70$ anos, $> 70 - \leq 80$ anos e > 80 anos). Para o grupo SMD, a média de idade foi de 63,39 anos (mediana = 66 anos / mínimo de 22 anos e máximo de 91 anos) com uma predominância de pacientes com idade superior a 60 anos em 65,3% (47/74) dos casos avaliados (Tabela 6).

Quanto à variável ORIGEM (dividida em urbana ou rural), foram avaliados um total de 45 pacientes de origem urbana (63,4%) e 26 pacientes de origem rural (36,6%) dentro do grupo SMD (Tabela 6).

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

Variáveis		Nº	%
Grupo	Caso	74	100,0%
Sexo	Feminino	38	51,4%
	Masculino	36	48,6%
Idade (Categorizada de acordo com o IPSS 2012)	≤60 anos	26	35,1%
	>60 - ≤70 anos	18	24,3%
	>70 - ≤80 anos	19	25,7%
	>80 anos	11	14,9%
Idade (categorizada)	<60 anos	27	36,5%
	≥ 60 anos	47	63,5%
Origem	Urbana	45	63,4%
	Rural	26	36,6%

Em relação às variáveis clínicas dos pacientes com SMD, identificou-se que 74 (100,0%) dos pacientes foram classificados como SMD primária (Tabela 7). Na análise da variável da classificação OMS (2001/2008) (JAFFE et al., 2001; BRUNNING et al., 2008), observamos 9 pacientes (12,3%) como AR, 12 (16,4%) pacientes como ARSA, 39 (53,4%) pacientes como CRDM, 4 (5,5%) pacientes classificados como AREB I, 9 (12,3%) pacientes como AREB II, 0 (0,0%) pacientes como SMD secundária e 0 (0,0%) pacientes como LMMC (Tabela 7). Quanto à forma da SMD, foi observado que 60 (82,2%) dos casos foram inseridos nas formas de baixo grau da doença e 13 (17,8%) foram definidas como formas de alto grau (Tabela 7).

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

Variáveis		Nº	%
Classificação da WHO	AR	9	12,3
	ARSA	12	16,4%
	CRDM	39	53,4%
	AREB I	4	5,5%
	AREB II	9	12,3%
	SMD-sec	9	10,8%
Classificação da WHO (categorizada)	AR	9	12,3%
	ARSA	12	16,4%
	CRDM	39	53,4%
	AREB	13	17,8%
	LMMC	0	0,0%
	SMD-sec	0	0,0%
Formas da SMD	Baixo Grau	60	82,2%
	Alto Grau	13	17,8%

Quanto à variável celularidade da medula óssea, estabelecida pela biópsia da medula óssea dos pacientes com SMD, foi dividida em hipocelular, normocelular e hipercelular e categorizada em hipocelular *versus* normocelular + hipocelular. Foram observados que 9 pacientes (17,6%) apresentaram medula óssea hipocelular, seguidos de 9 pacientes com medula óssea normocelular (17,6%) e 33 pacientes com medula hipercelular (64,7%) (Tabela 8). Adicionalmente, foi observado que 10 (52,6%) pacientes apresentaram fibrose na medula óssea (Tabela 8).

Quanto a presença de displasias na medula óssea, observou-se que 21 (50,0%) dos pacientes apresentaram dois tipos de displasias, corroborando com a predominância de 71,4% dos casos inseridos na faixa de presença de 2-3 displasias na medula óssea (Tabela 8). Dentre as principais displasias observadas no mielograma ao diagnóstico, observou-se que houve um predomínio de achados de disgranulopoiese, em 30 (71,4%) casos, seguidos de diseritropoiese 33 (78,6%), dismegacariopoiese 18 (42,9%) e presença de micromegacariócitos 11 (23,4%) na medula óssea dos pacientes com SMD (Tabela 8).

Ao analisar a celularidade da medula óssea, 5 (21,7%) pacientes apresentaram de 1% a 14% de sideroblastos em anel, na análise do mielograma ao diagnóstico, seguidos de 7 (30,4%) pacientes inclusos na faixa de $\geq 15\%$ a $< 50\%$ e, por fim, 11 (47,8%) dos pacientes apresentaram uma contagem maior ou igual a 50% (Tabela 8).

Quanto à percentagem de blastos observados ao mielograma, foi identificado que 61 (82,4%) pacientes apresentaram menores ou iguais a 5% de blastos na medula óssea ao diagnóstico (Tabela 8). Por conseguinte, 5 (6,8%) pacientes foram incluídos na faixa de >5% a ≤10% de presença de blastos, seguidos de 8 (10,8%) pacientes inseridos na faixa de mais que 10% de blastos na medula óssea (Tabela 8).

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

Variáveis		Nº	%
Celularidade da medula óssea	Hipocelular	9	17,6%
	Normocelular	9	17,6%
	Hiper celular	33	64,7%
Celularidade (categorizada)	Hipocelular	9	17,6%
	Normocelular+hipercelular	42	82,4%
Fibrose na medula óssea	Ausência	9	47,4%
	Presença	10	52,6%
Displasias na medula óssea	1	12	28,6%
	2	21	50,0%
	3	9	21,4%
Presença de diseritropoiese	Não	9	21,4%
	Sim	33	78,6%
Presença de dismegacariopoiese	Não	24	57,1%
	Sim	18	42,9%
Presença de disgranulopoiese	Não	12	28,6%
	Sim	30	71,4%
Presença de micromegariocito	Não	36	76,6%
	Sim	11	23,4%
Presença de sideroblastos em anel	≥1% - <14%	5	21,7%
	≥15% - <50%	7	30,4%
	≥50%	11	47,8%
Faixas das percentagens de blastos	≤5%	61	82,4%
	>5% - ≤10%	5	6,8%
	>10%	8	10,8%

Quanto à análise citogenética dos pacientes do grupo SMD, observou-se que cinquenta e um pacientes (68,9%) apresentaram resultados e 23 (38,1%) apresentaram ausência de metáfase ao diagnóstico (Tabela 9 e 10). Dentre os 51 pacientes com resultado citogenético (Figura 9), identificou-se que 29 (56,9%) pacientes possuíam cariótipo normal (Tabela 9) e 22 (43,1%) pacientes apresentaram cariótipo alterado, dos quais 14 (27,5%) pacientes apresentaram uma única alteração e 11 (68,8%) pacientes apresentaram clones com 1 (um) alteração estrutural. Adicionalmente, 13 (25,5%) pacientes apresentaram a presença de ganho ou perda de cromossomos (aneuploidias) dentre os pacientes com cariótipo alterado (Tabela 9 e Tabela 10).

Quanto às alterações citogenéticas mais comuns que acometem os pacientes com SMD, observou-se que 8 (15,7%) pacientes apresentaram alteração no cromossomo 5 (-5/5q-) (Tabela 9 e Tabela 10). Adicionalmente, foram observadas outras alterações frequentes em SMD, tais como as envolvendo os cromossomos 7 (-7/7q-) e 11 (-11/11q-), sendo observado em 7,8% dos casos avaliados (Tabela 9 e Tabela 10).

Dos pacientes com resultados (exceto os pacientes com SMD-sec), quanto à classificação prognóstica frente ao resultado citogenético estabelecido pelo IPSS-R (GREENBERG et al., 2012), verificou-se que houve um predomínio de pacientes com prognóstico favorável em 38 (76,0%) dos casos (Tabela 9).

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

Variáveis		Nº	%
Cariótipo (Alterado versus Normal)	Normal	29	56,9%
	Alterado	22	43,1%
Cariótipo (Aneuploide versus não Aneuploide)	Normal	29	56,9%
	Alterado não Aneuploide	9	17,6%
	Aneuploide	13	25,5%
Cariótipo (Presença de alteração no 5q)	Normal	29	56,9%
	Alterado com 5q-	8	15,7%
	Alterado sem 5q-	14	27,5%
Cariótipo (Presença de alteração no 7q)	Normal	29	56,9%
	Alterado com 7q-	4	7,8%
	Alterado sem 7q-	18	35,3%
Cariótipo (Presença de alteração no 11q)	Normal	29	56,9%
	Alterado com 11q-	4	7,8%
	Alterado sem 11q-	18	35,3%

Cariótipo (alterado)	Normal	29	56,9%
	1 alteração	14	27,5%
	2 alterações	4	7,8%
	3 ou mais alterações	4	7,8%
Cariótipo (Presença de Alterações Estruturais)	1 alteração estrutural	11	68,8%
	2 alterações estruturais	3	18,8%
	3 ou mais alterações estruturais	2	12,5%
Classificação do cariótipo de acordo com o IPSS-R	Muito favorável	0	0,0%
	Favorável	38	76,0%
	Intermediário	9	18,0%
	Desfavorável	0	0,0%
	Muito desfavorável	3	6,0%
Classificação do cariótipo de acordo com o IPSS-R (categorizada)	Muito favorável + favorável	39	76,5%
	Intermediário + desfavorável+ muito desfavorável	12	23,5%

Tabela 10: Descrição clínica dos pacientes com SMD.

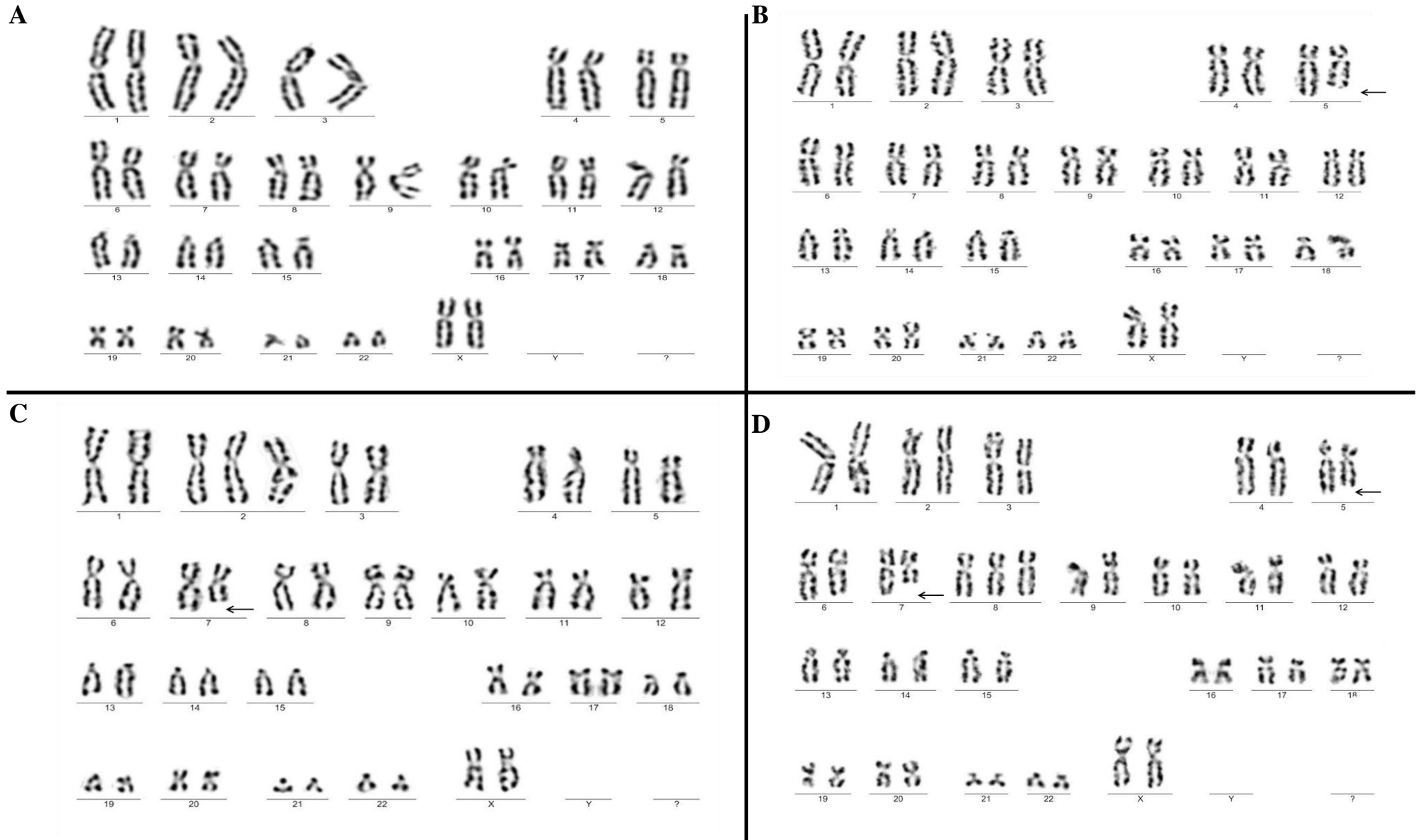
Paciente	Sexo	Idade	Celularidade	Cariótipo - ISCN 2013	OMS	IPSS-R	DP	e-LMA	Óbito
1	F	28	-	46,XX[20]	AR	Baixo (>1.5-3)	S	N	N
2	M	24	-	46,XY[9]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	S	N	S
3	F	78	-	46,X,i(x)(q10),del(17)(q22q23.3)[7]/46,XX[13]	AR	Baixo (>1.5-3)	N	N	-
4	F	69	Normocelular	46,XX,del(5)(q12q33)[18]/46,XX[2]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	S	N	N
5	F	45	Normocelular	46,XX[7]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	N	-	-
6	F	41	Hipocelular	Ausência de Metáfase	CRDM	-	S	-	-
7	F	83	Normocelular	46,XX[20]	AR	Muito Baixo (<=1.5)	N	N	N
8	M	85	Hiper celular	46,XY[15]	CRDM-SA	Baixo (>1.5-3)	S	N	S
9	M	47	Normocelular	47,XY,+mar[5]/46,XY,del(5)(q31)[5]/46,XY[15]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	S	N	S
10	M	67	Normocelular	Ausência de Metáfase	AREB II	-	-	S	-
11	M	30	-	46,XY[24]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	N	N	N
12	M	55	-	46,XY[15]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	N	N	N
13	M	53	-	46,XY[20]	CRDM	Intermediário (>3-4.5)	S	N	-
14	F	63	Hiper celular	46,XX[20]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	N	N	-
15	F	70	Hiper celular	Ausência de Metáfase	ARSA	-	S	N	-
16	M	66	Hiper celular	46,XY[17]	LMMC I	Baixo (>1.5-3)	N	S	S
17	M	91	-	46,X-Y[4]/46,XY[16]	ARSA	Muito Baixo (<=1.5)	N	N	-
18	M	62	Hiper celular	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2]	AREB II	Muito Alto (>6)	S	N	S
19	F	84	-	46,XX,del(20)(q13.1)[7]/46,XX[16]	AR	Baixo (>1.5-3)	-	-	-
20	F	71	Hiper celular	46,XX[6]	AR	Muito Baixo (<=1.5)	N	N	N
21	F	50	Hiper celular	46,XX[11]	ARSA	Muito Baixo (<=1.5)	N	N	N
22	F	71	-	Ausência de Metáfase	CRDM	-	N	N	N
23	F	77	-	Ausência de Metáfase	AREB II	-	-	S	S
24	M	61	Hiper celular	46,XY[20]	CRDM	Muito Baixo (<=1.5)	S	N	N
25	M	45	Hipocelular	47,XY,+mar[3]/46,XY[17]	CRDM	Alto (>4.5-6)	N	N	N
26	M	66	Hiper celular	46,XY[20]	AREB I	Intermediário (>3-4.5)	N	N	-
27	M	70	Hiper celular	Ausência de Metáfase	CRDM	-	N	-	-
28	M	88	-	46,XY[17]	AREB II	Muito Alto (>6)	S	S	S
29	M	81	Hiper celular	46,XX[20]	ARSA	Baixo (>1.5-3)	S	N	-
30	M	66	Hiper celular	Ausência de Metáfase	AREB II	-	S	S	S
31	M	80	-	47,XY,+8[12]/46,XY[8]	AREB I	Intermediário (>3-4.5)	N	S	S
32	M	88	Hiper celular	46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	S	S	S
33	F	41	Normocelular	Ausência de Metáfase	ARSA	-	S	N	-
34	F	66	Hiper celular	46,XX[25]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	N	N	-
35	M	68	Hiper celular	46,XY,del(5)(q15q33)[7]/46,XY[11]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	S	N	-
36	M	81	-	Ausência de Metáfase	CRDM	-	N	N	-
37	F	30	Hipocelular	90,XXXX,-6,-7,-8,-11,+21,+22[5]/46,XX,del(7)(q23),del(20)(q13.1)[AREB II	Muito Alto (>6)	S	N	S

				3]/45,XX,-7[5]/45~46,XX,- 7,del(7)(q32),del(11)(q32),- 17,del(17)(p11.2),del(20)(q13.1)[cp11]						
38	M	62	-	Ausência de Metáfase	CRDM	-	-	N	N	
39	M	41	Hipocelular	46,XY[10]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	N	N	N	
40	M	65	Hiper celular	47,XY,+mar[5],46,XY[11]	CRDM	Intermediário (>3-4.5)	S	N	S	
41	F	44	Normocelular	Ausência de Metáfase	CRDM	-	S	N	S	
42	M	77	-	46,XY,add(13)(p11)[12]/46,XY,del(7)(q32),add(13)(p11)[4]/48,XY,add(13)(p11),+22,+mar[9]/48,XY,del(7)(q32),add(13)(p11),+22,+mar[3]/46,XY[2]	CRDM	Alto (>4.5-6)	S	N	S	
43	M	82	Hiper celular	89,XXY,-20,-22,-Y[4]/46,XY,del(16)(?q22)[5]/46,XY[11]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	S	N	N	
44	M	49	Hiper celular	47,XY,+mar[6]/48,XY,+8,del(16)(?q22),+mar[4]/47~50,XY,del(4)(?q35),+8,+10,+11,del(16)(?q22),+21,+mar[cp8]	CRDM	Muito Alto (>6)	S	N	S	
45	M	45	Hiper celular	46,XY[8]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	N	S	S	
46	M	48	Hipocelular	46,XY[20]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	N	N	N	
47	M	63	Hiper celular	37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/46,XY,del(5)(q15q33)[5]/46,XY[6]	AREB II	Muito Alto (>6)	S	N	N	
48	F	56	Hiper celular	46,XX[20]	CRDM	Muito Baixo (<=1.5)	N	N	N	
49	F	71	Hiper celular	46,XX[25]	CRDM-SA	Baixo (>1.5-3)	S	-	-	
50	M	80	-	46,XX[20]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	S	N	S	
51	F	58	Hipocelular	Ausência de Metáfase	CRDM	-	S	S	S	
52	F	66	Hiper celular	Ausência de Metáfase	ARSA	-	S	N	N	
53	F	40	-	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(?q25)[7]/46,XX[4]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	S	N	S	
54	F	57	Hiper celular	46,XX[10]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	S	N	-	
55	F	74	Hiper celular	Ausência de Metáfase	CRDM	-	N	N	N	
56	F	72	-	Ausência de Metáfase	AREB II	-	S	N	S	
57	F	62	-	Ausência de Metáfase	CRDM	-	S	N	N	
58	F	41	Hipocelular	44,XX,-13,-17[4]/46,XX[5]	CRDM	Intermediário (>3-4.5)	S	N	N	
59	F	70	-	Ausência de Metáfase	AR	-	N	N	N	
60	F	79	-	Ausência de Metáfase	AR	-	-	N	N	
61	F	83	Hiper celular	Ausência de Metáfase	ARSA	-	N	N	N	
62	F	86	Hiper celular	Ausência de Metáfase	ARSA	-	N	N	-	
63	F	80	Hiper celular	46,XX[5]	ARSA	Baixo (>1.5-3)	S	N	-	
64	F	46	Hiper celular	46,XX[8]	AR	Baixo (>1.5-3)	S	N	N	
65	M	58	Hipocelular	46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12]	ARSA	Baixo (>1.5-3)	N	S	S	
66	M	73	Normocelular	46,XY[11]	AREB I	Alto (>4.5-6)	S	N	-	
67	F	22	Hipocelular	46,XX,del(5)(q15q33)[4]/46,XX[18]	CRDM	Muito Baixo (<=1.5)	N	N	S	

68	F	80	Hiper celular	47,XX,t(4;11)(q27;q32),+mar[4]/46,XX[16]	CRDM	Baixo (>1.5-3)	N	N	N
69	F	77	Normocelular	Ausência de Metáfase	CRDM	-	N	N	N
70	F	72	Hiper celular	46,XX[12]	ARSA	Baixo (>1.5-3)	N	N	-
71	F	60	-	46,XX[20]	AR	Baixo (>1.5-3)	S	N	N
72	M	74	Hiper celular	45,X,-Y[18]/46,XY[7]	ARSA	Baixo (>1.5-3)	N	N	N
73	M	71	-	Ausência de Metáfase	AREB II	-	S	N	S
74	M	66	Hiper celular	Ausência de Metáfase	AREB I	-	S	N	S

Legenda: IPSS-R (Sistema Internacional de Score Prognóstico Revisado), OMS (Organização Mundial de Saúde), DP (Dependência Transfusional), e-LMA (Evolução para Leucemia Mielóide Aguda), AR (Anemia refratária), ARSA (Anemia refratária com sideroblastos em anel), AREB (Anemia refratária com excesso de blastos tipo I e II), CRDM (Citopenia refratária com displasia em multilinhagens). S (Sim), N (Não), M (Masculino), F (Feminino).

Figura 12: Representação esquemática de resultados citogenéticos a partir de amostras de medula óssea de pacientes com SMD.



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

Quanto aos achados clínicos observados no sangue periférico dos pacientes com SMD, foi observado, ao hemograma, que 37 (50,0%) pacientes apresentaram Hb inferior a 8g/dL, que 49 (66,2%) pacientes apresentaram contagem de neutrófilos (ANC) superior a 800 por mm^3 e, por fim, 35 (47,3%) pacientes apresentaram contagem de plaquetas superior a 100.000/ mm^3 (Tabela 11).

Frente à variável indicativa do números de citopenias identificados no sangue periférico dos pacientes com SMD, em acordo com os critérios estabelecidos Greenberg e colaboradores (2012), foi observado que houve um predomínio de pacientes com a presença de 1 (uma) citopenia ao hemograma em 39 (52,7%) casos avaliados (Tabela 11).

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

Variáveis	Nº	%
Classificação dos valores de hemoglobina (HB)	$\geq 10\text{g/dL}$	17 23,0%
	$\geq 8 - <10\text{g/dL}$	20 27,0%
	$<8 \text{ g/dL}$	37 50,0%
Classificação dos valores de hemoglobina (HB) (categorizada)	$\geq 8 \text{ g/dL}$	37 50,0%
	$<8 \text{ g/dL}$	37 50,0%
Classificação dos valores de neutrófilos (ANC)	$\geq 800/\text{mm}^3$	49 66,2%
	$<800/\text{mm}^3$	25 33,8%
Classificação dos valores de plaquetas	$\geq 100.000/\text{mm}^3$	35 47,3%
	$\geq 50.000 - <100.000/\text{mm}^3$	17 23,0%
	$<50.000/\text{mm}^3$	22 29,7%
Classificação dos valores de plaquetas (categorizada)	≥ 50.000	52 70,3%
	<50.000	22 29,7%
Número de citopenias de acordo com o IPSS-R	1	39 52,7%
	2	19 25,7%
	3	16 21,6%

Frente a variável prognóstica estabelecida pelo IPSS-R (GREENBERG et al., 2012), verificou-se que 7 (13,7%) pacientes foram classificados como muito bom prognóstico; 31 (60,8%) pacientes foram definidos com bom prognóstico; 5 (9,8%) pacientes definidos com prognóstico intermediário e 3 (9,7%) e 5 (9,8%) pacientes foram estabelecidos como prognóstico alto e muito alto, respectivamente (Tabela12). Em relação à variável prognóstica estabelecida pelo WPSS, observou-se que houve um predomínio de casos de baixo risco, em 18 (36,0%) casos, seguidos de pacientes

estabelecidos ao prognóstico de risco intermediário e alto em 16 (32,0%) e 7 (14,0%) dos casos avaliados, respectivamente (Tabela 12).

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

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

Quanto ao acompanhamento terapêutico do paciente com SMD, foi observado que 38 (55,1%) pacientes tornaram-se dependentes transfusionais, quando utilizado o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses estabelecido por Malcovati e colaboradores (2005) (Tabela 13). Por fim, verificou-se que 24 (32,4%) pacientes foram a óbito e 10 (14,5%) pacientes evoluíram para LMA no decorrer da execução do presente estudo (Tabela 13).

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

Variáveis		Nº	%
Dependência transfusional	Não	31	44,9%
	Sim	38	55,1%
Óbito	Não	50	67,6%
	Sim	24	32,4%
Evolução para LMA	Não	59	85,5%
	Sim	10	14,5%

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

Os níveis de expressão gênica referente aos genes *ERCC8 (CSA)*, *ERCC6 (CSB)*, *ERCC5 (XPG)*, *XPA* e *XPC* para a associação entre os indivíduos controles (n=10) e amostras de *pool* celular dos pacientes com SMD (n=84), e suas respectivas variáveis clínicas (como listado abaixo), serão apresentadas nas seções a seguir.

- Sexo
- Idade
- Origem
- Quanto à classificação da OMS
- Formas da SMD
- Celularidade da Medula Óssea
- Celularidade da medula óssea (Categorizada)
- Presença de Fibrose na medula óssea
- Presença de Displasias na medula óssea
- Presença de Diseritropoese
- Presença de Dismegacariopoese
- Presença de Micromegacariócito
- Presença de Sideroblastos em anel
- Faixas de percentagens de Blastos
- Faixas de percentagem de Blastos (categorizada)
- Cariótipo
- Cariótipo (Quanto a alteração: normal/alterado)
- Cariótipo (Aneuploidia)
- Cariótipo (Presença de alteração no 5q)
- Cariótipo (Presença de alteração no 7q)
- Cariótipo (Presença de alteração no 11q)
- Cariótipo (Complexo - alterações no mesmo clone)
- Cariótipo (presença de alterações estruturais)
- Quanto ao prognóstico (IPSS-R)
- Classificação dos valores de hemoglobina (HB) de acordo com o IPSS-R
- Classificação dos valores de hemoglobina (HB) (categorizada)
- Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) de acordo com o IPSS-R
- Classificação dos valores de plaquetas de acordo com o IPSS-R
- Classificação do número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS-R
- Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R
- Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R (categorizada)
- Classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS
- Dependência Transfusional
- Óbito
- Evolução para LMA

4.2.1 Análise do nível de expressão do gene *ERCC8* (CSA)

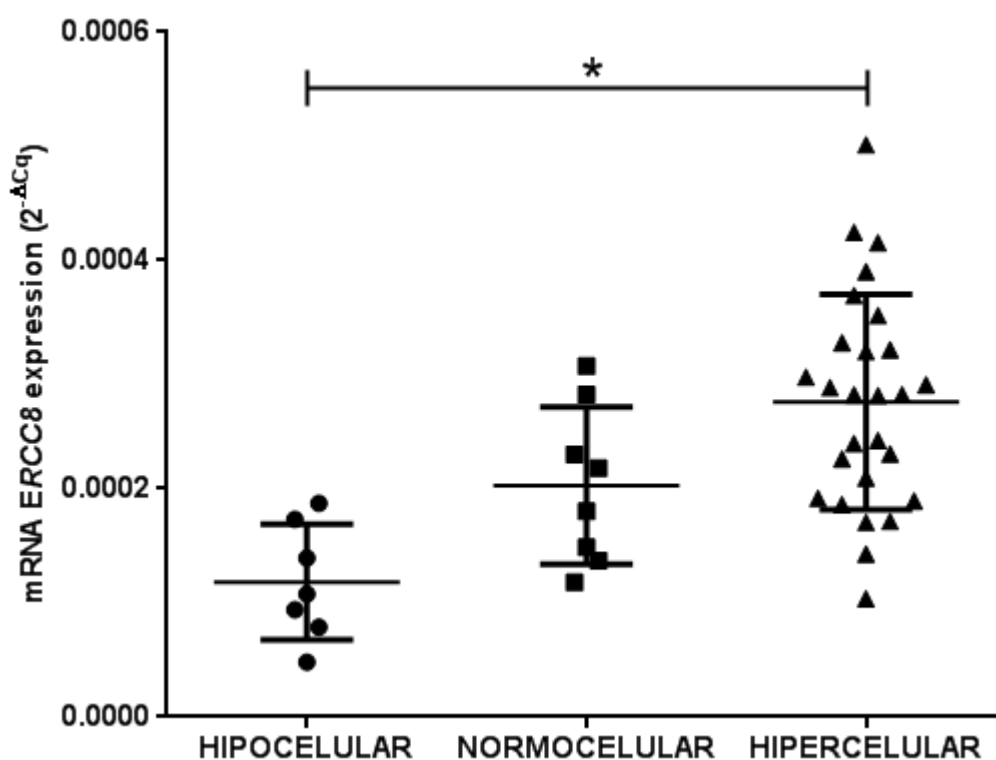
Inicialmente, em relação ao gene *ERCC8* (CSA), as variáveis de análise foram separadas em variáveis com significância estatística (relatadas na sessão corrente) e variáveis sem significância estatística (não demonstradas) como verificado na Figura 13.

Figura 13: Variáveis de análises com significância estatística e sem significância estatística para o gene *ERCC8* (CSA).

Variáveis com significância estatística	Variáveis sem significância estatística
<ul style="list-style-type: none"> • Celularidade da Medula Óssea • Celularidade da medula óssea (Categorizada) • Faixas de percentagens de Blastos • Faixas de percentagem de Blastos (categorizada) • Cariótipo (Quanto a alteração: normal/alterado) • Quanto à classificação da OMS • Formas da SMD 	<ul style="list-style-type: none"> • Sexo • Idade • Origem • Presença de Fibrose na medula óssea • Presença de Displasias na medula óssea • Presença de Dismegacariopose • Presença de Micromegacariócito • Presença de Sideroblastos em anel • Cariótipo • Cariótipo (Aneuploidia) • Cariótipo (Presença de alteração no 5q) • Cariótipo (Presença de alteração no 7q) • Cariótipo (Complexo - alterações no mesmo clone) • Cariótipo (presença de alterações estruturais) • Quanto ao prognóstico (IPSS-R) • Classificação dos valores de hemoglobina (HB) de acordo com o IPSS-R • Classificação dos valores de hemoglobina (HB) (categorizada) • Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) de acordo com o IPSS-R • Classificação dos valores de plaquetas de acordo com o IPSS-R • Classificação do número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS-R • Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R • Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R (categorizada) • Classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS • Dependência Transfusional • Óbito • Evolução para LMA

Inicialmente, para o gene *ERCC8*, foi encontrada associação com relação à variável de celularidade e presença de alterações displásicas na medula óssea dos pacientes com SMD. Quanto à associação do nível de expressão do gene *ERCC8* e o perfil de celularidade da medula óssea de pacientes com SMD, identificou-se que o gene *ERCC8* apresenta uma menor expressão em pacientes com medula hipocelular frente a pacientes com medula hipercelular ($p=0,000245$; IC= 0,000245185 – 0,000070094) (Figura 14).

Figura 14: Nível de expressão do gene *ERCC8* em pacientes com SMD frente a variável Celularidade.

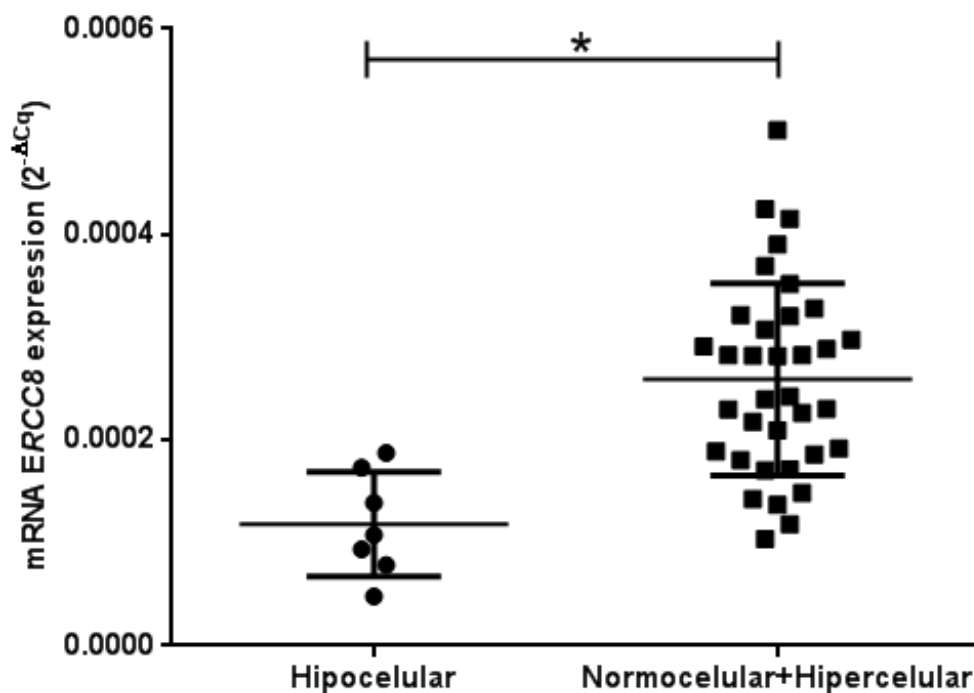


		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							ANOVA‡	Teste de Levene	Tukey <i>pos-hoc</i> test
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo				
Celularidade da medula óssea	Hipocelular	7	77,8%	0,000118350	0,0000191744	0,000071432	0,000165268	0,0002	0,241	0,145000	
	Normocelular	8	88,9%	0,000202785	0,0000243765	0,000145143	0,000260426			0,145000	
	Hipercelular	27	81,8%	0,000275989	0,0000181483	0,000238685	0,000313293			0,000245*	

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

Quanto ao perfil de celularidade da medula óssea de pacientes com SMD, observou-se que pacientes com medula óssea hipocelular apresentam uma menor expressão do gene *ERCC8* em relação à pacientes com medula óssea categorizada em normocelular + hipercelular ($p= 0,000420$; IC= 0,0002149300 – 0,0000668837) (Figura 15).

Figura 15: Nível de expressão do gene *ERCC8* em pacientes com SMD frente à variável de celularidade da medula óssea (categorizada) em pacientes com SMD.

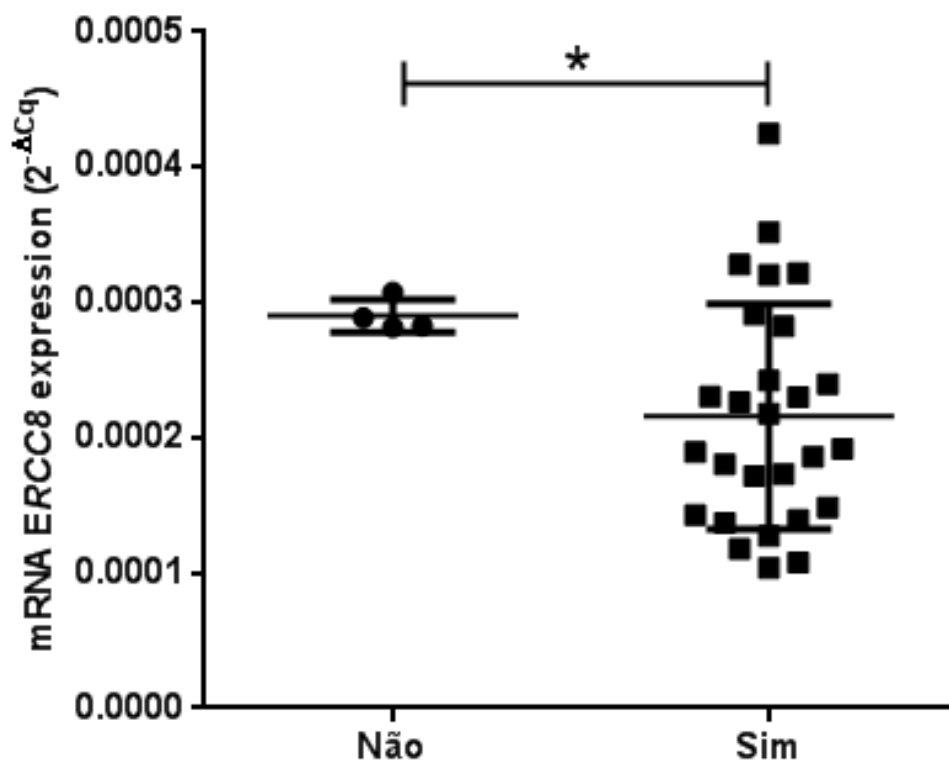


		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						Teste de Levene	p-valor†
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Celularidade da medula óssea (Categorizada)	Hipocelular	7	77,8%	0,000118350	0,0000191744	0,000071432	0,000165268	0,099867	0,000420
	Normocelular + Hipercelular	35	83,3%	0,000259257	0,0000158130	0,000227121	0,000291392		

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

Quanto a série hemopoética eritroblástica com presença de disritropoese em pacientes com SMD, observou-se que pacientes com medula óssea sem disritropoese apresentam uma maior expressão do gene *ERCC8* em relação à pacientes com medula óssea com disritropoese ($p=0,000150$; IC= 0,0000395256 – 0,0001093841) (Figura 16).

Figura 16: Nível de expressão do gene *ERCC8* em pacientes com SMD frente à variável presença de disritropoese na medula óssea em pacientes com SMD.



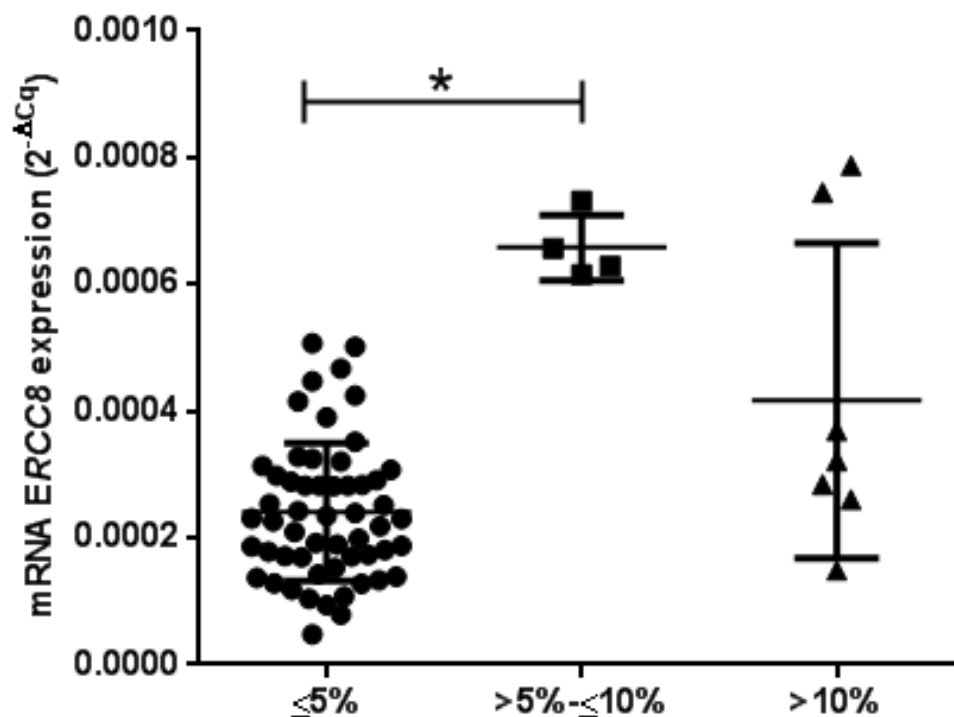
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						Teste de Levene	p-valor [‡]
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Presença de Disritropoese	NÃO	4	44,4%	0,000290159	0,0000059875	0,000271104	0,000309214	0,022521	0,000150
	SIM	27	81,8%	0,000215704	0,0000159912	0,000182834	0,000248574		

[‡]Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

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

Quanto as faixas de percentagens de blastos em pacientes com SMD, observou-se que pacientes com medula óssea com percentagem de blastos menores ou iguais a 5% exibiram uma menor expressão do gene *ERCC8* em relação à pacientes com percentagem de blastos maiores que 5% e menores ou iguais a 10% ($p < 0,0001$; IC= 0,000321954 – 0,000512819) (Figura 17).

Figura 17: Nível de expressão do gene *ERCC8* em pacientes com SMD frente à variável percentagem de blastos na medula óssea em pacientes com SMD.



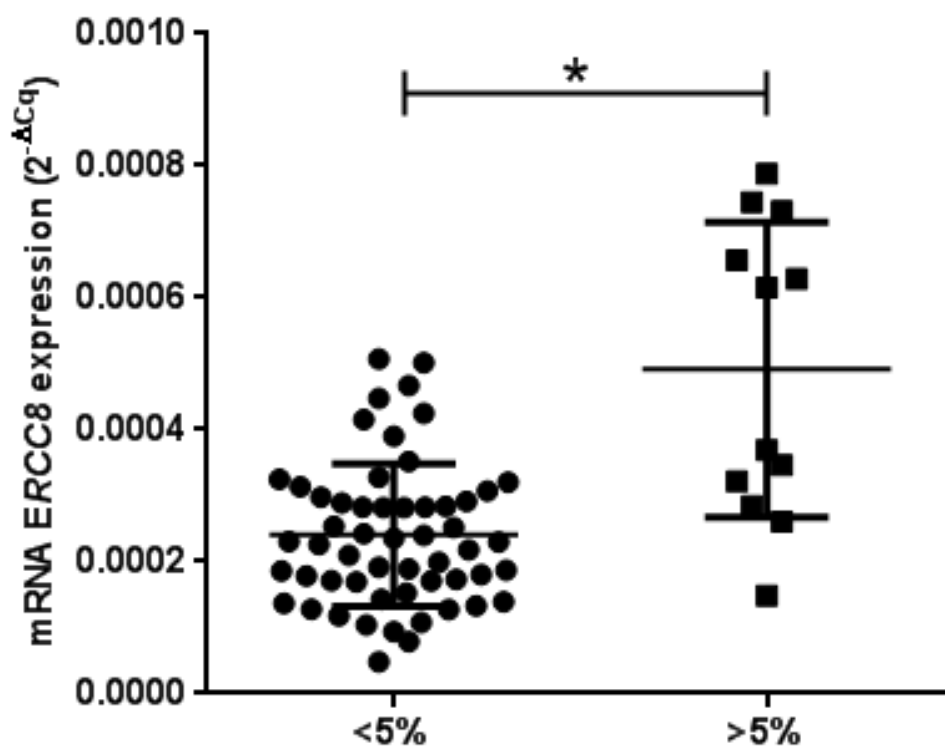
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell <i>pos-hoc</i> test
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo				
Faixas de percentagem de blastos	$\leq 5\%$	55	90,2%	0,000240633	0,0000146032	0,000211355	0,000269910	< 0,0001	0,000284	0,000060*	
	$> 5\% - \leq 10\%$	4	80,0%	0,000658019	0,0000258707	0,000575687	0,000740351			0,000060*	
	$> 10\%$	7	87,5%	0,000416727	0,0000939089	0,000186940	0,000646514			0,228735	
										0,096235	

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

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

Quanto as faixas de percentagens de blastos categorizadas para pacientes com SMD, observou-se que pacientes com medula óssea com percentagem de blastos abaixo de 5% exibiram uma menor expressão do gene *ERCC8* em relação à pacientes com percentagem de blastos acima de 5% ($p=0,002525$; IC= 0,0003946113 – 0,0001067379) (Figura 18).

Figura 18: Nível de expressão do gene *ERCC8* em pacientes com SMD frente à variável percentagem de blastos (categorizada) na medula óssea em pacientes com SMD.



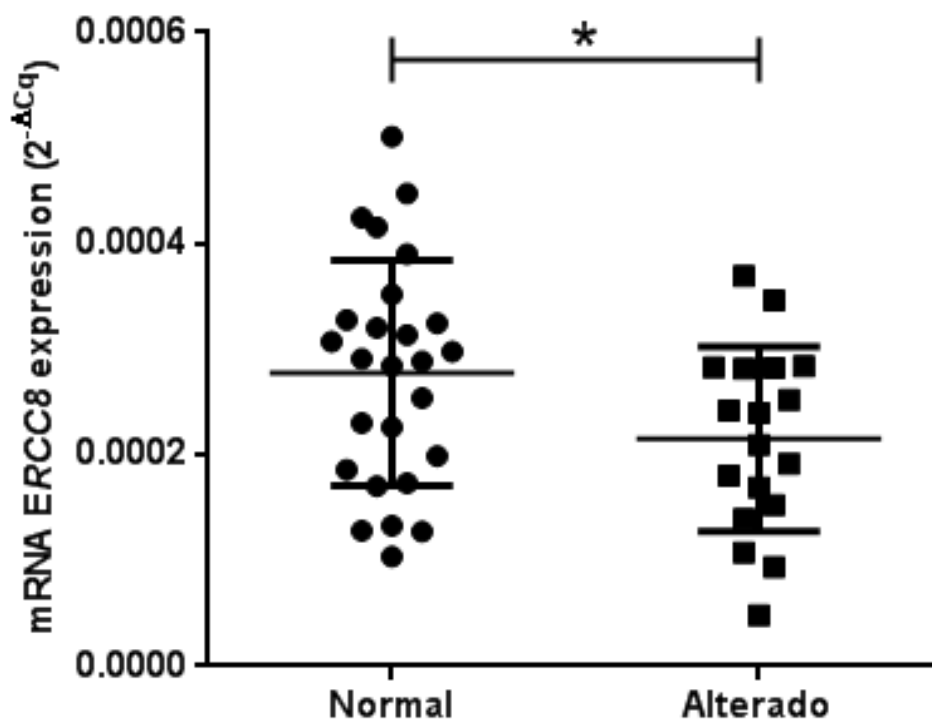
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Faixas de percentagem de blastos (categorizada)	< 5%	55	90,2%	0,000240633	0,0000146032	0,000211355	0,000269910	0,000001	0,002525
	> 5%	12	92,3%	0,000491307	0,0000645201	0,000349299	0,000633315		

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

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

Na análise do nível de expressão do *ERCC8* e o perfil citogenético dos pacientes com SMD, inicialmente, observou-se que pacientes com cariótipo normal possuem uma maior expressão do gene *ERCC8* em relação à pacientes com resultado de cariótipo alterado ($p=0,046628$; IC= 0,000001 – 0,000124) (Figura 19).

Figura 19: Nível de expressão do gene *ERCC8* em pacientes com SMD frente a variável cariótipo normal versus cariótipo alterado.



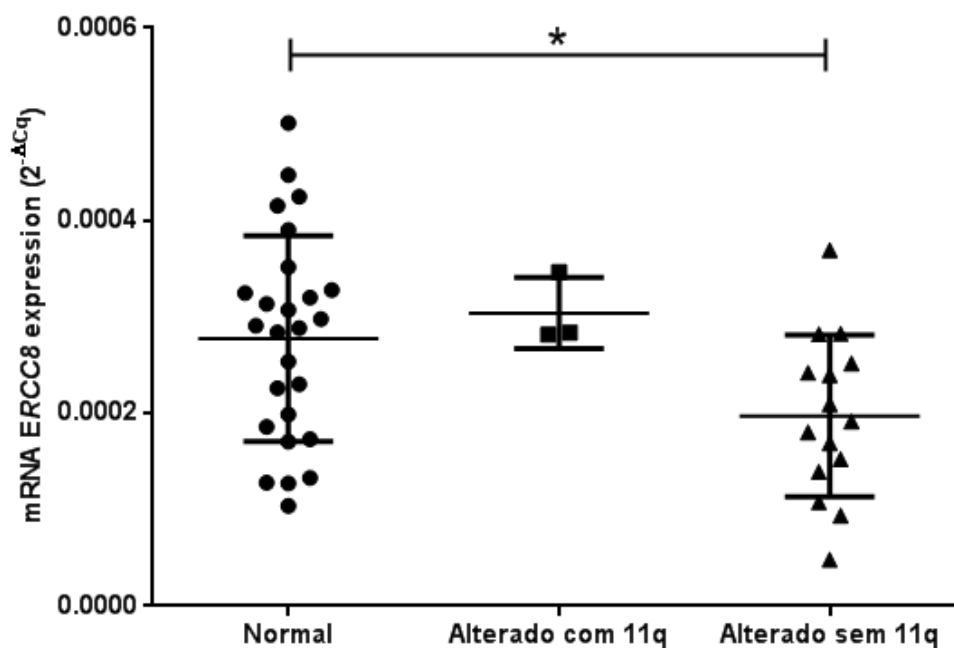
		Nível de Expressão (2 ^{-ΔCq})							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Cariótipo Normal versus Alterado	Normal	26	89,7%	0,000277659	0,0000209656	0,000234480	0,00032839	0,388760	0,046628
	Alterado	18	81,8%	0,000215145	0,0000205844	0,000171716	0,000258575		

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

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

Em relação ao nível de expressão do *ERCC8* e o perfil citogenético dos pacientes com SMD quanto a presença de alteração no braço longo do cromossomo 11, observou-se que pacientes com cariótipo alterado com 11q possuem uma maior expressão do gene *ERCC8* em relação à pacientes com resultado de cariótipo normal e estes possuem expressão do gene *ERCC8* maior que pacientes com cariótipo alterado sem 11q ($p=0,034066$; IC= 0,000006827 – 0,000181848) (Figura 20).

Figura 20: Nível de expressão do gene *ERCC8* em pacientes com SMD frente a variável Cariótipo (Presença de alteração no 11q): normal, alterado com 11q e alterado sem 11q.



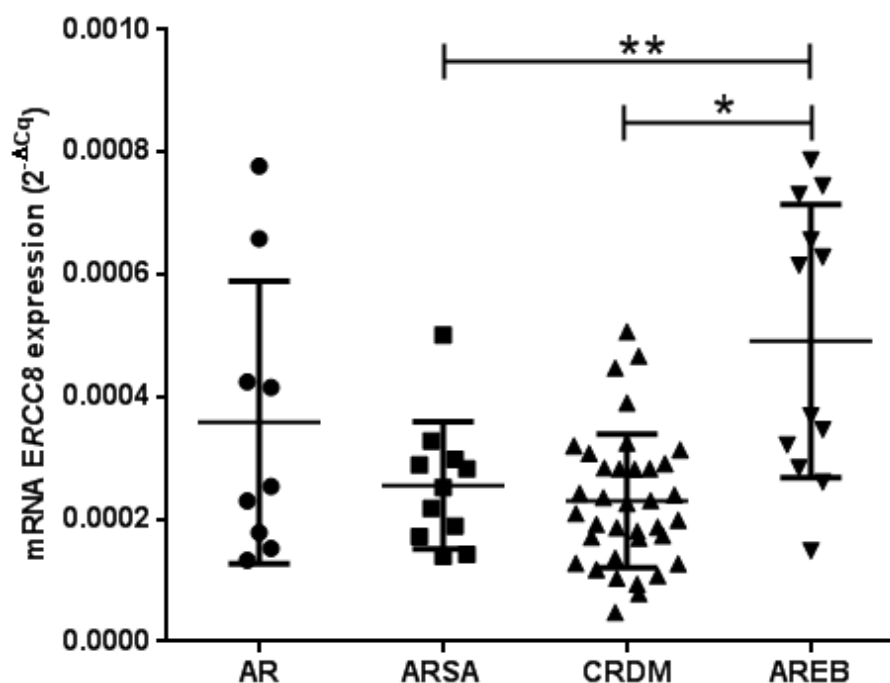
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)								
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	ANOVA‡	Teste de Levene	Tukey <i>pos-hoc</i> test
Cariótipo (Presença de alteração no 11q)	Normal	27	93,1%	0,000291707	0,0000245833	0,000241175	0,000342238	0,034066	0,192779	0,982116
	Alterado com 11q	3	75,0%	0,000304025	0,0000212537	0,000212578	0,000395473			0,982116
	Alterado sem 11q	15	83,3%	0,000197369	0,0000216584	0,000150916	0,000243822			0,297660
										0,032087*

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

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

Quanto à classificação clínica categorizada dos pacientes de acordo com os critérios preconizados pela OMS, observou-se que pacientes diagnosticados com AREB possuem um maior nível de expressão do gene *ERCC8* em relação à pacientes diagnosticados com ARSA ($p=0,021956$; IC= 0,000441233 - 0,000030229) e este, possuindo maior expressão em relação a pacientes diagnosticados com CRDM ($p=0,008935$; IC= 0,000458408 - 0,000064003) (Figura 21).

Figura 21: Nível de expressão do gene *ERCC8* em pacientes com SMD frente a classificação diagnóstica da doença.



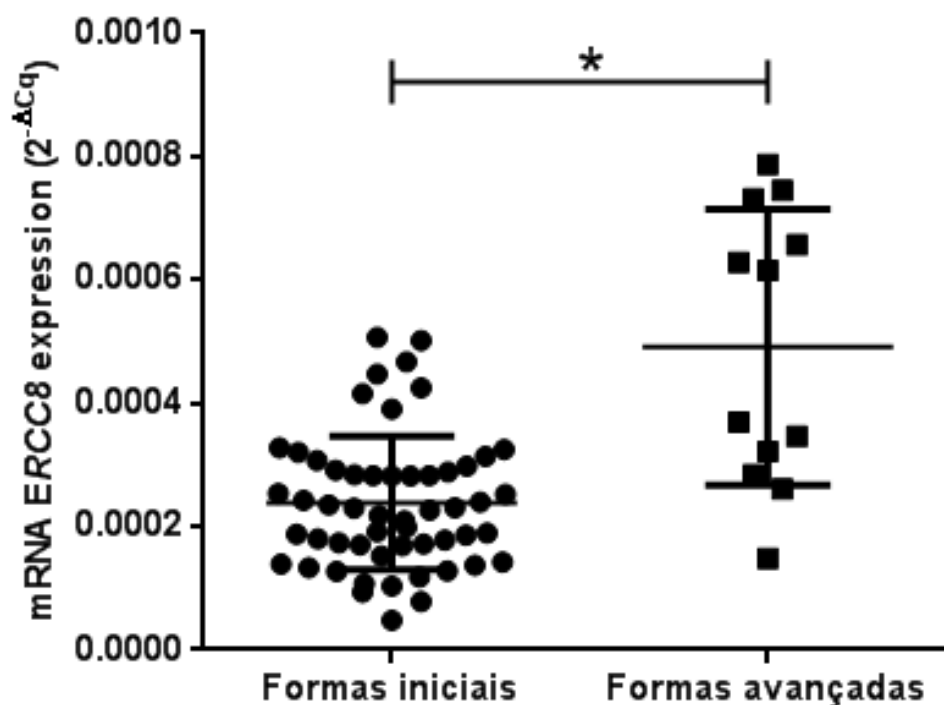
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)								
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell <i>post-hoc</i> test
Classificação diagnóstica da SMD (categorizada)	AR	9	100,0%	0,000358260	0,0000769919	0,000180716	0,000535804	0,000029	0,000007	0,619513 0,415615 0,560643
	ARSA	11	91,7%	0,000255576	0,0000313934	0,000185628	0,000325525			0,619513 0,894957 0,021956**
	CRDM	36	92,3%	0,000230102	0,0000182160	0,000193121	0,000267082			0,415615 0,894957 0,008935*
	AREB	12	92,3%	0,000491307	0,0000645201	0,000349299	0,000633315			0,560643 0,021956** 0,008935*

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

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

Em relação ao nível de expressão do gene *ERCC8* e as formas de SMD diagnosticadas nos pacientes, foi observado que pacientes com formas avançadas possuem uma maior expressão do gene *ERCC8* em relação à pacientes com formas iniciais ($p=0,002385$; IC= 0,0003967080 – 0,0001087665) (Figura 22).

Figura 22: Nível de expressão do gene *ERCC8* em pacientes com SMD frente a classificação das formas de SMD.



		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Formas de SMD	Inicial	54	90,0%	0,000238570	0,0000147270	0,000209031	0,000268109	0,000001	0,002385
	Avançada	12	92,3%	0,000491307	0,0000645201	0,000349299	0,000633315		

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

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

4.2.2 Análise do nível de expressão do gene *ERCC6* (*CSB*)

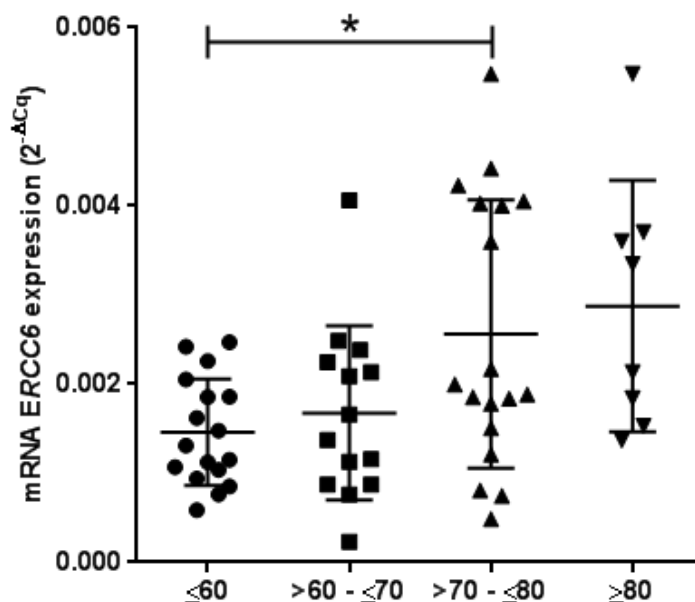
Inicialmente, em relação ao gene *ERCC6* (*CSB*), as variáveis de análise foram separadas em variáveis com significância estatística (relatadas na sessão corrente) e variáveis sem significância estatística (não demonstradas) como verificado na Figura 23.

Figura 23: Variáveis de análises com significância estatística e sem significância estatística para o gene *ERCC6* (*CSB*).

Variáveis com significância estatística	Variáveis sem significância estatística
<ul style="list-style-type: none"> • Celularidade da Medula Óssea • Celularidade da medula óssea (Categorizada) • Presença de Disritropese • Faixas de percentagens de Blastos • Faixas de percentagem de Blastos (categorizada) • Cariótipo (Quanto a alteração: normal/alterado) • Cariótipo (Presença de alteração no 11q) • Quanto à classificação da OMS • Formas da SMD 	<ul style="list-style-type: none"> • Sexo • Idade • Origem • Presença de Fibrose na medula óssea • Presença de Displasias na medula óssea • Presença de Dismegacariopese • Presença de Micromegacariócito • Presença de Sideroblastos em anel • Cariótipo • Cariótipo (Aneuploidia) • Cariótipo (Presença de alteração no 5q) • Cariótipo (Presença de alteração no 7q) • Cariótipo (Complexo - alterações no mesmo clone) • Cariótipo (presença de alterações estruturais) • Quanto ao prognóstico (IPSS-R) • Classificação dos valores de hemoglobina (HB) de acordo com o IPSS-R • Classificação dos valores de hemoglobina (HB) (categorizada) • Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) de acordo com o IPSS-R • Classificação dos valores de plaquetas de acordo com o IPSS-R • Classificação do número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS-R • Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R • Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R (categorizada) • Classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS • Dependência Transfusional • Óbito • Evolução para LMA

Quanto à associação do nível de expressão do gene *ERCC6* e idade categorizada segundo o IPSS revisado para pacientes com SMD, foi identificado que o gene *ERCC6* apresentou uma maior expressão em pacientes compreendidos na faixa etária >70 - ≤80 anos frente a pacientes compreendidos na faixa etária ≤ 60 anos ($p=0,006846$; IC= 0,000037467 – 0,002160626) (Figura 24).

Figura 24: Nível de expressão do gene *ERCC6* em pacientes com SMD frente a idade categorizada pelo IPSS revisado.



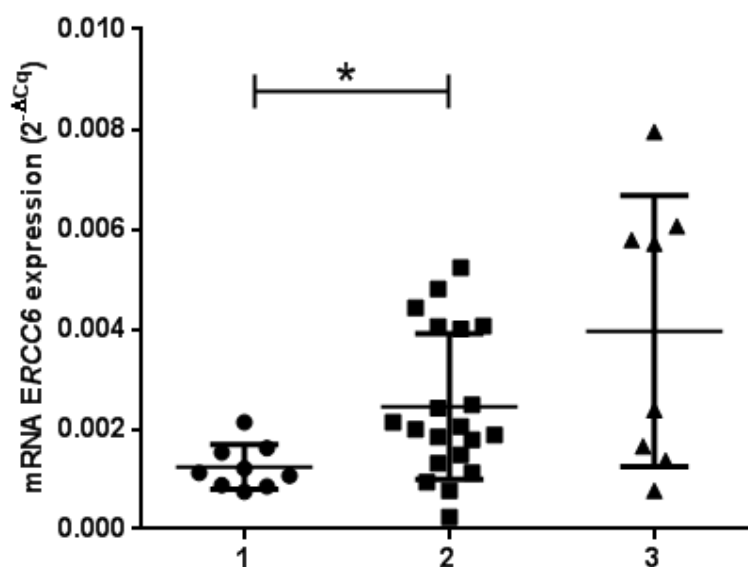
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)								
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell <i>pos-hoc</i> test
Idade categorizada IPSS-2012	≤60	17	65,4%	0,001462287	0,0001450732	0,001154745	0,001769828	0,006846	0,000343	0,889368 0,040626* 0,096319
	>60-≤70	14	77,8%	0,001676392	0,0002611978	0,001112108	0,002240675			0,889368 0,207512 0,202383
	>70-≤80	18	94,7%	0,002561333	0,0003544330	0,001813545	0,003309122			0,040626* 0,207512 0,953825
	≥80	8	72,7%	0,002877133	0,0004984456	0,001698496	0,004055769			0,096319 0,202383 0,953825

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

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

Quanto à análise da variável do número de displasias identificados na medula óssea dos pacientes com SMD, identificou-se que pacientes com 2 displasias na MO apresentam uma maior expressão do gene *ERCC6* frente à pacientes com 1 displasia ($p=0,007273$; IC= 0,000318516- 0,002103308) (Figura 25).

Figura 25: Nível de expressão do gene *ERCC6* em pacientes com SMD frente a variável Displasia na MO.



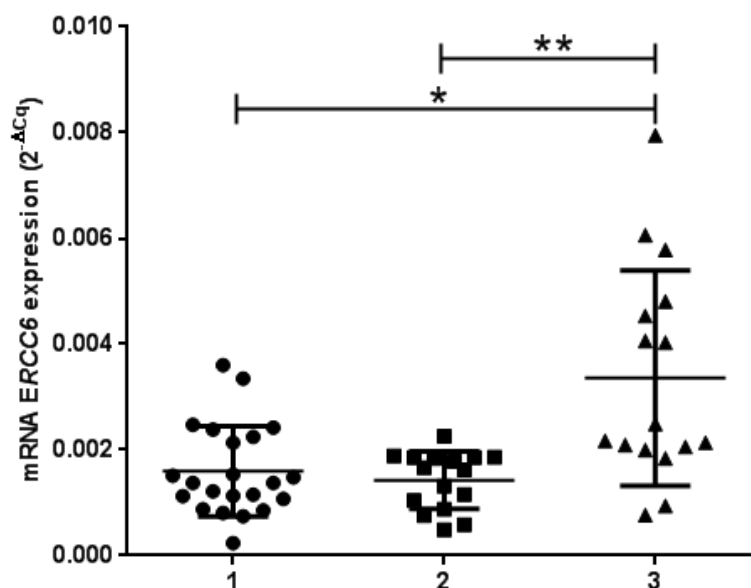
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell <i>pos-hoc</i> test
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo			
Displasia da medula óssea	1 displasia	9	75,0%	0,001240662	0,0001490860	0,000896869	0,001584455	0,007273	0,000005	0,006488* 0,058153
	2 displasias	20	95,2%	0,002451575	0,0003259409	0,001769372	0,003133777			
	3 displasias	8	88,9%	0,003960374	0,00095822165	0,001694552	0,006226196			

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

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

Quanto à análise da variável do número de citopenias identificados na medula óssea dos pacientes com SMD, identificou-se que pacientes com 3 citopenias no sangue periférico apresentam uma maior expressão do gene *ERCC6* frente à pacientes com 1 citopenia e este apresentou uma maior expressão do gene *ERCC6* frente a pacientes com 2 citopenias ($p=0,000060$; IC= 0,000386594 - 0,003281815) (Figura 26).

Figura 26: Nível de expressão do gene *ERCC6* em pacientes com SMD frente a variável número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS revisado.



		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)								
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell <i>pos-hoc</i> test
Citopenia de acordo com o IPSS-2012	1 citopenia	22	56,4%	0,001594022	0,0001820785	0,001215369	0,001972675	0,000060	0,000002	0,743855
	2 citopenias	16	84,2%	0,001426898	0,0001356197	0,001137831	0,001715964			0,011124*
	3 citopenias	16	100,0%	0,003356498	0,0005096962	0,002270107	0,004442890			0,005191**

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

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

4.2.3 Análise do nível de expressão do gene *ERCC5 (XPG)*

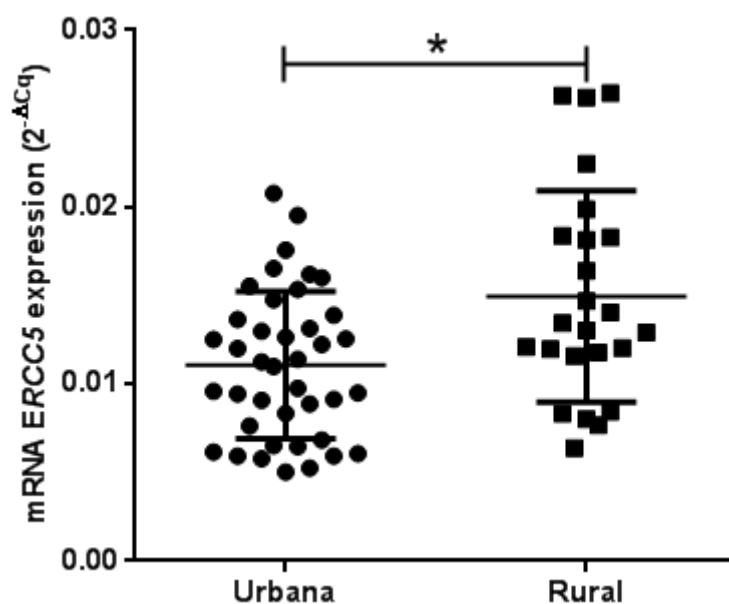
Inicialmente, em relação ao gene *ERCC5 (XPG)*, as variáveis de análise foram separadas em variáveis com significância estatística (relatadas na sessão corrente) e variáveis sem significância estatística (não demonstradas) como verificado na Figura 27.

Figura 27: Variáveis de análises com significância estatística e sem significância estatística para o gene *ERCC5 (XPG)*.

Variáveis com significância estatística	Variáveis sem significância estatística
<ul style="list-style-type: none"> • Origem • Classificação dos valores de hemoglobina (HB) (categorizada) • Classificação dos valores de plaquetas de acordo com o IPSS-R • Classificação dos valores de plaquetas de acordo com o IPSS-R (categorizada) • Classificação do número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS-R • Quanto à classificação da OMS • Formas da SMD • Dependência Transfusional • Evolução para LMA 	<ul style="list-style-type: none"> • Sexo • Idade • Celularidade da Medula Óssea • Celularidade da medula óssea (Categorizada) • Presença de Fibrose na medula óssea • Presença de Displasias na medula óssea • Presença de Diseritropoese • Presença de Dismegacariopose • Presença de Micromegacariócito • Presença de Sideroblastos em anel • Faixas de percentagens de Blastos • Faixas de percentagem de Blastos (categorizada) • Cariótipo • Cariótipo (Quanto a alteração: normal/alterado) • Cariótipo (Aneuploidia) • Cariótipo (Presença de alteração no 5q) • Cariótipo (Presença de alteração no 7q) • Cariótipo (Presença de alteração no 11q) • Cariótipo (Complexo - alterações no mesmo clone) • Cariótipo (presença de alterações estruturais) • Quanto ao prognóstico (IPSS-R) • Classificação dos valores de hemoglobina (HB) de acordo com o IPSS-R • Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) de acordo com o IPSS-R • Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R • Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R (categorizada) • Classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS • Óbito

Quanto à análise da variável origem dos pacientes com SMD, foi verificado que pacientes de origem rural apresentaram uma maior expressão do gene *ERCC5* frente a pacientes de origem urbana ($p=0,003248$; IC= 0,0064175127 - 0,0013481614) (Figura 28).

Figura 28: Nível de expressão do gene *ERCC5* em pacientes com SMD frente a variável origem.



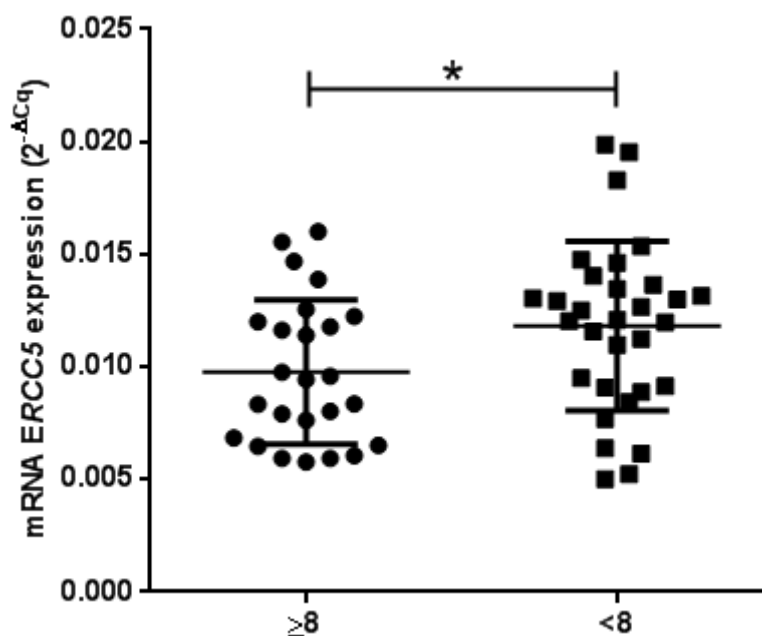
		Nível de Expressão (2 ^{-ΔCq})							Teste de Levene	p-valor†
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo			
Origem	Urbana	40	88,9%	0,011073307	0,0006573415	0,009743709	0,012402906	0,056665	0,003248	
	Rural	24	92,3%	0,014956144	0,0012196904	0,012433022	0,017479266			

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

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

Quanto à análise da variável valores de hemoglobina (HB) categorizada dos pacientes com SMD, foi verificado que pacientes com valores de hemoglobina $<8\text{g/dL}$ apresentaram uma maior expressão do gene *ERCC5* frente à pacientes com valores de hemoglobina $\geq 8\text{g/dL}$ ($p=0,035419$; IC= 0,0039406948 - 0,0001446555) (Figura 29).

Figura 29: Nível de expressão do gene *ERCC5* em pacientes com SMD frente a variável classificação dos valores de hemoglobina (HB) categorizada.



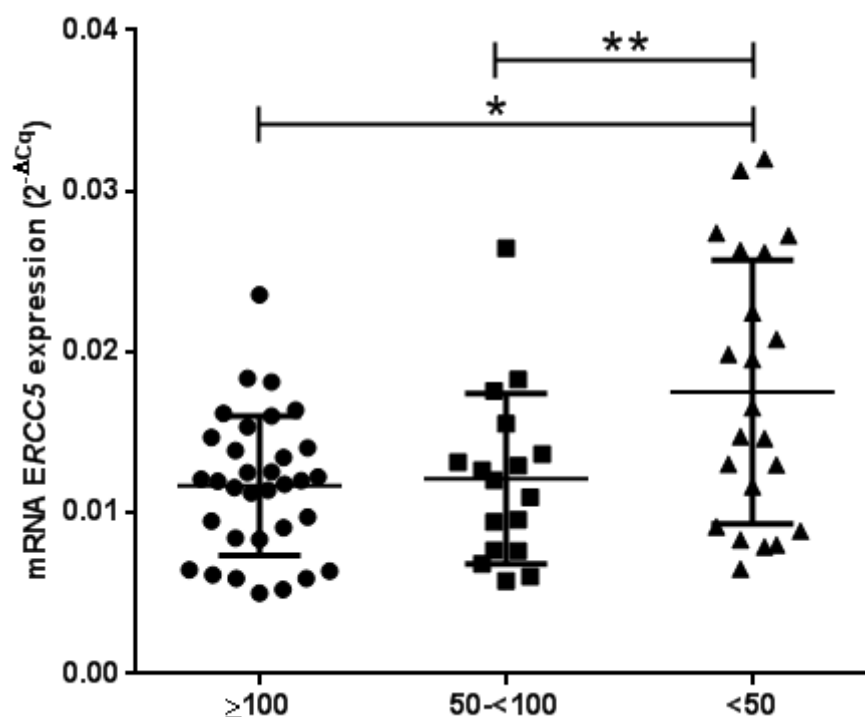
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							Teste de Levene	p-valor [‡]
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo			
Hemoglobina (HB)	$\geq 8\text{g/dL}$	25	67,6%	0,009773527	0,0006415543	0,008449424	0,011097630	0,811342	0,035419	
	$< 8\text{g/dL}$	31	83,8%	0,011816202	0,0006742779	0,010439143	0,013193262			

[‡]Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

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

Quanto à análise da variável valores de plaquetas, segundo IPSS-2012, dos pacientes com SMD, foi verificado que pacientes com valores de plaquetas $<50.000/\text{mm}^3$ apresentaram uma maior expressão do gene *ERCC5* frente à pacientes com valores de plaquetas entre $\geq 50.000 - <100.000/\text{mm}^3$ e este superior aos que apresentaram valores de plaquetas : $\geq 100.000/\text{mm}^3$ ($p=0,000282$; IC= 0,000084489 - 0,010537735) (Figura 30).

Figura 30: Nível de expressão do gene *ERCC5* em pacientes com SMD frente a variável classificação dos valores de plaquetas de acordo com o IPSS-2012.



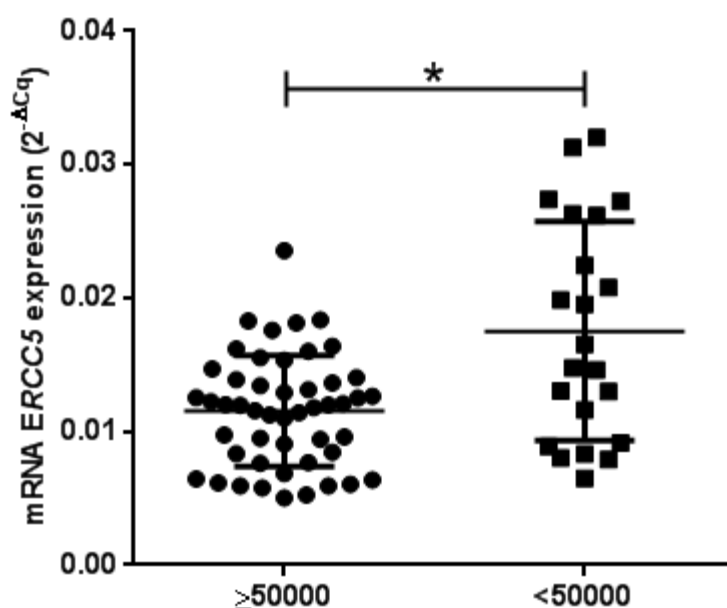
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell <i>pos-hoc</i> test
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo				
Plaquetas de acordo com o IPSS-2012	$\geq 100.000/\text{mm}^3$	33	94,3%	0,011690906	0,0007548995	0,010153226	0,013228586	0,001804	0,000282	0,952661 0,012761*	
	$\geq 50 - <100.000/\text{mm}^3$	17	100,0%	0,012133156	0,0012842408	0,009410687	0,014855625			0,952661 0,045804**	
	$<50.000/\text{mm}^3$	22	100,0%	0,017522183	0,0017494124	0,013884081	0,021160285			0,012761* 0,045804**	

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

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

Quanto à análise da variável valores de plaquetas, segundo IPSS-2012 categorizado, dos pacientes com SMD, foi verificado que pacientes com valores de plaquetas $<50.000/\text{mm}^3$ apresentaram uma maior expressão do gene *ERCC5* frente à pacientes com valores de plaquetas entre ≥ 50.000 ($p=0,003302$; IC= 0,0097776921 - 0,0021800534) (Figura 31).

Figura 31: Nível de expressão do gene *ERCC5* em pacientes com SMD frente a variável classificação dos valores de plaquetas de acordo com o IPSS-2012 categorizado.



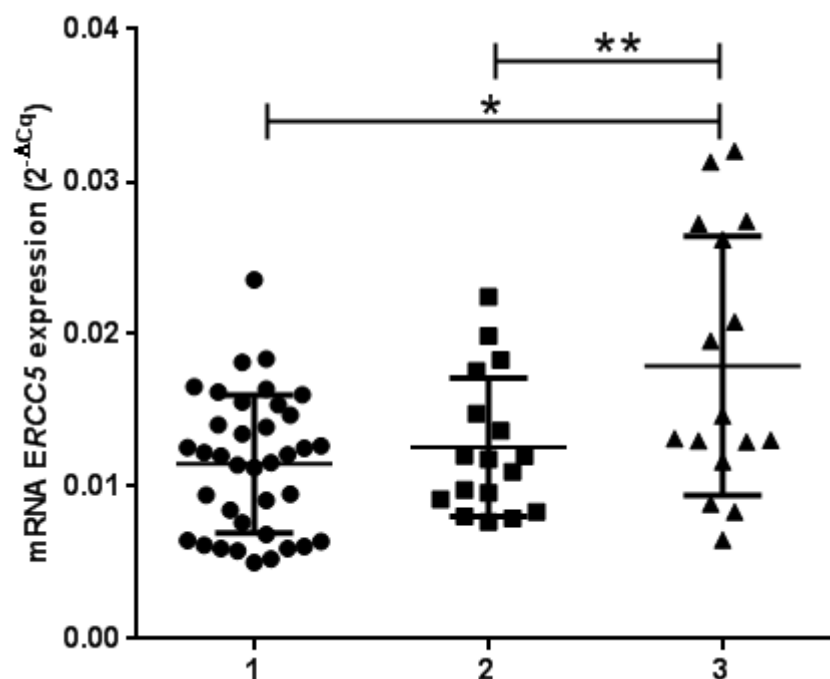
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Plaquetas de acordo com o IPSS-2012 (categorizado)	$\geq 50000/\text{mm}^3$	49	94,2%	0,011543310	0,0005958584	0,010345257	0,012741364	0,000005	0,003302
	$< 50000/\text{mm}^3$	22	100,0%	0,017522183	0,0017494124	0,013884081	0,021160285		

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

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

Quanto à análise da variável do número de citopenias identificados na medula óssea dos pacientes com SMD, identificou-se que pacientes com 3 citopenias no sangue periférico apresentam uma maior expressão do gene *ERCC5* frente à pacientes com 2 citopenias e este apresentou uma maior expressão do gene *ERCC5* frente a pacientes com 1 citopenia ($p=0,001297$; IC= 0,000714275 - 0,011331141) (Figura 32).

Figura 32: Nível de expressão do gene *ERCC5* em pacientes com SMD frente a variável número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS revisado.



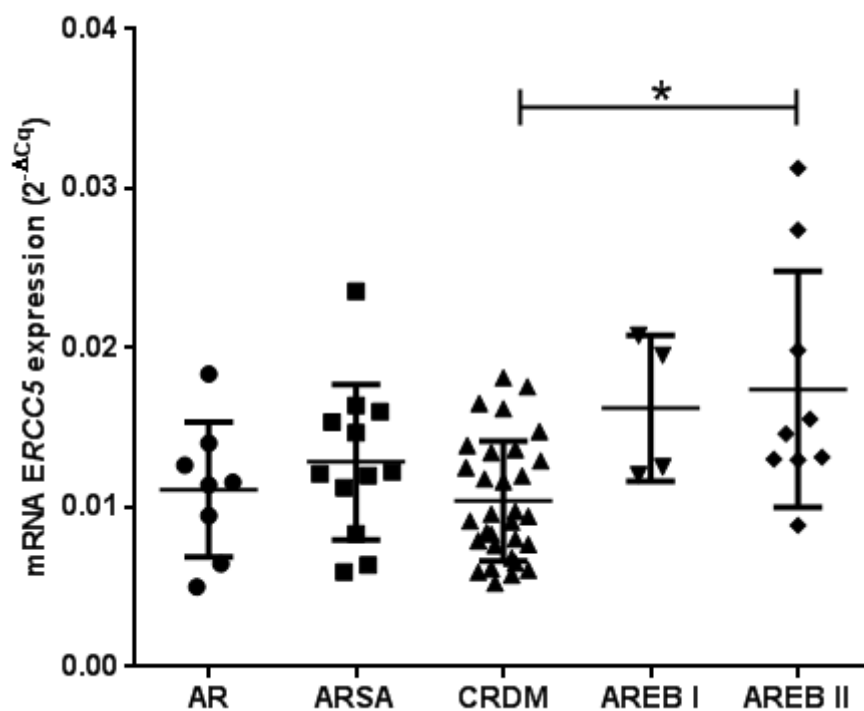
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)								
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell <i>post-hoc</i> test
Citopenia de acordo com o IPSS-2012	1 citopenia	37	94,9%	0,011470324	0,0007433672	0,009962706	0,012977943	0,001297	0,000114	0,685115
	2 citopenias	17	89,5%	0,012579475	0,0011029308	0,010241367	0,014917584			0,026065*
	3 citopenias	16	100,0%	0,017908769	0,0021247395	0,013379994	0,022437544			0,088180**

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

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

Quanto a classificação dos pacientes de acordo com as definições estabelecidas pela OMS foi verificada associação entre as categorias AREB II e CRDM, onde pacientes classificados como AREB II possuem uma maior expressão do gene *ERCC5* em relação aos pacientes diagnosticados como CRDM ($p=0,002043$; IC= 0,001223572 - 0,001989732) (Figura 33).

Figura 33: Nível de expressão do gene *ERCC5* em pacientes com SMD frente a classificação da OMS.



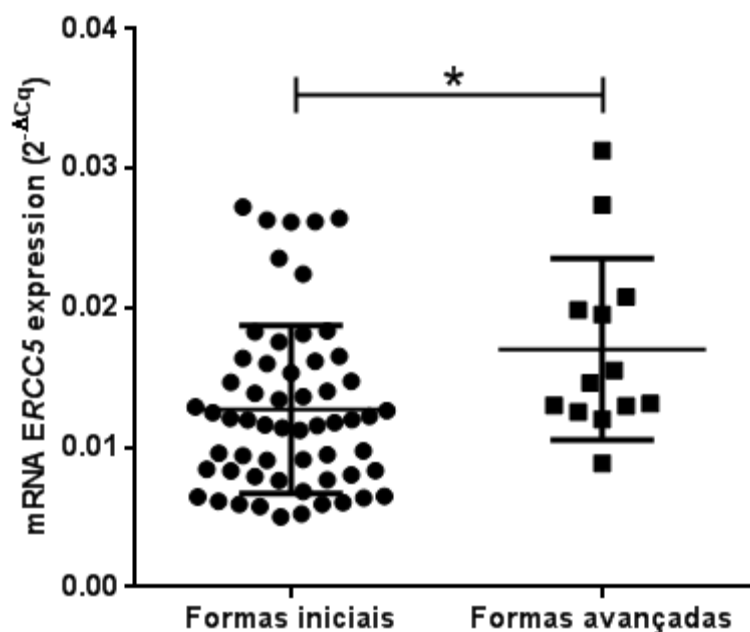
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell <i>pos-hoc</i> test
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo			
Classificação diagnóstica da SMD	AR	8	88,9%	0,011129852	0,0014952374	0,007594177	0,014665527	0,002130	0,110425	-
	ARSA	12	100,0%	0,012856814	0,0014061869	0,009761818	0,015951811			-
	CRDM	31	79,5%	0,010406390	0,0006745522	0,009028771	0,011784009			0,002043*
	AREB I	4	100,0%	0,016231211	0,0022889491	0,008946753	0,023515668			-
	AREBII	9	100,0%	0,017419487	0,0024698864	0,011723919	0,023115055			0,002043*

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

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

Em relação ao nível de expressão do gene *ERCC5* e as formas de SMD diagnosticadas nos pacientes, foi observado que pacientes com formas avançadas possuem uma maior expressão do gene *ERCC5* em relação à pacientes com formas iniciais ($p=0,024456$; IC= 0,0,0080510634 – 0,0,0005724678) (Figura 34).

Figura 34: Nível de expressão do gene *ERCC5* em pacientes com SMD frente a classificação das formas de SMD.



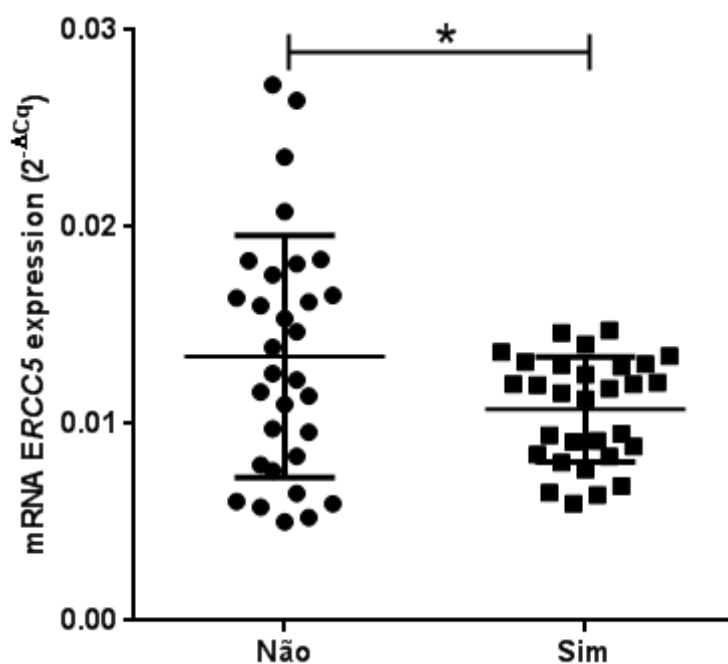
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						Teste de Levene	p-valor†
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Formas de SMD	Inicial	58	96,7%	0,012742098	0,0007909842	0,011158179	0,014326016	0,665667	0,024456
	Avançada	13	100,0%	0,017053864	0,0018010076	0,013129805	0,020977922		

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

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

Quanto à variável dependência transfusional do grupo de pacientes com SMD, pôde-se observar que pacientes sem dependência transfusional, definido de acordo com os critérios estabelecidos por Malcovati e colaboradores (2005), apresentaram um maior nível de expressão do gene *ERCC5* do que pacientes com dependência transfusional ($p=0,031367$; IC= 0,0002521801 - 0,0051199253) (Figura 35).

Figura 35: Nível de expressão do gene *ERCC5* em pacientes com SMD frente ao perfil de dependência transfusional.



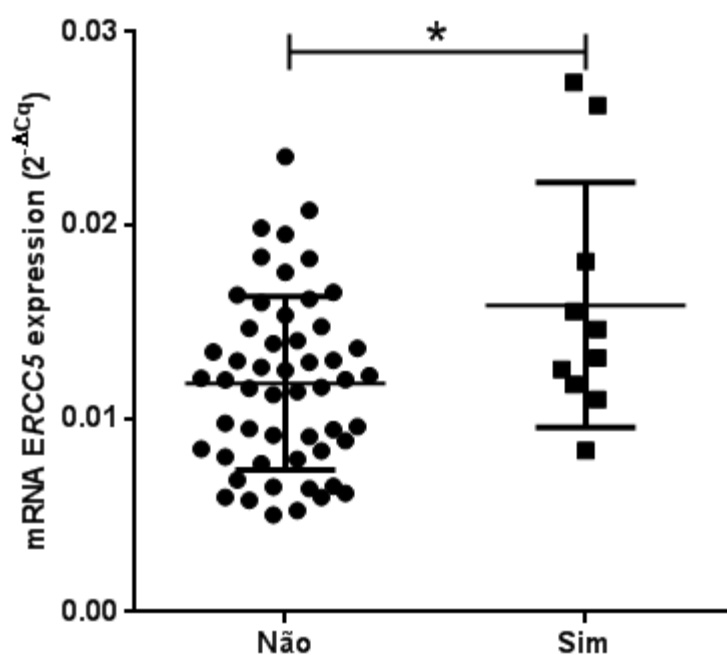
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							Teste de Levene	p-valor [‡]
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo			
Dependência transfusional	Não	31	100,0%	0,013421600	0,0011029683	0,011169038	0,015674162	0,000119	0,031367	
	Sim	30	78,9%	0,010735547	0,0004860596	0,009741444	0,011729651			

[‡]Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

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

Quanto à variável evolução para LMA, foi observado que pacientes que apresentaram quadro clínico de evolução para LMA também apresentaram um maior nível de expressão do gene *ERCC5* em relação aos pacientes que não evoluíram para LMA ($p=0,017654$; IC= 0,0073453995 – 0,0007270832) (Figura 36).

Figura 36: Nível de expressão do gene *ERCC5* em pacientes com SMD frente à variável de evolução para LMA.



		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							Teste de Levene	p-valor [‡]
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo			
Evolução para LMA	Não	53	89,8%	0,011837805	0,0006153918	0,010602931	0,013072679	0,217259	0,017654	
	Sim	10	100,0%	0,015874046	0,0020047043	0,011339090	0,020409002			

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

4.2.4 Análise do nível de expressão do gene *XPA*

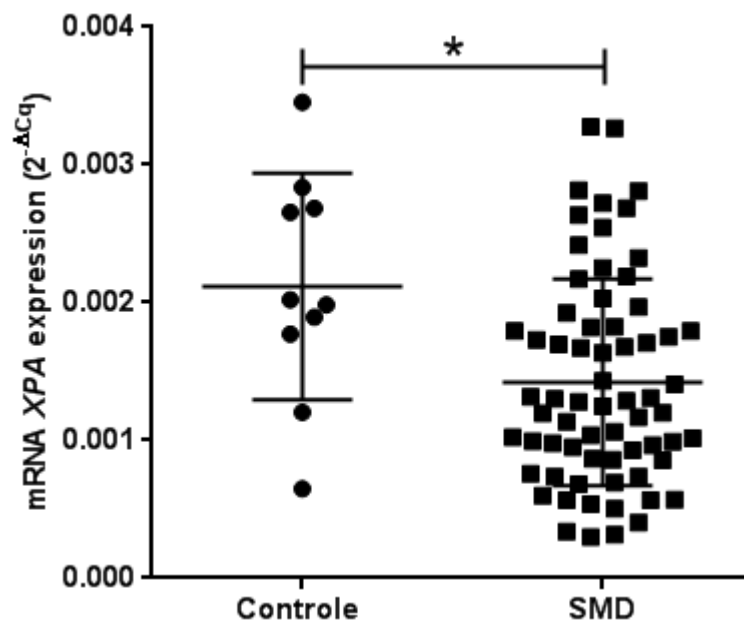
Inicialmente, em relação ao gene *XPA*, as variáveis de análise foram separadas em variáveis com significância estatística (relatadas na sessão corrente) e variáveis sem significância estatística (não demonstradas) como verificado na Figura 37.

Figura 37: Variáveis de análises com significância estatística e sem significância estatística para o gene *XPA*.

Variáveis com significância estatística	Variáveis sem significância estatística
<ul style="list-style-type: none"> • Grupo • Idade • Origem • Idade (categorizada) • Celularidade da Medula Óssea • Celularidade da medula óssea (Categorizada) • Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) de acordo com o IPSS-R • Classificação do número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS-R • Evolução para LMA 	<ul style="list-style-type: none"> • Sexo • Quanto à classificação da OMS • Formas da SMD • Presença de Fibrose na medula óssea • Presença de Displasias na medula óssea • Presença de Diseritropoese • Presença de Dismegacariopose • Presença de Micromegacariócito • Presença de Sideroblastos em anel • Faixas de percentagens de Blastos • Faixas de percentagem de Blastos (categorizada) • Cariótipo • Cariótipo (Quanto a alteração: normal/alterado) • Cariótipo (Aneuploidia) • Cariótipo (Presença de alteração no 5q) • Cariótipo (Presença de alteração no 7q) • Cariótipo (Presença de alteração no 11q) • Cariótipo (Complexo - alterações no mesmo clone) • Cariótipo (presença de alterações estruturais) • Quanto ao prognóstico (IPSS-R) • Classificação dos valores de hemoglobina (HB) de acordo com o IPSS-R • Classificação dos valores de hemoglobina (HB) (categorizada) • Classificação dos valores de plaquetas de acordo com o IPSS-R • Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R • Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R (categorizada) • Classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS • Dependência Transfusional • Óbito

Quanto à variável Grupo, foi observado que pacientes categorizados como Controle apresentaram um maior nível de expressão do gene *XPA* em relação aos pacientes categorizados como Caso ($p=0,008653$; IC= 0,0001814053 – 0,0,0012077668) (Figura 38).

Figura 38: Nível de expressão do gene *XPA* em pacientes com SMD frente à variável Grupo.



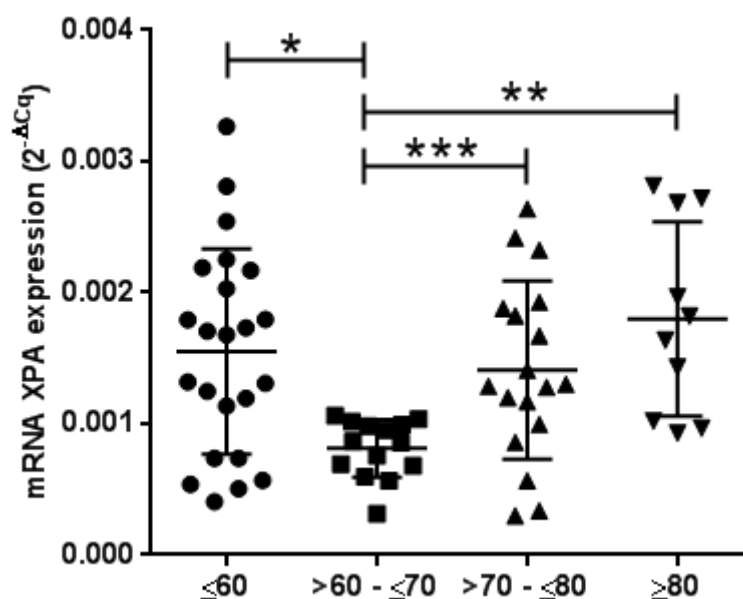
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						Teste de Levene	p-valor [‡]
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Grupo	Controle	10	100,0%	0,002116146	0,0002604682	0,001526926	0,002705366	0,921225	0,008653
	Caso	67	90,5%	0,001421560	0,0000917215	0,001238432	0,001604687		

[‡]Teste *t* de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

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

Quanto à associação do nível de expressão do gene *XPA* e idade segundo o IPSS revisado para pacientes com SMD, identificou-se que o gene *XPA* apresentou uma maior expressão em pacientes compreendidos na faixa etária ≥ 80 anos frente a pacientes compreendidos na faixa etária ≤ 60 anos, que apresentou maior expressão frente a pacientes compreendidos na faixa etária $>70-\leq 80$ anos e este apresentou maior expressão do gene *XPA* frente a pacientes compreendidos na faixa etária $>60-\leq 70$ (p=0,002665; IC= 0,000124363 – 0,001721836) (Figura 39).

Figura 39: Nível de expressão do gene *XPA* em pacientes com SMD frente a idade categorizada pelo IPSS revisado.



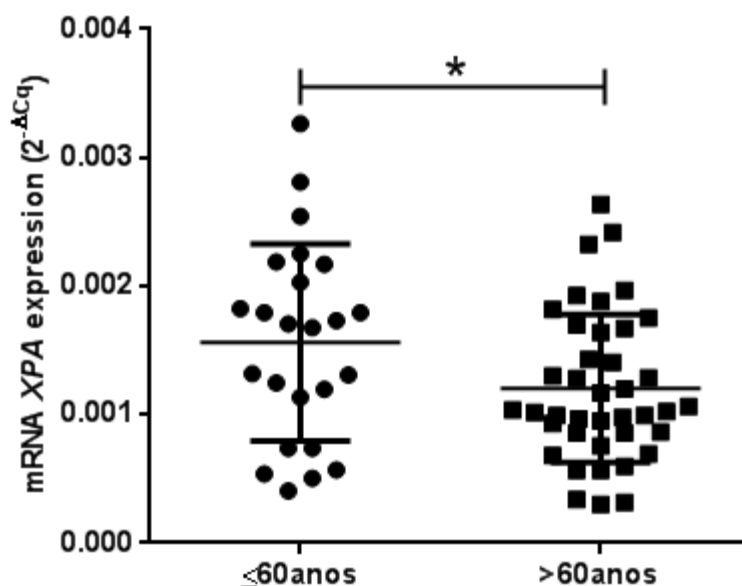
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell <i>post-hoc</i> test
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo			
Idade IPSS-2012	≤ 60	23	88,8%	0,001550386	0,0001629768	0,001212392	0,00188379	0,002665	0,003615	0,001174*
	$>60-\leq 70$	14	77,8%	0,000812143	0,0000587344	0,000685255	0,000939030			0,926298
	$>70-\leq 80$	18	94,7%	0,001409823	0,0001596120	0,001073071	0,001746575			0,010065***
	≥ 80	10	90,9%	0,001799053	0,0002335779	0,001270663	0,002327442			0,009462**
										0,818581
										0,530025

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

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

Quanto à associação do nível de expressão do gene *XPA* e idade segundo o IPSS categorizado para pacientes com SMD, identificou-se que o gene *XPA* apresentou uma maior expressão em pacientes compreendidos na faixa etária ≤ 60 anos frente a pacientes compreendidos na faixa etária > 60 anos ($p= 0,037400$; IC= 0,0000215732 – 0,0,0006948327) (Figura 40).

Figura 40: Nível de expressão do gene *XPA* em pacientes com SMD frente a idade pelo IPSS categorizado.



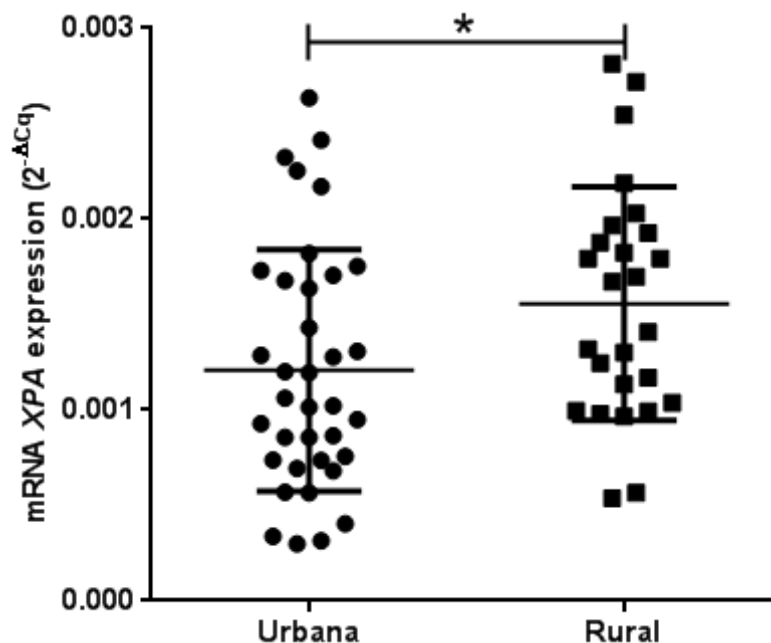
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						Teste de Levene	p-valor [‡]
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Idade IPSS-2012 (categorizado)	≤ 60 anos	24	88,9%	0,001561799	0,0001564552	0,001238146	0,001885451	0,091638	0,037400
	> 60 anos	40	85,1%	0,00123596	0,0000908011	0,001019933	0,001387258		

[‡]Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

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

Quanto à análise da variável origem dos pacientes com SMD, foi verificado que pacientes de origem rural apresentaram uma maior expressão do gene *XPA* frente à pacientes de origem urbana ($p=0,033395$; IC=0,0006714980 - 0,0000284644) (Figura 41).

Figura 41: Nível de expressão do gene *XPA* em pacientes com SMD frente a variável origem.



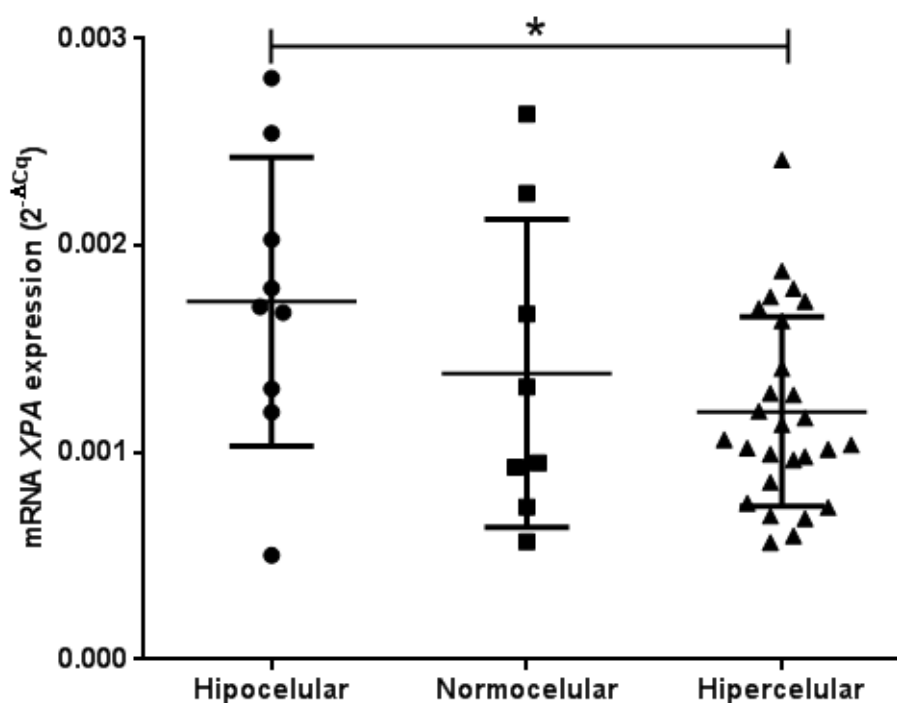
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Origem	Urbana	36	80,0%	0,001207841	0,0001056636	0,000993333	0,001422350	0,913210	0,033395
	Rural	26	100,0%	0,001557823	0,0001198357	0,001311016	0,001804629		

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

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

Quanto à associação do nível de expressão do gene *XPA* e o perfil de celularidade da medula óssea de pacientes com SMD, identificou-se que o gene *XPA* apresenta uma maior expressão em pacientes com medula hipocelular frente a pacientes com medula hipercelular ($p=0,061571$; IC= $1,82E-7 - 0,001018196$) (Figura 42).

Figura 42: Nível de expressão do gene *XPA* em pacientes com SMD frente a variável Celularidade da MO.



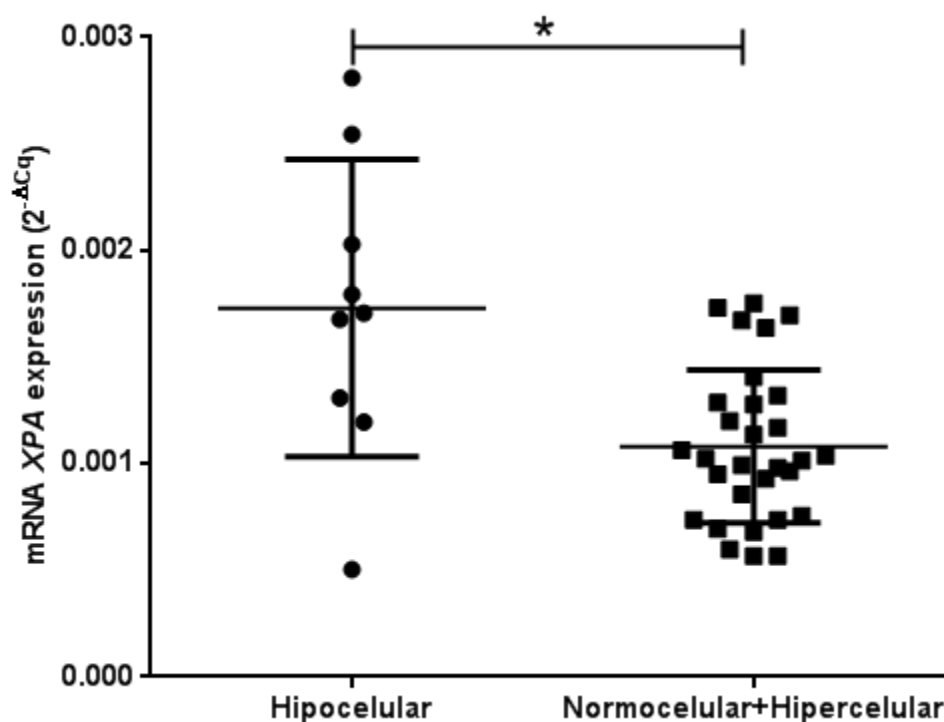
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							ANOVA†	Teste de Levene	Tukey <i>pos-hoc</i> test
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo				
Celularidade da medula óssea	Hipocelular	9	100,0%	0,001729973	0,0002324998	0,001193827	0,002266118	0,061571	0,170834	0,427546	
	Normocelular	8	88,9%	0,001383091	0,0002634911	0,000760033	0,002006148			0,427546	
	Hipercelular	27	81,8%	0,001198030	0,0000881497	0,001016836	0,001379224			0,699532	
										0,427546	
										0,699532	

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

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

Quanto ao perfil de celularidade da medula óssea de pacientes com SMD, observou-se que pacientes com medula óssea hipocelular apresentam uma maior expressão do gene *XPA* em relação à pacientes com medula óssea categorizada em normocelular + hipercelular ($p=0,000583$; IC= 0,0002994033 – 0,0009982221) (Figura 43).

Figura 43: Nível de expressão do gene *XPA* em pacientes com SMD frente à variável de celularidade da medula óssea em pacientes com SMD.



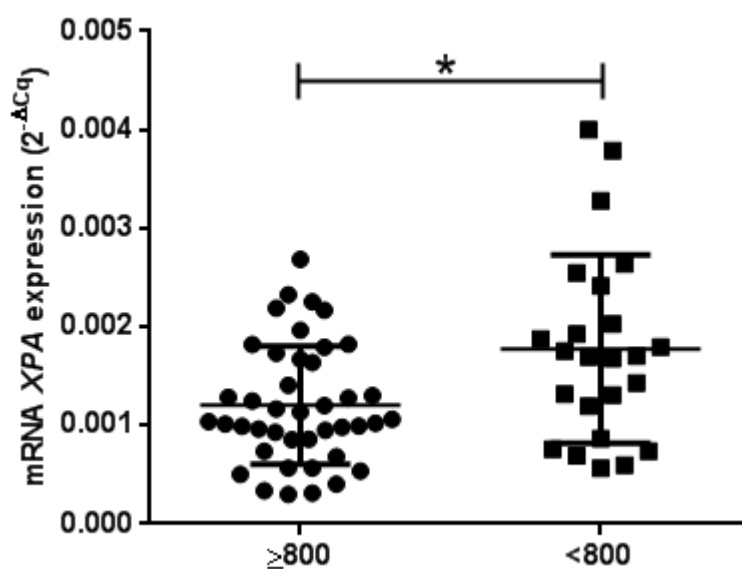
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						Teste de Levene	p-valor†
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Celularidade da medula óssea (Categorizada)	Hipocelular	9	100,0%	0,001729973	0,0002324998	0,001193827	0,002266118	0,050142	0,000583
	Normocelular + Hipercelular	30	71,4%	0,001081160	0,0000654374	0,000947325	0,001214994		

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

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

Quanto a classificação dos valores de neutrófilos (ANC) de acordo com o IPSS revisado, de pacientes com SMD, observou-se que pacientes com valores de neutrófilos $<800/\text{mm}^3$ apresentam uma maior expressão do gene *XPA* em relação à pacientes com valores de neutrófilos $\geq 800/\text{mm}^3$ ($p=0,004245$; IC=0,0009494217 – 0,0001851046) (Figura 44).

Figura 44: Nível de expressão do gene *XPA* em pacientes com SMD frente à variável classificação dos valores de neutrófilos (ANC) de acordo com o IPSS revisado em pacientes com SMD.



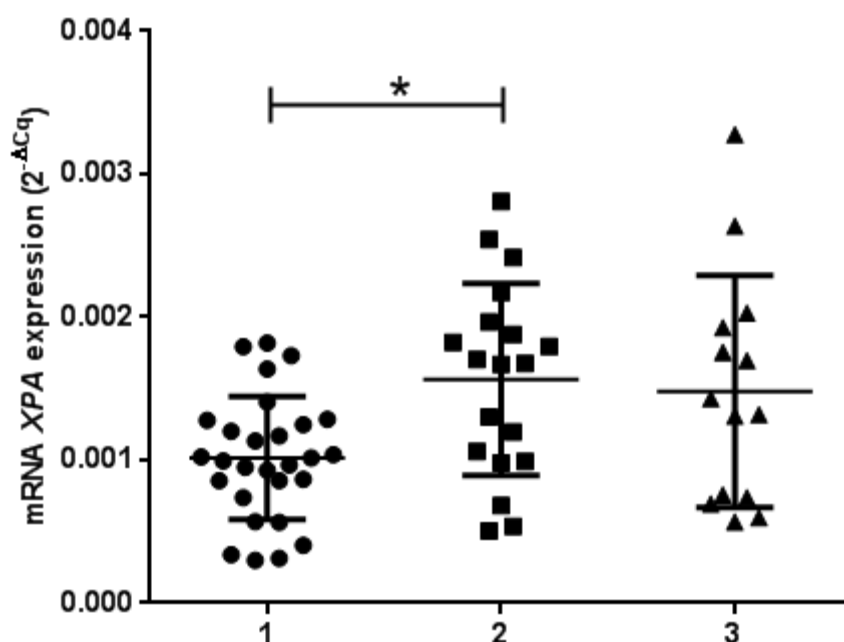
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Valores de neutrófilos IPSS-2012	$\geq 800/\text{mm}^3$	42	85,7%	0,001207322	0,0000927759	0,001019957	0,001394687	0,056005	0,004245
	$< 800/\text{mm}^3$	24	96,0%	0,001774585	0,0001948029	0,001371605	0,002177566		

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

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

Quanto à análise da variável do número de citopenias identificados na medula óssea dos pacientes com SMD, identificou-se que pacientes com 2 citopenias no sangue periférico apresentam uma maior expressão do gene *XPA* frente à pacientes com 3 citopenias e este apresentou uma maior expressão do gene *XPA* frente a pacientes com 1 citopenia ($p=0,006946$; IC= 0,000979287 - 0,000117812) (Figura 45).

Figura 45: Nível de expressão do gene *XPA* em pacientes com SMD frente a variável número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS revisado.



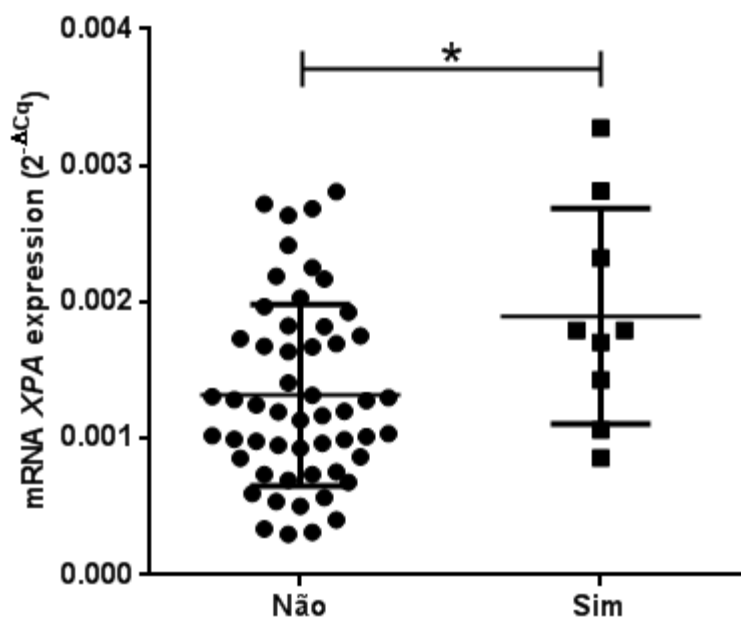
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)								
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell <i>pos-hoc</i> test
Citopenia de acordo com o IPSS-2012	1 citopenia	28	71,8%	0,001015368	0,0000811279	0,000848907	0,001181829	0,006946	0,017235	0,010433*
	2 citopenias	19	100,0%	0,001563917	0,0001539988	0,01240378	0,001887457			0,010433*
	3 citopenias	14	87,5%	0,001480564	0,0002168027	0,001012190	0,001948937			0,140630
										0,947398

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

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

Quanto ao quesito Evolução para LMA, foi identificado que pacientes que apresentaram, no percurso da doença, evolução clínica para LMA, apresentaram maior nível de expressão do gene *XPA* em relação à pacientes que não evoluíram para LMA ($p=0,022442$; IC= 0,0010684647 – 0,0000843381) (Figura 46).

Figura 46: Nível de expressão do gene *XPA* em pacientes com SMD que evoluíram para LMA.



		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor [‡]
Evolução para LMA	Não	54	91,5%	0,001319242	0,0000906404	0,001137441	0,001501044	0,647882	0,022442
	Sim	9	90,0%	0,001895644	0,0002630453	0,001289060	0,002502227		

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

4.2.5 Análise do nível de expressão do gene *XPC*

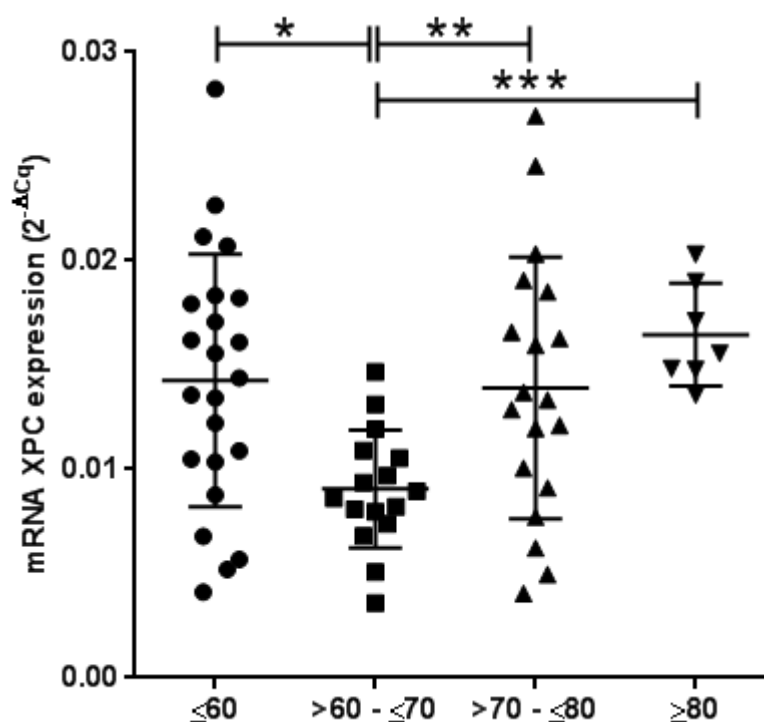
Inicialmente, em relação ao gene *XPC*, as variáveis de análise foram separadas em variáveis com significância estatística (relatadas na sessão corrente) e variáveis sem significância estatística (não demonstradas) como verificado na Figura 47.

Figura 47: Variáveis de análises com significância estatística e sem significância estatística para o gene *XPC*.

Variáveis com significância estatística	Variáveis sem significância estatística
<ul style="list-style-type: none"> • Idade • Celularidade da medula óssea (Categorizada) • Presença de Sideroblastos em anel 	<ul style="list-style-type: none"> • Sexo • Origem • Quanto à classificação da OMS • Formas da SMD • Celularidade da Medula Óssea • Presença de Fibrose na medula óssea • Presença de Displasias na medula óssea • Presença de Diseritropoese • Presença de Dismegacariopoese • Presença de Micromegacariócito • Faixas de percentagens de Blastos • Faixas de percentagem de Blastos (categorizada) • Cariótipo • Cariótipo (Quanto a alteração: normal/alterado) • Cariótipo (Aneuploidia) • Cariótipo (Presença de alteração no 5q) • Cariótipo (Presença de alteração no 7q) • Cariótipo (Presença de alteração no 11q) • Cariótipo (Complexo - alterações no mesmo clone) • Cariótipo (presença de alterações estruturais) • Quanto ao prognóstico (IPSS-R) • Classificação dos valores de hemoglobina (HB) de acordo com o IPSS-R • Classificação dos valores de hemoglobina (HB) (categorizada) • Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) de acordo com o IPSS-R • Classificação dos valores de plaquetas de acordo com o IPSS-R • Classificação do número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS-R • Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R • Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R (categorizada) • Classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS • Dependência Transfusional • Óbito • Evolução para LMA

Quanto à associação do nível de expressão do gene *XPC* e idade segundo o IPSS revisado para pacientes com SMD, identificou-se que o gene *XPC* apresentou uma maior expressão em pacientes compreendidos na faixa etária ≥ 80 anos frente a pacientes compreendidos na faixa etária ≤ 60 anos, que apresentou maior expressão frente a pacientes compreendidos na faixa etária $>70-\leq 80$ anos e este apresentou maior expressão do gene *XPC* frente a pacientes compreendidos na faixa etária $>60-\leq 70$ (p=0,005345 ; IC= 0,000449455 – 0,010819107) (Figura 48).

Figura 48: Nível de expressão do gene *XPC* em pacientes com SMD frente a idade categorizada pelo IPSS revisado.



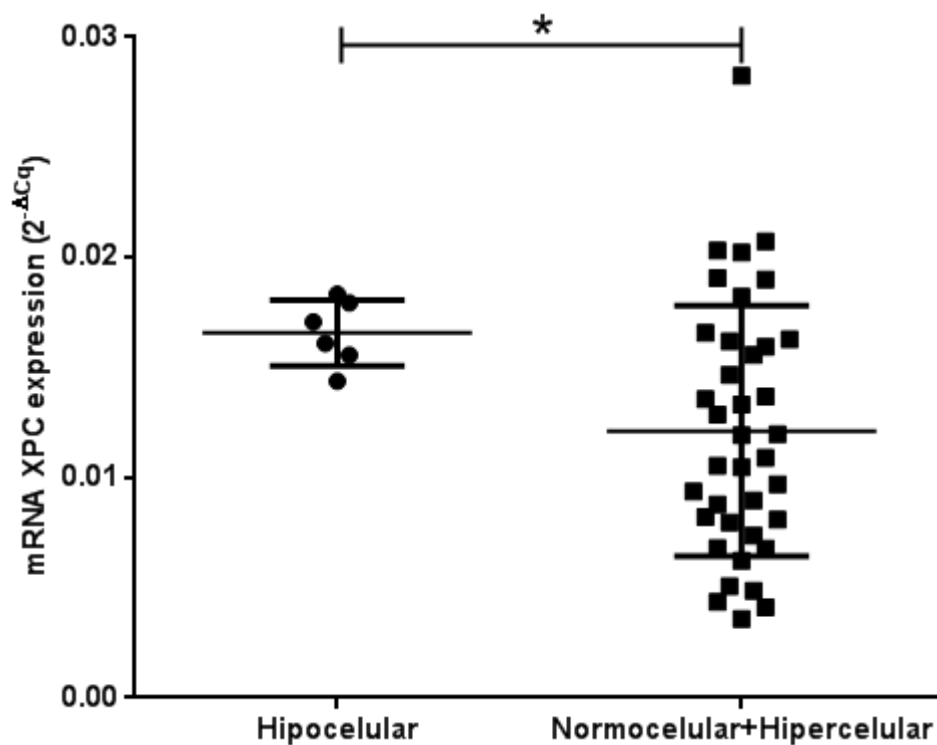
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell <i>post-hoc</i> test
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo			
Idade IPSS-2012	≤ 60	23	88,5%	0,014266588	0,0012643440	0,011644499	0,016888677	0,005345	0,010310	0,005419*
	$>60-\leq 70$	16	88,9%	0,009056800	0,0007049040	0,007554332	0,010559267			0,997638
	$>70-\leq 80$	19	100,0%	0,013908060	0,0014408242	0,010881001	0,016935120			0,514923
	≥ 80	7	63,6%	0,016454005	0,0009306159	0,014176870	0,018731140			0,005419*
										0,462203

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

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

Quanto ao perfil de celularidade (categorizada) da medula óssea de pacientes com SMD, observou-se que pacientes com medula óssea hipocelular apresentam uma maior expressão do gene *XPC* em relação à pacientes com medula óssea categorizada em normocelular + hipercelular ($p=0,000340$; IC= 0,0021917275 – 0,0067043853) (Figura 49).

Figura 49: Nível de expressão do gene *XPC* em pacientes com SMD frente à variável de celularidade da medula óssea em pacientes com SMD.



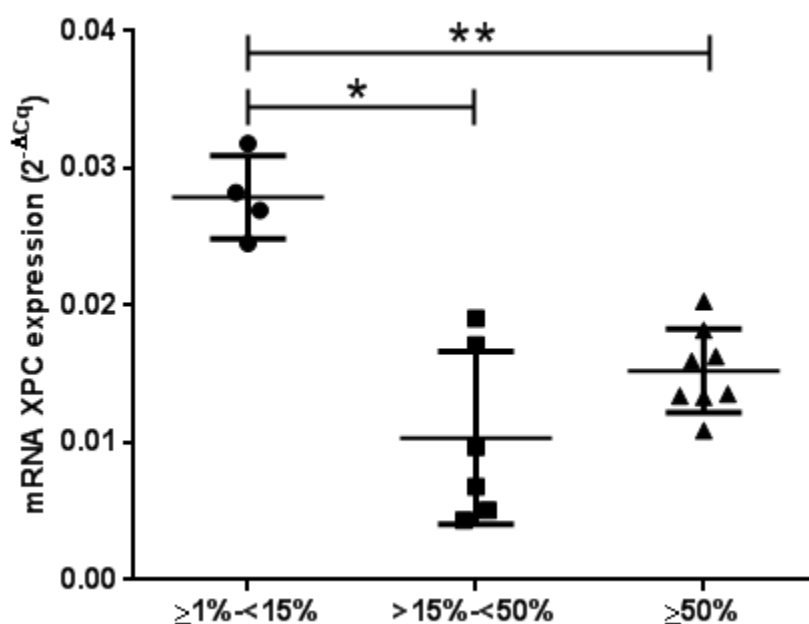
		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Celularidade da medula óssea (Categorizada)	Hipocelular	6	66,7%	0,016567125	0,006119905	0,014993954	0,018140297	0,012272	0,000340
	Normocelular + Hipercelular	38	90,5%	0,012119069	0,009225352	0,010249835	0,013988303		

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

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

Quanto à variável de presença de sideroblastos em anel na medula óssea dos pacientes com SMD. Nesta análise, verificou-se que pacientes que possuem valor na faixa de $\geq 1\%$ - $< 15\%$ possuem um maior nível de expressão do *XPC* frente aos pacientes inseridos com valores $\geq 50\%$ e este com maior expressão do gene *XPC* em relação a pacientes com valores $\geq 15\%$ - $< 50\%$ em pacientes com presença de sideroblastos em anel na MO ($p = 0,000067$; IC= 0,005634453 – 0,024920488) (Figura 50).

Figura 50: Nível de expressão do gene *XPC* em pacientes com SMD frente à presença de Sideroblastos em anel na MO.



		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						ANOVA†	Teste de Levene	Tukey <i>post-hoc</i> test
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo			
Presença de Sideroblastos em anel na MO	$\geq 1\%$ - $< 15\%$	4	80,0%	0,027885145	0,0015150603	0,023063547	0,032706743	0,000067	0,050078	0,000051* 0,000804**
	$\geq 15\%$ - $< 50\%$	6	85,7%	0,010349576	0,0025727765	0,003736043	0,016963108			0,000051* 0,132707
	$\geq 50\%$	8	72,7%	0,015244742	0,0010763663	0,012699540	0,017789944			0,000804** 0,132707

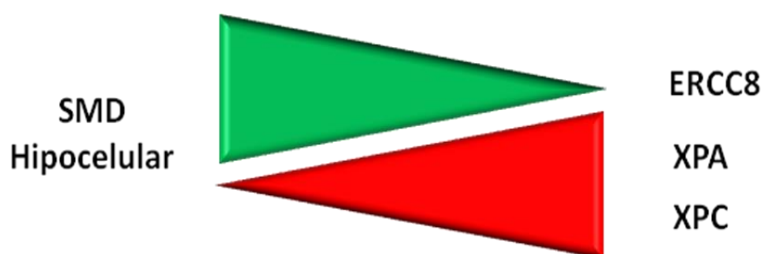
†ANOVA one-way. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

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

Em suma, pode-se relatar que os resultados apresentados demonstram que:

1. Ocorre uma importante redução da expressão do gene *ERCC8* e aumento dos genes *XPA* e *XPC* em pacientes com SMD hipocelular (figura 51);

Figura 51: Resultados dos níveis de expressão dos genes *ERCC8*, *XPA* e *XPC* em pacientes com SMD hipocelular.



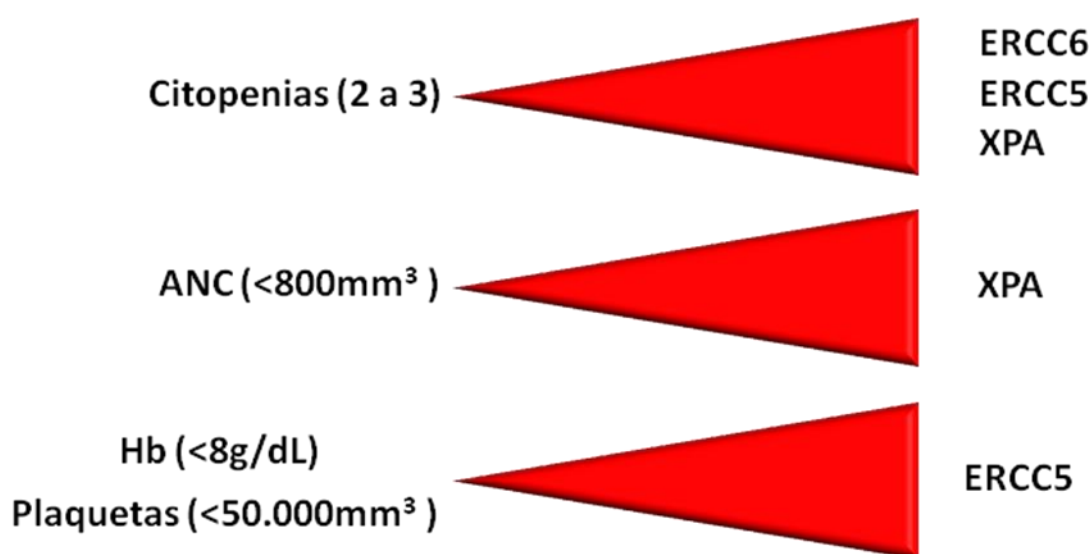
2. Tem-se um aumento dos níveis de expressão dos genes *ERCC8*, *ERCC5* e *XPA* em pacientes com faixas de percentagens de blastos entre 5%-10%, cariótipo alterado, AREB, formas avançadas, dependência transfusional e evolução para LMA.

Figura 52: Resultados dos níveis de expressão dos genes *ERCC8*, *XPA* e *XPC* em pacientes com faixas de percentagens de blastos entre 5%-10%, cariótipo alterado, AREB, formas avançadas, dependência transfusional e evolução para LMA.



3. Há um importante aumento nos níveis de expressão dos genes ERCC6, ERCC5 e XPA em pacientes com número de citopenias (duas e três citopenias), valores de neutrófilos menor que $800/\text{mm}^3$, hemoglobina menor que 8g/dL e plaquetas menor que $50000/\text{mm}^3$.

Figura 53: Resultado dos níveis de expressão dos genes ERCC6, ERCC5 e XPA em pacientes com número de citopenias (duas e três citopenias), valores de neutrófilos menor que $800/\text{mm}^3$, hemoglobina menor que 8g/dL e plaquetas menor que $50000/\text{mm}^3$.



4. Tem-se um importante aumento nos níveis de expressão dos genes ERCC6, ERCC5, XPA e XPC em pacientes com SMD, de origem rural e idade menor/igual a 70 anos.

Figura 54: Resultado dos níveis de expressão dos genes ERCC6, XPA e XPC em pacientes com SMD e idade menor/igual a 70 anos.



5. Há um importantes aumento do nível de expressão do gene XPC em pacientes com percentagem de sideroblastos em anel entre 1% e 15%.

Figura 55: Resultado do nível de expressão do gene XPC em pacientes com SMD quanto a percentagem de sideroblastos em anel entre 1% e 15%.



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

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

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

Gene	Cutoff*	Faixa**		OR	IC		p valor
		Superior	Inferior				
<i>ERCC8</i>	0.0002529	40 (54.1%)	34 (45.9%)	0.5	0.26	0.98	0.04
<i>ERCC5</i>	0.01472	25 (33.8%)	49 (66.2%)	2.62	1.33	5.14	0.0038
<i>XPA</i>	0.001807	25 (33.8%)	49 (66.2%)	10.63	3.92	28.87	0.000000031
<i>XPC</i>	0.0171	22 (29.7%)	52 (70.3%)	2.59	1.15	5.81	0.017

*Algoritmo estabelecido pelo software *Cutoff Finder*

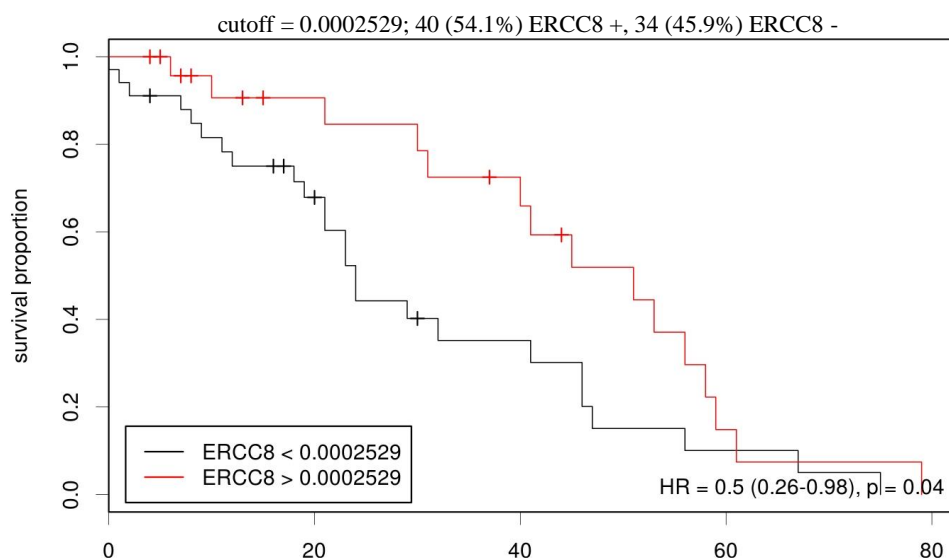
**Faixa de pacientes com expressão superior ou inferior ao *cut-off* estabelecido.

OR – Odds-Ratio / IC – Intervalo de Confiança

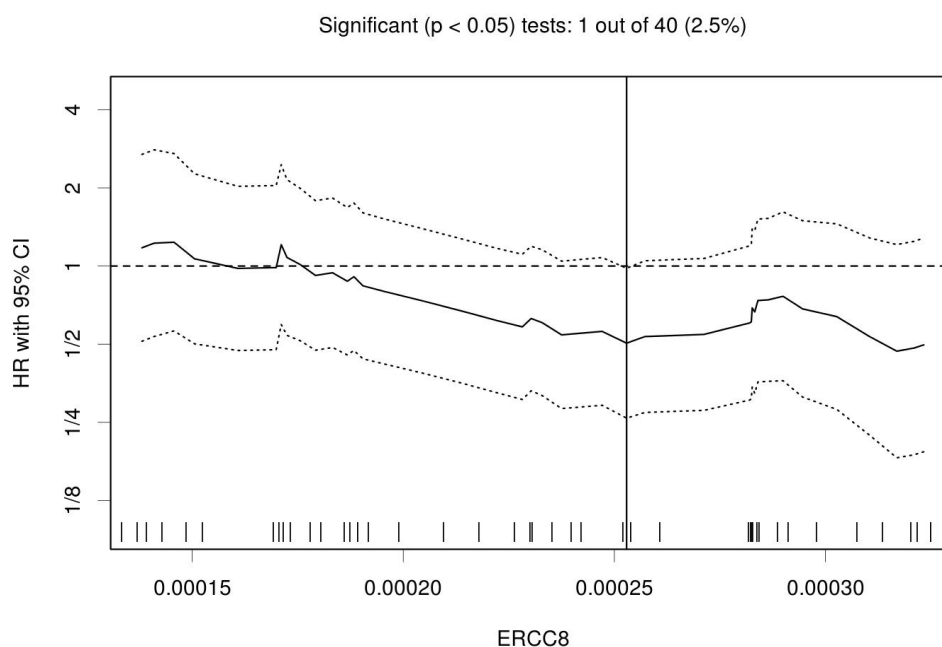
A tabela 14 apresenta, inicialmente, a análise de correlação da sobrevida dos pacientes com SMD e o nível de expressão do gene *ERCC8*, demonstrando que 40 (54.1%) pacientes com níveis de expressão superior ao *cutoff* de 0.0002529 possuem uma maior sobrevida (Figura 56A), com uma taxa de risco (HR, *hazard ratio*) de 0.5 (IC= 0.26-0.98) e com uma correlação significativa ($p=0.04$) entre 2.5% dos pontos de corte investigados, conforme apresentado na figura 56B.

Figura 56: Análises de associação entre o nível de expressão do gene *ERCC8* e a sobrevida dos pacientes com SMD. **A.** Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). **B.** Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida.

A



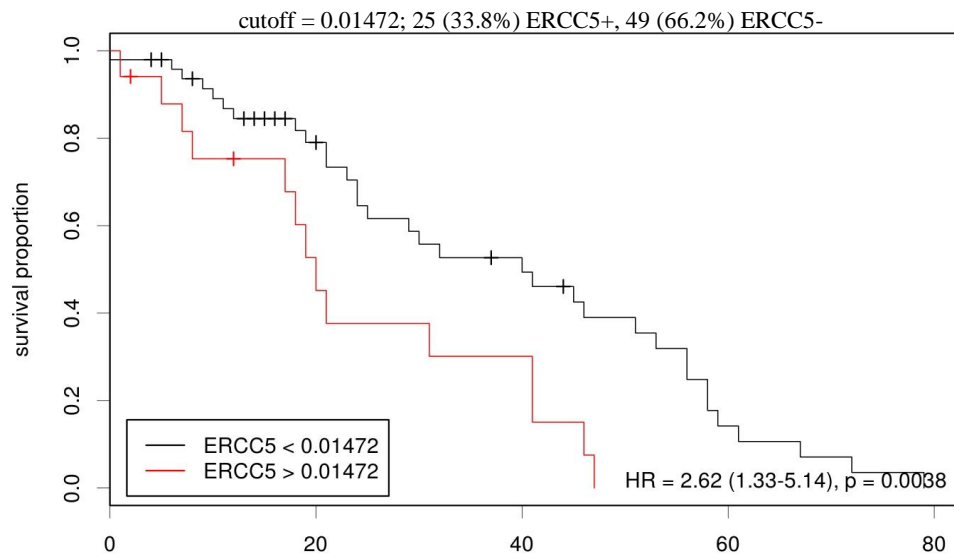
B



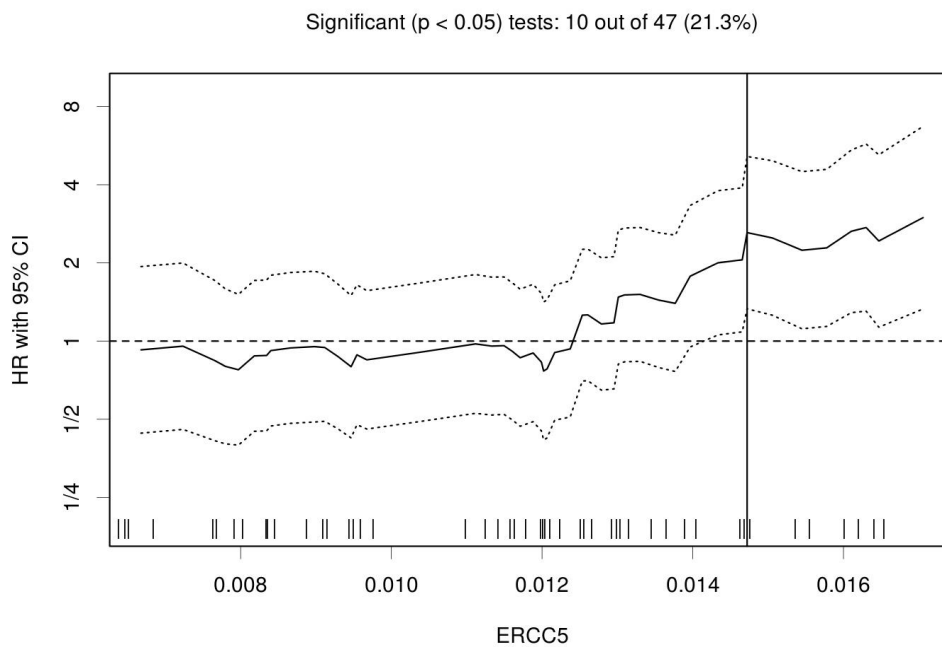
Segundamente, a tabela 14 apresenta a análise de correlação da sobrevida dos pacientes com SMD e o nível de expressão do gene *ERCC5*, demonstrando que 49 (66.2%) pacientes com níveis de expressão superior ao *cutoff* de 0.01472 possuem uma menor sobrevida (Figura 57A), com uma taxa de risco (HR, *hazard ratio*) de 2.62 (IC= 1.33-5.14) e com uma correlação significativa ($p=0.0038$) entre 21.3% dos pontos de corte investigados, conforme apresentado na figura 57B.

Figura 57: Análises de associação entre o nível de expressão do gene *ERCC5* e a sobrevida dos pacientes com SMD. **A.** Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). **B.** Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida.

A

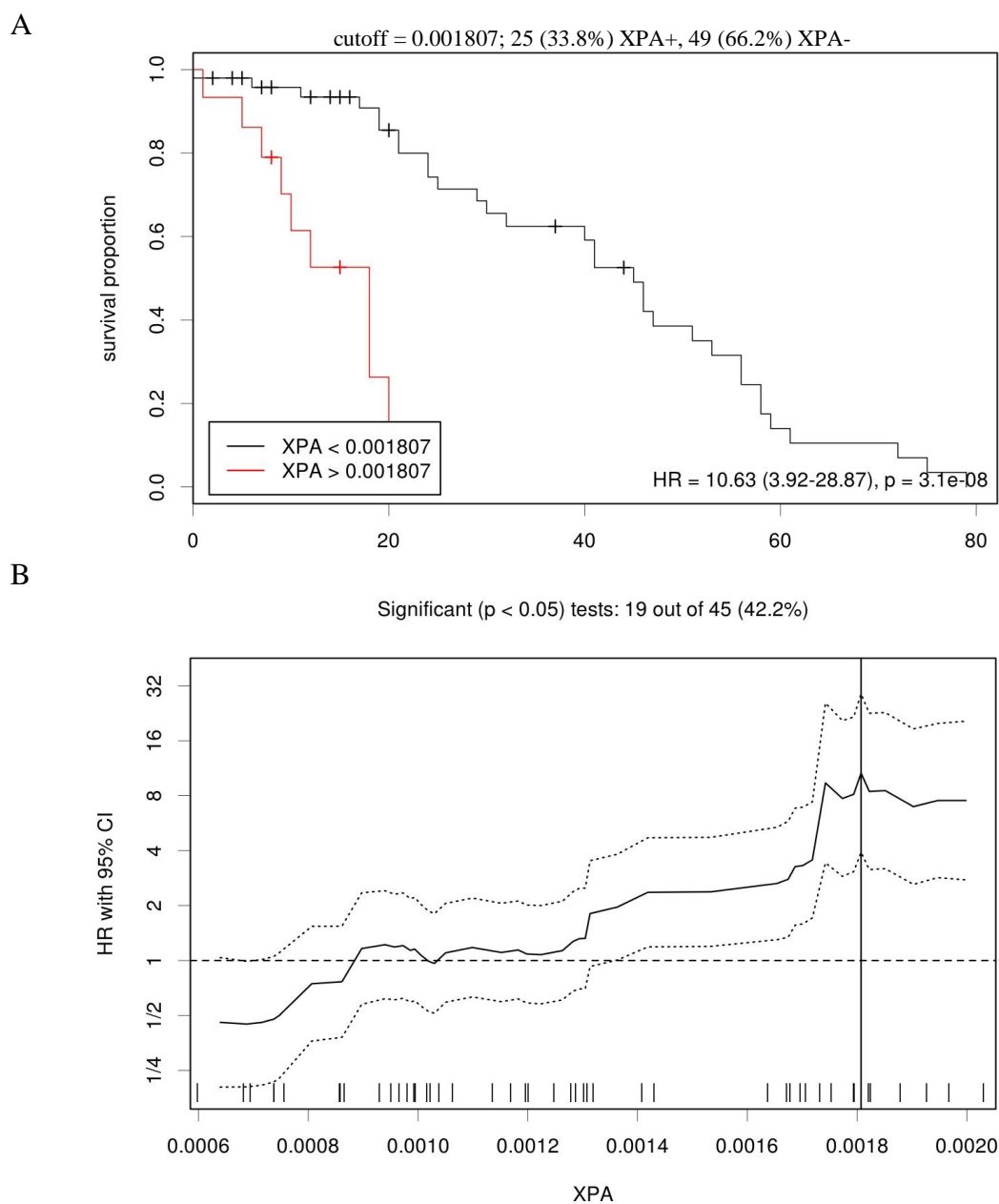


B



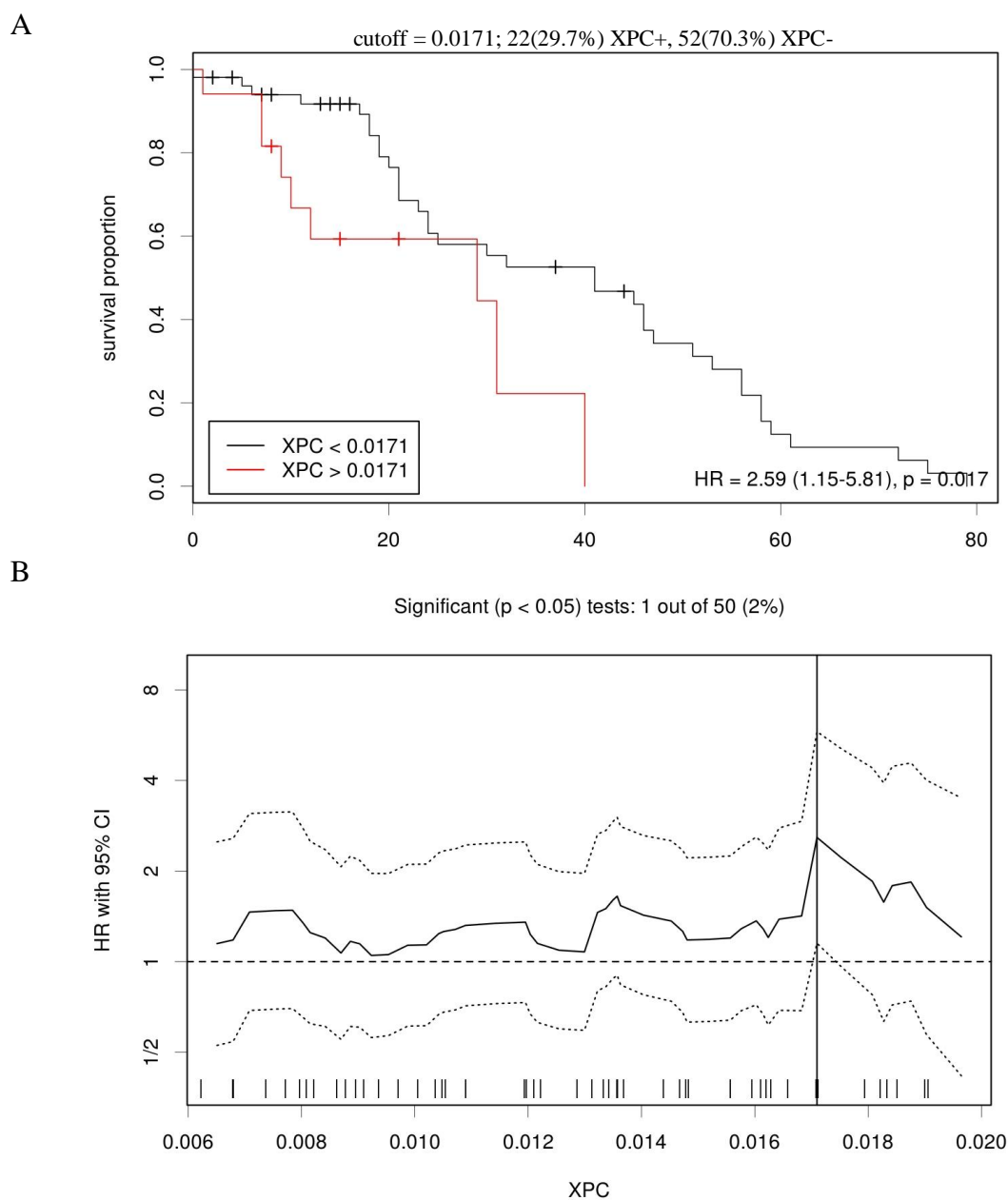
Por conseguinte, a tabela 14 apresenta a análise de correlação da sobrevida dos pacientes com SMD e o nível de expressão do gene *XPA*, demonstrando que 49 (66.2%) pacientes com níveis de expressão superior ao *cutoff* de 0.001807 possuem uma menor sobrevida (Figura 58A), com uma taxa de risco (HR, *hazard ratio*) de 10.63 (IC= 3.92-28.87) e com uma correlação significativa ($p=3.1e-08$) entre 42.2% dos pontos de corte investigados, conforme apresentado na figura 58B.

Figura 58: Análises de associação entre o nível de expressão do gene *XPA* e a sobrevida dos pacientes com SMD. **A.** Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meier). **B.** Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida.



Ao final a tabela 14 apresenta a análise de correlação da sobrevida dos pacientes com SMD e o nível de expressão do gene *XPC*, demonstrando que 52 (70.3%) pacientes com níveis de expressão superior ao *cutoff* de 0.0171 possuem uma menor sobrevida (Figura 59A), com uma taxa de risco (HR, *hazard ratio*) de 2.59 (IC= 1.15-5.81) e com uma correlação significativa ($p=0.017$) entre 2% dos pontos de corte investigados, conforme apresentado na figura 59B.

Figura 59: Análises de associação entre o nível de expressão do gene *XPC* e a sobrevida dos pacientes com SMD. **A.** Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). **B.** Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida.

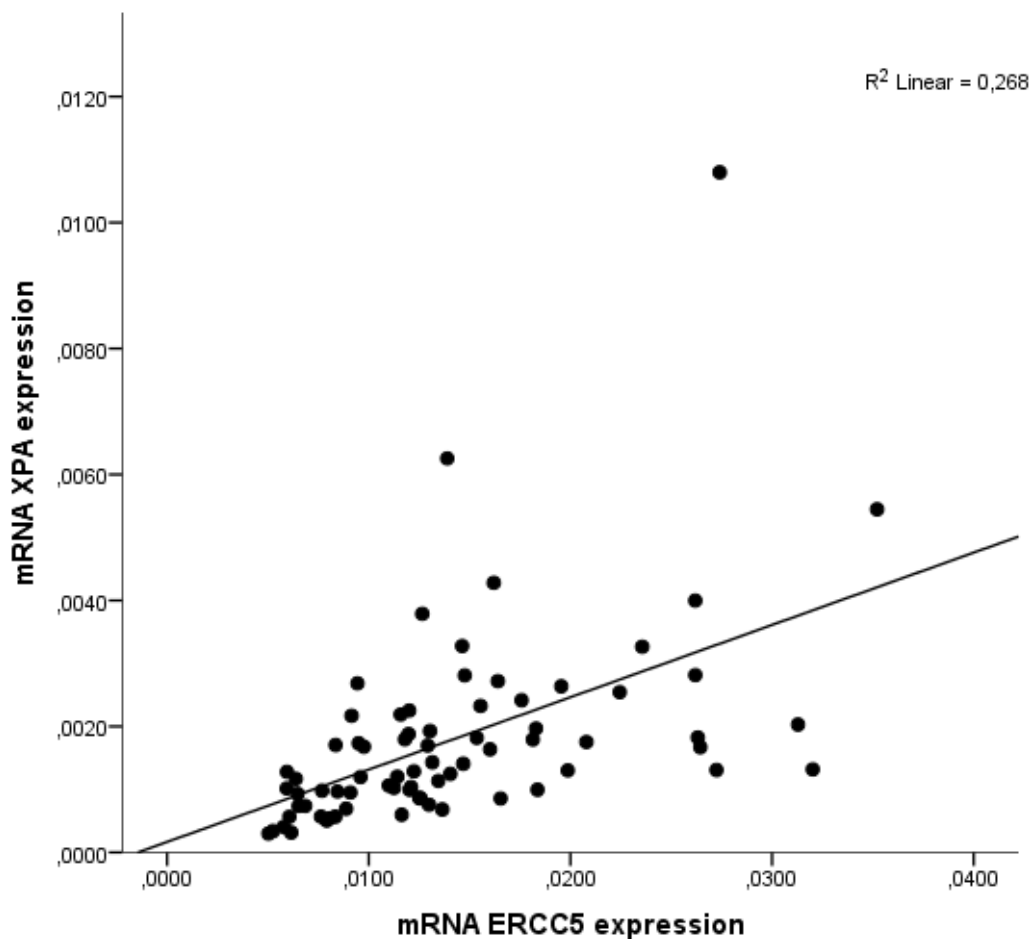


4.4 Análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de reparo em danos de fita simples de DNA

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

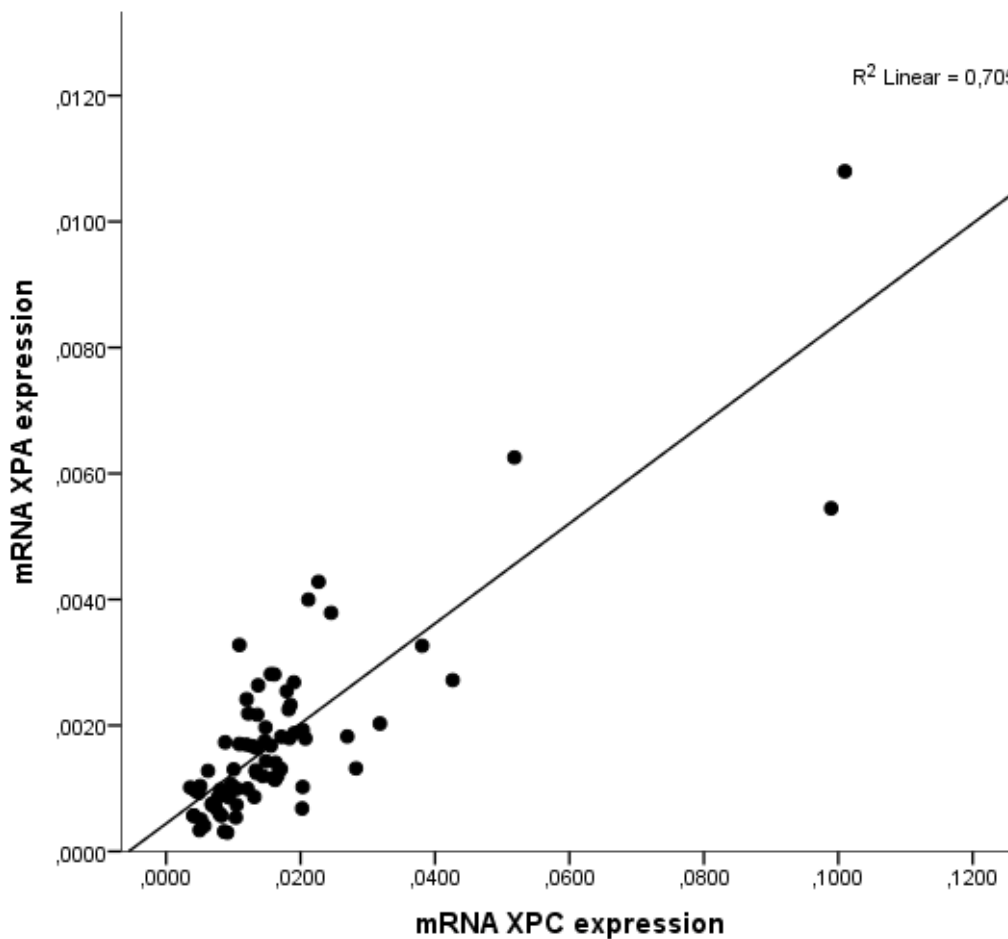
Inicialmente, na análise de correlação de *pearson*, observou-se que há uma forte correlação entre o gene *XPA* e o gene *ERCC5* ($r=0.517$; $p= 0,000002$), demonstrando que estes genes são responsáveis por 26.8% ($r^2=0.268$) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em pacientes com SMD (Figura 60).

Figura 60: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *XPA* e *ERCC5* em pacientes com SMD.



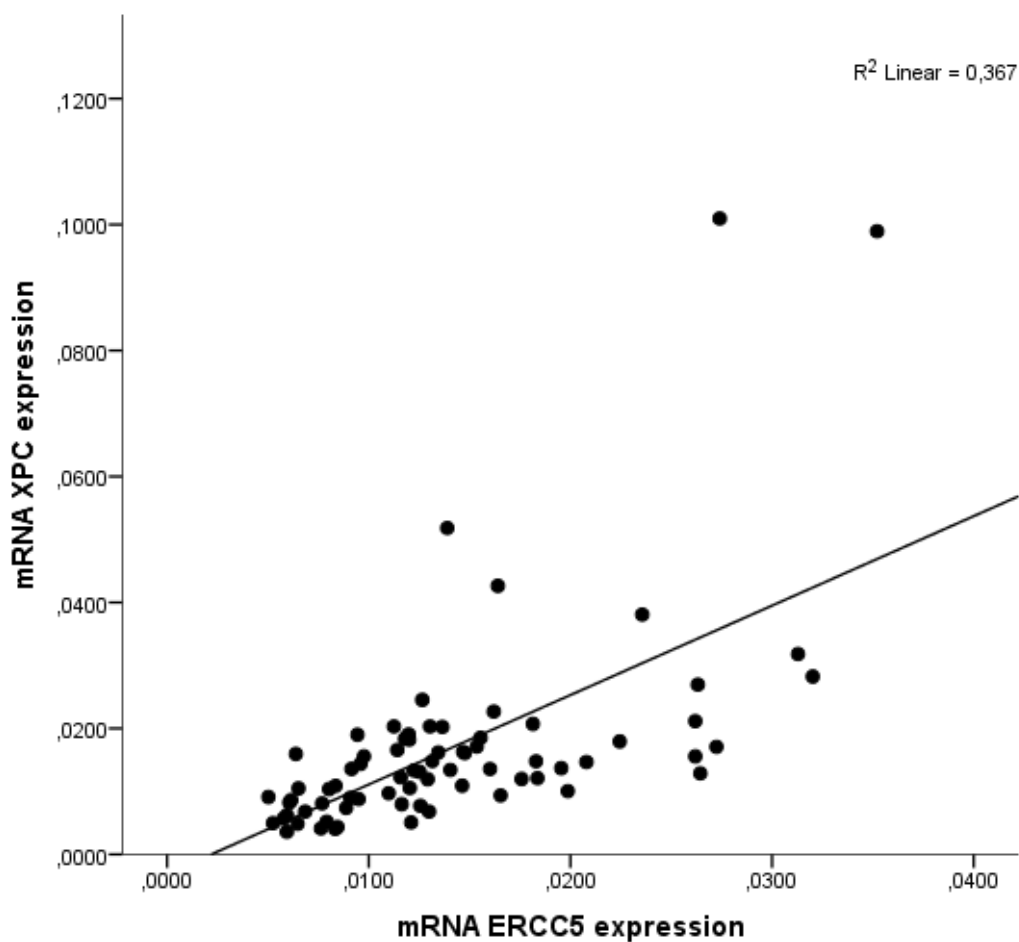
Seguidamente, na análise de correlação de *pearson*, foi observado que há uma forte correlação entre o gene *XPA* e o gene *XPC* ($r=0.839$; $p<0.001$), demonstrando que estes genes são responsáveis por 70,5% ($r^2=0.705$) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em pacientes com SMD (Figura 61).

Figura 61: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *XPA* e *XPC* em pacientes com SMD.



Ao final, na análise de correlação de *pearson*, foi observado que há uma forte correlação entre o gene *XPC* e o gene *ERCC5* ($r=0.605$; $p<0.001$), demonstrando que estes genes são responsáveis por 36,7% ($r^2=0.367$) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em pacientes com SMD (Figura 62).

Figura 62: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *XPC* e *ERCC5* em pacientes com SMD.



5 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar o nível de expressão de cinco genes relacionados ao mecanismo de reparo de fita simples de DNA, especificamente, reparo por excisão de nucleotídeo (NER), correlacionando com às variáveis clínicas e sócio-demográficas de 74 pacientes diagnosticados com SMD.

Inicialmente, quanto à caracterização dos pacientes, foi verificado que a média de idade foi de 63,39 anos (mediana de 66 anos, com mínimo de 22 anos e máximo de 91 anos), onde, tais resultados corroboram com achados nos estudos de Magalhães et al. (2010) e Belli et al. (2015). Em relação a proporção de pacientes do sexo masculino e feminino, neste estudo foi verificada uma relação de 1,05. Tal dado possui valor equivalente aos observados em registros epidemiológicos internacionais de SMD, que possuem razão masculino/feminino entre 1,1 e 2 (HAASE et al., 2007; BELLI et al., 2015).

Foi verificado um importante predomínio de de casos de SMD diagnosticados em pacientes que relataram ser de origem urbana 63,4% (45/74), corroborando, com achados de outros estudos, onde Magalhães et al. (2010) obtiveram 86,6% de casos de pacientes que viviam em centros urbanos.

Em relação à extratificação diagnóstica dos pacientes, segundo a classificação da OMS, foi observado um predomínio de casos de CRDM (53,4%), seguido de casos de AREB (17,8%), ARSA (16,4%) e AR (12,3%), conferindo, que mais da metade dos casos são de pacientes com SMD de baixo grau (82,2%). Estes dados seguem em conformidade com estudos de Belli et al. (2015), que analisou 345 pacientes brasileiros, constatando predomínio de casos de CRDM (35,1%), seguido de casos de AREB (29,8%), CRDU (13,4%) e ARSA (10,4%). Bem como, corroboram com estudos de Haase et al. (2007) que apresentou predominância de SMD de baixo grau (76,7%) em países ocidentais, prevalecendo, principalmente, os casos de CRDU, ARSA e CRDM, em aproximadamente, 64% dos casos.

Quanto ao perfil de celularidade da medula óssea foi observado predomínio de casos de medula hiper celular, e estes possuindo duas displasias, bem como achados medulares de predominância de disgranulopoese. Onde este dado morfológico é importante para o diagnóstico inicial da SMD (GOASGUEN et al., 2014; RAUH, 2014). Em relação ao perfil hiper celular da medula óssea, os dados do corrente trabalho estão em conformidade com os estudos de Bernasconi et al. (2008) e Ishibashi, Tamura

e Ogata (2011), que constataram correlação entre medula hiperclular e o perfil patogênico da doença, onde a alta taxa de apoptose em fases iniciais da doença são contrabalançados pela supraproliferação de células progenitoras hematopoiéticas (BERNASCONI et al., 2008; ISHIBASHI; TAMURA; OGATA, 2011).

A ocorrência de displasias na morfologia celular da medula óssea de pacientes diagnosticados com SMD é dado característico da patologia, onde, tomando-se por base os tipos de linhagens comprometidas, seja eritróide, granulocítica e megacariocítica, e o número de displasias conferem importantes achados para a classificação da SMD. Em particular, no corrente trabalho, o predomínio de duas displasias infere perfil mais agressivo e de pior prognóstico da SMD (BRUNNING et al., 2008; RAUH, 2014). Neste estudo, a análise das displasias granulocíticas (disgranulopose) em SMD conferiu com hipolobação nuclear (pseudocélulas de Pelger-Hüet), que é uma hipersegmentação irregular ou um perfil de alta granulosidade citoplasmática (GOASGUEN et al., 2014; RAUH, 2014), e segundo a classificação da OMS (BRUNNING et al, 2008) foi verificado nesta, que uma quantidade $\geq 10\%$ de células mielóides com granulopose em pacientes diagnosticados com SMD. Salientando, que a apresentação de disgranulopose é associada a presença de deleções no cromossomo 17 (17p-, i17q) em pacientes diagnosticados com SMD (PINHEIRO et al., 2006a).

Em relação ao perfil citogenético verificou-se que 43,1% dos pacientes diagnosticados com SMD *de novo* apresentaram cariótipo normal, corroborando com dados dos estudos de Dakshunamurthy et al (2005) e Haase et al (2007 e 2008), que predominaram casos de cariótipo normal (57,1%), altos índices de alterações citogenéticas com deleção isolada do 5q (72,5%) e cariótipos normais (74,5%), enquadrando, os pacientes em prognóstico favorável, em relação aos índices prognósticos do IPSS (GREENBERG et al.; 1997) e IPSS-R (GREENBERG et al. 2012), corroborando, com o estudo de Magalhães et al (2010). Estudos adicionais, de Solé et al (2005) e Haase et al (2008) observaram que alterações citogenéticas mais comuns em pacientes com SMD compreendiam alterações desbalanceadas do cromossomo 5 (-5/5q-), do cromossomo 7 (-7/7q-) e do cromossomo 11 (-11/11q-). Adicionalmente, a variação na frequência das alterações citogenéticas condizem com possível relação com o perfil étnico da população estudada (CHEN et al., 2005), onde, alterações do cromossomo 5 (-5/5q-) e cromossomo 7 (-7/7q-) tem maior ocorrência em pacientes com SMD de países ocidentais (CHEN et al., 2005).

Quanto aos elementos hematológicos, no corrente trabalho, foi constatado o predomínio de pacientes acometidos por anemia (valores de Hb menores que 8g/dL – quando não categorizada), com 37 casos (50,0%); neutropenia (contagem superior a 800 por mm^3), com 49 casos (66,2%); plaquetopenia (contagem superior a 100.000/ mm^3 – quando não categorizada), com 35 casos (47,3%); e dependentes transfusionais (utilizando-se o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (MALCOVATI et al., 2005)), com 38 casos (55,1%). Sabendo-se que a patologia da SMD caracteriza-se por um quadro de neutropenia e/ou plaquetopenia (TEFFERI et al., 2009b; CERRANO et al., 2016), o paciente diagnosticado com SMD apresentando anemia associada acompanhada de citopenia(s), por exemplo neutropenia e plaquetopenia, a doença será categorizada com baixa agressividade, caso contrário, com citopenias, será de alta agressividade (BRUNNING et al., 2008).

No corrente trabalho, entre os pacientes diagnosticados com SMD, foi encontrado uma reduzida taxa de óbito (até o momento de análise estatística), com 24 casos (32,4%), bem como, em paralelo, a evolução para LMA, também reduzida, com 10 casos (14,5%) e, contrariamente, uma taxa de dependência transfusional alta, com 38 casos (55,1%), conferindo um caráter heterogêneo da patologia. Corroborando com a literatura, onde, estudos demonstram que pacientes diagnosticados com SMD possuem evolução clínica heterogênea da doença, seja com o acometimento por anemia leve (condizente com bom prognóstico) a citopenia grave, configurada por elevada percentagem de blastos na medula óssea, conferindo pior prognóstico (NACHTKAMP et al., 2016), somando a esta conjuntura, a dependência transfusional (MALCOVATI et al., 2011) e comorbidades (DELLA PORTA et al., 2012; ZIPPERER et al., 2014) acarretam redução da expectativa de vida do paciente.

O registro mais atual de causas de morte em pacientes diagnosticados com SMD foi efetuado por Nachtkamo et al., (2016) ao avaliar 2877 pacientes alemães, constatando que a principal causa de óbito ocorria pela transformação para leucemia mieloide aguda, seguida das causas por infecções, cardiopatias, hemocromatose, neoplasia e hemorragia (NACHTKAMP et al., 2016). Importante observação a ser feita no corrente trabalho é que embora apresentando uma taxa de óbito e de evolução pra LMA, ambas de baixo valores, a dependência transfusional apresentou-se alta, tendo como causa uma hematopoese ineficaz, que é característica da SMD.

Nesta pesquisa, realizamos o primeiro estudo de análise da expressão dos genes de reparo em fita simples de DNA (*ERCC8(CSA)*, *ERCC6(CSB)*, *ERCC5(XPG)*,

XPA e *XPC*) em associação com variáveis clínicas em pacientes com SMD. Os resultados deste estudo serão discutidos de acordo com a categorização dos níveis de expressão dos genes avaliados de acordo com o agrupamento das associações clínicas significantes apresentadas.

Inicialmente, foi observado que pacientes diagnosticados com SMD hipocelular apresentaram uma reduzida expressão do gene *ERCC8(CSA)*, significativamente associada a presença de anormalidades cromossômicas (5/9; 71,4%) (Tabela 10). *ERCC8(CSA)*, juntamente com *ERCC6(CSB)* fazem a sinalização celular na via de reparo de fita simples acoplada a transcrição (TC-NER), uma subvia do mecanismo de reparo de excisão de nucleotídeo (NER). Estes genes atuam como sensores iniciais em lesões de fita simples de DNA, podendo considerar que este tipo de reparo de DNA está deficiente em SMD hipocelular. Este dado reforça uma intrínseca relação entre lesões de quebra de fita simples e lesões de quebra de fita dupla de DNA, principalmente, em paciente diagnosticados com SMD hipocelular. Este fato pode ser justificado, pois sabe-se que as lesões por quebra de fita simples, normalmente, não são associadas a quebras cromossômicas (RIBEIRO, 2014), mas podendo ser consideradas o primeiro passo para ocorrência de lesões de fita dupla, quando não corrigidas corretamente (BELLI, 2002).

Os pacientes com SMD hipocelular também evidenciaram um aumento de expressão dos genes *XPC* e *XPA*, genes pertencentes a subvia GG-NER, onde o gene *XPC* configura uma proteína que atua como sensor de dano à fita simples de DNA e o gene *XPA* elabora uma proteína com função verificadora do dano a ser reparado pelo sistema NER (MARTEIJN, 2014). Observamos uma correlação entre genes *XPA* e *XPC*, quando empregamos o teste de *pearson*, obtendo valores de $r=0,839$; $p<0,001$ e $r^2=0,705$, evidenciando que os genes *XPA* e *XPC* são responsáveis por 70,5% da variação dos respectivos níveis de expressão em pacientes com SMD hipocelular. Tal achado corrobora com o fato da proteína *XPC* possuir sítios de ligação (domínios de interação) para as proteínas *XPA*, *p62*, *OGG1*, *DDB2* e *XPB*, que atuam na via central do NER (PUUMALAINEN, 2016), indicando, que a correlação entre as expressões dos genes *XPC* e *XPA*, encontradas no corrente trabalho, são uma reprodução da modulação gênica, em função de interações proteicas entre *XPA* e *XPC*.

Aliado a estas observações, foi verificado que a supraexpressão dos genes *XPA* e *XPC* configuraram menor sobrevida, pois ao empregarmos a ferramenta bioestatística *Cutoff Finder*, foi observado que pacientes com expressão alta do gene *XPA*

(>0,001807) resultaram em menor sobrevida ($p=0,000000031$; $HR=10,63$; $95\%CI=3,92-28,87$), bem como, a alta expressão do gene XPC (>0,0171) também resultaram em menor sobrevida de pacientes diagnosticados com SMD ($p=0,0171$; $HR=2,59$; $95\%CI=1,15-5,81$). Este teste bioestatístico correlaciona biomarcadores dicotomizados com um resultado binário, empregando uma regressão logística [9]. Angariando estas observações, podemos supor que o mecanismo de reparo de fita simples de DNA anômalo pode relacionar-se com o evento de instabilidade genômica, e consequentemente, aberrações cromossômicas.

No corrente estudo, foram identificadas importantes associações entre os níveis de expressão dos genes autantes no NER frente às variáveis de pior prognóstico para SMD, tais como: presença de 2-3 citopenias periféricas (*XPA*, *ERCC5* e *ERCC6*), cariótipo alterado (*ERCC8*), presença de mais que 5% de blastos na MO (*ERCC8*), dependência transfusional (*ERCC5*), pacientes diagnosticados como AREB (*ERCC8* e *ERCC5*), sobrevida global (*ERCC5* e *XPA*) e evolução para LMA (*ERCC5* e *XPA*).

Sabe-se que Kuramoto et al. (2002), empregando linfócitos de sangue periférico de pacientes com SMD da cidade de Hiroshima, Japão, detectaram uma baixa expressão dos genes *ERCC3(XPB)*, *ERCC5(XPG)* e *XPC* em 10% dos pacientes com baixo risco para evolução para LMA e em 40% dos pacientes com alto risco de evolução para LMA, associando a deficiência do sistema de reparo NER a progressão da SMD para LMA. Assim, vê-se que defeitos no sistema de reparo NER que acarretam a doença *Xeroderma pigmentosum* estão associados a maior risco para SMD (WEBB, 2008).

Além disto, quanto a estratificação diagnóstica da SMD (BRUNNING et al., 2008; SALIM et al., 2016), tem-se que a classe AREB, que engloba os subtipos AREB I e AREB II, corresponde a um subtipo de AREB configurada por uma faixa de de 5% a 19% de blastos na medula óssea, e esta categoria está associada a ocorrência de cariótipos alterados, uma menor sobrevida no curso clínico e um elevado risco de progressão para LMA (BRUNNING et al., 2008; NAEIM; RAO; GRODY, 2008; LEE et al., 2015; SALIM et al., 2016).

Assim, fica claro o importante papel da participação do aumento da expressão do gene pertencente à via global de reparo do NER (*XPC*), a via acoplada transcrição (*ERCC8* e *ERCC6*), subvia do NER, e a via central (*XPA* e *ERCC5*), frente à variáveis de pior prognóstico para a SMD. Acreditamos que a via de reparo global do NER (GG-NER) esteja associada a neoplasias, por apresentar características de proliferação (YIGIN, 2015; STOUT, 2005; CHEN, 2007), devido a fortes e positivas correlações

entre os genes *XPC/XPA* e *XPC/ERCC5* e atuantes na via global e central do NER, pode ser considerado os principais mecanismos de reparo de lesões de fita simples de DNA que acometem o *pool* medular em pacientes diagnosticados com SMD. Estes achados demonstram a atuação de modo concomitante destes genes, em uma mesma cascata de eventos na patogênese da SMD, podendo ser considerados importantes marcadores de agressividade e de evolução clínica da SMD para LMA.

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

Outra abordagem interessante seria confirmar o papel dos genes de reparo em fita simples de DNA não somente em amostras do *pool* medular, mas, sim, em amostras de células tronco CD34+ a partir das mesmas metodologias apresentadas. Alguns autores já citam que a patogênese da SMD envolve genes relacionados à apoptose (RAZA; GALILI, 2012), alterações epigenéticas (SHEN et al., 2010), *splicing* (PAPAEMMANUIL et al., 2011; ARBER et al., 2015) e genes relacionados ao bloqueio de diferenciação (GUELLER et al., 2010) das células tronco hematopoéticas isoladas.

Em síntese, demonstramos que os genes relacionados a reparo de fita simples de DNA são também relacionados a patogênese da SMD. Estes resultados suportam a importância dos genes *ERCC8(CSA)*, *ERCC6(CSB)*, *ERCC5(XPG)*, *XPA* e *XPG* na manutenção da estabilidade genômica das células tronco hematopoiéticas promovendo um melhor entendimento da etiologia, estratificação diagnóstica, prognóstica e do processo de evolução clonal da Síndrome Mielodisplásica.

6 CONCLUSÕES

A partir do desenvolvimento deste estudo, podemos concluir que:

- Os genes *ERCC8(CSA)*, *XPA* e *XPC* podem corresponder a novos marcadores moleculares da patogênese da SMD associada a presença de anormalidades cromossômicas;

- Entende-se que o aumento de expressão dos genes (*ERCC8(CSA)*, *ERCC6(CSB)*, *ERCC5(XPG)*, *XPA* e *XPC*) estão associados a variáveis de pior prognóstico para SMD tais como: citopenias, percentagem de blastos, cariótipo alterado, formas avançadas, dependência transfusional, menor sobrevida e evolução para LMA.

- Demonstramos que os genes relacionados a reparo de fita simples de DNA são também relacionados a patogênese da SMD. Estes resultados indicam a importância dos genes *ERCC8(CSA)*, *ERCC6(CSB)*, *ERCC5(XPG)*, *XPA* e *XPG* quanto a etiologia, estratificação diagnóstica, prognóstica e do processo de evolução clonal da Síndrome Mielodisplásica.

REFERÊNCIAS

ALEKSEEV, S.; COIN, F. Orchestral maneuvers at the damaged sites in nucleotide excision repair. *Cell Mol Life Sci*, v. 72, n. 11, p. 2177-86, Jun 2015. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25681868> >.

BARAKAT, K.; GAJEWSKI, M.; TUSZYNSKI, J. A. DNA repair inhibitors: the next major step to improve cancer therapy. *Curr Top Med Chem*, v. 12, n. 12, p. 1376-90, 2012. ISSN 1873-4294. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22794314> >.

BELLI, M; SAPORA, O; TABOCCHINI, M.A. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J. Radiat. Res.* 2002;43:13–19.

BELLI, C. B. et al. Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients. *Am J Hematol*, Jun 2015. ISSN 1096-8652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26104573> >.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American- British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, v. 33, n. 4, p. 451-8, Aug 1976. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/188440> >.

BOHGAKI, T.; BOHGAKI, M.; HAKEM, R. DNA double-strand break signaling and human disorders. *Genome Integr*, v. 1, n. 1, p. 15, 2010. ISSN 2041-9414. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21054854> >.

BUTKIEWICZ D, Drosik A, Suwiński R, Krześniak M, Rusin M, Kosarewicz A, Rachtan J, Matuszczyk I and Gawkowska-Suwińska M. Influence of DNA repair gene polymorphisms on prognosis in inoperable non-small cell lung cancer patients treated with radiotherapy and platinumbased chemotherapy. *Int J Cancer*. 2012; 131:E1100-E1108.

COGLE, C. R. et al. Incidence of the myelodysplastic syndromes using a novel claims-based algorithm: high number of uncaptured cases by cancer registries. *Blood*, v. 117, n. 26, p. 7121-5, Jun 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21531980> >.

COGLE, C. R. Incidence and Burden of the Myelodysplastic Syndromes. *Curr Hematol Malig Rep*, v. 10, n. 3, p. 272-81, Sep 2015. ISSN 1558-822X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26134527> >.

CRAMERS, P., Verhoeven, E.E., Filon, A.R., Rockx, D.A.P., Santos, S.J., van der Leer, A.A., Kleinjans, J.C.S., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H.F., 2011. Impaired repair of ionizing radiation-induced DNA damage in Cockayne syndrome cells. *Radiation Research* 175, 432–443.

DELLA PORTA, M. G. et al. Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*, v. 96, n. 3, p. 441-9, Mar 2011. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21134982> >.

DE SWART, L. et al. Validation of the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes: a report from the prospective European LeukaemiaNet MDS (EUMDS) registry. *Br J Haematol*, v. 170, n. 3, p. 372-83, Aug 2015. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25907546> >.

DIANOV, G. L.; HÜBSCHER, U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. *Nucleic Acids Res*, v. 41, n. 6, p. 3483-90, Apr 2013. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23408852> >.

DING DP, He XF, Zhang Y. Lack of association between XPG Asp1104His and XPF Arg415Gln polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis of case-control studies. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 129: 203-209.

DING D, Zhang Y, Yu H, Guo Y, Jiang L, He X, Ma W and Zheng W. Genetic variation of XPA gene and risk of cancer: A systematic review and pooled analysis. *Int J Cancer*. 2012; 131:488-496.

DIZDAROGLU, M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res*, v. 763, p. 212-45, 2015 Jan-Mar 2015. ISSN 1388-2139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25795122> >.

DUAN Z, He C, Gong Y, Li P, Xu Q, Sun LP, Wang Z, Xing C, Yuan Y. Promoter polymorphisms in DNA repair gene ERCC5 and susceptibility to gastric cancer in Chinese. *Gene* 2012; 511: 274-9.

FISHEL, R. Mismatch Repair. *J Biol Chem*, Sep 2015. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26354434> >.

GARCIA-MANERO, G. Myelodysplastic syndromes: 2015 Update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*, v. 90, n. 9, p. 831-41, Sep 2015. ISSN 1096-8652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26294090> >.

GERMING, U. et al. Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*, v. 87, n. 9, p. 691-9, Sep 2008. ISSN 0939-5555. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18575866> >.

GREENBERG, P. et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, v. 89, n. 6, p. 2079-88, Mar 1997. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9058730> >.

GREENBERG, P. L. et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, v. 120, n. 12, p. 2454-65, Sep 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740453> >.

GUARDIOLA, A; et al. Síndrome de Cockayne. *Arq Neuropsiquiatria* 1999;57(1):106-110.

HARTMAN A-R, Ford JM. BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet* 32(1):180–184. (2002) doi:10.1038/ng953

HOEIJMAKERS JH. The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. *EMBO J* 1997; 16:5955-65; PMID:9312053; [http:// dx.doi.org/10.1093/emboj/16.19.5955](http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.19.5955)

HOEIJMAKERS, J. H. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*, v. 361, n. 15, p. 1475-85, Oct 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812404> >.

IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*, v. 12, n. 8, p. 620-36, Aug 2013. ISSN 1568-7856. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23684800> >.

JAARSMA D, van der Pluijm I, van der Horst GT, Hoeijmakers JH. Cockayne syndrome pathogenesis: lessons from mouse models. *Mech Ageing Dev* 2013; 134: 180-95; PMID:23591128; [http://dx.doi.org/10.1016/ j.mad.2013.04.003](http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2013.04.003)

JASPERS, N. G. et al. Anti-tumour compounds illudin S and Irofulven induce DNA lesions ignored by global repair and exclusively processed by transcription-and replication-coupled repair pathways. *DNA Repair* 1, 1027–1038 (2002).

JONAS, B. A.; GREENBERG, P. L. MDS prognostic scoring systems – past, present, and future. *Best Pract Res Clin Haematol*, v. 28, n. 1, p. 3-13, Mar 2015. ISSN 1532-1924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25659725> >.

KANTARJIAN, H. et al. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. *Cancer*, v. 113, n. 6, p. 1351-61, Sep 2008. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18618511> >.

KUPER, J.; KISKER, C. Damage recognition in nucleotide excision DNA repair. *Curr Opin Struct Biol*, v. 22, n. 1, p. 88-93, Feb 2012. ISSN 1879-033X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257761> >.

KURAMOTO, K; BAN, S; ODA, K; TANAKA, H; KIMURA, A; SUZUKI, G. Chromosomal instability and radiosensitivity in myelodysplastic syndrome cells. *Leukemia*. 2002; 16:2253–2258. [PubMed:12399970]

LAMARQUE, M. et al. The revised IPSS is a powerful tool to evaluate the outcome of MDS patients treated with azacitidine: the GFM experience. *Blood*, v. 120, n. 25, p. 5084-5, Dec 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23243156> >.

LATINI, P., Frontini, M., Caputo, M., Gregan, J., Cipak, L., Filippi, S., Kumar, V., Ve'lez- Cruz, R., Stefanini, M., Proietti-De-Santis, L., 2011. CSA and CSB proteins interact with p53 and regulate its Mdm2-dependent ubiquitination. *Cell Cycle* 10, 3719–3730.

LAUGEL, V. Cockayne syndrome: the expanding clinical and mutational spectrum. *Mech. Ageing Dev.* 134, 161–170 (2013).

LANGIE, S. A. et al. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis*, v. 36 Suppl 1, p. S61-88, Jun 2015. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26106144> >.

LEE, E. J. et al. The evolving field of prognostication and risk stratification in MDS: Recent developments and future directions. *Blood Rev*, Jun 2015. ISSN 1532-1681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26119927> >.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, v. 362, n. 6422, p. 709-15, Apr 1993. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8469282> >.

OGI, T. et al. Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Mol Cell*, v. 37, n. 5, p. 714-27, Mar 2010. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227374> >.

OZTURK, S.; DEMIR, N. DNA repair mechanisms in mammalian germ cells. *Histol Histopathol*, v. 26, n. 4, p. 505-17, Apr 2011. ISSN 1699-5848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21360444> >.

MACHADO CR, Vieira-da-Rocha JP, Mendes IC, et al (2014). Nucleotide excision repair in *Trypanosoma brucei*: specialization of transcription-coupled repair due to multigenic transcription. *Mol Microbiol*, 92, 756-76.

MAIER, B., Gluba, W., Bernier, B., Turner, T., Mohammad, K., Guise, T., Sutherland, A., Thorner, M., Scoble, H., 2004. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes and Development* 18, 306–319.

McCULLOUGH LE, Santella RM, Cleveland RJ, et al (2014). Polymorphisms in DNA repair genes, recreational physical activity and breast cancer risk. *Int J Cancer*, 134, 654-63.

MALCOVATI, L. et al. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica*, v. 96, n. 10, p. 1433-40, Oct 2011. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21659359> >.

MAGALHÃES, S. M. M. et al. Epidemiological and Clinicopathological Data From the Brazilian Registry of Patients with Myelodysplastic Syndromes and Comparative Analysis between different geographic areas. *Blood*. 116, abstract 1884 2010.

MARTEIJN et al. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jul;15(7):465-81. PMID:24954209 DOI: 10.1038/nrm3822 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954209> >

NATELSON, E. A.; PYATT, D. Acquired myelodysplasia or myelodysplastic syndrome: clearing the fog. *Adv Hematol*, v. 2013, p. 309637, 2013. ISSN 1687-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24194760> >.

NEUKIRCHEN, J. et al. Validation of the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) in patients with myelodysplastic syndrome: a multicenter study. *Leuk Res*, v. 38, n. 1, p. 57-64, Jan2014. ISSN 1873-5835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24238640> >.

NEUKIRCHEN, J. et al. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS- registry. *Leuk Res*, v. 35, n. 12, p. 1591-6, Dec 2011. ISSN 1873-5835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708407> >.

PROIETTI-DE-SANTIS L, Drané P, Egly JM. Cockayne syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation. *EMBO J* 2006; 25:1915-23; PMID:16601682; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601071>

PUUMALAINEN, MR; Ru`themann, P; Min, JH; Naegeli, H. Xeroderma pigmentosum group C sensor: unprecedented recognition strategy and tight spatiotemporal regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* (2016) 73:547–566.

RIBEIRO, H.L.Jr, OLIVEIRA R.T.G, MAIA, A.R.S et al. Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. *Hematol. Oncol.* 2014;33(4):220-228

RICHMAN, S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Int J Oncol*, Aug 2015. ISSN 1791-2423. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26315971> >.

ROUILLON, C.; WHITE, M. F. The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins. *Res Microbiol*, v. 162, n. 1, p. 19-26, Jan 2011. ISSN 1769-7123. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20863882> >.

ROLLISON, D. E. et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*, v. 112, n. 1, p. 45-52, Jul 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18443215> >.

SCHÄRER, O. D. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 5, n. 10, p. a012609, Oct 2013. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24086042> >.

SCHEIBYE-KNUDSEN, M., Ramamoorthy, M., Sykora, P., Maynard, S., Lin, P.C., Minor, R.K., Wilson, D.M., Cooper, M., Spencer, R., de Cabo, R., Croteau, D.L., Bohr, V.A., 2012. Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged

mitochondria by promoting mitochondrial autophagy. *Journal of Experimental Medicine* 209, 855–869.

SWERDLOW, S. H. et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th edition. Lyon, France: IARC Press, 2008.

SEKERES, M. A. The epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am*, v. 24, n. 2, p. 287-94, Apr 2010. ISSN 1558-1977. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20359626> >.

SCHANZ, J. et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*, v. 30, n. 8, p. 820-9, Mar 2012. ISSN 1527-7755. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22331955> >.

THEIL, A. F. et al. Disruption of TTDA results in complete nucleotide excision repair deficiency and embryonic lethality. *PLoS Genet.* 9, e1003431 (2013).

TSE D, Zhai R, Zhou W, et al (2008). Polymorphisms of the NER pathway genes, ERCC1 and XPD are associated with esophageal adenocarcinoma risk. *Cancer Causes Control*, 19, 1077-83.

TYNER, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., Park, S.H., Thompson, T., Karsenty, G., Bradley, A., Donehower, L.A., 2002. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415, 45–53.

VOSO, M. T. et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS) predicts survival and leukemic evolution of myelodysplastic syndromes significantly better than IPSS and WHO Prognostic Scoring System: validation by the Gruppo Romano Mielodisplasie Italian Regional Database. *J Clin Oncol*, v. 31, n. 21, p. 2671-7, Jul 2013. ISSN 1527-7755. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23796988> >.

ZENG Y, Li Wei, Ya-Jie Wang, Chuan Liu. Genetic Association between ERCC5 rs17655 Polymorphism and Colorectal Cancer Risk: Evidence Based on a Meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 16: 5665-5571, 2015

ZHANG Y, Rohde LH, Wu H. Involvement of nucleotide excision and mismatch repair mechanisms in double strand break repair. *Current genomics*. 2009; 10(4):250–8. doi: 10.2174/138920209788488544 PMID: 19949546; PubMed Central PMCID: PMC2709936.

ZHOU, T; HASTY, P; WALTER, C. A.; BISHOP, A.J.R.; SCOTT, L.M.; REBEL, V. I. Myelodysplastic Syndrome: an inability to appropriately respond to damaged DNA?; *Exp Hematol*. 2013 August ; 41(8): 665–674. doi:10.1016/j.exphem.2013.04.008

WEBB, S. Xeroderma pigmentosum. *BMJ* 2008, 336, 444–446.

WILSON, D. M. et al. Variation in base excision repair capacity. *Mutat Res*, v. 711, n. 1-2, p. 100- 12, Jun 2011. ISSN 0027-5107. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21167187>>.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

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

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

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

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

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

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

Serão coletadas somente 2mL de amostra de medula óssea com o uso de uma agulha específica para aspiração da medula óssea. Todo o procedimento de coleta da medula óssea é realizado mediante administração de anestésico local com duração máxima de 15 minutos. Durante o procedimento de coleta esternal da medula óssea, pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxeadada) ao redor do local de onde foi retirado a medula óssea, desaparecendo em poucos dias, e poderá ocorrer dor discreta e de fácil alívio, podendo ser, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local. Raramente, pode ocorrer infecção local. Para pacientes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral. A coleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise.

Após o procedimento, serão coletados dados pessoais de sexo e idade, apresentação clínica e checagem dos exames laboratoriais indicados para esclarecimento diagnóstico, tais como: hemograma completo, citologia e histologia (análise microscópica das células) da medula óssea, avaliação para depósitos de ferro medular, bem como outros exames que são feitos mesmo para os pacientes que não participam de nenhuma pesquisa.

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

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

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

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

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

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

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

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

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja algum imprevisto ou dúvidas, você deverá entrar em contato solicitar contato direto com o pesquisador responsável pelo estudo: **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (85-81881972)** ou com o aluno de Doutorado Acadêmico **Allan Rodrigo Soares Maia (85 – 87651070)**.

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

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

ASSINATURAS

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

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

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

_____/_____/_____

Data

Assinatura do participante da pesquisa

____/____/____

Data **Assinatura do Pesquisador Responsável**

____/____/____

Data **Assinatura do Responsável pela aplicação do**
TCLE

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

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

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

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

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é estudar o material genético de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica gerando dados que favoreçam a uma melhor compreensão do surgimento e evolução clínica desta doença. Para compreender melhor os pontos clínicos dos pacientes visualizados nesta pesquisa, precisamos comparar os achados clínicos destes pacientes com indivíduos sadios (voluntários). É devido a este contexto que necessitamos recrutar indivíduos saudáveis (voluntários) para participar da presente pesquisa.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

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

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

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

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

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

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

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

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

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

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

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

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

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

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

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja algum imprevisto ou dúvidas, você deverá entrar em contato solicitar contato direto com o pesquisador responsável pelo estudo: **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (85-81881972)** ou com o aluno de Doutorado Acadêmico **Allan Rodrigo Soares Maia (85 – 87651070)**.

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

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

ASSINATURAS

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

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

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

_____/_____/_____

Data

Assinatura do participante da pesquisa

____/____/____

Data **Assinatura do Pesquisador Responsável**

____/____/____

Data **Assinatura do Responsável pela aplicação do**
TCLE

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Howard Lopes Ribeiro Junior

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 45116415.8.0000.5054

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.292.509

Apresentação do Projeto:

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.292.509

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

Critério de Inclusão:

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

Critério de Exclusão:

Serão excluídos deste estudo pacientes portadores de quaisquer outras doenças que não seja Síndrome Mielodisplásica, que não seja diagnosticado no Laboratório de Citogenômica do Câncer no período compreendido entre os anos de 2015 a 2019 e que autorizarem o uso de amostra de medula óssea, mediante compreensão e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para compor o grupo

Continuação do Parecer: 1.292.509

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e atende às normas relativas à pesquisas com seres humanos, em especial à Res. 486/12 do CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.292.509

Foram todos devidamente apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_512397.pdf	21/09/2015 15:17:23		Aceito
Outros	Alteracoes_Parecer_CEP_UFC_Projeto_Doutorado_21092015.doc	21/09/2015 15:16:07	Howard Lopes Ribeiro Junior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Reparo_Atualizado_21092015.doc	21/09/2015 15:14:45	Howard Lopes Ribeiro Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEVoluntarioNovo.doc	18/09/2015 15:49:14	Howard Lopes Ribeiro Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPacienteNovo.doc	18/09/2015 15:48:44	Howard Lopes Ribeiro Junior	Aceito
Outros	Declaração de concordancia.pdf	15/05/2015 12:28:32		Aceito
Outros	Lattes.pdf	12/05/2015 12:43:06		Aceito
Outros	CARTA DE APRESENTAÇÃO DO PROTOCOLO.jpg	08/05/2015 12:51:14		Aceito
Outros	TERMO DE CIENCIA DO MÉDICO RESPONSÁVEL.jpg	08/05/2015 12:31:01		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA DE ROSTO.jpg	08/05/2015 12:26:39		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.292.509

FORTALEZA, 22 de Outubro de 2015

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

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