



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARILENA FACUNDO DE CASTRO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO mRNA DOS GENES *ATAXIA TELANGIECTASIA*
***MUTADA* E *ATAXIA TELANGIECTASIA RAD-3* RELACIONADA EM PACIENTES**
COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

FORTALEZA

2017

MARILENA FACUNDO DE CASTRO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO mRNA DOS GENES *ATAXIA TELANGIECTASIA*
MUTADA E *ATAXIA TELANGIECTASIA RAD-3* RELACIONADA EM PACIENTES COM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária

Orientadora: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientadora: Profa. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães.

FORTALEZA

2017

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)

- C352a Castro, Marilena Facundo de.
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO mRNA DOS GENES ATAXIA TELANGIECTASIA MUTADA E ATAXIA TELANGIECTASIA RAD-3 RELACIONADA EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA / Marilena Facundo de Castro. – 2017.
91 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.
Coorientação: Profa. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães.
1. Síndrome Mielodisplásica. 2. Reparo do DNA. 3. Ataxia Telangiectasia Mutada. 4. Ataxia Telangiectasia Rad-3 relacionada. I. Título.
-

CDD 615

MARILENA FACUNDO DE CASTRO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO mRNA DOS GENES *ATAXIA TELANGIECTASIA*
MUTADA E *ATAXIA TELANGIECTASIA RAD-3* RELACIONADA EM PACIENTES COM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Rosangela Pinheiro Goncalves Machado
Hemocentro do Estado do Ceará (HEMOCE)

Profa. Dra. Juliana Cordeiro de Sousa
Faculdade de Tecnologia Intensiva (FATECI)

A Deus,

À minha mãe e irmãos,

Ao meu pai (*in memoriam*),

Ao meu esposo

Que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me agraciado com uma vida repleta de saúde.

Aos meus pais, Maria Isabel Arruda de Castro e Francisco Aldenor Teixeira de Castro (*In Memoriam*) por todo carinho e dedicação. Também, por abrirem mão de projetos pessoais para que eu pudesse gozar das melhores oportunidades e ter uma boa educação. Não sei se mereço tanto.

Aos meus irmãos, Marina Arruda de Castro e Gustavo Arruda de Castro por todo apoio e incentivo.

Ao meu esposo, Tércio de Freitas Paulo, por todo amor, carinho e paciência que tem me dedicado. Por estar sempre ao meu lado e ter me ajudado em todos os momentos dessa caminhada, por nunca ter me deixado desanimar e por muitas vezes ter sido minha maior inspiração.

À Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, pela confiança e oportunidade de realizar este trabalho.

À Dra. Silvia Maria Meira Magalhães, talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer com justiça e com o devido merecimento. Obrigada por toda disponibilidade e suporte. Sua ajuda e seu apoio foram para mim de valor inestimável.

Ao Dr. Ronald Feitosa Pinheiro, por toda sua dedicação e disponibilidade. Sua participação foi fundamental no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela confiança depositada em mim, por todo incentivo e por ser exemplo de profissional dedicado e competente.

A Profa. Caroline Aquino Moreira-Nunes pelo suporte e disponibilização de materiais necessários à pesquisa.

Aos professores participantes da banca examinadora, Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior e Dra. Rosângela Pinheiro Gonçalves Machado, pelo tempo disponibilizado, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas do Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas e a turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas. Em especial aos amigos: Luana Letícia, Marília Rocha, Pedro Aurio e Tarcísio Paulo, vocês tornaram essa jornada muito mais leve e prazerosa.

À Alanna Carla Costa, obrigada por acreditar em mim, até mesmo quando eu achei difícil acreditar, e também por todo carinho, paciência e dedicação.

Aos colegas do Laboratório de Citogenômica do Câncer. Agradeço a paciência e todo o suporte. Em especial, à Daniela de Paula Borges que foi essencial na definição, elaboração e análises desse trabalho.

Às colegas Anacélia, Mirele, Luciana, Priscila e Patrícia por todo apoio, incentivo, pelo ombro amigo e por todos momentos de descontração.

Aos funcionários da pós-graduação que sempre me atenderam com muito respeito e dedicação, em especial ao secretário Maxwilliam Rodrigues.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho.

RESUMO

Diversos fatores podem contribuir para a fisiopatologia da Síndrome Mielodisplásica, dentre eles a instabilidade genética que pode ser ocasionada pela ativação ineficaz das vias de reparo do DNA. Os genes Ataxia Telangiectasia Mutada (*ATM*) e Ataxia Telangiectasia Rad-3 relacionada (*ATR*) atuam como reguladores centrais na resposta aos danos do DNA e podem estar diretamente envolvidos na patogênese da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de expressão do *mRNA* dos genes *ATM* e *ATR* em pacientes com SMD e verificar sua relação com diferentes variáveis clínicas, epidemiológicas e com a sobrevida. A expressão desses genes foi realizada através da técnica de PCR quantitativa em tempo real, realizou-se o cariótipo por banda G e os dados clínicos foram coletados de prontuários. As análises estatísticas, para as diferentes variáveis, foram realizadas utilizando o software SPSS 21.0. A análise de sobrevida foi realizada utilizando o *software Cutoff Finder*. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 67 anos e houve predomínio do subtipo Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas Linhagens (72,6%). Além disso, foi observado que os genes *ATM* e *ATR* estavam hipoexpresso em pacientes com medula hipocelular ($p=0,021$ e $0,002$ respectivamente), com baixa contagem de neutrófilos ($p=0,019$ e $p=0,032$ respectivamente) e na presença de 2 ou 3 citopenias ($p=0,012$ e $0,002$ respectivamente). Foi observado, também, uma hipoexpressão para o gene *ATM* na presença de disgranulopoese ($p=0,01$). O aumento de expressão do gene *ATR* foi observado em pacientes que progrediram para Leucemia Mieloide Aguda ($p=0,005$) e as análises de sobrevida global e livre de LMA mostraram que o aumento de *ATR* está associado a uma pior sobrevida global ($p=0,0001$) e ao maior risco de progressão para LMA ($p=0,0029$). Observou-se uma forte correlação entre os genes *ATM* e *ATR* ($r^2=0,560$, $p=0,000$). Concluímos que a hipoexpressão do *mRNA* dos genes *ATM* e *ATR* está relacionada a SMD hipoplástica e que a hipoexpressão desses genes está relacionada ao acúmulo de danos e possível acometimento das linhagens celulares, principalmente a granulocítica. Além disso os genes *ATM* e *ATR* estão fortemente correlacionados na SMD, mostrando que eles atuam em conjunto na sinalização do reparo do DNA e que a hiperexpressão do gene *ATR* está relacionada a evolução para Leucemia Mieloide Aguda e pior sobrevida global e livre de doença nos pacientes com SMD.

Palavras-chave: Ataxia Telangiectasia Mutada. Ataxia Telangiectasia Rad-3 relacionada. Reparo do DNA. Síndrome Mielodisplásica.

ABSTRACT

Several factors are involved in the pathogenesis of Myelodysplastic Syndrome, e.g. genetic instability that may be caused by ineffective activation of DNA repair mechanisms. The ataxia-telangiectasia mutated (*ATM*) and ataxia-telangiectasia mutated and Rad-3-related (*ATR*) proteins kinases act as central regulators of the DNA damage response. The aim of this study was to evaluate the relationship between gene expression and the epidemiological, clinical, and laboratory characteristics of patients with MDS. We evaluated the expression of *ATM* and *ATR* genes by quantitative PCR methods. The results of expression were related with different clinical variables using the SPSS 21.0 software. The survival analyzes were performed using the Cutoff Finder software. The results showed that the hypoexpression of the *ATM* and *ATR* repair genes was related to patients with hypocellular bone marrow ($p = 0.021$ and $p = 0.002$ respectively), in neutropenia ($p = 0.019$ and $p = 0.032$ respectively) and in the presence of 2 or 3 cytopenias ($p = 0.012$ and $p = 0.002$, respectively). Hypoexpression was also observed for the *ATM* gene in the presence of dysgranulopoiesis ($p=0.01$). The increase of the *ATR* gene expression was observed in patients who progressed to acute myeloid leukemia ($p = 0.005$) and analyzes of overall and AML-free survival showed that the increase in *ATR* was associated with a worse overall survival ($p = 0.0001$) and the increased risk of progression to AML ($p = 0.0029$). In addition, *ATM* and *ATR* are strongly correlated ($r^2 = 0.560$ and $p = 0.000$). We concluded that hypoexpression of the *ATM* and *ATR* genes is related to hypoplastic MDS and that hypoexpression is related to the accumulation of damage and possible involvement of the cell lines. In addition, DNA repair genes are strongly correlated to MDS and that the *ATR* hyperexpression is related to the risk of progression to AML and worse overall survival.

Palavras-chave: Ataxia Telangiectasia Mutated. Ataxia Telangiectasia Rad-3-related. DNA repair. Myelodysplastic Syndrome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação esquemática da patogênese da Síndrome Mielodisplásica.....	20
Figura 2	– Representação esquemática de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular de mamíferos.....	25
Figura 3	– Representação esquemática da exposição aos fatores desencadeantes de danos ao DNA em células tronco, possíveis mecanismos de reparo e desencadeamento do processo neoplásico.....	28
Figura 4	– Representação esquemática da localização do gene <i>ATM</i> no cromossomo 11.....	30
Figura 5	– Representação esquemática da ativação da proteína ATM e sua modificação da forma dimérica inativa para a forma monomérica ativa.....	31
Figura 6	– Representação esquemática da localização do gene <i>ATR</i> no cromossomo 3.....	32
Figura 7	– Representação esquemática da ativação de ATR a partir de ssDNA.....	33
Figura 8	– Representação simplificada das vias de controle do ciclo celular mediadas por ATM e ATR em resposta aos diferentes tipos de dano ao DNA.....	34
Figura 9	– Análises de associação entre o nível de expressão do gene <i>ATR</i> e a sobrevida global e livre de LMA dos pacientes com SMD. A e C. Gráficos de obtenção de <i>Cutoff</i> a partir da otimização por correlação com a sobrevida global e livre de LMA. B e D. Gráficos de curva da sobrevida global e livre de LMA (Kaplan-Meyer)	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Níveis de expressão do mRNA do gene <i>ATM</i> quanto à celularidade na biópsia óssea dos pacientes portadores de síndrome mielodisplásica.....	51
Gráfico 2	– Níveis de expressão do mRNA do gene <i>ATM</i> quanto ao número de citopenias presentes na avaliação do sangue periférico em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica.....	51
Gráfico 3	– Níveis de expressão do mRNA do gene <i>ATM</i> quanto à presença ou ausência de disgranulopoiese na biópsia óssea de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica.....	52
Gráfico 4	– Níveis de expressão do mRNA do gene <i>ATM</i> quanto à contagem absoluta de neutrófilos no sangue periférico de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica.....	52
Gráfico 5	– Níveis de expressão do mRNA do gene <i>ATR</i> quanto à celularidade na biópsia óssea dos pacientes portadores de síndrome mielodisplásica.....	53
Gráfico 6	– Níveis de expressão do mRNA do gene <i>ATR</i> quanto ao número de citopenias presentes na avaliação do sangue periférico em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica.....	54
Gráfico 7	– Níveis de expressão do mRNA do gene <i>ATR</i> quanto à contagem absoluta de neutrófilos no sangue periférico de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica.....	54
Gráfico 8	– Níveis de expressão do mRNA do gene <i>ATR</i> quanto à evolução clínica de síndrome mielodisplásica para Leucemia Mieloide Aguda (LMA).....	55
Gráfico 9	– Correlação de Pearson entre os níveis de expressão do mRNA dos genes <i>ATM</i> e <i>ATR</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Sondas utilizadas na avaliação da expressão gênica por qPCR.....	44
Tabela 2	– Características dos pacientes quanto a gênero, idade e variáveis hematológicas (Hemograma, Mielograma e Biópsia óssea).....	49
Tabela 3	– Caracterização dos <i>cutoffs</i> na análise de associação entre os níveis de expressão dos genes <i>ATM</i> e <i>ATR</i> com a sobrevida global dos pacientes com SMD.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKAP12	A-kinase-anchoring protein 12
ANC	Contagem de Neutrófilos
AR	Anemia Refratária
AREB	Anemia Refratária com Excesso de Blastos
AREB – II	Anemia Refratária com Excesso de Blastos 2
AREB – T	Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação
AREB -I	Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1
ARSA	Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada
ATR	ATM- e Rad 3-relacionada
B2M	β 2-microglobulina
BER	Reparo por Excisão de Bases
Chk1	Proteína checkpoint quinase 1
Cq	Quantification cycle
CRDM	Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem
CRDM - SA	Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem Com Sideroblastos em Anel
CRDU	Citopenia Refratária com Displasia em Única Linhagem
DDR	Resposta ao Dano do DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-PKcs	Proteína quinase dependente de DNA
DSBs	Quebras de Fita dupla de DNA (DNA double-strand breaks)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAB	Grupo Franco-Americano-Britânico
FISH	Hibridação Fluorescente in Situ
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
G0	Fase G0
G1	Fase Gap 1
G2	Fase Gap 2
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
Hb	Hemoglobina
HR	Hazard ratio

HR	Reparo por Recombinação Homóloga
IC	Intervalo de Confiança
INDEX	Média de tendência central
IPSS	International Prognostic Score System
IPSS -R	International Prognostic Score System Revised
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica
M	Mitose
MIQE	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
MMR	Reparo de erros do emparelhamento de bases do DNA
NER	Reparo por Excisão de Nucleotídeos
NHEJ	Reparo por Junções Não Homólogas
NPM1	Nucleophosmin/Nucleoplasmin Family, Member 1
NR	Neutropenia Refratária
OMS	Organização Mundial da Saúde
p- ATM	Proteína Ataxia- Telangiectasia Mutada
p53	Proteína p53
p-ATR	Proteína Ataxia Telangiectasia e Rad3
p-CHK1	Ponto de verificação quinase 1
p-CHK2	Ponto de controle quinase 2
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
p-TP53	Proteína tumoral p53
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RPA	Proteína de replicação A
S	Fase de síntese de DNA
SD	Desvio Padrão
SF3B1	Splicing factor 3B subunit 1
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SMD – U	Síndrome Mielodisplásica Não Classificada
SMD/DMP	Síndrome Mielodisplásica/Doença mieloproliferativa
ssDNA	Junções de cadeia simples
TR	Trombocitopenia Refratária

UBC	Ubiquitina C
UV	Radiação Ultravioleta
WPSS	WHO-Classification Based Prognostic Scoring System
XP	Xeroderma Pigmentosum

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.2 Epidemiologia.....	18
1.3 Patogênese da Síndrome Mielodisplásica	19
1.4 Classificação da Síndrome Mielodisplásica.....	21
1.5 Avaliação de Prognóstico dos Pacientes com Síndrome Mielodisplásica	22
1.6 Citogenética na SMD.....	23
1.7 Ciclo Celular	24
1.8 Lesões no DNA e Mecanismos de Reparo	26
1.9 Ataxia Telangiectasia Mutada e Ataxia Telangiectasia Rad-3 relacionada.....	29
1.10 Genes relacionados ao reparo do DNA na Síndrome Mielodisplásica	35
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo Geral.....	40
2.2 Objetivos Específicos	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Delineamento do estudo	41
3.2 Local do estudo	41
3.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	41
3.4 Aspectos éticos.....	41
3.5 Coleta das amostras.....	42
3.6 Cariótipo por banda G	42
3.5 Obtenção do pool celular	42
3.7 Extração de RNA total	43
3.8 Síntese de cDNA.....	43
3.9 PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	43
3.8.1 Reações	44
3.8.2 Seleção dos genes referência.....	45

3.8.3 Determinação relativa dos níveis de expressão dos genes alvo	45
3.10 Variáveis clínicas utilizadas nas análises	45
3.11 Análise estatística.....	47
3.11.1 Análise de sobrevida dos pacientes com SMD em relação aos níveis de expressão dos genes avaliados	47
4 RESULTADOS	48
4.1 Características clínicas dos pacientes com síndrome mielodisplásica	48
4.2 Análise da expressão do gene Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) em pacientes com síndrome mielodisplásica	50
4.3 Expressão do gene Ataxia Telangiectasia Mutada Rad-3 Relacionada (ATR) em pacientes com Síndrome Mielodisplásica	53
4.4 Análise de correlação entre os genes ATM e ATR	55
4.5 Análise de sobrevida dos pacientes com SMD em relação aos níveis de expressão dos genes ATM e ATR	56
5 DISCUSSÃO	58
CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	72
APÊNDICE B – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES QUANTO À CITOGENÉTICA, À CLASSIFICAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE E AO GRUPO DE RISCO SEGUNDO CLASSIFICAÇÃO DO SISTEMA DE ESCORE DE PROGNÓSTICO INTERNACIONAL REVISADO (IPSS-R).....	75
APÊNDICE C - TABELA COM TODOS OS RESULTADOS DA PESQUISA.....	79
ANEXO A – CLASSIFICAÇÃO FRANCO-AMERICANA-BRITÂNICA DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA	83
ANEXO B - CLASSIFICAÇÃO DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE 2001.....	84
ANEXO C - CLASSIFICAÇÃO DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE 2008.....	85

ANEXO D – CLASSIFICAÇÃO DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE 2016.....	86
ANEXO E – EXTRATIFICAÇÃO DE RISCO DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (WPSS)	87
ANEXO F – EXTRATIFICAÇÃO DE RISCO DO SISTEMA DE SCORE PROGNÓSTICO INTERNACIONAL REVISADO (IPSS-R)	88
ANEXO G - ARTIGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO NO ANO DE 2017.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais da Síndrome Mielodisplásica

A síndrome mielodisplásica (SMD) foi considerada, por muitos anos, uma condição de pré-leucemia devido à alta taxa de progressão para a leucemia mieloide aguda (LMA) (CHAMSEDDINE *et al.* 2016). Segundo DOLATSHAD *et al.* (2015), com a progressão da doença, há risco de 30 a 40% dos pacientes com SMD desenvolverem LMA. Cerca de 50% dos pacientes com SMD vão a óbito devido às complicações decorrentes das citopenia (CHAMSEDDINE *et al.* 2016).

A SMD constitui, atualmente, um grupo heterogêneo de doenças clonais que se caracterizam por: displasias, insuficiência da medula óssea, aumento da morte celular programada (apoptose). Esse conjunto de alterações leva às citopenias periféricas que são o principal evento laboratorial observado nos pacientes. A depender da linhagem celular envolvida, as citopenias podem levar às principais manifestações clínicas da doença: síndrome anêmica, dependência transfusional, infecção e hemorragias (MA, 2012; ADÈS, ITZYKSON, FENAUX, 2014).

A etiologia da SMD pode ser variada e desconhecida, sendo a maioria dos casos classificada como doença primária (*de novo*) que representa cerca de 85 a 90% dos casos surgindo sem causa óbvia. Em 10 a 15% dos casos, a SMD pode ser classificada como secundária devido a um tratamento quimioterápico ou radioterápico para tumores sólidos, linfoma ou outras leucemias (BORTOLHEIRO, 2006; SEKERES, 2010; CHAMSEDDINE *et al.* 2016).

Os principais tratamentos relacionados ao desenvolvimento de SMD secundária são: a quimioterapia com uso de agentes alquilantes e inibidores da topoisomerase, a radioterapia ou o transplante autólogo de medula óssea. O período típico de latência para a SMD secundária após a exposição a agentes alquilantes e a radiação é de 5 a 10 anos e o risco parece ser dose-dependente. A SMD também é secundária a exposição prolongada ao benzeno, a tinturas para cabelo, a pesticidas, ao tabaco e a herbicidas (SEKERES, 2010; CHAMSEDDINE *et al.* 2016).

Na SMD primária as anomalias citogenéticas são observadas em 40 a 60% dos casos, enquanto, a SMD secundária apresenta um curso clínico mais agressivo que a SMD primária, com incidência de alterações citogenéticas em aproximadamente 80% dos casos, a depender da população estudada, esquema quimioterápico utilizado e tempo de seguimento

dos pacientes (PINHEIRO; CHAUFFAILLE, 2006; VASSALLO; MAGALHÃES, 2009).

O diagnóstico da SMD é baseado nas características clínicas e morfológicas e pode ser difícil em pacientes com cariótipo normal ou que não apresentam marcadores morfológicos robustos, como sideroblastos em anel ou excesso de blastos (MALCOVATI *et al.*, 2013; SHAHRABI *et al.*, 2016). O diagnóstico da SMD é, em geral, bastante difícil e em muitos casos recomenda-se um protocolo de exclusão de causas não clonais. Dentre as principais causas de exclusão estão: as deficiências nutricionais, a exposição recente a agentes tóxicos, disfunções metabólicas e hormonais, doenças infecciosas, doenças auto-imunes e etilismo (MAGALHÃES e LORAND-METZE, 2004; MALCOVATI *et al.*, 2013; STEENSMA *et al.*, 2015, SHAHRABI *et al.*, 2016)

Nas situações inconclusivas, em que a apresentação clínica e morfologia são ambíguos, a detecção de uma mutação associada à SMD pode fornecer apoio adicional no diagnóstico. Nos casos em que o diagnóstico está estabelecido certas mutações podem auxiliar na previsão dos riscos que levam a progressão leucêmica e óbito, como por exemplo as mutações em *FLT3*, *KIT*, ou *NPM1* que são adquiridas ocasionalmente durante a progressão para LMA (STEENSMA *et al.*, 2015).

1.2 Epidemiologia

A incidência e as características clínicas dos pacientes com SMD variam de acordo com a área geográfica e isso tem sido atribuído a fatores étnicos, ocupacionais, de estilo de vida e ambientais (BELLI *et al.* 2015).

A taxa de incidência das SMD é de aproximadamente 5 casos por 100.000 pessoas ao ano na população em geral, entretanto apresenta maior incidência em indivíduos com mais de 60 anos (cerca de 20 a 50 casos por 100.000) (MALCOVATI *et al.*, 2013).

Em 2004, nos Estados Unidos a taxa de incidência da SMD foi estimada em 3,8 casos por 100.000 pessoas, com estimativa de 15 mil de novos diagnósticos anuais. As taxas foram mais baixas em pessoas com menos de 40 anos (0,14 casos por 100.000) e maior com o aumento da idade com incidência de 36 casos por 100.000 para pacientes com 80 anos ou mais (SEKERES, 2010).

Neukirchen *et al.* (2011) avaliaram estimativas da incidência e prevalência da SMD na população da cidade de Düsseldorf (Alemanha) mostrando uma prevalência padronizada de idade de aproximadamente 7 casos por 100.000 pessoas e incidência global padronizada de idade de 2,51 casos por 100.000 pessoas. Ainda nesse estudo, foi observado

que a incidência foi maior em homens, especialmente entre aqueles com 80 anos ou mais e que a prevalência também aumentou com o avanço da idade.

Magalhães *et al.* (2010) avaliaram 476 pacientes com diagnóstico de SMD entre 2003 e 2007 tratados em 12 centros terciários brasileiros selecionados com base em conhecimentos clínicos e experiência científica. Os resultados deste estudo mostraram uma mediana de idade de 68,3 anos ao diagnóstico, predomínio do sexo feminino 50,8% e que 86,6% dos pacientes eram provenientes de áreas urbanas (MAGALHÃES *et al.*, 2010).

Estudo realizado por Belli *et al.* (2015) analisou retrospectivamente 1.080 pacientes com SMD *de novo* na América do Sul sendo 635 pacientes provenientes da Argentina, 345 do Brasil e 100 do Chile. A mediana de idade foi de 69 anos na população total investigada com leve predomínio de pacientes do sexo masculino (BELLI *et al.* 2015).

Considerando diversas limitações na obtenção de dados epidemiológicos e clínicos fidedignos, como a não investigação das possíveis causas de citopenia periféricas em idosos, bem como a resistência em indicar procedimentos diagnósticos invasivos como a avaliação do aspirado medular, que é necessário ao diagnóstico de SMD, é provável que a incidência seja subestimada. Bejar e Steensma (2014) estimam que cerca de 30.000 a 40.000 novos casos de SMD ocorram nos Estados Unidos a cada ano.

1.3 Patogênese da Síndrome Mielodisplásica

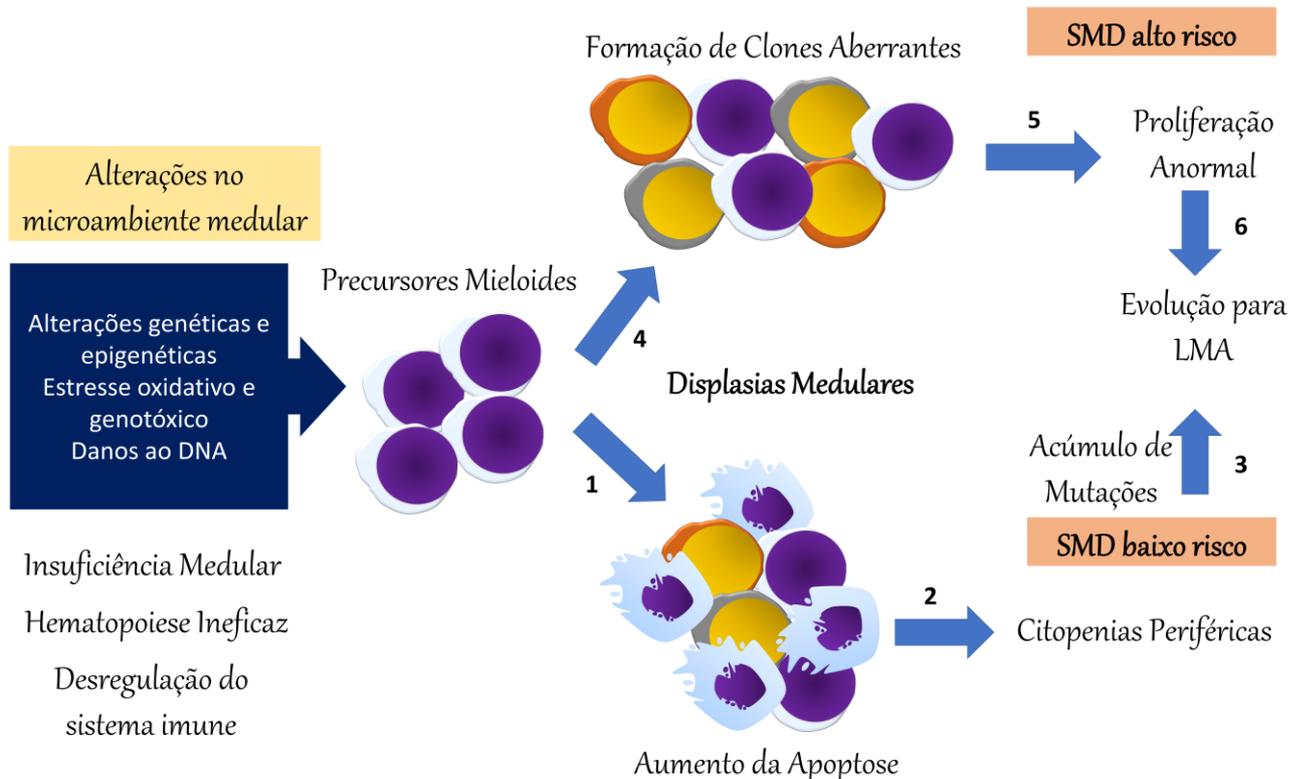
A patogênese da SMD (Figura 1) não é totalmente compreendida, e é provável que múltiplos mecanismos estejam envolvidos no seu desenvolvimento incluindo: instabilidade genética, mutações, exposição a agentes genotóxicos, desregulação da resposta imune inata e alterações citogenéticas (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014; GANGAT; PATNAIK; TEFFERI, 2015; CHAMSEDDINE *et al.* 2016).

Acredita-se que o acúmulo de danos genéticos resulta em mutações celulares que comprometem diversas vias, envolvendo: a regulação epigenética, a resposta ao dano do DNA (ácido desoxirribonucleico), o maquinário de *splicing* (processo que remove os íntrons e junta os éxons depois da transcrição do RNA) e a sinalização por tirosina quinase (GANGAT; PATNAIK; TEFFERI, 2015).

A maioria dessas mutações são adquiridas aleatoriamente durante o envelhecimento, mas podem ocorrer também devido à exposição a agentes genotóxicos. O acúmulo de alterações pode culminar com a formação de um clone anormal, que passa a proliferar, formando subpopulações clonais (WALTER *et al.*, 2013). Existem diversos

mecanismos genéticos para o início da SMD, entretanto há em comum o fato de existir um clone fundador com centenas de mutações presentes na medula óssea dos pacientes e que proliferam descontroladamente quando ocorre evolução da doença para LMA (WALTER *et al.*, 2013).

Figura 1 - Representação esquemática da patogênese da Síndrome Mielodisplásica



Legenda. A SMD é uma doença com fisiopatologia complexa envolvendo fatores genéticos, danos ao DNA, estresse oxidativo e genotóxico, desregulação do sistema imune e alterações no microambiente medular que levam a insuficiência medular e hematopoiese ineficaz. Nas fases iniciais da doença, consideradas de baixo risco, os precursores mielóides sofrem alterações em seu material genético (1) ocasionando displasias medulares e levando ao aumento da apoptose que culmina com as citopenias periféricas (2). O acúmulo de alterações genéticas pode ocasionar a evolução da SMD de baixo risco para a SMD de alto risco podendo progredir para LMA (3). Na SMD de alto risco, o precursor mielóide pode sofrer alterações genéticas (4) que levam a produção de clones aberrantes, estes podem proliferar descontroladamente (5) levando à evolução para LMA (6).

Fonte: Elaborada pelo autor

Além da origem de um clone alterado, diversos outros mecanismos parecem contribuir na patogênese da doença. Entre esses mecanismos, está a desregulação do sistema imune que tem sido associada ao mecanismo de apoptose nos pacientes com SMD. Outro fator importante a ser considerado é que alguns pacientes se beneficiam do tratamento com imunossupressores reafirmando o envolvimento dessa desregulação na SMD (GLENTHØJ *et al.* 2016).

A apoptose intramedular aumentada é frequentemente observada na fase inicial da doença principalmente em pacientes de baixo risco e à medida que a apoptose diminui, ocorre progressão da doença e possível evolução para LMA (MARCONDES *et al.*, 2008; GAÑÁN-GÓMEZ *et al.*, 2015, WOLACH; STONE, 2016, HE; LIU, 2016).

1.4 Classificação da Síndrome Mielodisplásica

Em 1976 o grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) fez uma distinção entre os casos de leucemia aguda com necessidade de tratamento imediato e uma variedade de distúrbios menos grave em indivíduos com mais de 50 anos com sintomas de duração variável ao qual foi dado o nome de síndrome dismielopoietica ou mielodisplásica (BENNETT *et al.* 1982).

Devido a heterogeneidade da SMD, diversos sistemas de classificações foram criados ao longo dos anos na tentativa de agrupar pacientes com características semelhantes com a finalidade de compreender melhor a evolução da doença e facilitar o tratamento desses pacientes.

Bennett *et al.* (1976) fizeram a primeira classificação da SMD denominada de FAB, dividindo-a em dois grupos: Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB) e Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC), sendo o componente monocítico proeminente na medula óssea e no sangue periférico responsável pela distinção da LMMC da AREB.

Bennett *et al.* (1982) propuseram uma revisão do sistema de classificação de 1976 levando em consideração: 1) alterações morfológicas, quantitativas e presença de blastos no sangue periférico, 2) celularidade da medula óssea, 3) presença ou ausência de sideroblastos em anel na medula óssea, 4) percentual de blastos na medula óssea. O grupo FAB definiu cinco grupos a depender das diversas características citadas anteriormente em: Anemia Refratária (AR), Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA), Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB), Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC) e Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação (AREB-T) (**ANEXO A**).

Em 2001, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs uma nova classificação para a SMD levando em consideração critérios do grupo FAB e incluindo outros critérios como a citogenética. A primeira grande mudança dessa nova classificação foi a redução do número de blastos de 30% para 20% no sangue periférico ou medula óssea como critério para o diagnóstico de leucemia aguda, logo o grupo AREB-T foi removido desta classificação. Outras mudanças incluem: um refinamento das definições para a AR e ARSA; a adição das

novas categorias Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem (CRDM) e a CRDM com sideroblastos em anel (CRDM-SA); dividiu a AREB em AREB-I (5% a 9% de blastos na medula) e AREB-II (10% a 19% de blastos na medula); reconhecimento da síndrome 5q-; adicionou o grupo de Síndrome Mielodisplásica Não Classificada (SMD-U) que inclui a SMD hipocelular; e criou o grupo Síndrome Mielodisplásica/Doença mieloproliferativa (SMD/DMP) (**ANEXO B**) (VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002).

Em 2008, a OMS fez uma revisão da classificação elaborada em 2001 sendo a principal modificação a criação de um novo grupo denominado Citopenia Refratária com Displasia em Única Linhagem (CRDU), no qual foi incluído a AR e outros dois subgrupos Neutropenia Refratária (NR) e Trombocitopenia Refratária (TR), além do uso de características citogenéticas sugestivas da SMD no grupo SMD-U (**ANEXO C**) (VARDIMAN *et al.*, 2009).

Uma nova revisão da classificação da OMS foi realizada recentemente, em 2016, (**ANEXO D**) introduzindo refinamentos na interpretação morfológica e na avaliação da citopenia, bem como a influência de informações genéticas no diagnóstico e classificação da doença (ARBER *et al.*, 2016). Esta classificação apresenta poucas diferenças em relação à anterior, sendo as principais modificações as alterações nas nomenclaturas de anemia refratária e citopenia refratária pela terminologia síndrome mielodisplásica e a adição da mutação do gene *Splicing factor 3B subunit 1* (SF3B1) (STEENSMA, 2015; ARBER *et al.*, 2016).

1.5 Avaliação de Prognóstico dos Pacientes com Síndrome Mielodisplásica

Devido à heterogeneidade da doença e possível evolução clínica para a LMA Greenberg *et al.* (1997) desenvolveram um sistema de escore prognóstico para a SMD (*International Prognostic Score System – IPSS*) levando em consideração o número de blastos na medula óssea, o grupo de risco citogenético e a presença de citopenias no sangue periférico. Esse sistema tinha como propósito estimar a sobrevida global dos pacientes e o risco de evolução para LMA, servindo de orientação para condutas clínicas e terapêuticas.

Malcovati *et al.* (2005) propuseram um novo sistema de classificação denominado *WHO-Classification Based Prognostic Scoring System* (WPSS) que utiliza o subtipo de SMD segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as características citogenéticas e a ausência ou presença de dependência transfusional como critérios para a avaliação do prognóstico sendo atribuído pontos para cada variável (**ANEXO E**). A soma dos pontos, para cada

variável, classifica os pacientes em cinco grupos de risco distintos: muito baixo (pontuação 0), baixo (1), intermediário (2), alto (3-4), muito alto (5-6).

Greenberg *et al.* (2012) revisaram o IPSS dando origem ao Sistema de Escore Prognóstico Internacional (*International Prognostic Score System Revised*– IPSS-R) que é atualmente utilizado na clínica para avaliação do prognóstico dos pacientes com SMD. As principais modificações em relação ao IPSS de 1997, foram a divisão citogenética em 5 grupos de risco (muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto) que anteriormente eram apenas 3 (baixo, intermediário e alto), a categorização da concentração de hemoglobina (Hb), e as contagens de plaquetas e neutrófilos (**ANEXO F**).

1.6 Citogenética na SMD

A análise citogenética tem um importante papel na determinação da clonalidade, no diagnóstico e na avaliação do prognóstico de pacientes com suspeita de SMD. As alterações citogenéticas são normalmente decorrentes de eventos secundários a uma instabilidade genômica causada por uma mutação genética inicial (MALCOVATI *et al.*, 2013; CAZZOLA; DELLA PORTA; MALCOVATI, 2013).

Aproximadamente 50 a 60% dos pacientes com SMD *de novo* e 80% das SMD secundárias apresentam alguma alteração citogenética. Sendo que os cromossomos mais comumente afetados são 5, 6, 7, 8 e 13, sendo as lesões cromossômicas mais recorrentes: as deleções parciais dos cromossomos 5 ou 7, e cópias adicionais do cromossomo 8 (VISCONTE *et al.*, 2014; BEJAR; STEENSMA, 2014).

A deleção 5q, quando presente, ocorre principalmente em duas regiões distintas e possuem diferente impacto prognóstico (HAASE, 2008; BEJAR *et al.*, 2014). A deleção que ocorre mais próxima ao centrômero está relacionada a SMD secundária à terapia, tendo uma forma mais agressiva, já a área mais próxima da região 5q32 está relacionada com a síndrome 5q- e apresenta prognóstico favorável (HAASE, 2007; BEJAR *et al.*, 2014). A síndrome 5q- é classificada separadamente pela OMS como um dos subtipos da SMD e é caracterizada por: anemia macrocítica, diseritropoiese e contagens de plaquetas normais (BEJAR; STEENSMA, 2014).

As alterações cromossômicas únicas geralmente são detectadas na SMD *de novo*, enquanto o cariótipo complexo, definido como sendo aquele com 3 ou mais anormalidades cromossômicas, geralmente é observado em pacientes com SMD secundária (VISCONTE *et al.*, 2014).

Quando ocorrem repetidas falhas na realização do cariótipo por banda G (ausência ou baixa qualidade das metáfases) a realização da técnica hibridação fluorescente *in situ* (FISH) pode ser útil no complemento da análise citogenética convencional (MALCOVATI *et al.*, 2013). Além disso, a FISH pode ser útil para esclarecer aberrações complexas e podendo detectar anormalidades em até 15% dos casos de pacientes com cariótipo normal (MALCOVATI *et al.*, 2013).

1.7 Ciclo Celular

O crescimento e a diferenciação celular, assim como a integridade do genoma, são regulados por uma rede complexa de eventos, nos quais os pontos de controle do ciclo celular (*checkpoints*), o reparo do DNA e a apoptose têm papéis críticos (WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017).

O ciclo de divisão celular em mamíferos é um processo altamente organizado e regulado, que envolve diversas proteínas responsáveis pelo monitoramento da integridade genômica (Figura 2) e resulta na correta separação cromossômica dando origem a duas células filhas (OTTO; SICINSKI, 2017). A proliferação celular depende da progressão através das fases do ciclo celular que consistem em: Fase Gap 1 (G1), Fase de síntese de DNA (S), fase Gap 2 (G2), Mitose (M) e G0.

Cada célula filha originada, após finalizado um ciclo, pode seguir dois destinos: a progressão no ciclo celular ou a saída dele (fase G0). A fase G0 do ciclo celular é um estado quiescente que pode ser decorrente de detenções permanentes, associadas a diferenciação terminal, ou senescência de saída reversível (MATSON; COOK, 2017).

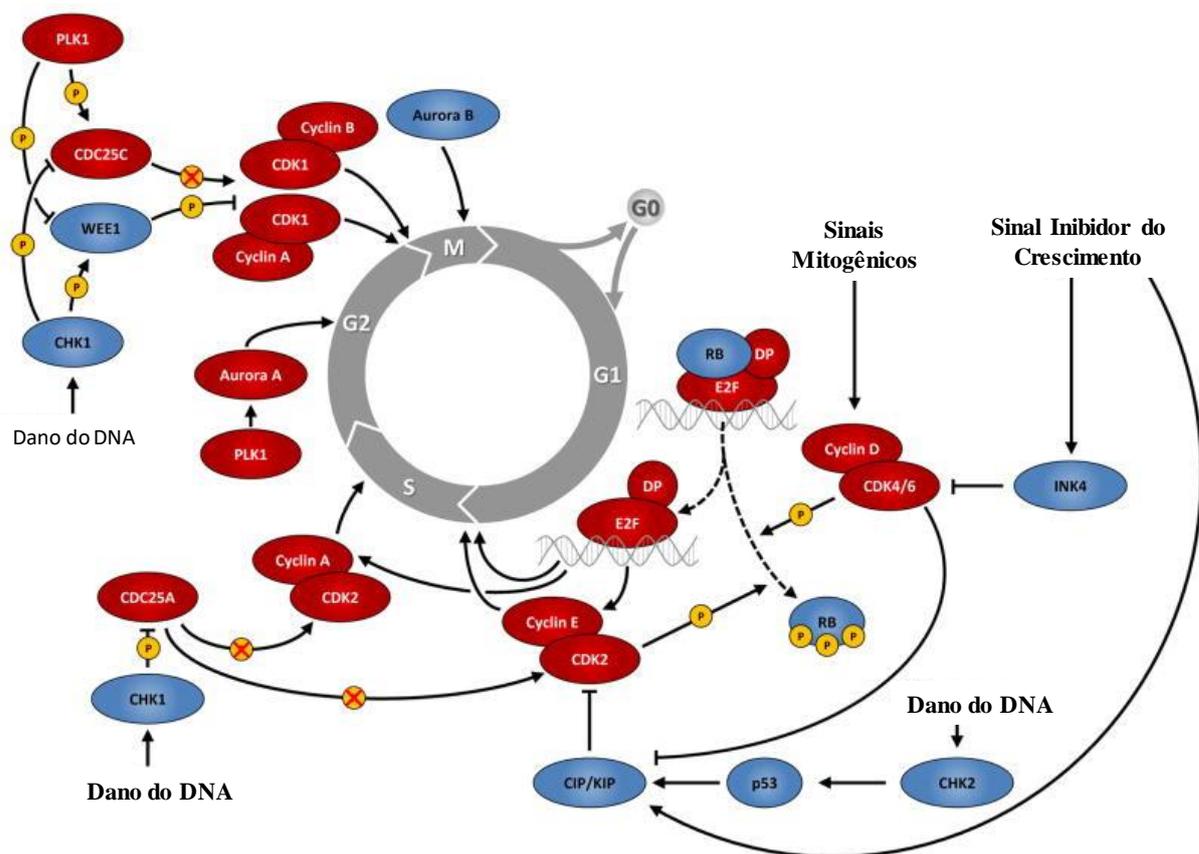
A quiescência é ativamente mantida pela repressão transcricional contínua de genes necessários à mitose e à replicação do DNA, e através da expressão ativa de genes antiapoptóticos, antisenescentes e antidiferenciadores (MATSON; COOK, 2017). Nesta fase, as células permanecem metabolicamente ativas, mas não se dividem ou, sob a ativação por sinais mitogênicos, retornam para a fase G1 do ciclo. A fase G1 constitui a etapa de crescimento inicial da célula. Nesta fase, as células absorvem nutrientes para a síntese de proteínas e RNA necessários à síntese de DNA (MASSAGUÉ, 2004).

A fase seguinte é denominada fase S e tem como característica principal a replicação do genoma. Nesta fase, a manutenção da integridade genômica é determinante para uma divisão celular bem-sucedida (DARLING *et al.*, 2017). Após a fase S, uma segunda fase de crescimento (fase G2) prepara a célula para a divisão e monta estruturas citoesqueléticas,

antes da divisão do material genético que ocorre durante a mitose (fase M) (DARLING *et al.*, 2017).

A replicação do DNA e a segregação cromossômica são processos propensos a erros e, quando ocorrem, normalmente ativam as proteínas envolvidas nos *checkpoints* para interromper o ciclo celular e desencadear o reparo do DNA (BRANDMAIER; HOU; SHEN, 2017).

Figura 2 – Representação esquemática de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular de mamíferos.



Fonte: Adaptada de Otto e Sicinski (2017)

O ciclo celular é constituído de fases G1, S, G2, M e uma fase quiescente denominada G0. Diversos fatores podem levar a alterações no ciclo celular como a ação de sinais mitogênicos, sinal inibidor do crescimento e dano no DNA. Esses diversos fatores atuam ativando diversas cascatas de sinalização, e quando os danos de DNA ocorrem as proteínas Chk1 e Chk2 são ativadas culminando com paradas no ciclo celular para permitir o reparo efetivo do DNA.

Os *checkpoints* consistem em pontos de parada do ciclo celular para análise do material genético. Os pontos de verificação ocorrem predominantemente nos seguintes estágios do ciclo celular: em G1 (transição de G1 para S), em G2 (transição de G2 para M) e

na transição da metafase para a anafase. Quando o DNA sofre um dano, as células sofrem bloqueio em diferentes *checkpoints* dependendo do estado do ciclo celular no momento em que o dano foi ocasionado (MEERAN; KATIYAR, 2008).

O *checkpoint* G1 impede a replicação do DNA danificado através de vários caminhos de transdução de sinal. Após o dano do DNA, a proteína *Chk1* ativada fosforila Cdc25A, desencadeando sua ubiquitinação e degradação pela via do proteassoma, que é necessária para a transição G1/S. Sob circunstâncias normais, a proteína *p53* que é denominada “guardiã do genoma” está inativa e quando o DNA sofre um dano ela é fosforilada por *ATM* ou *ATR* em Ser15 ou por *Chk1* em Ser20 levando a uma série de eventos que culminam com a parada do ciclo celular em G1 permitindo um possível reparo do DNA (MEERAN; KATIYAR, 2008).

Após a checagem em G1, se o DNA estiver íntegro ele segue para a fase S onde ocorre a ativação de uma cadeia intracelular de fosforilação, culminando na ativação de enzimas envolvidas na duplicação do DNA como a DNA polimerase, as helicases, ligases e topoisomerasas. Após a fase S, encontra-se o *checkpoint* G2 que consiste em uma pausa pré-mitótica decorrente da inibição da enzima Cdc25, responsável por ativar o fator promotor da mitose. Este fator é responsável por mediar a passagem da fase G2 para a mitose (NUSSBAUM; MCLNNES; WILLARD, 2016).

Outro *checkpoint* importante é o do fuso mitótico, que ocorre durante a metáfase quando os cromossomos estão alinhados na placa equatorial. O *checkpoint* do fuso mitótico tem como objetivo monitorar a ligação dos cromossomos aos microtúbulos do fuso garantindo integridade genômica a nível cromossômico (NUSSBAUM; MCLNNES; WILLARD, 2016).

1.8 Lesões no DNA e Mecanismos de Reparo

A estrutura primária do DNA humano sofre, todos os dias, diversos danos que podem ser resultantes de fatores exógenos, tais como radiação ionizante, luz ultravioleta e compostos químicos, ou de fatores endógenos como as espécies reativas de oxigênio, erros de replicação de DNA e ativação de oncogenes (BOHGAKI; BOHGAKI; HAKEM, 2010). Esses danos podem causar mudanças de base simples ou culminar com alterações mais complexas como deleções, fusões, translocações, aneuploidia e podem levar, conseqüentemente, à instabilidade genômica e comprometimento celular (BOHGAKI; BOHGAKI; HAKEM, 2010).

A capacidade de uma célula responder corretamente e reparar os danos ao DNA é de fundamental importância na manutenção da integridade genômica e proteção contra o desenvolvimento do câncer (BOHGAKI; BOHGAKI; HAKEM, 2010; DERHEIMER; KASTAN, 2010).

A resposta ao dano do DNA (DDR) da célula está relacionada à sua capacidade de detectar e sinalizar problemas em seu DNA com o objetivo de ativar mecanismos apropriados de reparo, manter a progressão no ciclo celular ou eliminar células com genoma irreparável (Figura 3). Deste modo, a DDR desempenha um papel importante em muitos aspectos do câncer e pode limitar, atuando como barreira na proliferação de células aberrantes, o desenvolvimento do tumor nos estágios iniciais (MARÉCHAL; ZOU, 2013; WEBER; RYAN, 2015).

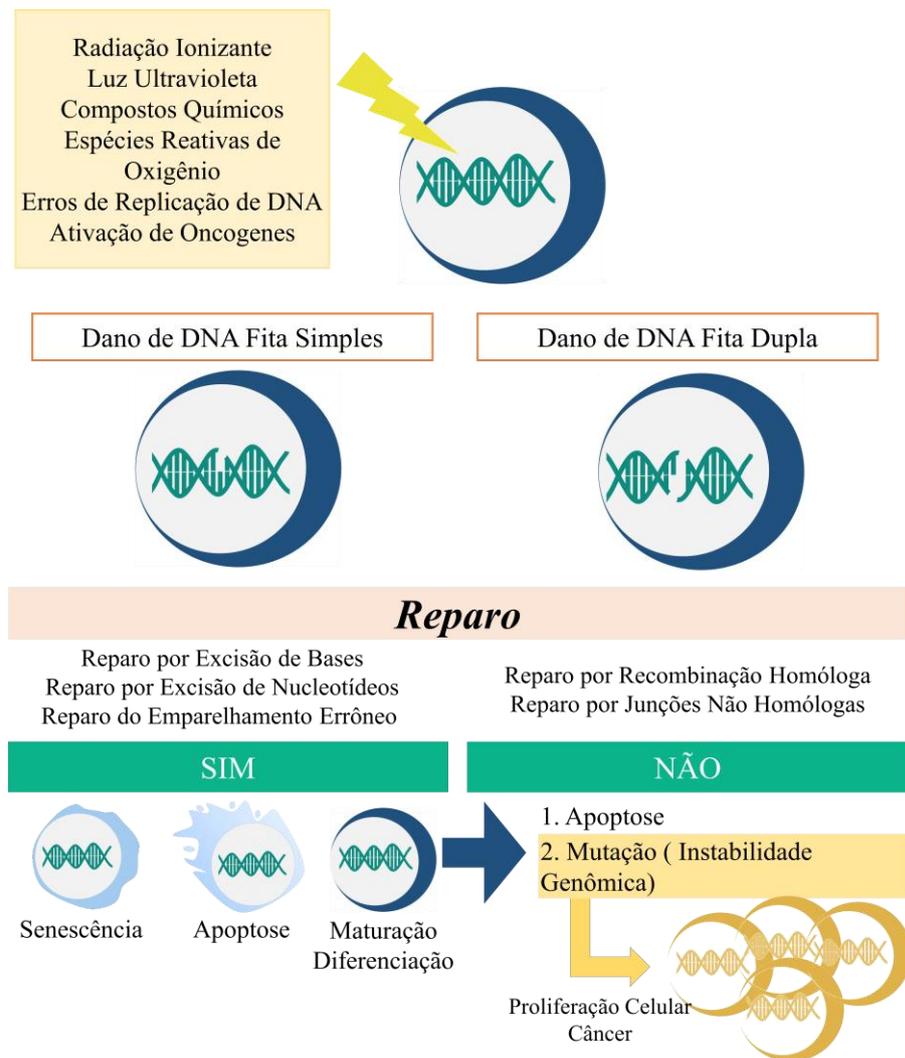
Atualmente, sabe-se que numerosas predisposições hereditárias ao câncer resultam de mutações em genes de reparo do DNA e que deficiências nos mecanismos de reparo podem contribuir para o desenvolvimento tumoral (WEBER; RYAN, 2015).

As células têm múltiplas vias de reparo do DNA com o objetivo de preservar a estabilidade genômica quando os danos ocorrem (IYAMA; WILSON, 2013). Dentre os diversos mecanismos de reparo de DNA estão: o excisão de bases, o excisão de nucleotídeos, o do emparelhamento errôneo, o por recombinação homóloga (HR) e o por junções não homólogas (NHEJ).

As lesões de fita simples de DNA são as formas mais comuns de dano ao DNA, ocorrendo na ordem de dezenas de milhares por célula por dia. Os principais mecanismos envolvidos no reparo desse tipo de lesão são: reparo por excisão de bases (BER), reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e reparo do emparelhamento errôneo também conhecido como reparo de erros do emparelhamento de bases do DNA (*Mismatch repair*-MMR). Nas vias de reparo por BER e NER a lesão é removida e uma DNA polimerase utiliza a fita de DNA não danificada como molde para restaurar a sequência original do DNA. O MMR está relacionado ao reconhecimento e reparo de erros nas inserções de bases e presença de deleções incorporadas no DNA que podem surgir durante a replicação e na recombinação do DNA (IYAMA; WILSON, 2013; TORGOVNICK; SCHUMACHER, 2015).

Os reparos por recombinação homóloga e reparo por junções não homólogas são as principais vias envolvidas no reparo de quebra de dupla fita de DNA (*DNA double-strand breaks* - DSBs). Estima-se que ocorram aproximadamente 10 DSBs por célula por dia baseado em cromossomos metafásicos e quebras de cromátides em células humanas primárias (LIEBER, 2010).

Figura 3 – Representação esquemática da exposição aos fatores desencadeantes de danos ao DNA em células tronco, possíveis mecanismos de reparo e desencadeamento do processo neoplásico



Legenda. As células humanas sofrem ação de diversos agentes que podem levar a danos ao DNA. Para que a célula siga o processo de maturação e diferenciação esses danos precisam ser reparados e diversos mecanismos estão envolvidos nesse processo sendo: o reparo por excisão de bases, reparo por excisão de nucleotídeos e reparo de erros do emparelhamento de bases do DNA ou reparo do emparelhamento errôneo responsáveis pelo reparo de danos de fita simples e o reparo por recombinação homóloga e o reparo por junções não homólogas responsáveis pelo reparo de dupla fita de DNA. Quando o DNA é devidamente reparado, a célula pode sofrer senescência, ser encaminhada para apoptose ou continuar sua maturação e diferenciação. Se o DNA não for devidamente reparado, a célula pode ser encaminhada para apoptose ou adquirir instabilidade genômica podendo gerar um clone anormal e proliferar levando ao desenvolvimento do câncer.

Fonte: Elaborada pelo autor

O reparo por HR é um mecanismo que se utiliza de um modelo homólogo intacto como uma cromátide irmã para orientar o reparo. O reparo por HR é a principal via de reparo de DSBs usada durante as fases S e G2 do ciclo celular onde as cromátides irmãs estão intactas e prontamente disponíveis. Nesse tipo de reparo um processamento final extensivo

(ou ressecção) é requerido gerando um DNA de cadeia simples que invade a cópia homóloga do locus quebrado, que é então usado como modelo para síntese de DNA (BOHGAKI; BOHGAKI; HAKEM, 2010; CLOUAIRE; MARNEF; LEGUBE, 2017).

O reparo por NHJE é predominante na fase G1 do ciclo celular, pois nesta fase do ciclo um doador de homologia não está próximo. A maioria dos DSBs relacionados ao rearranjo do genoma (translocações e deleções) em células neoplásicas são acompanhadas do reparo por NHJE (LIEBER, 2010). Pacientes com defeito na sinalização do dano do DNA ou no processo NHEJ apresentam fenótipo de imunodeficiência primária, que incluem radiosensibilidade, predisposição a malignidade e comprometimento neurológico e alguns genes como por exemplo *ATM*, *LIG IV*, *RAD50* são relacionados a presença desses fenótipos devido atuarem na sinalização das vias de reparo do DNA (MORIO, 2017).

As DSBs são as mais deletérias formas de danos ao DNA, e se não reparadas, podem levar à quadros de instabilidade genômica, aberração cromossômica e translocação. Vale ressaltar que a instabilidade genômica é passo essencial no desenvolvimento do câncer e que com o envelhecimento ocorre uma redução da capacidade de manter o equilíbrio celular, e isto provavelmente, contribui para o desenvolvimento de doenças. Além disso, células que sobrevivem após reparo inadequado podem tornar-se malignas. Nas situações em que as células apresentam DSBs caminhos de DDR são ativados por quinases como a *Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM)* e a *ATM- e Rad-3 relacionada (ATR)* (BOHGAKI; BOHGAKI; HAKEM, 2010; IYAMA; WILSON, 2013; MORIO, 2017).

1.9 Ataxia Telangiectasia Mutada e Ataxia Telangiectasia Rad-3 relacionada

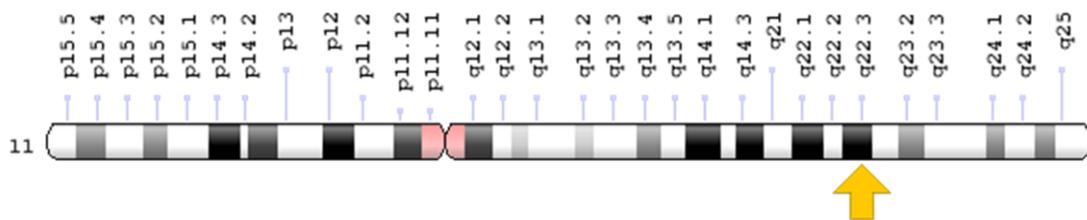
As neoplasias humanas apresentam uma grande heterogeneidade, entretanto todas elas possuem uma característica em comum: são decorrentes de uma única célula que sofreu, em algum momento, alterações no DNA decorrentes por exemplo de alterações epigenéticas ou mutações e transmitiu essas alterações a todas as células descendentes (IBRAHIM *et al.*, 2000). Estas mutações têm como alvo genes relacionados a proliferação, diferenciação e morte celular, sendo eles: reguladores do ciclo celular, supressores tumorais, reguladores da apoptose e do reparo do DNA (IBRAHIM *et al.*, 2000).

Em células de mamíferos, as proteínas *ATM*, *ATR* e a proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs) são as mais importantes quinases envolvidas na DDR. Essas quinases são membros da família fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (MARÉCHAL; ZOU, 2013).

ATM e *ATR* estão envolvidos em um amplo espectro de processos celulares que são importantes para a manutenção da estabilidade genômica dos organismos e podem atuar em conjunto ou separadamente (MARÉCHAL; ZOU, 2013).

O gene Ataxia Telangiectasia Mutada (*ATM*) é um gene supressor tumoral localizado no braço longo do cromossomo 11 na posição 11q22.3-23.1 (Figura 4) que, quando ativado, leva a síntese da proteína *ATM* em seres humanos (URESHINO *et al.*, 2016). A proteína *ATM* existe nas células na forma de dímero inativo e, na presença de danos de fita dupla de DNA, rapidamente transita para a forma monomérica (Figura 5) (BAKKENIST; KASTAN, 2003).

Figura 4 – Representação esquemática da localização do gene *ATM* no cromossomo 11



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

Legenda: O gene que codifica a proteína *ATM* está localizado no cromossomo 11 na posição q22.2-q23.1 representada pela seta amarela.

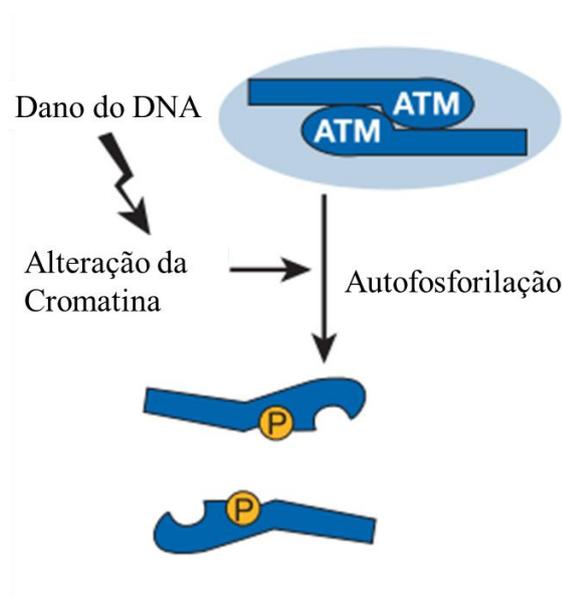
O gene *ATM* foi inicialmente identificado com base na sua mutação em Ataxia-Telangiectasia, uma doença genética caracterizada por ataxia cerebelar progressiva, apraxia oculomotora, imunodeficiência, aumento de alfa fetoproteína no soro, hipersensibilidade a radiações ionizantes e alta incidência de câncer (BERNSTEIN; CONCANNON, 2017).

A proteína *ATM* quinase desempenha um papel central na DDR por fosforilação de várias moléculas, e está envolvida não só no reparo de DSB, regulação do ciclo celular, decisão do destino celular, mas também na regulação transcricional, manutenção de telômeros (MORIO, 2017).

Em células normais, o alongamento de telômeros é dependente da telomerase e regulado positivamente por *ATM*. A *ATM* garante o acesso da enzima telomerase ao fosforilar *TRF1* e levar a diminuição da sua interação com o DNA telomérico (RENAULT *et al.*, 2017). O encurtamento de telômeros ocorre progressivamente a cada divisão celular, e parece estar associado ao envelhecimento celular e a carcinogênese, incluindo doenças hematológicas como o Linfoma Não-Hodking (RENAULT *et al.*, 2017).

A proteína *ATM* fosforila preferencialmente resíduos de serina e treonina quando seguidos por uma glutamina e modifica diversas proteínas fosforilantes diretamente envolvidas no processo de reparo (BERNSTEIN; CONCANNON, 2017). Além disso, modifica diversos componentes principais da estrutura da cromatina. A modulação da cromatina dependente de *ATM* pode promover o acesso aos maquinários de reparo e reorganizar domínios de cromossomos inteiros (CLOUAIRE; MARNEF; LEGUBE, 2017).

Figura 5 – Representação esquemática da ativação da proteína ATM e sua modificação da forma dimerica inativa para a forma monomérica ativa



Fonte: Adaptada de Bakkenist e Kastan, 2003

Legenda: A proteína ATM existe nas células na forma de dímero inativo e, na presença de danos de fita dupla de DNA, rapidamente transita para a forma monomérica fosforilada.

Quando as DSBs ocorrem, a proteína ATM atua na resposta inicial e rápida a esse dano levando a modificações em diversas vias celulares. Uma dessas modificações é a ativação da proteína p53 que se acumula e leva à ativação do gene que codifica a proteína p21 que é inibidora do maquinário celular. Outra via de atuação da ATM é a ativação da proteína ChK2 que é responsável pela fosforilação e inativação de Cdc25c que mantém o progresso da fase G2 do ciclo celular, por desfosforilação, ativando a quinase E dependente de ciclina Cdc2. ATM também pode atuar na fosforilação da proteína Mdm2 que é responsável pela exportação nuclear de p53 impedindo, assim, a sua degradação (SHILOH, 2001).

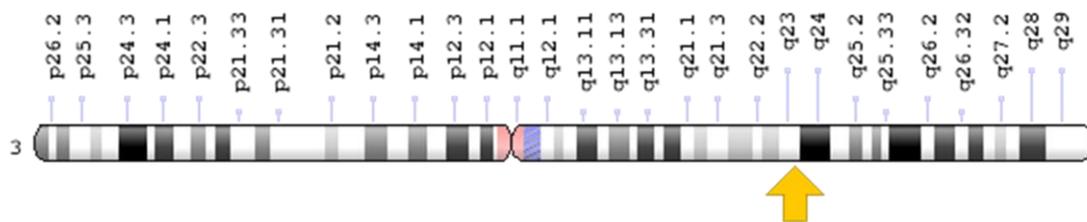
Alterações em *ATM* predis põe à malignidade, especialmente a leucemias e linfomas. Entretanto, o seu papel nas malignidades mielóides ainda não é totalmente

compreendido. Sabe-se que, em pacientes com SMD, quando há alterações no cromossomo 11 a banda que inclui o gene *ATM* (11q22) é excluída em aproximadamente 70% dos casos (URESHINO *et al.*, 2016, MORIO 2017).

Diversos estudos têm avaliado o papel do gene e da proteína *ATM* em várias doenças, dentre elas o cancer de pâncreas, o gástrico e o de mama (ROBERTS *et al.*, 2011, HELGASON *et al.*, 2015, BERNSTEIN; CONCANNON, 2017). Roberts *et al.* (2011) identificaram que mutações no gene *ATM* estão relacionadas a predisposição para o adenocarcinoma ductal pancreático familiar. Bernstein e Concannon (2017) observaram que algumas mutações em *ATM* predispõem ao risco de desenvolver cancer de mama enquanto outras parecem ter um efeito protetor.

Enquanto o gene *ATM* atua, principalmente, em resposta aos DSBs, o gene *ATR*, localizado no braço longo do cromossomo 3 na posição 3q23 (Figura 6), é ativado em resposta a uma série de lesões prejudiciais ao DNA que envolvem junções de cadeia simples (ssDNA) (SHILOH, 2001, TAREK *et al.*, 2014). As ssDNA são intermediários da replicação e do reparo de DNA comumente geradas quando há estresse na forquilha de replicação, além de atuar em resposta a ressecção de uma dupla fita de DNA e nos danos causados por radiação UV (SHILOH, 2001, TAREK *et al.*, 2014).

Figura 6 - Representação esquemática da localização do gene *ATR* no cromossomo 3



Fonte: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ATR#conditions>

Legenda: O gene que codifica a proteína *ATM* está localizado no cromossomo 3 na posição 3q23 representada pela seta amarela.

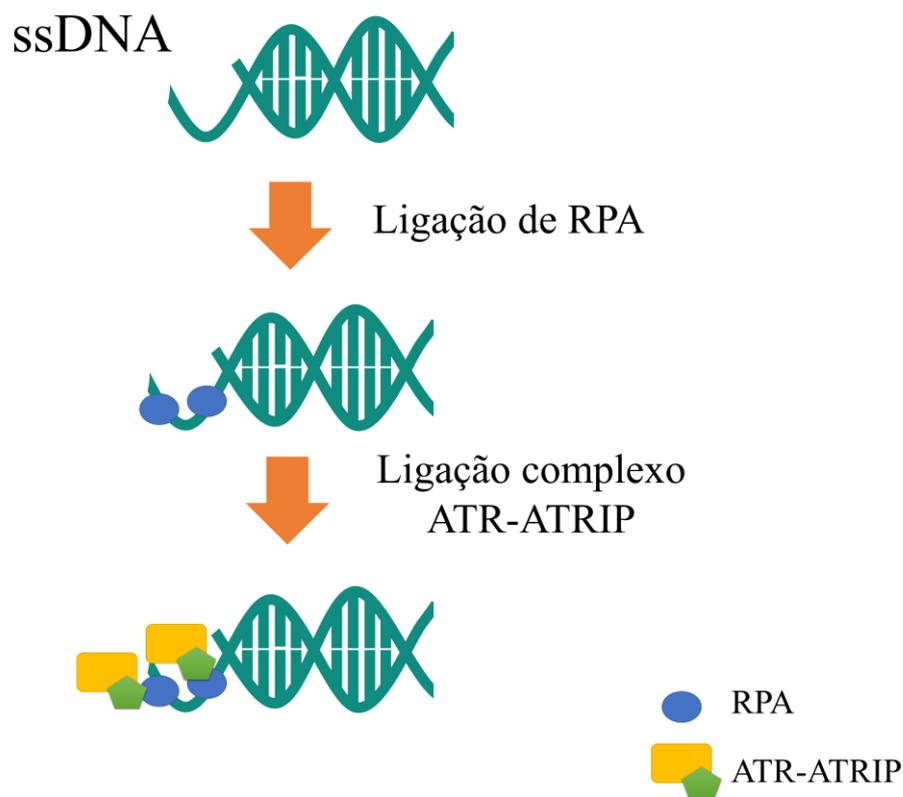
A proteína *ATR* atua ligada a proteína *ATRIP* que é crucial na manutenção da sua estabilidade e de suas funções. Quando as ssDNA são geradas na célula, são rapidamente revestidas pela proteína de replicação A (RPA) que fornece um meio crucial para a ligação do complexo *ATR-ATRIP* na fita de DNA (Figura 7) (FLYNN; ZOU, 2011).

Estudo realizado por Shiotani e Zou (2009) mostrou que, em resposta aos DSB, *ATM* é crucial também para a posterior ativação de *ATR* e sugeriram que a ativação de *ATR* é

acoplada a uma perda de ativação de *ATM*. Ainda neste estudo, foi verificado que os DSB e as ssDNA curtas levam a ativação de *ATM*, entretanto quando as ssDNA são longas a capacidade das DSB ativarem *ATM* é reduzida, sugerindo que, no contexto das DSB, o comprimento das ssDNA regulam a ativação de *ATM* e *ATR* (SHIOTANI; ZOU, 2009).

Embora esteja envolvida em múltiplos processos, a proteína *ATR* pode ser considerada o regulador primário da via de reparo por excisão de nucleotídeos devido sua capacidade de detectar estresses de replicação e de transcrição causados, por exemplo, pela radiação UV (MUSICH; LI; ZOU, 2017).

Figura 7 – Representação esquemática da ativação de *ATR* a partir de ssDNA



Fonte: Elaborada pelo Autor

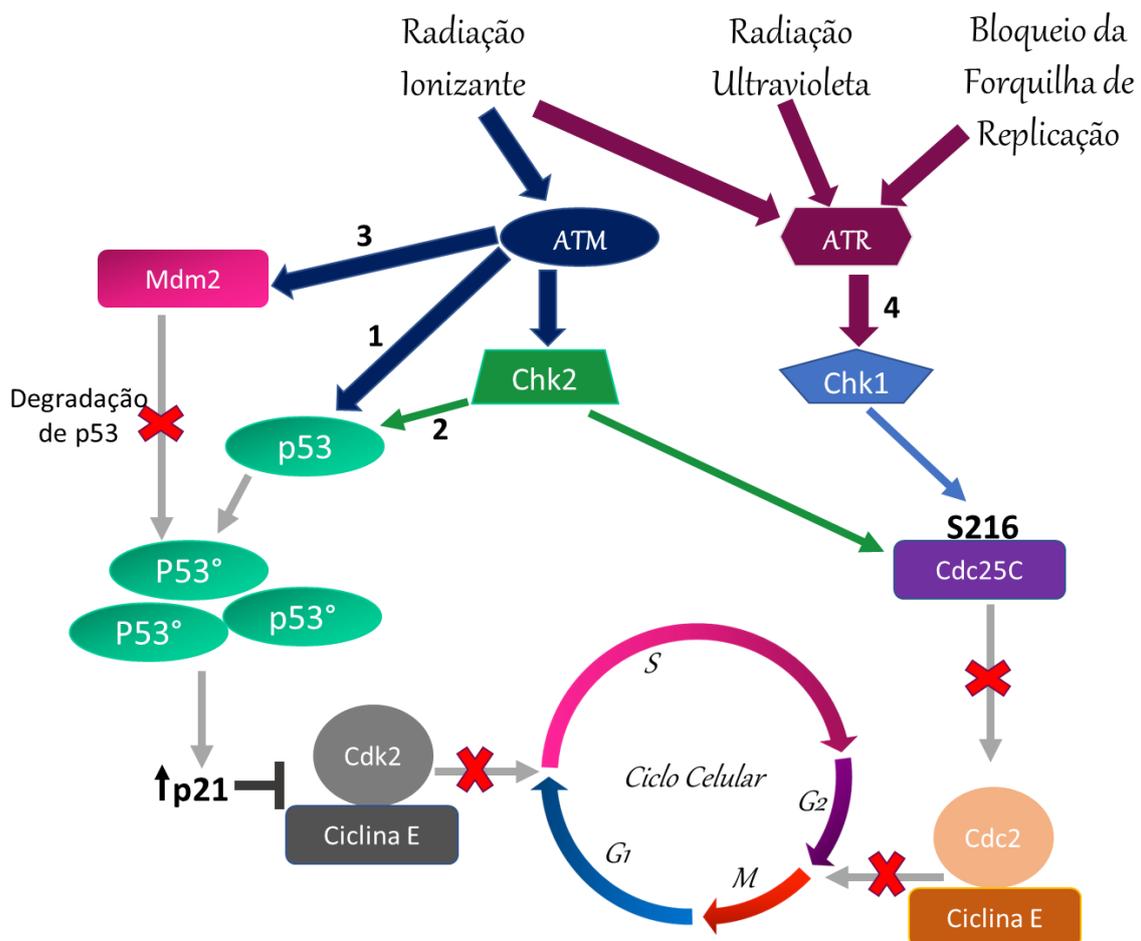
Legenda: As ssDNA são intermediários da replicação e do reparo de DNA comumente geradas quando há estresse na forquilha de replicação, além de atuar em resposta a ressecção de uma dupla fita de DNA e nos danos causados por radiação UV. Quando as ssDNA são geradas na célula, são rapidamente revestidas pela proteína de replicação A (RPA) que fornece um meio crucial para a ligação do complexo ATR-ATRIP na fita de DNA.

Em resposta a diversos danos como os causados pela radiação UV e por estresse na forquilha de replicação, a *ATR* quinase é ativada e fosforila muitos mediadores/efetores incluindo a proteína *checkpoint quinase 1* (*Chk1*), que atua de forma similar à proteína *Chk2*

ativada por ATM, a *A-kinase-anchoring protein 12* (AKAP12), a proteína *p53* e *XPA* (SHILOH, 2001; MUSICH; LI; ZOU, 2017). Algumas vias de sinalização comuns as duas proteínas, *ATM* e *ATR*, podem ser visualizadas esquematicamente na Figura 8.

Algumas evidências demonstram que o aumento de *ATR* e de *Chk1* podem promover o crescimento tumoral ao invés de suprimi-lo, uma vez que são muitas vezes regulados positivamente em neoplasias, como observado por Samento *et al.* (2015) para *Chk1* na leucemia linfoblástica aguda de célula T.

Figura 8 – Representação simplificada das vias de controle do ciclo celular mediadas por *ATM* e *ATR* em resposta aos diferentes tipos de dano ao DNA



Fonte: Adaptada de Shiloh, 2001

Legenda: Radiação ionizante e ultravioleta, bem como bloqueios da forquilha de replicação podem causar danos ao DNA. Uma vez gerados, esses danos levam à ativação dos principais sensores de danos do DNA, os genes *ATM* e *ATR*, que codificam proteínas de mesmo nome. Uma vez geradas, essas proteínas atuam em dois substratos principais Chk2 e Chk1 respectivamente. E ATM pode ainda atuar diretamente sobre a proteína p53 e Mdm2. A ativação dessas vias leva à parada no ciclo celular nas fases G2/M e G1/S para permitir que as células sofram reparo antes de seguir para a próxima fase do ciclo mantendo, assim a integridade genômica.

Nos últimos anos, a inibição da DDR tornou-se atraente na terapia do câncer, uma vez que a resistência às terapias genotóxicas foi associada ao aumento da sinalização DDR, e muitos tipos de câncer têm defeitos em certos componentes da DDR (MANIC *et al.*, 2015). Entretanto, a resposta aos danos de DNA parece ser peculiar para cada tipo de câncer e o papel de inibidores na SMD ainda não foi estabelecido.

Assim, a DDR é crucial para a sobrevivência da célula, uma vez que sua capacidade de detectar e sinalizar problemas em seu DNA leva a ativação de mecanismos apropriados de reparo que são importantes na manutenção da integridade genômica e na proteção contra o desenvolvimento do câncer.

1.10 Genes relacionados ao reparo do DNA na Síndrome Mielodisplásica

A instabilidade genômica é diretamente relacionada à SMD devido à alta frequência de alterações cromossômicas que podem ser decorrentes do acúmulo de alterações genéticas e da incapacidade das células de responderem aos danos de DNA (BOHGAKI; BOHGAKI; HAKEM, 2010; VALKA *et al.*, 2017).

Dentro deste contexto, diversos trabalhos têm avaliado genes e proteínas relacionadas ao reparo do DNA e controle do ciclo celular em pacientes com SMD. Dentre eles, Fabiani *et al.* (2009) avaliaram os polimorfismos dos genes relacionados ao reparo por recombinação homóloga (*RAD51-G135C* e *XRCC3- Thr241Met*) e do gene relacionado ao reparo por excisão de nucleotídeos (Xeroderma pigmentosum D - *XPD Lys751Gln*) e observaram que a frequência dos polimorfismos foi semelhante em pacientes com SMD e controles.

Economopoulou *et al.* (2010) avaliaram as enzimas *Ku70*, *Ku80*, *DNA-PKcs*, *XRCC4 ligase IV (LIG4)* através de análise por *Western Blot* e demonstraram uma expressão significativamente menor da proteína *LIG4* em pacientes com SMD em comparação com os controles e uma correlação negativa com o grupo de risco do cariótipo. Deste modo, Economopoulou *et al.* (2010) propuseram um potencial papel da redução da expressão da *LIG4* na indução da instabilidade genética e, como consequência, anormalidades citogenéticas complexas e mau prognóstico em pacientes com SMD. Além disso, observaram uma correlação positiva entre a expressão de *Ku70* e o percentual de blastos. A proteína *Ku70* atua inibindo a proteína *BAX* (pró-apoptótica) com isso o grau de apoptose diminui levando ao aumento do número de blastos, que escapam da apoptose, estando relacionada à doença mais agressiva (ECONOMOPOULOU *et al.*, 2010).

Li *et al.* (2011) avaliaram os polimorfismos dos genes *RAD51*-G135C, avaliado anteriormente por Fabiani *et al.* (2009), e *XRCC3*-C241T em pacientes chineses e não observaram diferença entre variantes polimórficas de *XRCC3*-C241T entre pacientes e controles. Entretanto, demonstraram que a variante homozigótica C/C de *RAD51*-G135C aumentava a susceptibilidade à SMD e o risco de associação de SMD com cariótipo anormal. *RAD51* é um gene de reparo de DNA e seu produto proteico atua no reparo por HR. O alelo *RAD51*-135C tem uma atividade enzimática reduzida em comparação com o *RAD51*-135G isto pode resultar na diminuição da capacidade de reparo do DNA e aumento da instabilidade genética e, eventualmente, aumento do risco de MDS (LI *et al.*, 2011).

Aktuglu *et al.* (2014) estudaram a influência genética dos polimorfismos dos genes relacionados ao reparo por excisão de bases (AP endonuclease 1 - *APE1*, *hOGG1*, *XRCC1*), reparo por HR (*XRCC3*) e reparo excisão de nucleotídeos (*XPB* e xeroderma pigmentoso do grupo G - *XPG*) em pacientes turcos com SMD e não observaram diferenças significativas para *APE1*, *XRCC1* e *XPG* entre pacientes com SMD e controles. Por outro lado, os genótipos Thr/Met de *XRCC3*, Cys+ de *XPB* e Gln/Gln de *hOGG1* foram associados com um risco aumentado de SMD (AKTUGLU *et al.*, 2014).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Citogenômica do Câncer – Fortaleza - Ceará, têm como uma das suas principais linhas de pesquisa o estudo de genes relacionados ao reparo de DNA em pacientes com SMD. Em 2012, o grupo analisou genótipos do gene *ATM* em pacientes com SMD e observaram diferença significativa no polimorfismo de *ATM* rs228593 entre pacientes e grupo controle (RIBEIRO JUNIOR *et al.*, 2013). Além disso, mostraram que o genótipo A/G de *ATM* rs228593 estava associado a um menor risco de desenvolver SMD que o grupo controle, ao número de citopenias periféricas e com o baixo risco segundo o IPSS-R (RIBEIRO JUNIOR *et al.*, 2013). Ribeiro Jr. *et al.* (2013) sugeriram, portanto que o polimorfismo A/G de *ATM* rs228593 está associado a SMD de baixo risco. Em 2015, o grupo realizou a genotipagem para polimorfismos dos genes envolvidos no reparo por HR (*BRCA1* rs4793191, *BRCA2* rs9567623 e *RAD51* rs1801320) e no reparo por NHEJ (*XRCC5* rs3835, *XRCC6* rs2267437 e *LIG4* rs1805388) em pacientes brasileiros com SMD (RIBEIRO JUNIOR *et al.*, 2015). Ribeiro Junior *et al.* (2015) demonstraram que o genótipo G/C do polimorfismo rs1801320 e A/G do polimorfismo rs3835 foram associados a uma menor chance de desenvolver a doença e que o genótipo G/G do rs1801320 foi associado à presença de uma citopenia em sangue total. Para o polimorfismo rs2267437 os genótipos C/G e CG+GG foram associados à cariótipo normal e à medula normocelular/hipercelular. Em resumo, o trabalho realizado por Ribeiro Junior *et al.* (2015) sugeriram que os genes *RAD51*,

XRCC5 e *XRCC6* são importantes na manutenção da estabilidade genômica em pacientes com SMD.

Joshi *et al.* (2016) observaram uma alta frequência dos polimorfismos *XRCC1* (Arg280His) e *XPB* (Lys751Gln) em pacientes com SMD em comparação com os controles e que *XRCC1* apresentava associação significativa com o subgrupo AREB-I. Baseados em seus resultados, Joshi *et al.* (2016) sugeriram que os polimorfismos *XRCC1* Arg280His e *XPB* Lys751Gln estavam associados ao risco de desenvolver SMD e que os polimorfismos de *XRCC1* estavam associados aos subgrupos AREB-I e AREB II na população estudada.

Ribeiro Junior *et al.* (2016) avaliaram os níveis de expressão de mRNA dos genes relacionados ao reparo de DNA (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4*) e sua associação com seus respectivos polimorfismos funcionais (rs228593, rs4793191, rs9567623, rs1801320, rs3835, rs2267437 e rs1805388) em pacientes com SMD. Além de tentar detectar associações clínicas. Os resultados de Ribeiro Junior *et al.* (2016) mostraram que: o genótipo polimórfico TT de rs1805388 em pacientes com três citopenias estava relacionado ao aumento de *LIG4*; que o genótipo GG do polimorfismo rs2267437 foi associado ao aumento de expressão do gene *XRCC6* em pacientes com medula hiperclerular e do subgrupo ARSA e que o genótipo polimórfico AA de rs228593 estava associado a uma maior expressão de *ATM* em pacientes com risco alto e muito alto segundo o IPSS-R. Com base em seus resultados, Ribeiro Junior *et al.* (2016) sugeriram que os polimorfismos funcionais rs228593, rs2267437 e rs1805388 alteram o nível de expressão dos genes *ATM*, *XRCC6* e *LIG4*, respectivamente e que contribuem para a instabilidade genômica em pacientes com SMD.

Popp *et al.* (2017) avaliaram *γH2AX* e *53BP1*, componentes da cascata de transdução de sinal para DDR, por microscopia de fluorescência. E para avaliar a DDR, realizaram *Western Blotting* das proteínas chave na DDR fosforiladas *p-ATM* (Proteína Ataxia-Telangiectasia Mutada), *p-ATR* (Proteína Ataxia Telangiectasia e Rad3), *p-CHK1* (ponto de verificação quinase 1), *p-CHK2* (ponto de controle quinase 2) e *p-TP53* (proteína tumoral p53) nas linhagens celulares CD34+ de controles, SMD e LMA, e em amostras de medula óssea de LMA. Os resultados de Popp *et al.* (2017) observaram que *γH2AX* aumentou gradativamente (normal < SMD < LMA) sugerindo uma acumulação contínua de danos de DNA e que *p-ATM* e *p-ATR* foram consistentemente expressos em pacientes com LMA. Popp *et al.* (2017) mostraram evidências de que há um aumento contínuo das DSBs em SMD e LMA em conjunto com a deficiência de DDR.

Estudo realizado por Santiago *et al.* (2017) avaliou os polimorfismos do *Xeroderma Pigmentosum* (XP) (*XPA* rs1800975, *XPC* rs2228000, *XPB* rs1799793 e *XPD* rs1800067) e expressão do mRNA dos genes *XPA* e *XPB* em pacientes com SMD. Santiago *et al.* (2017) sugeriram que os polimorfismos do *Xeroderma Pigmentosum* estavam associados à patogênese e ao prognóstico em pacientes com SMD, pois demonstraram que: os genótipos TC e TT para o polimorfismo rs2228000 foram associados ao aumento da *odds ratio* de citopenia mais profunda (Hb e contagem de neutrófilos); que o genótipo selvagem GG para o polimorfismo rs1799793 estava associado a uma menor chance de desenvolver SMD; que *XPA* estava hipoexpresso em pacientes mais jovens, em SMD hipocelular e pacientes com cariótipo anormal quando apresentavam genótipos AG ou AA.

Ribeiro Junior *et al.* (2017a) estudaram a expressão do mRNA dos genes *ERCC8*, *XPA*, *XPC*, *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* e *LIG4* e sua relação com a celularidade da medula óssea em pacientes com SMD e demonstraram que pacientes com medula hipocelular apresentavam diminuição da expressão dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *LIG4* e *ERCC8* e aumento da expressão de *XPA* e *XPC* que os pacientes com medular normo/hipercelular. Além disso, Ribeiro Junior *et al.* (2017a) demonstraram que a presença de anormalidades cromossômicas estava associada a diminuição da expressão de *ATM*, *LIG4* e *ERCC8* em pacientes com SMD hipocelular. Ribeiro Junior *et al.* (2017a) verificaram correlação positiva entre os pares de gene: *BRCA1/BRCA2*, *ATM/LIG4*, *LIG4/BRCA1*, *LIG4/BRCA2*, *ATM/XPA*, *ATM/XPC*, *LIG4/XPC* e *XPA/XPC* e sugeriram que essas correlações demonstram relações importantes entre genes de reparo de fita simples e fita dupla de DNA, que podem estar envolvidos na patogênese da SMD.

Valka *et al.* (2017) avaliaram um painel para 84 genes associados ao reparo de DNA, a expressão do mRNA dos genes *RAD51*, *XRCC2*, *RPA3* e *MPG* e, também, *RAD51* por imuno-histoquímica. Os principais achados deste trabalho revelaram que os níveis de expressão de *BRCA2*, *EXO1*, *FEN1*, *RAD51*, *XRCC2* e *XRCC4* estavam aumentados nos casos de SMD de baixo risco e diminuídos nos casos de alto risco, enquanto o oposto foi observado para os genes *APEX2*, *CCNO*, *MPG*, *POLL*, *XPA* e *XRCC3* (VALKA *et al.*, 2017). Para os genes *NEIL1*, *RPA3* e *XRCC6* houve diminuição, em geral, para todas as amostras e, além disso, a expressão de *RAD51* e de *XRCC2* diminuiu gradualmente durante a progressão da doença (VALKA *et al.*, 2017).

Complementando os achados de Valka *et al.* (2017), Ribeiro Junior *et al.* (2017b) avaliaram a expressão de 14 genes relacionados ao reparo do DNA (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *XRCC5*, *XRCC6*, *LIG4*, *XPA*, *XPC*, *XPB/ERCC2*, *XPD/ERCC4*, *XPG/ERCC5*,

CSA/ERCC8 e *CSB/ERCC6*) em amostras de células estaminais CD34+ de pacientes brasileiros. Ribeiro Junior *et al.* (2017b) detectaram uma redução na expressão dos genes *ATM*, *XPG*, *XPC*, *XPD*, *XPF*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, com perfil diferenciado, seja relacionado às células-tronco hematopoiéticas CD34+ de pacientes com SMD, ou quando estratificados de acordo com variáveis de prognóstico desfavoráveis, como a presença de disgranulopoiese, contagem de blastos > 5% e cariótipo alterado. Mostraram, também, uma regulação positiva para os genes *RAD51*, *XPA*, *LIG4* e *BRCA2* na presença de micromegacariócitos, dependência transfusional, contagem de neutrófilos ($\geq 800 \times 10^9 L^{-1}$) e valores de Hb ($\geq 8 g/dL$), respectivamente, todos representando doença mais agressiva. E, além disso, que a baixa expressão de *BRCA1* estava associado a uma pior sobrevida global (RIBEIRO JUNIOR *et al.*, 2017b).

Esses estudos reforçam o papel da cascata de eventos relacionados ao reparo de DNA na patogênese e prognóstico da SMD. No entanto, não foram identificados estudos com o *ATR* na SMD.

Os genes *ATM* e *ATR* são sinalizadores dos mecanismos de reparo do DNA e estão envolvidos em diversos processos celulares. Como a SMD é uma doença caracterizada pela presença de citopenias periféricas, aumento da apoptose, alterações citogenéticas, entre outros processos, acredita-se que esses genes possam estar envolvidos na fisiopatologia e na evolução clínica da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os níveis de expressão do mRNA dos genes relacionados aos mecanismos de reparo de DNA (*ATM* e *ATR*) em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica (SMD).

2.2 Objetivos Específicos

Comparar o nível de expressão dos genes *ATM* e *ATR* nos pacientes portadores de SMD com diferentes condições clínicas e laboratoriais;

Avaliar a correlação entre os genes *ATM* e *ATR* em pacientes com SMD.

Determinar e avaliar a sobrevida global e livre de LMA de acordo com o nível de expressão dos genes *ATM* e *ATR*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo transversal com 100 pacientes portadores de SMD, ao diagnóstico. Os diagnósticos foram realizados no período de 2008 a 2015 de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (SWERDLOW *et al*, 2008). Todos os pacientes foram provenientes do ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (HUWC/UFC).

3.2 Local do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (UFC), no Laboratório de Citogenômica do Câncer (NPDM-UFC), Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC/UFC) e Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará (Hemoce).

3.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico confirmado de SMD no período de 2008 a 2015 que continham resultados do hemograma, mielograma e que tinham todo protocolo de exclusão para outras doenças realizado.

Foram excluídos do estudo pacientes que realizaram transplante de medula óssea, com amostra insatisfatória para realização da expressão gênica e aqueles em que não houve amplificação durante o experimento de expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

3.4 Aspectos éticos

A presente pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará (Nº do processo: 1.764.073), utilizando-se o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**APÊNDICE A**).

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

3.5 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras em tubo Vacutainer® contendo EDTA para a obtenção do pool celular. Todas as coletas foram realizadas por médicos hematologistas habilitados.

3.6 Cariótipo por banda G

Os cariótipos foram realizados pela equipe do Laboratório de Citogenômica do Câncer sob coordenação dos professores Dr. Ronald Feitosa Pinheiro e Dra. Silvia Maria Meira Magalhães membros participantes dessa pesquisa. Toda a metodologia foi realizada utilizando protocolos próprios (PINHEIRO; CHAUFFAILLE, 2009).

Resumidamente, para a realização da citogenética 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. Foi realizada cultura por 24 horas em estufa a 37°C.

Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 50 µL de colchicina (Colcemid®), por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspenso em solução hipotônica de KCl 0,075mol.L⁻¹ e fixado em solução de ácido acético e metanol (3:1), por 4 vezes.

O material foi gotejado em lâminas de microscopia óptica que, em seguida, foram aquecidas por 3 minutos em micro-ondas em alta potência. O bandeamento foi realizado pela técnica de tripsina e as bandas coradas com o kit Panótico®.

As lâminas foram analisadas e, quando possível, pelo menos 20 metáfases de cada paciente foram avaliadas, sendo capturadas e analisadas em sistema computadorizado com software para cariotipagem CytoVision®.

Os resultados das análises citogenética de medula óssea foram estabelecidos de acordo com os critérios do Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN-2013) (SHAFFER; MCGOWAN-JORDAN; SCHMID, 2013).

3.5 Obtenção do *pool* celular

Para a obtenção do *pool* celular da medula óssea a amostra do tubo Vacutainer® contendo EDTA foi centrifugada. O plasma foi desprezado e o restante da amostra foi transferida para um tubo do tipo Falcon de 50 mL.

Em seguida, a amostra foi lavada com solução de lise (25 mL de solução 1:9 de

cloreto de amônio $0,144 \text{ mol.L}^{-1}$ e bicarbonato de amônio $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$).

O conteúdo foi agitado lentamente e submetido a banho de gelo por 15 minutos e, após esse tempo, centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C .

A fase aquosa foi desprezada e acrescentado $250\mu\text{L}$ de PBS e $750\mu\text{L}$ de *Trizol LS Reagent*® (Invitrogen, EUA) ao *pool* celular obtido. O material foi homogeneizando com pipeta até dissolução completa. Após este procedimento, o material foi armazenado no freezer a -80°C .

3.7 Extração de RNA total

A extração de RNA das células do *pool* medular dos pacientes com SMD foi de acordo com o protocolo do fabricante utilizado *Trizol LS Reagente*®. Foram adicionados $200\mu\text{L}$ de Clorofórmio e $10\mu\text{L}$ de glicogênio para cada 10^6 células de cada amostra armazenada em 1mL de *Trizol Reagente*®.

Cada amostra foi, então, homogeneizada em vórtex e centrifugada a 14.000rpm por 15 minutos a 4°C . Retirou-se o sobrenadante de cada amostra, transferindo para novos tubos, seguidos de precipitação com $400\mu\text{L}$ de isopropanol, e incubado por 60 minutos a -20°C , após esse período, a amostra foi novamente centrifugada a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado.

O pellet formado foi ressuspenso em etanol 70% (v/v), centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. Após seco, o pellet foi diluído em água livre de RNase.

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 também foi verificada por eletroforese em gel de agarose 2%.

3.8 Síntese de cDNA

Após a extração do RNA, 2000ng de cada amostra foram utilizados na síntese do 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*®), de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi diluído cinco vezes para a ser utilizado nas reações de qPCR e armazenado a -20°C .

3.9 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

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).

3.8.1 Reações

As reações de qPCR foram realizadas em duplicata utilizando sondas *TaqMan assay*® com marcação FAM-MGB pela Applied Biosystems (Tabela 1).

Todas as reações foram realizadas no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System® (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), em placas transparentes de 96 poços (*MicroAmp 96-well Plates*, *Applied Biosystems*, Inc., Foster City, CA, USA).

Para cada reação foi utilizado 7µL de *TaqMan*® Universal PCR Master Mix, 0,5µL de sonda (*TaqMan assay*®) e 2,5µL de cDNA com o volume final de 10µL para cada reação. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneos).

Todas as amostras (casos e controle interno das reações) foram realizadas em duplicatas e uma amostra calibradora quantitativa foi incluída em todas as placas de qPCR (*pool* de duas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, disponibilizada pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP) para minimizar as diferenças de amplificação entre as reações. Como controle de contaminantes da qPCR, foram utilizados NTCs (*no-templante controls*) adicionando-se água no lugar do cDNA, em cada placa.

Tabela 1 – Sondas utilizadas na avaliação da expressão gênica por qPCR

GENES	CÓDIGO DE REFERÊNCIA (Applied Biosystems)
Genes Normalizadores	
UBC (<i>Ubiquitina C</i>)	Hs00824723_m1
B2M (<i>β2-Microglobulina</i>)	Hs99999907_m1
GAPDH (<i>Gliceraldeído fosfato desidrogenase</i>)	Hs02786624_g1
Genes de Estudo	
ATM (<i>Ataxia Telangiectasia Mutada</i>)	Hs01112344_m1
ATR (<i>Ataxia Telangiectasia Mutada Rad 3 Related</i>)	Hs00992123_m1

3.8.2 Seleção dos genes referência

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* ajustados e padronizados foram fornecidos pelo software do aparelho *7500 Real-Time PCR System®* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA).

Três genes referência foram utilizados para validar a estabilidade dos níveis de expressão gênica: *β2-microglobulina (B2M)*, *Ubiquitina C (UBC)* e *Gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH)*.

Entende-se como gene endógeno mais estável, aquele ou aqueles que apresentam o menor valor de desvio padrão. Neste estudo para a escolha do par de genes de referência mais estáveis, foi calculado o desvio padrão de cada gene de referência com base em valores brutos (*Cq* - *quantification cycle*).

Após a análise do desvio padrão, foi realizado um cálculo de coeficiente de correlação de Pearson para cada par de genes de referência candidatos (*B2M-UBC*, *B2M-GAPDH* e *UBC-GAPDH*).

Foi realizada a média de tendência central (INDEX) que corresponde à média geométrica de todos os genes. E em seguida realizou-se correlação de Pearson de cada gene referência, separadamente, com o INDEX obtido.

Os genes de referência que apresentaram menor valor de desvio padrão, maior correlação entre si e com o valor INDEX ($r > 0,7$) (VANDESOMPELE *et al.*, 2002), foram considerados os mais estáveis.

Assim, para este estudo, obtivemos que os genes mais estáveis nas amostras de cDNA utilizadas foram a *B2M* e o *GAPDH*.

3.8.3 Determinação relativa dos níveis de expressão dos genes alvo

Para normalizar os valores de *Cq* dos genes alvo (*ATM* e *ATR*), o *Cq* determinado para uma amostra para cada gene foi subtraído da média geométrica dos *Cq*'s dos genes de referência utilizados (*B2M* e *GAPDH*) da mesma amostra, gerando assim os valores de ΔCq e $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.10 Variáveis clínicas utilizadas nas análises

As variáveis analisadas neste estudo foram:

- Sexo: masculino e feminino;
- Idade (Categorizada): <60 anos e ≥60 anos
- Quanto à classificação OMS (2008) os pacientes foram divididos em: 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), SMD secundária.
- Celularidade da medula óssea: Hipocelular, Normocelular e Hipercelular;
- Presença de Fibrose na medula óssea: Presença e Ausência;
- Presença de Diseritropoese: Sim e Não;
- Presença de Dismegacariopoese: Sim e Não;
- Presença de Disgranulopoese: Sim e Não;
- Presença de Sideroblastos em anel: 0% 1-14%, ≥15%
- Faixas de percentagens de Blastos: <10% e >10%;
- Cariótipo:
Quanto a alteração: normal e alterado;
Cariótipo (Aneuploidia): normal, alterado não aneuploide, aneuploide;
Cariótipo (alteração no 5q): normal, alterado com 5q e alterado sem 5q;
Cariótipo (alteração no 7q): normal, alterado com 7q e alterado sem 7q;
Cariótipo (Complexo - alterações no mesmo clone): normal, 1 alteração, 2 alterações e 3 ou mais alterações;
- Quanto ao prognóstico (IPSS-R): muito favorável/favorável, intermediário, desfavorável/muito desfavorável;
- Classificação dos valores de Hb de acordo com o IPSS-R: ≥10g/dL, 8-<10g/dL e <8g/dL;
- Classificação da contagem de neutrófilos (ANC) segundo o IPSS-R: ≥800/mm³ e <800/mm³;
- Classificação dos valores de plaquetas segundo o IPSS-R: ≥100.000/mm³, ≥50.000 - <100.000/mm³ e <50.000/mm³;
- Classificação do número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS-R: 1 citopenia, 2 e 3 citopenias;
- Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R (categorizada): muito baixo e baixo versus intermediário versus alto e muito alto;
- Dependência Transfusional: sim e não;
- Óbito: sim e não;
- Evolução para LMA: sim e não.

3.11 Análise estatística

A avaliação da distribuição normal, em grupos de até 50 casos, para cada variável analisada foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk. Valores de *outliers* foram removidos, quando ocorreram, por não serem representativos do grupo que o estudo tinha o objetivo de generalizar. Foram considerados com distribuição normal (dados paramétricos) os grupos com 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 one-way, para a comparação das médias em variáveis com mais de dois grupos. O pós-teste (*post-hoc*) para a ANOVA one-way foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Caso houvesse homogeneidade de variâncias (p-valor $\geq 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA one-way o teste de Tukey. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados (p-valor <0,05), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Games-Howell.

O teste de correlação de Pearson foi utilizado para a obtenção dos valores de r e r-square (r^2) que demonstram a influência do nível de expressão de um dado gene sobre o outro na população avaliada.

Os dados sobre os níveis de expressão gênica (valores de $2^{-\Delta C_q}$) foram expressos em média \pm desvio padrão (SD), com intervalo de confiança (IC) (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 21.0).

3.11.1 Análise de sobrevida dos pacientes com SMD em relação aos níveis de expressão dos genes avaliados

Para a análise de sobrevida, global e livre de LMA, foi utilizado o *software* online gratuito *Cutoff Finder* (<http://molpath.charite.de/cutoff/>) para obtenção das diferenças entre as curvas de sobrevivência pelo teste de *Log-Rank*. O *Cutoff Finder* é um software que determina o melhor ponto de corte para uma determinada variável analisada.

A variável de expressão gênica foi reajustada para pontos de corte (*Cutoff points*) estabelecidos pelo *software Cutoff Finder* que estabelece o ponto de corte ideal, (ponto com o desdobramento mais significativo obtido pelo teste de *Log-Rank*, que aumenta o poder do teste em afastar a hipótese nula (BUDCZIES *et al.*, 2012).

4 RESULTADOS

4.1 Características clínicas dos pacientes com síndrome mielodisplásica

No presente estudo foram incluídos 100 pacientes diagnosticados com SMD, destes 46,0% corresponderam a indivíduos do sexo feminino e 54,0% ao masculino (Tabela 2).

Utilizando a categorização do IPSS-R de Greenberg *et al* (2012), os pacientes foram divididos em quatro faixas etárias, sendo que 33,0% apresentavam idade ≤ 60 anos, 25% entre $>60 - \leq 70$ anos, 24% entre $>70 - \leq 80$ anos e 18% >80 anos. Em outra categorização de idade, 33,0% dos pacientes apresentavam idade ≤ 60 anos e 67,0% idade >60 anos. A média de idade da população estudada foi de $64,67 \pm 17,11$ anos e a mediana 67 anos com a faixa etária variando de 23 a 91 anos (Tabela 2).

Os pacientes também foram categorizados quanto a concentração de Hb no sangue periférico segundo IPSS-R, e 50,0% deles apresentavam níveis inferiores a 8g/dL, 23% níveis de 8-10g/dL e 26% acima de 10g/dL. A média da concentração de Hb foi de $8,26 \pm 2,4$ e a mediana de 7,9g/dL (Tabela 2).

Em relação as demais citopenias conforme o IPSS-R, o número de neutrófilos em 64,0% dos pacientes foi maior ou igual a $800/\text{mm}^3$ e em 36,0% menor que $800/\text{mm}^3$, e para as plaquetas foi observado que 30,0% apresentavam contagens inferiores a $50.000/\text{mm}^3$, 21,0% na faixa de 50.000 a $100.000/\text{mm}^3$ e 49,0% contagens superiores a $100.00/\text{mm}^3$ (Tabela 2).

Dos 100 pacientes incluídos neste estudo, 71 apresentavam resultado de biópsia da medula óssea. Desta forma, observou-se que 12,0% apresentavam medula hipocelular, 15,0% normocelular, 44,0% hipercelular e 29,0% ausência de resultados. E 16,0% dos pacientes apresentaram fibrose medular.

Em relação aos achados do mielograma, 59,0% dos pacientes apresentavam menos que 5% de blastos na medula óssea, 10,0% estavam na faixa entre 5 e 10% e 8,0% dos pacientes apresentavam mais que 10%. Em 23,0% dos casos não foi possível determinar o percentual de blastos devido a problemas relacionados a qualidade do material examinado (Tabela 2).

As características dos pacientes em relação à citogenética, à classificação da OMS 2008 e a avaliação prognóstica segundo o IPSS-R estão apresentadas no **APÊNDICE B**.

Tabela 1 - Características dos pacientes quanto a gênero, idade e variáveis hematológicas (Hemograma, Mielograma e Biópsia óssea)

Variáveis	Pacientes (%)
Gênero	
Feminino	46,0
Masculino	54,0
Idade (anos)	
≤60	33,0
>60-70	25,0
>70-80	24,0
>80	18,0
Média ± S.D.	64,67 ± 17,11
Faixa	23-91
Mediana	67
Blastos na Medula Óssea (%)	
<5%	59,0
5%-10%	10,0
>10%	8,0
Média ± S.D.	4,05 ± 8,48
Mediana	1
Hemoglobina (g/dL)	
≥10	26,0
8-<10	23,0
<8	50,0
Média ± S.D.	8,26 ± 2,4
Mediana	7,9
Contagem Global de Neutrófilos (/ mm³)	
<800	36,0
≥ 800	64,0
Média ± D.P.	2.130,01 ± 2.125,16
Mediana	1.323
Contagem Global de Plaquetas (/mm³)	
≥ 100	49,0
50-<100	21,0
<50	30,0
Média ± S.D.	148.478,1 ± 154.281,4
Mediana	98.000
Celularidade da Medula Óssea	
Hipocelular	12,0
Normocelular	15,0
Hiper celular	44,0
Ausência de Biópsia	29,0
Fibrose Medular	
Presença	16,0
Ausência	55,0

Todos os 100 pacientes foram classificados de acordo com os critérios da OMS 2008, sendo que em 90,0% dos casos a SMD foram do tipo primária, em 6,0% do tipo secundária e em 4,0% classificada como LMMC. Dentre os pacientes com SMD primária, houve predomínio do subtipo CRDM (n=52, 57,7%), seguido de ARSA (n=12, 13,3%), AREB I (n=9, 10,0%), AREB II e CRDU ambos com 8,9% (n=8) e Síndrome 5q (1,1%).

A análise citogenética por banda G mostrou que 40,0% dos pacientes apresentavam cariótipo normal e 29,0% cariótipo alterado. E, nos pacientes com SMD secundária (n=6), 2 apresentaram cariótipo normal e 2 com alguma alteração (**APÊNDICE B**).

A avaliação dos cariótipos também demonstrou que, nos pacientes com resultado citogenético (69,0%), 17,4% (n=12) apresentaram apenas uma alteração citogenética, 13,0% (n=9) duas alterações e 8,7% (n=6) cariótipo complexo. E as principais alterações observadas foram as relacionadas ao cromossomo 5 (-5/5q-) (n=11, 15,9%), as relacionadas ao cromossomo 7 (-7/7q-) (n=3, 4,35%) e a presença de aneuploidia (n=18, 26,1%) (**APÊNDICE B**).

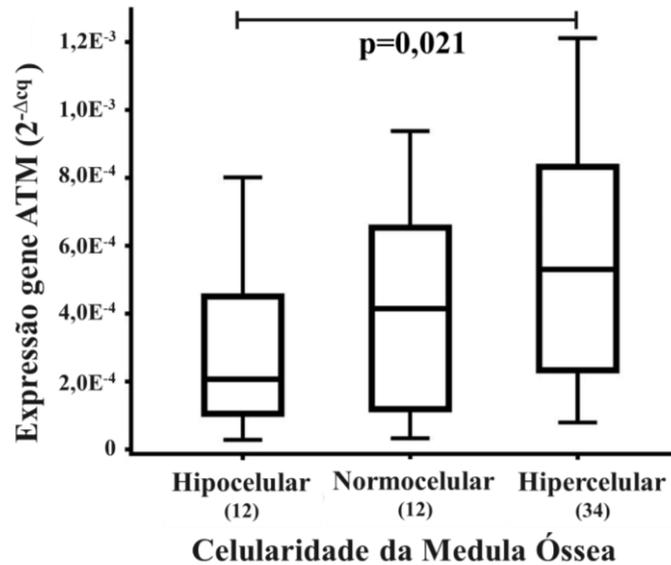
Do total de pacientes incluídos no estudo, foi possível determinar o prognóstico de acordo com o IPSS-R em 62 pacientes, destes 45 (72,6%) apresentavam prognóstico favorável, 12 (19,4%) intermediário, 3 (4,8%) muito desfavorável e 1 (1,6%) desfavorável. Quanto a classificação de risco pelo IPSS-R, 6% dos pacientes apresentavam risco muito baixo, 24 % baixo risco, 23% risco intermediário, 4% alto risco, 3% risco muito alto e em 28% não foi possível fazer a classificação devido a insuficiência de dados.

4.2 Análise da expressão do gene *Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM)* em pacientes com síndrome mielodisplásica

Na avaliação da expressão dos níveis de mRNA do gene *ATM* foram observadas associações significantes em relação à celularidade da medula ao exame de biópsia óssea, disgranulopoiese e contagem absoluta de neutrófilos.

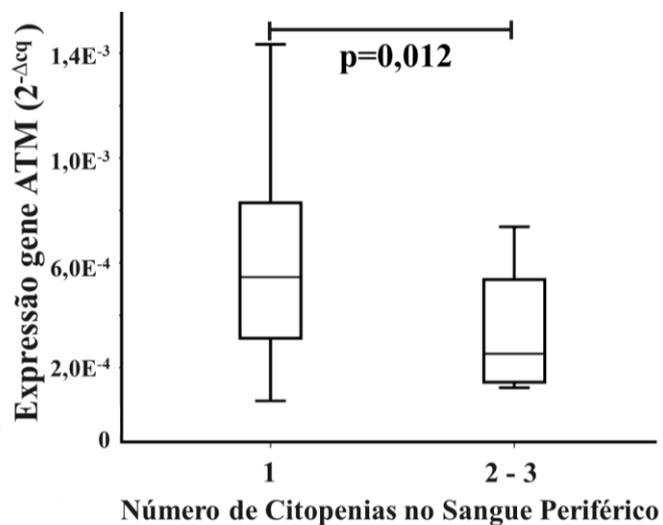
Ao avaliar o nível de expressão do mRNA do gene *ATM* em relação a celularidade da medula óssea, observou-se um aumento crescente dos níveis expressão do gene *ATM* com o aumento da celularidade. A diferença entre as médias foi estatisticamente significativa entre o grupo com medula hipocelular, de menor expressão, e o grupo com medula hiper celular com maiores níveis de expressão (p=0,021) (Gráfico 1).

Gráfico 1- Níveis de expressão do mRNA do gene *ATM* quanto à celularidade na biópsia óssea dos pacientes portadores de síndrome mielodisplásica



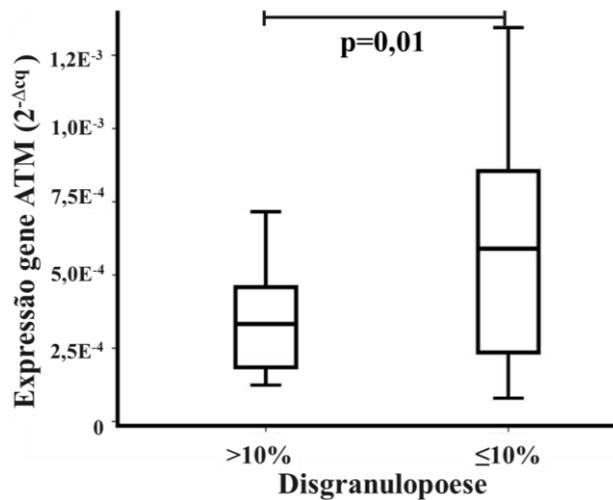
A avaliação dos níveis de expressão de *ATM* em relação ao número de citopenias no sangue periférico demonstraram uma hipoexpressão desse gene em pacientes com maior número de linhagens celulares acometidas (2 ou 3 citopenias) em relação ao grupo de pacientes com apenas 1 citopenia (Gráfico 2)

Gráfico 2 - Níveis de expressão do mRNA do gene *ATM* quanto ao número de citopenias presentes na avaliação do sangue periférico em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica



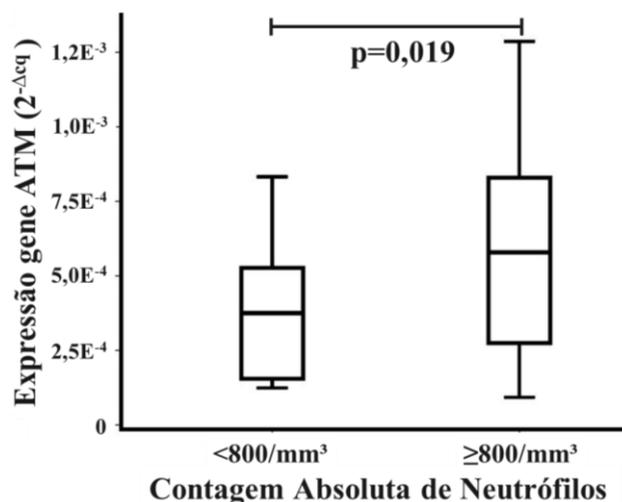
Quanto à variável disgranulopoiese da medula óssea, avaliada por biópsia, foi observado que os níveis de expressão do gene *ATM* estão diminuídos no grupo de pacientes com presença de disgranulopoiese (>10% das células displásticas granulocíticas) quando comparados ao grupo sem disgranulopoiese ($\leq 10\%$ das células displásticas granulocíticas) ($p=0,01$) (Gráfico 3)

Gráfico 3 - Níveis de expressão do mRNA do gene *ATM* quanto à presença ou ausência de disgranulopoiese na biópsia óssea de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica



Em relação à contagem absoluta de neutrófilos no sangue periférico foi observado que a expressão do gene *ATM* está diminuída nos pacientes com contagens inferiores a $800/\text{mm}^3$ quando comparado ao grupo com contagem igual ou superior a $800/\text{mm}^3$ ($p=0,019$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Níveis de expressão do mRNA do gene *ATM* quanto à contagem absoluta de neutrófilos no sangue periférico de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica

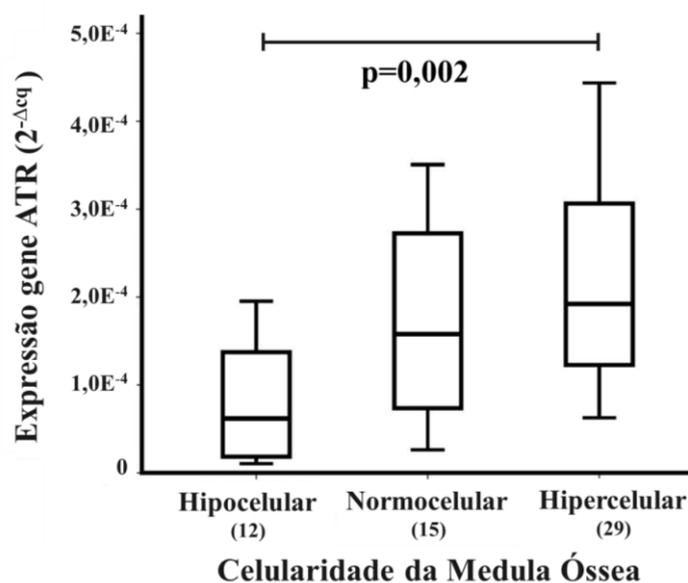


4.3 Expressão do gene *Ataxia Telangiectasia Mutada Rad-3 Relacionada (ATR)* em pacientes com Síndrome Mielodisplásica

Para a avaliação da expressão do gene *ATR* foram observadas associações significantes em relação às variáveis celularidade da medula óssea, número de citopenias periféricas, contagem absoluta de neutrófilos e evolução para LMA.

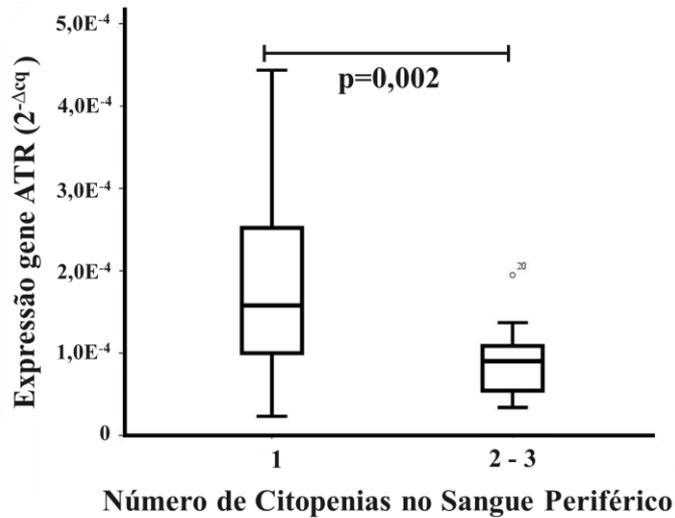
Quanto à variável celularidade da medula óssea observou-se um aumento dos níveis de expressão do mRNA do gene *ATR* com o aumento da celularidade. Foi observado diferença estatisticamente significativa ao comparar as médias de expressão gênica entre o grupo com medula hipocelular, de menor expressão, e o grupo com medula hipercelular com maiores níveis de expressão ($p=0,002$) como pode ser observado no Gráfico 5.

Gráfico 5 - Níveis de expressão do mRNA do gene *ATR* quanto à celularidade na biópsia óssea dos pacientes portadores de síndrome mielodisplásica



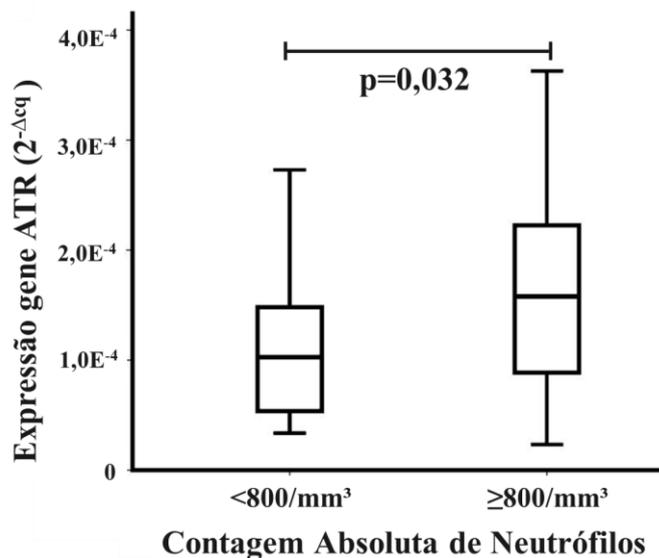
A avaliação dos níveis de expressão do mRNA do gene *ATR*, em relação ao número de citopenias no sangue periférico, demonstrou que pacientes com 2 ou 3 linhagens celulares acometidas apresentam menores níveis de expressão desse gene que o grupo de pacientes que apresentou o acometimento de uma única linhagem celular ($p=0,002$) (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Níveis de expressão do mRNA do gene *ATR* quanto ao número de citopenias presentes na avaliação do sangue periférico em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica



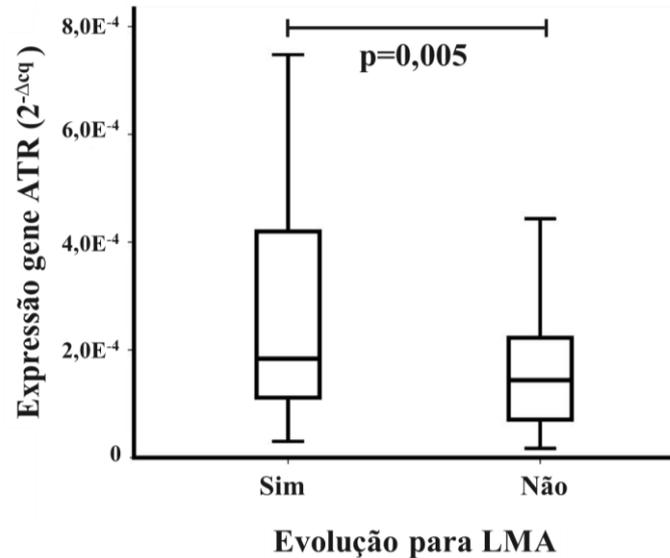
Em relação à contagem absoluta de neutrófilos no sangue periférico, foi observado que a expressão do gene *ATR* está diminuída nos pacientes com contagens inferiores a 800/mm³ quando comparado ao grupo com contagem igual ou superior a 800/mm³ (p=0,032) (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Níveis de expressão do mRNA do gene *ATR* quanto à contagem absoluta de neutrófilos no sangue periférico de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica



Em pacientes que evoluíram para LMA os níveis de expressão de *ATR* estão hiperexpressos no grupo que evoluiu para LMA (p=0,005) (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Níveis de expressão do mRNA do gene *ATR* quanto à evolução clínica de síndrome mielodisplásica para Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

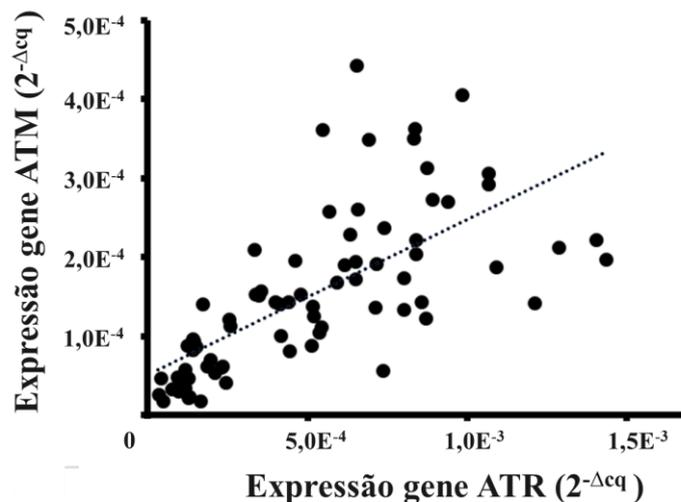


Não observamos associação significativa para as demais variáveis estudadas. Os resultados estão resumidos no **APÊNDICE C**.

4.4 Análise de correlação entre os genes *ATM* e *ATR*

O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi realizado para se analisar a intensidade da associação linear existente entre os genes alvo e o r^2 (r square) foi realizado para analisar a influência de um gene sobre outro. Observou-se uma forte correlação entre os genes *ATM* e *ATR* ($r = 0,748$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 56,0% ($r^2 = 0,560$) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Correlação de Pearson entre os níveis de expressão do mRNA dos genes *ATM* e *ATR*



4.5 Análise de sobrevida dos pacientes com SMD em relação aos níveis de expressão dos genes *ATM* e *ATR*

Para as análises de associação dos níveis de expressão do mRNA dos genes *ATM* e *ATR* e a sobrevida dos pacientes com SMD, foi inicialmente estabelecido o *cutoff* para cada gene utilizando o software *Cutoff Finder*. A determinação do *cutoff* permitiu a realização do teste *log-rank* associado com o gráfico de curva de sobrevida global e livre de LMA estabelecido por *Kaplan-Meier*. Os dados dos *cutoffs* para cada gene estão apresentados na Tabela 4.

A Tabela 4 mostra que não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida global e na livre de LMA entre os pacientes com níveis de expressão de *ATM* inferior versus superior ao *cutoff* de 0,0009146 e 0,001665 respectivamente.

Em relação aos níveis de expressão de *ATR*, foi demonstrado que 19 (19,2%) pacientes com níveis de expressão superior ao *cutoff* de 0,0003493 possuem menor sobrevida global (Figura 9B), com uma taxa de risco (HR, *hazard ratio*) de 2,12 (IC= 1,22-3,68) e uma correlação significativa (p=0,0061) entre 9,5% dos pontos de corte investigados, conforme apresentado na Figura 9A.

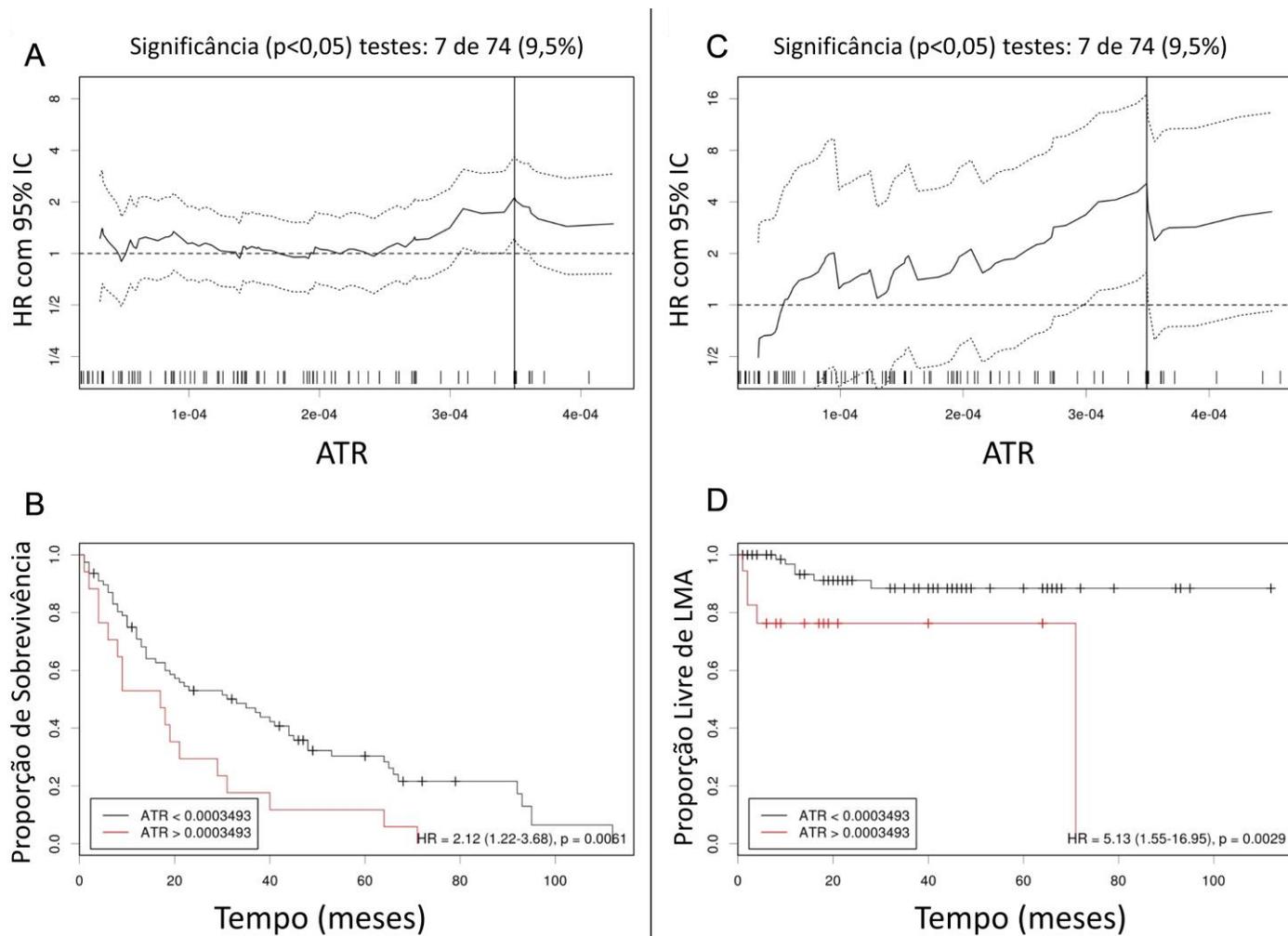
Ao avaliar a sobrevida livre de LMA, observou-se que pacientes com níveis de expressão superior ao *cutoff* de 0,0003493 possuem menor sobrevida livre de progressão (Figura 9D), com uma taxa de risco (HR, *hazard ratio*) de 5,13 (IC= 1,55-16,55) e uma correlação significativa (p=0,0029) entre 9,5% dos pontos de corte investigados, conforme apresentado na Figura 9C.

Tabela 3 - Caracterização dos *cutoffs* na análise de associação entre os níveis de expressão dos genes *ATM* e *ATR* com a sobrevida global dos pacientes com SMD.

Sobrevida	Gene	<i>Cutoff</i> *	Faixa*		HR	IC	p.valor
			Superior	Inferior			
<i>Global</i>	<i>ATM</i>	0,0009146	22,2%	77,8%	0,64	0,35-1,14	0,13
<i>Global</i>	<i>ATR</i>	0,0003493	19,2%	80,8%	2,12	1,22-3,68	0,0061
<i>Livre de LMA</i>	<i>ATM</i>	0,001665	11,0%	89,0%	2,51	0,53-11,86	0,23
<i>Livre de LMA</i>	<i>ATR</i>	0,0003493	20,0%	80,0%	5,13	1,55-16,55	0,0029

IC – Intervalo de Confiança

Figura 9 - Análises de associação entre o nível de expressão do gene *ATR* e a sobrevida global e livre de LMA dos pacientes com SMD. A e C. Gráficos de obtenção de *Cutoff* a partir da otimização por correlação com a sobrevida global e livre de LMA. B e D. Gráficos de curva da sobrevida global e livre de LMA (Kaplan-Meyer).



5 DISCUSSÃO

A síndrome mielodisplásica constitui um grupo de doenças hematológicas clonais que tem como características principais a presença de citopenias periféricas, hematopoese ineficaz e é frequentemente associada à presença de alterações citogenéticas. Estas alterações são, em geral, decorrentes de uma instabilidade genômica que pode ser decorrente, por exemplo, de mutações e de falhas nos mecanismos de reparo do DNA.

Assim, nesse estudo nos propomos avaliar os níveis de expressão do mRNA dos genes *ATM* e *ATR* em 100 pacientes portadores de SMD e verificar sua relação com parâmetros sociodemográficos, hematológicos e clínicos.

Inicialmente, quanto a caracterização dos pacientes, foi observado um leve predomínio de indivíduos do sexo masculino em relação ao feminino numa razão de 1,17:1. A mediana de idade foi de 67 anos e a doença apresentou maior frequência em indivíduos com mais de 60 anos (67,0%). Esses dados são equivalentes aos observados no estudo de Belli *et al.* (2015), que avaliaram 1080 pacientes na América Latina e observaram um predomínio de indivíduos do sexo masculino (1,2:1), mediana de idade de 69 anos na população estudada e de 68 anos para pacientes brasileiros.

As citopenias periféricas são geralmente observadas em pacientes com SMD e são, em geral, resultantes do aumento da apoptose principalmente nas fases iniciais da doença. Greenberg *et al.* (2012) relataram que a anemia tem sido associada a fatores de pior prognóstico nesses pacientes e que a anemia crônica pode contribuir para a alta mortalidade não leucêmica relacionada às doenças cardíacas. Neste estudo, observamos uma elevada frequência de pacientes com hemoglobina inferior a 10g/dL caracterizando a anemia como principal citopenia observada e ocorrendo em 73,0% dos pacientes investigados. A SMD é frequentemente caracterizada por um quadro clínico de anemia grave e quando ocorre isoladamente, ou seja, sem associação com outras citopenias a doença é, em geral, menos agressiva (CERRANO *et al.*, 2016; BRUNNING *et al.*, 2008).

Em 2008, a Organização Mundial da Saúde propôs um sistema de classificação para a SMD. A SMD do tipo primária correspondeu a 90,0% dos casos e, quanto a estratificação diagnóstica pela OMS 2008, os subtipos mais frequentes foram CRDM (57,8%) e AREB (18,9%). Belli *et al.* (2015) demonstraram também um predomínio de pacientes brasileiros dos subtipos CRDM (42,3%) e AREB (29,8%). Deste modo, o presente trabalho encontra-se em conformidade com os dados da literatura.

A análise citogenética constitui um dos critérios utilizados na avaliação do risco e

na determinação do prognóstico (PINHEIRO; CHAUFFAILLE, 2009; MALCOVATI *et al.*, 2013; CAZZOLA; DELLA PORTA; MALCOVATI, 2013).

Dentre os pacientes com resultado citogenético disponível (n=69), 57,97% apresentaram cariótipo normal e 42,02% cariótipo alterado. Estudo de Greenberg *et al.* (1997) demonstrou características semelhantes, em que 60% dos pacientes apresentavam cariótipo normal e Giagounidis e Haase (2013) relataram que alterações cromossômicas ocorrem em aproximadamente 30 a 60% dos pacientes com SMD. Além disso, Meggendorfer *et al.* (2017) afirmam que menos de 50% dos pacientes com SMD apresentam cariótipo alterado.

Verificamos que nos pacientes com resultado de cariótipo disponível, 29,0% apresentaram alterações cromossômicas e que em 8,6% o cariótipo apresentava 3 ou mais alterações (complexo). Estes resultados apresentam um perfil semelhante ao encontrado no estudo de Uyanik *et al.* (2016) que avaliaram 119 pacientes com SMD atendidos no departamento de Hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Trakya, no período de 2010 a 2014, e observaram a ocorrência de alterações cromossômicas em 32,5% e cariótipo complexo em 8,4% dos pacientes avaliados.

Adicionalmente, as principais alterações citogenéticas não balanceadas frequentemente observadas em pacientes com SMD correspondem a alterações nos cromossomos 5 e 7 (HAASE, 2008). A principal alteração citogenética observada no presente estudo, relacionada a um cromossomo específico, foi a alteração no cromossomo 5 (-5/5q-) com uma frequência de 15,9%, corroborando com Meggendorfer *et al.* (2017) que afirmaram que a deleção (5q) é a principal alteração observada em pacientes com cariótipo alterado ocorrendo em 10 a 20% dos pacientes com SMD e com o estudo de Kawankar e Vundinti (2011) que relataram que a monossomia ou deleção 5q é a principal alteração citogenética observada em pacientes com SMD em todo mundo. Estes achados corroboram com o estudo de Borgonovo *et al.* (2005) que avaliaram 93 pacientes com SMD primária, incluindo crianças e adultos, provenientes do Hospital da Universidade Federal do Paraná e relataram frequência 12,5% da deleção 5q.

Quanto as alterações relacionadas ao cromossomo 7 (-7/7q-), a frequência observada no presente estudo foi de 4,35% resultado inferior ao relatado por Borgonovo *et al.* (2005) que observaram uma frequência de 14,1% dessas alterações em pacientes brasileiros. Essa variação nas frequências de alterações citogenéticas são relatadas na literatura e são possivelmente decorrentes da associação do perfil étnico da população estudada (CHEN *et al.*, 2005)

A frequência elevada de pacientes com SMD que apresentam alterações

citogenéticas sugere diferentes graus de instabilidade genética associados a SMD. Essa instabilidade é diretamente ligada a danos ou alterações no DNA. As células de mamíferos apresentam diversas vias de reparo do DNA que tem como objetivo principal preservar a estabilidade genômica e garantir a correta divisão celular (IYAMA; WILSON, 2013).

Os genes *ATM* e *ATR* são os sinalizadores iniciais da DDR e, quando ativados, desencadeiam uma cascata de eventos que culminam na parada do ciclo celular, para permitir que o maquinário celular realize os reparos necessários antes da célula passar para a próxima fase do ciclo (MARÉCHAL; ZOU, 2013; WEBER; RYAN, 2015). Desta forma, esses genes são sensores cruciais na sinalização dos danos do DNA, na resposta a esse dano e, conseqüentemente, na manutenção da integridade genômica (MARÉCHAL; ZOU, 2013; WEBER; RYAN, 2015).

Os resultados deste trabalho demonstram que a hipoexpressão do gene *ATM* está relacionada a pacientes com medula hipocelular, com uma alta frequência de alterações citogenéticas (60,0%), enquanto que a frequência dessas alterações nos pacientes com medula normocelular e hiper celular foram de 40,0% e 33,3% respectivamente.

A celularidade da medula óssea em pacientes com SMD primária é prioritariamente normo ou hiper celular (KOH *et al.* 2010; INVERNIZZI *et al.*, 2015). Entretanto, em cerca de 10 a 15% dos casos a medula apresenta-se hipocelular dando origem a SMD hipoplásica que é considerada uma entidade distinta da doença, conhecida por apresentar melhor prognóstico que a SMD normo/hiper celular (KOH *et al.* 2010; INVERNIZZI *et al.*, 2015). No entanto, a literatura se mostra controversa em relação a presença de anormalidades citogenéticas em pacientes com SMD hipocelular (HUANG *et al.*, 2008; YUE *et al.*, 2008; KOH *et al.* 2010). Vale ressaltar, que a presença de alterações citogenéticas, em geral, estão associadas a fatores de pior prognóstico como estabelecido pelo IPSS-R de Greenberg *et al.* (2012), entretanto como a SMD hipoplásica apresenta características bem peculiares e o IPSS-R utiliza outras variáveis para determinar o prognóstico, além dos dados controversos na literatura, é provável que a presença isolada de alterações citogenéticas não seja o único fator determinante no prognóstico desses pacientes.

Esses resultados corroboram com os achados de Ribeiro *et al.* (2017) que observaram a hipoexpressão do gene *ATM* em pacientes com medula hipocelular e que relataram associação significativa entre a hipoexpressão desse gene e a presença de alterações cromossômicas em pacientes com SMD. Ribeiro *et al.* (2017) sugeriram que o reparo é ineficiente em pacientes com medula hipocelular e que os danos do DNA tendem a se acumular nesses pacientes. Além disso, Ribeiro *et al.* (2017) fortaleceram a relação entre os danos de

fita simples e de fita dupla de DNA, demonstrando que as lesões de fita simples, que não são associadas a grandes lesões ao DNA, se não reparadas podem constituir a primeira etapa para uma DBS.

Outros resultados de níveis de expressão do gene *ATM* sugerem que a diminuição da sua expressão apresenta forte relação com fatores de pior prognóstico em pacientes com SMD como a disgranulopoiese e a neutropenia. O termo displasia refere-se ao desenvolvimento anormal de células hematopoiéticas da medula óssea que incluem anormalidades relacionadas ao número de células ou a sua morfologia podendo afetar as três linhagens (eritróide, granulocítica e megacariocítica). A displasia é uma característica morfológica importante e base do diagnóstico da SMD estando relacionada principalmente a hematopoiese ineficaz (LIANG *et al.*, 2017). Assim, hipotetizamos que a diminuição da expressão do gene *ATM*, que atua como sinalizador do reparo de danos do DNA e ativa uma cascata de proteínas que podem levar ao bloqueio do ciclo celular nas células tronco da medula óssea, pode levar ao comprometimento dos sistemas de reparo resultando em lesões não reparadas do DNA e culminar em alterações displásticas na linhagem granulocítica (disgranulopoiese) (SHILOH, 2001, CLOUAIRE; MARNEF; LEGUBE, 2017).

Dentre os pacientes que apresentaram disgranulopoiese (n=39), 26 tinham resultado citogenético, sendo que 38,5% destes apresentavam cariótipo alterado. Isto fortalece a hipótese de que a diminuição da expressão do gene *ATM* está relacionada ao comprometimento celular nesses pacientes, possivelmente envolvendo funcionamento inadequado dos mecanismos de reparo do DNA (SHILOH, 2001, CLOUAIRE; MARNEF; LEGUBE, 2017). Assim, hipotetizamos que a célula medular do paciente com SMD pode ser direcionada para a morte (apoptose) ou acumular danos no DNA gerando instabilidade genética e conseqüentemente possíveis alterações cromossômicas.

As citopenias estão associadas geralmente à displasia nas células precursoras (MATSUDA *et al.*, 2013). Os neutrófilos são células originadas a partir da diferenciação de precursores granulocíticos, desta forma, a diminuição da contagem de neutrófilos nos pacientes com hipoexpressão de *ATM* pode ser decorrente de alterações nos precursores granulocíticos devido, provavelmente, ao acúmulo de danos ao DNA ou ao aumento da apoptose em pacientes com SMD. Estudo realizado por Matsuda *et al.* (2013) não demonstrou relação significativa entre a disgranulopoiese e a redução do número de neutrófilos e sugeriu que a diminuição na contagem de neutrófilos deve ser resultante do aumento da apoptose. Deste modo, é importante salientar que uma possível relação direta entre disgranulopoiese e a neutropenia não pode ser descartada, uma vez que baixos níveis de expressão de *ATM* podem

levar ao acúmulo de danos ocasionando alterações displásticas e possível sinalização de células não reparadas para a apoptose.

Além disso, observamos uma diminuição dos níveis de expressão de *ATM* no grupo com duas ou três citopenias quando comparado ao grupo de indivíduos com apenas uma citopenia. Reafirmando, assim, que a baixa expressão do *ATM* compromete a integridade genômica decorrente principalmente da ineficiência da ativação dos mecanismos de reparo.

Quanto aos níveis de expressão do gene *ATR*, obtivemos resultados significativamente estatísticos entre: celularidade da medula óssea (hipocelular, normocelular e hiper celular), número de citopenias (1 citopenia e 2 ou 3 citopenias), evolução para LMA, sobrevida global e sobrevida livre de LMA.

Em relação à celularidade da medula óssea, ao número de neutrófilos no sangue periférico e ao número de citopenias, os resultados de níveis de expressão do gene *ATR* obtidos foram semelhantes ao observado para o gene *ATM* demonstrando que os genes atuam em conjunto na sinalização do reparo do DNA (MARÉCHAL; ZOU, 2013). Além disso, a forte correlação observada entre esses genes fortalece a hipótese de que na SMD, os genes *ATM* e *ATR* são importantes sinalizadores de reparo de DNA e que as diminuições nos níveis de expressão desses genes estão relacionadas ao comprometimento celular nesses pacientes.

Estima-se que um terço dos pacientes com SMD desenvolvam LMA, que está associada a um desfecho extremamente desfavorável e a uma baixa sobrevida, e que uma ou mais mutações ocorrem com frequência nos pacientes com SMD (ENRICO *et al.*, 2017, GANGULY; BANERJEE; AGARWAL, 2017). O acúmulo sequencial dessas mutações impulsiona a evolução da doença a partir de hematopoiese clonal de potencial indeterminado para SMD, e desta para LMA (GANGULY; BANERJEE; AGARWAL, 2017).

Na análise de associação da expressão do gene *ATR* e as sobrevidas global e livre de doença, para o paciente com SMD, verificou-se que o aumento da expressão do gene *ATR*, baseado no ponto de corte, esteve associado a uma pior sobrevida global e pior sobrevida livre de LMA. Esses resultados sugerem que os pacientes com SMD, que evoluem para LMA, apresentam um perfil diferenciado de expressão gênica dos sensores de DSBs daqueles pacientes que não evoluem.

Esses resultados mostram-se contrários aos anteriores em que se observou, em relação à outras variáveis analisadas, que a hipoexpressão de *ATR* estava associada a fatores relacionados a acúmulo de danos do DNA devido a ineficiência da ativação dos mecanismos de reparo. Entretanto, a evolução para a Leucemia Mieloide Aguda é caracterizada por expansão clonal e é frequente em pacientes com alta instabilidade genômica, assim sugerimos

que o gene *ATR* é mais ativado, nesses pacientes, na tentativa de reparar as diversas lesões do DNA. Esses dados sugerem que o aumento da expressão dos níveis de *ATR* estão relacionados a um pior prognóstico e pior sobrevida em pacientes com SMD. Deste modo sugerimos que a hipoexpressão pode levar ao acúmulo de danos no DNA, mas por outro lado o aumento da sua ativação pode ser indicativo de evolução clonal em pacientes com SMD.

Este trabalho levanta uma série de questionamentos em relação ao papel dos genes *ATM* e *ATR* na SMD, entretanto apresenta algumas limitações. Dentre elas, está o pequeno grupo de pacientes com medula hipocelular que não permite concluir de fato o papel de *ATR* na SMD-hipoplástica e o pequeno número de pacientes com evolução para LMA em que foi verificado que o aumento da expressão do gene *ATR* parece ser indicativo de evolução clonal e de pior prognóstico em pacientes com SMD.

Deste modo, outros estudos enfatizando o papel do *ATR* e do *ATM* em pacientes com SMD hipoplástica e com evolução clonal são necessários para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da SMD. Além disso, para melhor avaliação do papel de *ATM* e *ATR* na SMD, sugerimos a realização de estudos com sequenciamento e proteômica.

CONCLUSÕES

- A hipoexpressão do mRNA dos genes *ATM* e *ATR* nos pacientes portadores de SMD está relacionada a SMD hipoplástica.
- Os genes *ATM* e *ATR* estão hipoexpressos em pacientes com 2 ou 3 citopenias estando, portanto, relacionado a um maior acometimento das linhagens celulares
- A hipoexpressão do gene *ATM* está relacionada a presença de disgranulopose mostrando que uma possível alteração nos seus níveis pode levar ao acometimento da linhagem granulocítica.
- Os genes *ATM* e *ATR* estão hipoexpressos em pacientes com neutropenia, reafirmando um possível acúmulo de danos ao DNA nos pacientes com SMD e consequentemente comprometimento das linhagens celulares, principalmente da granulocítica.
- Os genes *ATM* e *ATR* estão fortemente correlacionados na SMD
- A hiperexpressão do gene *ATR* está relacionada ao risco de evolução para LMA e pior sobrevida global nos pacientes com SMD.

REFERÊNCIAS

- ADÈS, L.; ITZYKSON, R.; FENAUX, P., Myelodysplastic syndromes. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p.2239-2252, 2014.
- AKTUĞLU, M.B. *et al.* Investigation of DNA repair gene variants on myelodysplastic syndromes in a Turkish population. **Medical Oncology**, v. 31, n. 10, 2014.
- ARBER, D.A. *et al.*, The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p.2391-2405, 2016.
- AUNAN, J.R. *et al.*, Molecular and biological hallmarks of ageing. **British Journal Of Surgery**, v. 103, n. 2, p.29-46, 2016.
- BAKKENIST, C.J.; KASTAN, M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. **Nature**, v. 421, n. 6922, p.499-506, 2003
- BEJAR, R.; STEENSMA, D.P., Recent developments in myelodysplastic syndromes **Blood**, v. 124, n. 18, p.2793-2803, 2014.
- BELLI, C.B. *et al.*, Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients. **American Journal Of Hematology**, v. 90, n. 10, p.851-858, 2015.
- BENNETT, J. M. *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **British Journal Of Haematology**, v. 51, p.189-199, 1982.
- BENNETT, J.M. *et al.*, Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. **British Journal Of Haematology**, v. 33, p.451-458, 1976.
- BERNSTEIN, J.L.; CONCANNON, P., ATM, radiation, and the risk of second primary breast cancer. **International Journal Of Radiation Biology**, v. 93, n. 10, p.1121-1127, 2017
- BOHGAKI, T.; BOHGAKI, M.; HAKEM, R., DNA double-strand break signaling and human disorders. **Genome Integrity**, v. 1, n. 1, 2010.
- BORGONOVO, T. *et al.* Cytogenetic study of Brazilian patients with myelodysplastic syndrome (MDS). **Genetics And Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p.654-660, 2005.
- BORTOLHEIRO, T.C., Classificações morfológicas das síndromes mielodisplásicas: da classificação Franco-Americana-Britânica (FAB) à classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 3, n. 28, p.194-197, 2006.
- BRANDMAIER, A.; HOU, S.; SHEN, W.H. Cell Cycle Control by PTEN. **Journal Of Molecular Biology**, v. 429, n. 15, p.2265-2277, 2017.
- BUDCZIES, J. *et al.*, Cutoff Finder: A Comprehensive and Straightforward Web Application Enabling Rapid Biomarker Cutoff Optimization. **Plos One**, v. 7, n. 12, 2012.
- BUSTIN, S.A. *et al.*, The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p.611-622, 2009.

- CAZZOLA, M.; DELLA PORTA, M. G.; MALCOVATI, L., The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. **Blood**, v. 122, n. 25, p.4021-4034, 2013.
- CERRANO, M. *et al.*, Anemia in the Elderly: not Always what it Seems. **Mediterr J Hematol Infect Dis.**, v. 8, n. 1, p. :e2016017, 2016.
- CHAMSEDDINE, A.N. *et al.*, Unraveling Myelodysplastic Syndromes: Current Knowledge and Future Directions. **Current Oncology Reports**, v. 18, n. 1, 2016.
- CHEN, B. *et al.*, Clinical and cytogenetic features of 508 Chinese patients with myelodysplastic syndrome and comparison with those in Western countries. **Leukemia**, v. 19, p.767-775, 2005.
- CLOUAIRE, T.; MARNEF, A.; LEGUBE, G., Taming Tricky DSBs: ATM on duty. **Dna Repair**, v. 56, p.84-9,1 2017.
- DARLING, S. *et al.* Regulation of the cell cycle and centrosome biology by deubiquitylases. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 5, p.1125-1136, 2017.
- DERHEIMER, F.A.; KASTAN, M.B., Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. **Febs Letters**, v. 584, n. 17, p.3675-3681, 2010.
- DOLATSHAD, H *et al.* Disruption of SF3B1 results in deregulated expression and splicing of key genes and pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem and progenitor cells. **Leukemia**, v. 29, n. 5, p.1092-1103, 2015.
- ECONOMOPOULOU, P. *et al.*, Expression analysis of proteins involved in the non homologous end joining DNA repair mechanism, in the bone marrow of adult de novo myelodysplastic syndromes. **Annals Of Hematology**, v. 89, n. 3, p.233-239, 2009.
- ENRICO, Alicia *et al.* Influence of Acute Myeloid Leukemia Progression on the Prognosis of 831 Patients With Myelodysplastic Syndromes From the Argentine Database. **Clinical Lymphoma Myeloma And Leukemia**, v. 17, n. 11, p.743-752, 2017.
- FABIANI, E. *et al.* Polymorphisms of detoxification and DNA repair enzymes in myelodysplastic syndromes. **Leukemia Research**, v. 33, n. 8, p.1068-1071, 2009.
- FLYNN, R.L; ZOU, L. ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. **Trends In Biochemical Sciences**, v. 36, n. 3, p.133-140, 2011.
- GAÑÁN-GÓMEZ, I. *et al.*, Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 29, n. 7, p.1458-1469, 2015.
- GANGAT, N.; PATNAIK, M.M.; TEFFERI, A., Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. **American Journal Of Hematology**, v. 91, n. 1, p.76-89, 2015.
- GANGULY, Bani Bandana; BANERJEE, Debasis; AGARWAL, Mohan B.. Impact of chromosome alterations, genetic mutations and clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) on the classification and risk stratification of MDS. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, 2017
- GIAGOUNIDIS, A.; HAASE, D., Morphology, cytogenetics and classification of MDS. **Best**

Practice & Research Clinical Haematology, v. 26, n. 4, p.337-353, 2013

GILL, H.; LEUNG, A.; KWONG, Y., Molecular and Cellular Mechanisms of Myelodysplastic Syndrome: Implications on Targeted Therapy. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p.440-460, 2016.

GLENTHØJ, A. *et al.* Immune Mechanisms in Myelodysplastic Syndrome. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p.944, 2016.

GOASGUEN, J.E *et al.* INTERNATIONAL WORKING GROUP ON MORPHOLOGY OF MDS (IWGM-MDS). Proposal for refining the definition of dysgranulopoiesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. **Leuk Res.**, v. 38, n. 4, p. 447-53, 2014.

GREENBERG, P. L. *et al.* Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p.2454-2465, 2012.

GREENBERG, P.L. *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 89, n. 6, p.2079-2088, 1997

HAASE, D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. **Annals Of Hematology**, v. 87, n. 7, p.515-526, 2008.

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

HAASE, D. *et al.* New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. **Blood**, v. 110, n. 13, p.4385-4395, 2007.

HE, Q.; LIU, F., Unexpected role of inflammatory signaling in hematopoietic stem cell development. **Current Opinion In Hematology**, v. 23, n. 1, p.18-22, 2016.

HELGASON, H. *et al.* Loss-of-function variants in ATM confer risk of gastric cancer. **Nature Genetics**, v. 47, n. 8, p.906-910, 2015.

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

IBRAHIM, S. *et al.*, 11q23 Abnormalities in Patients With Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome as Detected by Molecular and Cytogenetic Analyses. **American Journal Of Clinical Pathology**, v. 114, n. 5, p.793-797, 2000.

IYAMA, T.; WILSON, D.M., DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **Dna Repair**, v. 12, n. 8, p.620-636, 2013.

JOSHI, D. *et al.*, Association of XPD (Lys751Gln) and XRCC1 (Arg280His) gene polymorphisms in myelodysplastic syndrome. **Annals Of Hematology**, v. 95, n. 1, p.79-85, 2016.

KAWANKAR, N.; VUNDINTI, B.R., Cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndrome: an overview. **Hematology**, v. 16, n. 3, p.131-138, 2011.

- KOH, Y. *et al.* Hypoplastic myelodysplastic syndrome (h-MDS) is a distinctive clinical entity with poorer prognosis and frequent karyotypic and FISH abnormalities compared to aplastic anemia (AA). **Leukemia Research**, v. 34, n. 10, p.1344-1350, 2010.
- LI, L. *et al.* Detoxification and DNA repair genes polymorphisms and susceptibility of primary myelodysplastic syndromes in Chinese population. **Leukemia Research**, v. 35, n. 6, p.762-765, 2011.
- LIANG, C. *et al.*, Characteristics of bone marrow cell dysplasia and its effectiveness in diagnosing myelodysplastic syndrome. **Hematology**, p.1-12, 2017.
- LIEBER, M.R., The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. **Annual Review Of Biochemistry**, v. 79, n. 1, p.181-211, 2010.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p.402-408, 2001.
- MA, X. Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. **The American Journal Of Medicine**, v. 125, n. 7, 2012.
- MAGALHÃES, S.M.; LORAND-METZE, I. Síndromes mielodisplásicas: protocolo de exclusão. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, 2004.
- MALCOVATI, L. *et al.* A WHO Classification-Based Prognostic Scoring System (WPSS) for Predicting Survival in Myelodysplastic Syndromes. **Blood**, v. 106, n. 11, p.788, 2005
- MALCOVATI, L. *et al.* Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 122, n. 17, p.2943-2964, 2013.
- 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.1433-1440, 2011.
- MANIC, G. *et al.* Trial Watch: Targeting ATM–CHK2 and ATR–CHK1 pathways for anticancer therapy. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 2, n. 4, 2015.
- MARCONDES, A.M. *et al.* Dysregulation of IL-32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia modulates apoptosis and impairs NK function. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 105, n. 8, p.2865-2870, 2008.
- MARECHAL, A.; ZOU, L., DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, v. 5, n. 9, 2013.
- MASSAGUÉ, Joan. G1 cell-cycle control and cancer. **Nature**, v. 432, p.298-306, 2004.
- MATSON, J.P.; COOK, J.G., Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses. **The Febs Journal**, v. 284, n. 3, p.362-375, 2017
- MATSUDA, A. *et al.*, Correlation Between Dysplastic Lineage and Type of Cytopenia in Myelodysplastic Syndromes Patients With Refractory Anemia According to the FAB Classification. **American Journal Of Clinical Pathology**, v. 140, n. 2, p.253-257, 2013.

MEERAN SM, KATIYAR SK. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. **Frontiers in bioscience**, v.13, p.2191-2202, 2008.

MEGGENDORFER, M. *et al.*, Molecular analysis of myelodysplastic syndrome with isolated del(5q) reveals a specific spectrum of molecular mutations with prognostic impact: a study on 123 patients and 27 genes. **Haematologica**, v. 102, n. 9, p.1502-1510, 2017.

MORIO, T. Recent advances in the study of immunodeficiency and DNA damage response. **International Journal Of Hematology**, v. 106, n. 3, p.357–365, 2017.

MUSICH, PR.; LI, Z.; ZOU, Y. Xeroderma Pigmentosa Group A (XPA), Nucleotide Excision Repair and Regulation by ATR in Response to Ultraviolet Irradiation. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, p.41-54, 2017.

NEUKIRCHEN, J. *et al.* Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: Data from the Düsseldorf MDS-registry. **Leukemia Research**, v. 35, n. 12, p.1591-1596, 2011.

NUSSBAUM, R.I.; MCLNNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Thompson e Thompson Genética Médica**. 8. ed.: Elsevier, 2016. 560 p.

OTTO, T.; SICINSKI, P., Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p.93-115, 2017.

PINHEIRO, R.F., CHAUFFAILLE, M.L.L.F., Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 42, n.11, p.1110-1012, 2009.

PINHEIRO, R.F.; CHAUFFAILLE, M.L.L.F., Síndrome mielodisplásica secundária à quimio ou radioterapia – SMD relacionada a tratamento. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 3, n. 28, p.201-203, 2006.

POPP, H.D. *et al.* Increase of DNA damage and alteration of the DNA damage response in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. **Leukemia Research**, v. 57, p.112-118, 2017.

RENAULT, A. *et al.* Telomere length, ATM mutation status and cancer risk in Ataxia-Telangiectasia families. **Carcinogenesis**, v. 38, n.10 p.994-1003, 2017.

RIBEIRO JUNIOR, H.L. *et al.* ATM polymorphism is associated with low risk myelodysplastic syndrome. **Dna Repair**, v. 12, n. 2, p.87-89, 2013.

RIBEIRO JUNIOR, H.L. *et al.*, DNA repair gene expressions are related to bone marrow cellularity in myelodysplastic syndrome. **Journal Of Clinical Pathology**, v. 70, n. 11, p.970-980, 2017a.

RIBEIRO JUNIOR, H.L. *et al.*, Expression of DNA repair genes are important molecular findings in CD34+ stem-cells of Myelodysplastic Syndrome. **European Journal Of Haematology**, 2017b.

RIBEIRO JUNIOR, H.L. *et al.*, Influence of functional polymorphisms in DNA repair genes of myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**, v. 48, p.62-72, set. 2016.

- RIBEIRO JUNIOR, H.L. *et al.*, Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. **Hematological Oncology**, v. 33, n. 4, p.220-228, 2015.
- ROBERTS, N.J. *et al.* ATM Mutations in Patients with Hereditary Pancreatic Cancer. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 1, p.41-46, 2012
- SANTIAGO, S.P. *et al.* New polymorphisms of Xeroderma Pigmentosum DNA repair genes in myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**, v. 58, p.73-82, 2017.
- SEKERES, M.A., The Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. **Hematology/oncology Clinics Of North America**, v. 24, n. 2, p.287-294, 2010.
- SHAFFER, L.G.; MCGOWAN-JORDAN, J.; SCHMID, M., **ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013)**. Switzerland: Karger, 2013. 140 p.
- SHAHRABI, S. *et al.*, Genetics and epigenetics of myelodysplastic syndromes and response to drug therapy: new insights. **Oncology Reviews**, v. 10, n. 2, p.78-85, 2016.
- SHIOTANI, B.; ZOU, L. Single-Stranded DNA Orchestrates an ATM-to-ATR Switch at DNA Breaks. **Molecular Cell**, v. 33, n. 5, p.547-558, 2009
- STEENSMA, D.P., Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 7, p.969-983, 2015.
- TORGOVNICK, A.; SCHUMACHER, B., DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. **Frontiers In Genetics**, v. 6, p.1-15, 2015.
- URESHINO, H. *et al.* Acute Megakaryoblastic Leukemia with Myelodysplasia-related Changes Associated with ATM Gene Deletion. **Internal Medicine**, v. 55, n. 12, p.1625-1629, 2016.
- UYANIK, M.S. *et al.*, Could the mosaic pattern of chromosomal abnormality predict overall survival of patients with myelodysplastic syndrome? **Hematology/oncology And Stem Cell Therapy**, v. 9, n. 2, p.41-47, 2016.
- VALKA, J. *et al.*, Differential expression of homologous recombination DNA repair genes in the early and advanced stages of myelodysplastic syndrome. **European Journal Of Haematology**, v. 99, n. 4, p.323-331, 2017.
- VARDIMAN, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p.937-951, 2009.
- VARDIMAN, J.W.; HARRIS, N.L.; BRUNNING, R.D., The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood**, v. 100, n. 7, p.2292-2302, 2002.
- VASSALLO, J.; MAGALHÃES, S.M.M. Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 31, n. 4, p.267-272, 2009.
- VISCONTE, C, *et al.*, Molecular Pathogenesis of Myelodysplastic Syndromes. **Translational**

Medicine. v. 8, n. 4, p.19-30, 2014.

WALTER, M.J. *et al.*, Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 27, n. 6, p.1275-1282, 2013.

WEBER, A.M.; RYAN, A.J., ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 149, p.124-138, 2015.

WIMAN, K. G.; ZHIVOTOVSKY, B. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. **Journal Of Internal Medicine**, v. 281, n. 5, p.483-495, 2017

WOLACH, O.; STONE, R., Autoimmunity and Inflammation in Myelodysplastic Syndromes. **Acta Haematologica**, v. 136, p.108-117, 2016.

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

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM-FFOE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As síndromes mielodisplásticas (SMD) são um grupo de doenças heterogêneo que acometem principalmente indivíduos idosos. Caracterizam-se por uma ampla variedade de manifestações clínicas e patológicas, sendo as principais: citopenias periféricas e hematopoese displástica que tendem a persistir por 4 ou mais semanas. Acredita-se que na doença a integridade genômica possa estar comprometida uma vez que alterações citogenéticas são geralmente observadas.

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

Esta pesquisa trata-se de um estudo transversal observacional e o objetivo principal é avaliar a expressão dos genes *ATM* /*ATR* e sua relação com o dano ao DNA em pacientes com SMD atendidos no ambulatório do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). Esta pesquisa possibilitará uma melhor compreensão da fisiopatologia e do curso clínico da doença e verificar o potencial das técnicas utilizadas (Real Time PCR e Teste do cometa) no diagnóstico e prognóstico da 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 5mL 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.

RISCOS

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.

BENEFÍCIOS

O projeto de pesquisa irá contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatologia das SMD e deste modo auxiliar em tomadas de decisões mais adequadas pelos médicos no que se refere a terapias e acompanhamento dos pacientes

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.

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: **MARILENA FACUNDO DE CASTRO (XX-XXXXXXXXXX)**.

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 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES QUANTO À CITOGENÉTICA, À CLASSIFICAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE E AO GRUPO DE RISCO SEGUNDO CLASSIFICAÇÃO DO SISTEMA DE ESCORE DE PROGNÓSTICO INTERNACIONAL REVISADO (IPSS-R)

Pacientes	Citogenética Clássica por Banda G (Cariótipo)	Classificação OMS 2008	Grupo de Risco (IPSS-R)
1	46,XX[20]	ARSA	Baixo Risco
2	46,XY[9]	CRDM	Risco Intermediário
3	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
4	46,X,i(x)(q10),del(17)(q22q23.3)[7]/46,XX[13]	CRDU	Baixo Risco
5	46,XX,del(5)(q12q33)[18]/46,XX[2]	SÍNDROME 5q	Baixo Risco
6	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
7	46,XX[20]	CRDU	Muito Baixo Risco
8	46,XX[20]	CRDM	Baixo Risco
9	46,XY[5]	LMMC	Não se aplica
10	46,XY[15]	ARSA	Baixo Risco
11	46,XY,del(4)(q31)[4]/46,XY,del(5)(q21q33)[3]/46,XY[15]	CRDM	Risco Intermediário
12	Ausência de Metáfase	AREB II	Não se aplica
13	46,XY[24]	CRDM	Risco Intermediário
14	46,XY[20]	AREB I	Risco Intermediário
15	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
16	46,XY[20]	CRDM	Risco Intermediário
17	46,XX[20]	CRDM	Baixo Risco
18	Ausência de Metáfase	AREB I	Não se aplica
19	46,XY[17]	LMMC	Não se aplica
20	46,X-Y[4]/46,XY[16]	ARSA	Baixo Risco
21	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2].	AREB II	Risco Muito Alto
22	46,XY[20]	AREB I	Risco Intermediário

23	46,XY[9]	SMD RELACIONADA A TERAPIA	Não se aplica
24	46,XY[5]	CRDM	Risco Intermediário
25	46,XX,del(20)(q13.1)[7]/46,XX[16]	CRDU	Muito Baixo Risco
26	46,XX[6]	CRDU	Muito Baixo Risco
27	46,XX[11]	ARSA	Muito Baixo Risco
28	47,XY,+15[10]/46,XY[10]	CRDM	Risco Intermediário
29	47,XY,+mar[3]/46,XY[17]	CRDM	Risco Intermediário
30	46,XY[20]	AREB I	Risco Intermediário
31	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
32	46,XY[17]	AREB II	Risco Intermediário
33	46,XX[20]	ARSA	Baixo Risco
34	Ausência de Metáfase	AREB I	Não se aplica
35	Ausência de Metáfase	AREB II	Não se aplica
36	47,XY,+8[12]/46,XY[8]	AREB I	Risco Intermediário
37	46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17]	CRDM	Risco Intermediário
38	46,XX[20]	AREB I	Risco Intermediário
39	46,XY,del(17)(q22)[3]/47,XY,+mar[4]/46,XY[20]	CRDM	Baixo Risco
40	Ausência de Metáfase	ARSA	Não se aplica
41	46,XY[20]	CRDM	Muito Baixo Risco
42	46,XX[7]	CRDM	Baixo Risco
43	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
44	46,XY,del(5)(q15q33)[7]/46,XY[11]	CRDM	Risco Intermediário
45	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
46	90,XXXX,-6,-7,-8,-11,+21,+22[5]/46,XX,del(7)(q23),del(20)(q13.1)[3]/45,XX,-7[5]/45~46,XX,-7,del(7)(q32),del(11)(q32),-17,del(17)(p11.2),del(20)(q13.1)[cp11]	AREB II	Risco Muito Alto
47	46,XY[20]	LMMC	Não se aplica
48	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
49	46,XY[10]	CRDM	Risco Intermediário

50	47,XY,+mar[5],46,XY[11]	CRDM	Alto Risco
51	46,XY,-?10,+mar[5]/46,XY[1]	CRDM	Risco Intermediário
52	46,XY[5]	CRDM	Baixo Risco
53	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 Risco
54	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
55	89,XXY,-20,-22,-Y[4]/46,XY,del(16)(?q22)[5]/46,XY[11]	CRDM	Risco Intermediário
56	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	Alto Risco
57	47,XY,del(5)(q31),+mar[7]/46,XY,del(11)(q23)[3]/46,XY,del(5)(q31),del(11)(q23)[5]	CRDM	Baixo Risco
58	46,XY[6]	CRDM	Baixo Risco
59	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
60	46,XY[8]	CRDM	Baixo Risco
61	46,XY	CRDM	Baixo Risco
62	37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/46,XY,del(5)(q15q33)[5]/46,XY[6]	AREB II	Risco Muito Alto
63	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
64	46,XY[10]	CRDM	Baixo Risco
65	46,XX[20]	CRDM	Baixo Risco
66	46,XX[20]	CRDM	Risco Intermediário
67	46,XX[15]	CRDU	Baixo Risco
68	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
69	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(?q25)[7]/46,XX[4]	CRDM	Risco Intermediário
70	Ausência de Metáfase	ARSA	Não se aplica
71	46,XX[8]	CRDM	Risco Intermediário
72	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
73	Ausência de Metáfase	SMD RELACIONADA A TERAPIA	Não se aplica
74	46,XX[20]	LMMC	Não se aplica
75	Ausência de Metáfase	AREB II	Não se aplica

76	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
77	44,XX,-13,-17[4]/46,XX[5]	CRDM	Risco Intermediário
78	46,XX,del(5)(q15q33)[8]/46,XX[19]	SMD RELACIONADA A TERAPIA	Não se aplica
79	Ausência de Metáfase	CRDU	Não se aplica
80	Ausência de Metáfase	ARSA	Não se aplica
81	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
82	46,XX[5]	ARSA	Baixo Risco
83	46,XX[8]	CRDU	Baixo Risco
84	Ausência de Metáfase	SMD RELACIONADA A TERAPIA	Não se aplica
85	46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12]	ARSA	Risco Intermediário
86	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
87	46,XY[11]	AREB I	Alto Risco
88	46,XX,del(5)(q15q33)[4]/46,XX[18]	CRDM	Baixo Risco
89	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
90	47,XX,t(4;11)(q27;q32),+mar[4]/46,XX[16]	CRDM	Risco Intermediário
91	46,XX[3]	CRDM	Baixo Risco
92	46,XX,del(17)(q11.2)93]/46,XX[4]	SMD RELACIONADA A TERAPIA	Não se aplica
93	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica
94	46,XX[12]	ARSA	Muito Baixo Risco
95	46,XX[20]	CRDU	Baixo Risco
96	46,XY[6]	ARSA	Baixo Risco
97	Ausência de Metáfase	AREB II	Não se aplica
98	Ausência de Metáfase	AREB I	Não se aplica
99	46,XX[20]	SMD RELACIONADA A TERAPIA	Não se aplica
100	Ausência de Metáfase	CRDM	Não se aplica

Fonte: elaborada pelo autor.

APÊNDICE C - TABELA COM TODOS OS RESULTADOS DA PESQUISA

	GENE ATM				GENE ATR			
	Número de Indivíduos (n)	Média (x10 ⁻⁴)	Desvio Padrão (x10 ⁻⁴)	p valor	Número de Indivíduos (n)	Média (x10 ⁻⁴)	Desvio Padrão (x10 ⁻⁴)	p valor
Sexo								
Feminino	40	6,670620	1,715705	0,102	37	1,670350	1,002578	0,772
Masculino	44	5,863600	3,852335		48	1,600980	1,156291	
Idade (anos)								
≤60	20	4,373950	2,722435	0,168	27	1,042410	0,357874	0,06
>60	59	5,630490	3,705241		59	1,979470	1,243872	
Classificação OMS 2008								
CRDU	6	8,866830	3,251502	0,612	4	1,766500	0,202739	0,076
ARSA	11	5,695180	4,033378		12	1,694330	1,074809	
CRDM	36	4,458640	2,522369		47	1,633196	1,332801	
AREB-I	8	5,810000	3,063066		8	1,916630	0,940732	
AREB-II	6	2,799817	3,297702		8	1,931500	2,006785	
SMD relacionada a terapia	6	6,889330	3,827491		4	1,605750	0,350558	
Fibrose								
Presença	55	6,327600	9,184995	0,684	53	1,558980	1,273620	0,635
Ausência	15	7,329070	4,180214		11	1,371270	0,558458	
Diseritropoese								
Presença	72	7,483780	5,688532	0,451	67	1,751930	1,238478	0,067
Ausência	4	3,658853	10,115540		4	0,587500	0,607274	
Dismegacariopoese								

Presença	25	4,789448	2,744894	0,653	33	1,705480	1,250223	0,705
Ausência	29	4,452000	2,726552		34	1,598590	1,045099	
Disgranulopose								
Sim	21	3,504670	1,888875	0,01	31	1,368810	0,930677	0,105
Não	31	5,755290	3,539594		31	1,793030	1,085817	
Sideroblastos em Anel								
0	65	5,441110	3,824180	0,492	66	1,830240	1,378026	0,267
1 a 14	6	3,677670	3,102454		6	1,030170	0,955878	
≥ 15	13	5,166080	3,623500		15	1,640800	1,000540	
Percentual de blastos								
<10%	73	5,439740	3,542131	0,526	75	1,626670	1,071233	0,409
≥ 10%	10	6,293200	6,479600		10	1,770809	1,770809	
Cariótipo								
Normal	27	5,784810	3,352877	0,179	35	1,664090	0,955817	0,152
Alterado	18	4,510720	2,561579		26	1,300485	0,957927	
Cariótipo (Aneuploidia)								
Normal	29	4,952790	2,894544	0,388	36	1,672110	0,943293	0,145
Alterado sem aneuploidia	9	4,591890	3,416013		8	0,991750	0,639570	
Alterado com aneuploidia	11	3,522755	3,327420		16	1,333190	1,061169	
Cariótipo (Alteração 5q)								
Normal	27	5,360780	3,140242	0,389	35	1,664090	0,955817	0,188
Alterado com 5q	11	4,236640	3,395018		11	1,135360	0,880322	
Alterado sem 5q	17	4,056470	3,357000		17	1,126635	1,061300	
Cariótipo (Alteração 7q)								
Normal	27	5,360780	3,140242	0,273	35	1,664090	0,955817	0,115
Alterado com 7q	4	3,348750	3,909549		4	0,741250	0,609089	
Alterado sem 7q	19	4,137530	3,781307		24	0,129383	1,300500	

Cariótipo (Complexo)								
Normal	28	4,269460	2,534649	0,601	36	1,672110	0,943293	0,384
1 alteração	12	4,755750	3,187831		12	1,403920	1,017414	
2 alterações	6	3,111670	3,332415		8	0,914380	0,788433	
Complexo (≥ 3 alterações)	5	3,248000	3,285062		6	0,715170	0,492428	
Prognóstico IPSS-R								
Muito Favorável/Favorável	45	7,606770	9,849965	0,86	42	1,569830	0,986440	0,35
Intermediário	12	6,763700	9,533139		11	1,347640	1,199479	
Desfavorável/Muito Desfavorável	4	1,948000	2,004136		4	0,628330	0,507801	
Hemoglobina (IPSS-R)								
≥ 10 g/dL	20	5,848000	2,198685	0,368	20	1,547700	0,856915	0,924
8-10 g/dL	22	4,120000	0,661461		23	1,566300	1,169079	
< 8 g/dL	35	5,269000	2,861094		36	1,648640	1,005229	
Contagem de Neutrófilos (IPSS-R)								
$\geq 800/\text{mm}^3$	20	3,831150	2,276818	0,019	20	1,168000	0,720595	0,032
$< 800/\text{mm}^3$	52	5,757130	3,300871		49	1,679470	0,933299	
Contagem de Plaquetas (IPSS-R)								
$\geq 100.000/\text{mm}^3$	38	6,099000	3,503075	0,082	44	1,700110	1,040913	0,115
$\geq 50.000 - < 100.000/\text{mm}^3$	20	5,286350	3,346486		19	1,960790	1,338981	
$< 50.000/\text{mm}^3$	13	2,458460	1,376288		24	1,303170	1,072153	
Número de Citopenias no Sangue Periférico (IPSS-R)								

1	56	5,345500	3,061247	0,012	59	1,787750	1,058537	0,002
2 e 3	11	3,165640	1,702478		16	0,895630	0,419853	
Classificação de Risco (IPSS-R)								
Muito baixo/baixo	22	4,852410	3,101670	0,07	14	1,862690	0,730835	0,271
Intermediário	22	4,298950	3,427798		15	1,627110	0,551518	
Alto/Muito Alto	4	0,769750	0,525837	4	0,659000	0,311059		
Dependência Transfusional								
Sim	35	4,802970	2,819730	0,307	42	1,600481	1,190153	0,674
Não	32	5,583940	3,387941		39	1,712670	1,099964	
Óbito								
Sim	54	4,457930	3,155192	0,392	32	1,400500	1,023583	0,474
Não	30	5,098030	3,457194		39	1,586740	1,068351	
Evolução para LMA								
Sim	11	4,036180	3,700186	0,305	12	2,805670	2,371899	0,005
Não	73	5,259880	3,660803		73	1,161149	1,076054	

ANEXO A – CLASSIFICAÇÃO FRANCO-AMERICANA-BRITÂNICA DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Classificação Franco-Americana-Britânica (FAB)		
Tipo	Medula Óssea	Sangue Periférico
Anemia Refratária (AR)	Blastos \leq 5%	Blastos \leq 1%
Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA)	Blastos \leq 5% Sideroblastos em anel $>$ 15%	Blastos \leq 1%
Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB)	Blastos $>$ 5% e $<$ 20%	Blastos $<$ 5%
Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC)	Blastos $<$ 20%	Blastos $<$ 5% Monócito $>$ 1000/mm ³
Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação (AREB-T)	Blastos $>$ 20% e $<$ 30% ou Bastonetes de Auer	Blastos \geq 5%

Fonte: Adaptado de Bennet et al. (1982)

ANEXO B - CLASSIFICAÇÃO DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE 2001

Classificação Organização Mundial de Saúde 2001		
Doença	Medula Óssea	Sangue Periférico
Anemia Refratária (AR)	Displasia Eritróide <5% de blastos <15% Sideroblastos em Anel	Anemia Ausência ou raros blastos
Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA)	Displasia Eritróide <5% de blastos ≥15% Sideroblastos em Anel	Anemia Ausência de blastos
Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem (CRDM)	Displasia ≥ 10% em duas ou mais linhagens celulares <5% de blastos <15% Sideroblastos em Anel Ausência de Bastonete de Auer	Citopenias (bicitopenia ou pancitopenia) Ausência ou raros blastos Ausência de Bastonete de Auer Monócitos <1x10 ⁹ /L
Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem e Sideroblastos em Anel (CRDM-SA)	Displasia ≥ 10% em duas ou mais linhagens celulares <5% de blastos ≥15% Sideroblastos em Anel Ausência de Bastonete de Auer	Citopenias (bicitopenia ou pancitopenia) Ausência ou raros blastos Ausência de Bastonete de Auer Monócitos <1x10 ⁹ /L
Anemia Refratária com Excesso de Blastos -1 (AREB-1)	Displasia uni ou multilinhagem 5% a 9% de blastos Ausência de Bastonete de Auer	Citopenias <5% de blastos Ausência de Bastonete de Auer Monócitos <1x10 ⁹ /L
Anemia Refratária com Excesso de Blastos -2 (AREB-2)	Displasia uni ou multilinhagem 10% a 19% de blastos Presença ou não de Bastonete de Auer	Citopenias 5% a 19% de blastos Presença ou não de Bastonete de Auer Monócitos <1x10 ⁹ /L
Síndrome Mielodisplásica com del(5q) isolada	Normal ou aumento de megacariócitos com núcleo hipolobados <5% de blastos del(5q) isolada	Anemia <5% de blastos Plaquetas normal ou aumentada
Síndrome Mielodisplásica Não Classificada	Displasia unilinhagem em granulócitos ou megacariócitos <5% de blastos Ausência de Bastonete de Auer	Citopenias Ausência ou raros blastos Ausência de Bastonete de Auer

Fonte: Adaptado de Vardiman, Harris, Brunning (2002)

ANEXO C - CLASSIFICAÇÃO DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE 2008

Classificação Organização Mundial de Saúde 2008		
Doença	Medula Óssea	Sangue Periférico
Citopenia Refratória com Displasia em Única Linhagem (CRDU) - Anemia Refratória (AR) - Neutropenia Refratória (NR) - Trombocitopenia Refratória (TR)	Displasia de única linhagem \geq 10% das células mieloides <5% de blastos <5% dos percussores eritróides com sideroblastos em anel	Uni ou Bicitopenia <1% de Blastos
Anemia Refratória com Sideroblastos em Anel (ARSA)	Displasia Eritróide <5% de blastos \geq 15% Sideroblastos em Anel	Anemia Ausência de blastos
Citopenia Refratória com Displasia Multilinhagem (CRDM)	Displasia \geq 10% em duas ou mais linhagens celulares <5% de blastos <15% Sideroblastos em Anel Ausência de Bastonete de Auer	Citopenias Ausência ou raros blastos (<1%) Ausência de Bastonete de Auer Monócitos <1x10 ⁹ /L
Anemia Refratória com Excesso de Blastos -1 (AREB-1)	Displasia uni ou multilinhagem 5% a 9% de blastos Ausência de Bastonete de Auer	Citopenias <5% de blastos Ausência de Bastonete de Auer Monócitos <1x10 ⁹ /L
Anemia Refratória com Excesso de Blastos -2 (AREB-2)	Displasia uni ou multilinhagem 10% a 19% de blastos Presença ou não de Bastonete de Auer	Citopenias 5% a 19% de blastos Presença ou não de Bastonete de Auer Monócitos <1x10 ⁹ /L
Síndrome Mielodisplásica com del(5q) isolada	Normal ou aumento de megacariócitos com núcleo hipolobados <5% de blastos Citogenética: del(5q) isolada Ausência de Bastonete de Auer	Anemia Ausência ou raros blastos (<1%) Plaquetas normal ou aumentada
Síndrome Mielodisplásica Não Classificada (SMD-U)	Displasia em <10% das células em uma ou mais linhagens mieloides quando acompanhada de alterações citogenéticas consideradas presuntivas de SMD* <5% de blastos	Citopenias Ausência ou raros blastos (<1%)

***Alterações**
Não Balanceadas: -7 ou del(7q), -5 ou del(5q), i(17q) ou t(17p), -13 ou del(13q), del(11q), del(12p) ou t(12p), del(9q), idic(X)(q13).
Balanceadas: t(11;16)(q23;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3;q21.1), t(2;11)(p21;q23), inv(3)(q21q26.2), t(6;9)(p23;q34)
Cariotipo complexo: (3 ou mais anormalidades cromossômicas) envolvendo uma ou mais das anormalidades acima descritas.

Fonte: Adaptado de Vardiman et al. (2009)

ANEXO D – CLASSIFICAÇÃO DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE 2016

Classificação Organização Mundial de Saúde 2016		
Doença	Medula Óssea	Sangue Periférico
SMD com Displasia em Única Linhagem (SMD-DU)	Displasia em 1 linhagem 5%* de Sideroblastos em anel ≤5% de blastos	Uni ou Bicitopenia <1% de Blastos
SMD com Displasia em Múltiplas Linhagens (SMD-DM)	Displasia em 2 ou 3 linhagens 5% de Sideroblastos em anel* ≤5% de blastos	Citopenia em 1 ou mais linhagens ≤1% de blastos
SMD-SA com Displasia em Única Linhagem (SMD-SA-DU)	Displasia em 1 linhagem ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel ≤5% de blastos	≤1% de Blastos Uni ou Bicitopenia
SMD-SA com Displasia em Múltiplas Linhagens (SMD-SA-DM)	Displasia em 2 ou 3 linhagens ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel ≤5% de blastos	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos
SMD com Excesso de Blastos 1 (SMD-EB-1)	Displasia em 0,1, 2 ou 3 linhagens 5 a 9% de blastos	Citopenia em 1 ou mais linhagens 2 a 4% de blastos
SMD com Excesso de Blastos 2 (SMD-EB-2)	Displasia em 0,1, 2 ou 3 linhagens 10 a 19% de blastos	Citopenia em 1 ou mais linhagens 5 a 19% de blastos
Síndrome Mielodisplásica com del(5q) isolada	Displasia em 1 ou mais linhagens ≤5% de blastos del(5q) isolada ou com 1 alteração adicional, exceto del(7q)/-7	1% de Blastos Uni ou Bicitopenia
Síndrome Mielodisplásica Não Classificável (SMD-U) com 1% de blasto	Displasia em 1 ou mais linhagens ≤5% de blastos	Citopenia em 1 ou mais linhagens ≤1% [!] de blastos
Síndrome Mielodisplásica Não Classificável (SMD-U) com displasia em única linhagem e pancitopenia	Displasia em 1 linhagem ≤5% de blastos	Citopenia em 3 linhagens ≤1% de blastos
Síndrome Mielodisplásica Não Classificável (SMD-U) baseada em alterações citogenéticas	Ausência de displasias ≤15% de Sideroblastos em anel ≤5% de blastos	Citopenia em 1 ou mais linhagens ≤1% de blastos

*Na presença de mutação do gene SF3B1.
[!]1% de blastos deve ser encontrado em pelo menos duas situações isoladas.

Fonte: Adaptado de Arber et al. (2016)

ANEXO E – EXTRATIFICAÇÃO DE RISCO DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (WPSS)

Variável Prognóstica	Valor 0	Valor 1	Valor 2	Valor 3
Categoria WHO	AR, ARSA, 5q-	CRDM e CRDM-RA	AREB-1	AREB-2
Cariótipo	Favorável	Intermediário	Desfavorável	
Dependência Transfusional	Não	Sim		

Favorável = cariótipo normal, del (5q), del (20q), -Y

Desfavorável = cariótipo complexo (≥ 3 anomalias), 7-anomalias cromossômicas

Intermediário = todas as outras aberrações

Dependencia Transfusional: pelo menos 1 transfusão a cada 8 semanas durante um período de 3 meses

A soma desses pontos para as três variáveis leva a classificação desses pacientes em cinco grupos risco distintos:

0 → muito baixo

1 → baixo

2 → intermediário

3- 4 → alto

5 – 6 → muito alto

Fonte: Adaptado de Malcovati et al. (2005)

ANEXO F – EXTRATIFICAÇÃO DE RISCO DO SISTEMA DE ESCORE PROGNÓSTICO INTERNACIONAL REVISADO (IPSS-R)

		Muito Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Muito Alto
		# Única del (11q)-Y	# Normal # Única del (5q) del (12p) del (20q) # Dupla Incl. Del (5q)	# Única del (7q)+8 i (17q)+19 Qualquer outra # Dupla Qualquer Outra	# Única Del (3q)-7 # Dupla Incl. -7/7q- # Complexo 3 Anormalidades	# Complexo > 3 anormalidades

Valores de Escore	Citogenética	Muito Bom 0	Bom 1	Intermediário 2	Pobre 3	Muito Pobre 4
	Blastos MO(%)	≤2% 0	>2 a <5% 1	5 a 10% 2	>10% 3	
	Hemoglobina (g/dL)	≥10 0	8 a <10 1	<8 1,5		
	Neutrófilos (cél/mm ³)	≥800 0	<800 0,5			
	Plaquetas (cél/mm ³)	≥ 100 0	50 a <100 0,5	≤50 1		

Escore	Categoria de Risco	Sobrevida (mediana em anos)
≤1,5	Muito Baixo	8,8 (7,8-9,9)
>1,5 – 3	Baixo	5,3 (5,1 -5,7)
>3 – 4,5	Intermediário	3,0 (2,7 – 3,3)
>4,5 – 6	Alto	1,6 (1,5 – 1,7)
>6	Muito Alto	0,8 (0,7-0,8)

Fonte: Adaptado de Greenberg et al. (2012)

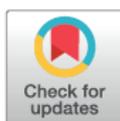
RESEARCH ARTICLE

Myelodysplastic syndrome patients present more severe respiratory muscle impairment and reduced forced vital capacity: Is disordered inflammatory signaling the culprit?

Bruno Memória Okubo^{1,2}, Anacélia Gomes de Matos^{1,2}, Howard Lopes Ribeiro Junior¹, Daniela de Paula Borges^{1,2}, Roberta Taiane Germano de Oliveira^{1,2}, Marilena Facundo de Castro³, Manoel Ricardo Alves Martins⁴, Romélia Pinheiro Gonçalves³, Pedro Felipe Carvalho Bruin⁴, Ronald Feitosa Pinheiro^{1,2,4}, Sílvia Maria Meira Magalhães^{1,2,4*}

1 Cancer Cytogenomic Laboratory, Federal University of Ceará, Ceará, Brazil, **2** Post-Graduate Program in Medical Science, Federal University of Ceará, Ceará, Brazil, **3** Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceará, Ceará, Brazil, **4** Department of Clinical Medicine, Federal University of Ceará, Ceará, Brazil

* silviamm@ufc.br


 OPEN ACCESS

Citation: Okubo BM, Matos AGd, Ribeiro Junior HL, Borges DdP, Oliveira RTGd, de Castro MF, et al. (2017) Myelodysplastic syndrome patients present more severe respiratory muscle impairment and reduced forced vital capacity: Is disordered inflammatory signaling the culprit? PLoS ONE 12(9): e0184079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184079>

Editor: Ken Mills, Queen's University Belfast, UNITED KINGDOM

Received: November 29, 2016

Accepted: August 17, 2017

Published: September 6, 2017

Copyright: © 2017 Okubo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This study was conducted with partial support from National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) and Foundation for Support of Scientific and Technological Development - Ceará (FUNCAP).

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

Abstract

Background/Objectives

The ageing process is associated with gradual decline in respiratory system performance. Anemia is highly prevalent among older adults and usually associated with adverse outcomes. Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of hematologic malignancies with increasing incidence with age and characterized by anemia and other cytopenias. The main objectives of this study were to evaluate respiratory muscle strength and lung function in elderly patients with anemia, compare data between myelodysplastic syndromes and non-clonal anemias and evaluate the influence of serum IL-8 level and NF- κ B activity on deteriorate pulmonary function in this specific population.

Participants

Individuals aged 60 and older with anemia secondary to MDS, non-clonal anemia and healthy elderly individuals.

Measurements

Forced expiratory volume in 1 second (FEV₁), forced vital capacity (FVC), and FEV₁/FVC ratio were measured by spirometry. Respiratory muscle strength was evaluated by maximal static respiratory pressures measurement. IL-8 analysis was performed by ELISA and activity of NF- κ B by chemiluminescent assay.

Results

Mean Hb concentration was comparable between patients with anemia. Significant differences were detected between all patients with anemia and controls for maximum-effort



SHORT COMMUNICATION

Interleukin-8 and nuclear factor kappa B are increased and positively correlated in myelodysplastic syndrome

Anacélia Gomes de Matos^{1,2,5} · Howard Lopes Ribeiro Junior^{1,2,5} · Daniela de Paula Borges^{1,2,5} · Bruno Memória Okubo^{1,2} · Juliana Cordeiro de Sousa^{1,2} · Maritza Cavalcante Barbosa⁴ · Marilena Facundo de Castro⁴ · Romélia Pinheiro Gonçalves⁴ · Ronald Feitosa Pinheiro^{1,2,3,5} · Sílvia Maria Meira Magalhães^{1,2,3,5}

Received: 14 July 2017 / Accepted: 9 August 2017
 © Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract The pathogenesis of myelodysplastic syndromes (MDS) is complex and depends on the interaction between aberrant hematopoietic cells and their microenvironment, probably including aberrations in cytokines and their signaling pathways. To evaluate interleukin-8 (IL-8) plasma levels and nuclear factor kappa B (NF- κ B) in patients with MDS and to test possible correlation between IL-8 and NF- κ B, a total of 45 individuals were analyzed: 25 consecutive adult de novo MDS patients and 20 sex and age-matched healthy elderly volunteers. IL-8 analysis was performed by ELISA and activity of NF- κ B by chemiluminescent assay. MDS patients showed higher level of IL-8 when compared to controls ($p = 0.006$). Patients aged 75 and above showed even higher levels ($p = 0.035$). NF- κ B activity was significantly elevated in MDS patients when compared to controls ($p < 0.0001$) and higher in patients older than 75 years ($p = 0.047$). NF- κ B activity was associated with higher serum ferritin ($p = 0.042$) and higher percentage of blasts ($p = 0.028$). A significant positive correlation

between IL-8 and NF- κ B was demonstrated ($r = 0.480$; $p = 0.015$). Many pathways involved in pathophysiology of MDS have been recently described, suggesting that an inflammatory process may act as a pathogenic driver. In this study, significantly elevated levels of IL-8 and NF- κ B were demonstrated in MDS patients, with positive association of NF- κ B with some markers of poor prognosis. A positive correlation between IL-8 and NF- κ B suggests they cooperate as part of a complex networking of immune and inflammatory factors involved in MDS.

Keywords Interleukin-8 (IL-8) · Nuclear factor kappa B (NF- κ B) · Proinflammatory cytokine · Myelodysplastic syndrome

Introduction

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of hematopoietic stem cell disorders clinically characterized by peripheral cytopenias due to ineffective hematopoiesis and by high risk of progression to acute myeloid leukemia (AML) [1]. It is considered a disease of older people as median age at diagnosis range from 70 to 75 years. In Brazil, there is a slight predominance of female with mean age of 65 years at diagnosis and high prevalence of lower-risk disease [2, 3]. Similar characteristics were recently reported in a Latin American series of 1080 patients [4].

The pathogenesis of MDS is complex and multifactorial and depends on the interaction between aberrant hematopoietic cells and their microenvironment. It is well established that chronic inflammation underpins the development of a number of human cancers. In MDS, many unraveled specific pathways involved in its

✉ Ronald Feitosa Pinheiro
 ronaldfpinheiro@uol.com.br; ronaldpinheiro@pq.cnpq.br

¹ Cancer Cytogenomic Laboratory, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

² Post-graduate Program in Medical Science, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

³ Department of Clinical Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

⁴ Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

⁵ Center for Research and Drug Development (NPDM), Federal University of Ceará, R. Coronel Nunes de Melo, 1000 - 2º andar, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE CEP 60430-275, Brazil