



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

ROBERTA TAIANE GERMANO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS DNA POLIMERASES COM ATIVIDADE
TRANSLEÇÃO EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME
MIELODISPLÁSICA**

FORTALEZA

2018

ROBERTA TAIANE GERMANO DE OLIVEIRA

ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS DNA POLIMERASES COM ATIVIDADE
TRANSLAÇÃO EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

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

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA

2018

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)

- O51a Oliveira, Roberta Taiane Germano de.
ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS DNA POLIMERASES COM ATIVIDADE TRANSLESÃO
EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA / Roberta Taiane Germano de
Oliveira. – 2018.
114 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.
1. Síndrome Mielodisplásica. 2. Tolerância a danos no DNA. 3. Síntese Translesão. 4. Expressão
Gênica. I. Título.

CDD 610

*Dedico este trabalho aos três pilares da minha vida: meu pai-vovô,
Júlio; minha avó, Antônia, mulher forte e decidida e minha mãe,
Jacira, que além de mãe é uma grande amiga.*

AGRADECIMENTOS

Há 7 anos o sonho de ingressar na Universidade pública estava se realizando. Com muito esforço e dedicação consegui alcançar um dos meus maiores objetivos e agora me vejo finalizando mais uma etapa. Chego ao fim desta jornada com a sensação de dever cumprido e com muito mais sonhos, os quais pude construir aqui dentro. Mas essa etapa só pode se tornar possível graças à incalculável ajuda de muitas pessoas, que, de alguma forma contribuíram para isto.

Primeiramente, agradeço a **Deus** por ter colocado em meu caminho todas essas pessoas para que me ajudassem a seguir da melhor forma possível. Agradeço imensamente à minha família, por ter grande influência na pessoa que me tornei. Por me mostrar que a cada dia surge uma nova dificuldade para driblar, mas que é isso que faz de nós quem somos e que constrói todos os nossos valores. Por me mostrar que não importa de onde vim, mas aonde quero chegar e por estarem ao meu lado nessa chegada.

Com um grande carinho, agradeço às minhas irmãs, **Natalia e Taline**. Por passarem pelas dificuldades da vida de mãos dadas comigo, por serem para mim exemplos de mulheres fortes, cada uma ao seu modo. Obrigada, Taline por me salvar várias vezes durante o recreio na escola, se não fosse você talvez eu não estivesse viva pra chegar até aqui hahaahha. Obrigada Natalia por estar sempre disponível a nos ajudar nas emergências do dia a dia, você nasceu com o dom da enfermagem e desejo muito que consiga alcançar esse sonho. Eu as amo imensamente.

Ao meu tio, **Pe. Julio**, por sempre ter sido para mim uma inspiração. Um grande exemplo de homem, militante e servo de Deus.

A meus avós, **Julio e Antonia**, por serem meus segundos pais. Por terem me criado de uma forma simples, mas singela. À minha avó por ter tido mão de ferro nas horas em que era preciso, por me deixar na escola todos os dias, por me apoiar quando minha mãe não apoia (risos). Ao meu avô, por ser meu tudo. Por fazer meu café da manhã antes de ir à escola, pelo esforço que sempre fez para continuar trabalhando e nos trazer o pão de cada dia, assim como o dinheiro das minhas passagens para ir à faculdade durante minha graduação... Eu realmente os amo de todo meu coração.

À minha mãe, **Jacira**, por ser para mim o maior exemplo de uma mulher guerreira e batalhadora. Pelo seu apoio incondicional durante minha trajetória de vida, sendo diversas vezes meu alicerce e por sempre ter se esforçado para me educar, me ensinando as tarefinhas de casa todos os dias, mesmo que não tenha conseguido terminar o ensino fundamental... Por todo amor que tem por mim. Obrigada mãe por seus ensinamentos e esforço sem medida. Eu a amo incondicionalmente. Sem você nada disso seria possível.

Aos meus amigos de infância, **Romichele, Ronaldo, Roldinei, Nayara e Maxwell**, por estarem presentes durante grande parte dos passos dados para a realização deste sonho e por sempre me apoiarem e darem forças para dar mais um passo. Em especial a **Romichele** e a **Nayara**, por me darem todo o suporte que eu precisava nos maiores momentos de dificuldade, por sempre me encorajarem a ser melhor do que eu posso ser e simplesmente por fazerem parte da minha vida. Vocês são a família que Deus me permitiu escolher.

Ao **Lucas Bayde**, com todo carinho, por ser um grande companheiro. Obrigada por todo o suporte que tem me proporcionado e por conseguir lidar com minhas chatices e reclamações do dia a dia, rrsrs. O seu apoio foi um dos grandes catalisadores nessa jornada.

À **Dona Layre e Sr. Asdrubal**, pelo carinho que tem por mim e por todo o suporte que me dão desde que os conheci. Agradeço à vida pela oportunidade de ter conhecido pessoas tão bondosas.

Aos meus amigos da UNILAB, **Tatyane, Sarah, Lívia, Davino, Camila, Julie, Henrique, Fernanda, Débora e Simone**, meu muito obrigada pelo companheirismo e ajuda no dia a dia. O apoio de vocês torna meus dias mais leves e me dá forças pra continuar superando os obstáculos. Vocês são grandes profissionais e pessoas incríveis.

Aos profissionais e estudantes do Laboratorio de Citogenômica do Câncer, **Mayara, Manu, Sharlene, Wesley, Gabi, Cris, Rinna, Mayumi, Bruna, Caio, Victor, Breno, Camila, Letícia, Larissa, Saulo, Arthur, Kezia e Daniel**, muito obrigada pelo companheirismo do dia a dia e por estarem presentes nessa jornada auxiliando sempre que eu preciso. Acreditem, você são um suporte e tanto. Em especial a **Izabelle, Marília e Daniela**, que estão nesse barco comigo desde o início. Superamos muitas dificuldades juntas e é gratificante perceber como nossa amizade se fortaleceu após essas batalhas.

Agradeço especialmente ao meu amigo e eterno IC, **Gabriel**, pelo apoio sem limites durante o Mestrado. Tenho certeza que o caminho teria sido muito mais difícil você. Obrigada por sua ajuda durante as noites de experimentos e por aguentar meus desesperos e angústias. Estou muito orgulhosa do pesquisador que você está se tornando e muito feliz em ver como vem amadurecendo mais a cada dia.

A meu orientador, **Prof. Dr. Ronald**, por acreditar no meu potencial e ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, sendo um grande orientador acadêmico. Muito obrigada por ter me repassado e continuar repassando tantos ensinamentos, tanto academicamente quanto pessoalmente. Sua vontade de fazer pesquisa séria, honesta e de qualidade (não seja uma pessoa medíocre, hahaha), atrelada à sua vontade de melhorar a vida dos pacientes com SMD me mostrou que é esse caminho que quero seguir. E no fim de 8 anos de convivência diária, encontrei um defeito: ele é fortalezense roxo.

Com um carinho especial, ao meu amigo **Howard**, por ser minha inspiração acadêmica. Por sempre ter me aconselhado, incentivado e orientado durante a graduação e o Mestrado. Por sempre me expor meus erros e me incentivar a melhorar e por acreditar no meu potencial. Muito obrigada pelos conselhos e orientações até aqui, você tem grande influência na minha vida acadêmica.

Um agradecimento muito especial **aos pacientes diagnosticados com Síndrome Mielodisplásica**, que contribuem para o avanço do conhecimento da doença e nos permitem realizar nossas pesquisas através da doação de suas amostras.

Aos participantes da banca, por terem aceitado avaliar este trabalho e disponibilizado um pouco do seu tempo, engrandecendo o mesmo com suas considerações.

À **Ivone** e à **Rita**, pela enorme paciência durante esses dois anos e por estarem sempre dispostas a resolver os problemas da melhor forma possível.

Ao **CNPq** e à **CAPES** pelo apoio financeiro a essa pesquisa.

À **Universidade Federal do Ceará**, pela oportunidade de fazer o Mestrado e por todo apoio financeiro concedido durante esses anos.

Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas.

Carl Sagan

RESUMO

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são um grupo de doenças clonais das células precursoras hematopoéticas caracterizadas por citopenias, displasias de uma ou mais linhagens celulares, hematopoese ineficaz e risco de progressão para leucemia mieloide aguda. É a doença da medula óssea mais comum em idosos acima de 60 anos, com incidência de até 80 casos/100 mil habitantes/ano. A patogênese da SMD envolve alterações citogenéticas e/ou mutações gênicas em até 80% dos casos e acredita-se que estas alterações sejam decorrentes de lesões no DNA, após exposição a agentes endógenos, exógenos/ambientais, físicos, químicos e biológicos, que causam instabilidade genômica. As células dispõem de mecanismos de reparo do DNA que atuam nas lesões de fita simples e lesões de fita dupla e mecanismos de tolerância a danos que agem quando essas lesões não podem ser reparadas. A tolerância a danos no DNA é realizada por DNA polimerases com atividade translesão (TLS), as quais tem a capacidade de transpassar as lesões ou corrigir o DNA lesionado, porém, neste processo, podem gerar mutações pontuais e instabilidade genômica. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica das enzimas DNA polimerases com atividade TLS (*POLH*, *POLK*, *POLL*, *REV3L*, *POLN*, *POLQ*, *POLI*, *REVI* e *PCNA*) em pacientes portadores de SMD, associando os achados com alterações cromossômicas, variáveis clínico-laboratoriais e à sobrevida dos pacientes, buscando novos biomarcadores e/ou possíveis alvos terapêuticos para a SMD. Foram avaliados 86 pacientes com SMD diagnosticados em hospital terciário de referência e 06 voluntários saudáveis como controles. O estudo citogenético foi realizado por Banda-G e para análise da expressão gênica utilizou-se a metodologia de PCR em tempo real (RT-qPCR). Identificamos que pacientes com hemoglobina inferior a 8g/dL apresentaram diminuição da expressão dos genes *PCNA* e *POLL*, bem como pacientes com Hb 8-10 g/dL apresentaram menor expressão dos genes *REV3L* e *PCNA*. A expressão do *PCNA* encontra-se diminuída, também, em pacientes com duas displasias na medula óssea e os níveis de expressão do gene *POLL* encontram-se diminuídos em pacientes com 2 ou 3 citopenias no sangue periférico. Com relação à celularidade da medula óssea, pacientes com medula hiperclular apresentaram diminuição da expressão dos genes *REV3L*, *POLK* e *POLQ* quando comparados com medula normocelular. *REV3L* também apresentou menor expressão em medula hipocelular frente a normocelular. Pacientes agrupados na categoria de risco intermediário e muito alto + alto apresentaram menor expressão do gene *PCNA* frente a categoria muito baixo + baixo. Com relação a classificação da OMS, pacientes dos subtipos AREB I e AREB II apresentaram menor expressão do gene *POLN* quando comparados com subtipo ARSA e pacientes do subtipo AREB II apresentaram menor expressão quando comparados com o subtipo CRDM. Adicionalmente, pacientes que evoluíram para LMA também apresentaram diminuição da expressão de *POLN* e *POLQ*. *REV3L*, *POLQ* e *POLK* apresentaram aumento de expressão nos pacientes com SMD frente ao grupo controle. *REV3L* também demonstrou-se com aumento de expressão em pacientes com cariótipo alterado quando comparado com cariótipo normal. Observou-se aumento de expressão do gene *POLL* em pacientes com duas displasias e pacientes com 1-14% de sideroblastos em anel, bem como pacientes que fizeram tratamento com eritropoetina (EPO). O gene *POLH* também apresentou aumento de expressão em pacientes em uso de EPO, enquanto que *REVI* estava com expressão aumentada em pacientes que não responderam ao tratamento com EPO. Esta pesquisa proporcionou associações clínicas significantes com relação a expressão dos genes *REV3L*, *POLH*, *POLK*, *POLQ*, *POLN*, *POLL*, *POLI*, *REVI* e *PCNA*, demonstrando que esses genes podem estar envolvidos na patogênese e evolução da doença.

Palavras-chave: Síndrome Mielodisplásica. Tolerância a danos no DNA. Síntese Translesão. Expressão Gênica

ABSTRACT

Myelodysplastic Syndromes (MDS) are a group of clonal diseases of hematopoietic precursor cells characterized by cytopenias, dysplasias of one or more cell lineages, ineffective hematopoiesis and risk of progression to acute myeloid leukemia. It is the most common bone marrow disease in the elderly over 60 years old, with an incidence of 80 cases per 100.000 per year. The MDS pathogenesis involves cytogenetic alterations and/or gene mutations in up to 80% of the cases, these alterations may be due to DNA damage after exposure to endogenous, exogenous/environmental, physical or chemical agents that causes genomic instability. The cells have a DNA repair mechanism that acts on single-strand and double-strand breaks and mechanisms of tolerance to injury that act when those lesions cannot be repaired. DNA damage tolerance is carried out by DNA polymerases with translesion activity (TLS), which have the capacity to bypass or correct DNA damage but may lead to point mutations and genomic instability during the process. Mutations and alterations in TLS polymerases expression have been associated with the development and progression of several neoplasias, therefore, this study aimed to evaluate the gene expression of DNA polymerases with TLS activity (*POLH*, *POLK*, *POLL*, *REV3L*, *POLN*, *POLQ*, *POLI*, *POLN* and *REVI*) in patients with MDS, associating with chromosomal alterations, clinical-laboratory variables and overall survival, searching for new biomarkers and/or possible therapeutic targets for MDS. We evaluated 86 patients diagnosed with MDS in HUWC and 06 healthy volunteers as controls. The cytogenetic was performed by G-Band and gene expression was evaluated using the real-time PCR methodology (qRT-PCR). We identified that patients with hemoglobin below 8g/dL had lower expression of the *PCNA* and *POLL*, as well as patients with Hb 8-10 g/dL for *REV3L* and *PCNA*. The *PCNA* expression is also decreased in patients with two bone marrow dysplasias, and the expression levels of *POLL* are decreased in patients with 2 or 3 cytopenias. Regarding the bone marrow cellularity, patients with hypercellular bone marrow presented lower expression of *REV3L*, *POLK* and *POLQ* when compared with normocellular bone marrow. *REV3L* also had lower expression in patients with hypocellular bone marrow compared to normocellular bone marrow. Patients grouped in the category of intermediate and very high + high risk presented lower expression of *PCNA* compared to very low + low category. Regarding WHO classification, patients classified as RAEB I and RAEB II had lower expression of the *POLN* when compared to RASA and RAEB II patients also presented a lower expression when compared to the RCMD. In addition, patients who progressed to AML had decreased expression of *POLN* and *POLQ*. *REV3L*, *POLQ* and *POLK* expression was higher in MDS patients when compared to the healthy control group. *REV3L* also had higher expression in patients with abnormal karyotype when compared to normal karyotype. Overexpression of the *POLL* was observed in patients with two dysplasias and patients with 1-14% ring sideroblasts, as well as patients treated with erythropoietin (EPO). The *POLH* also showed increased expression in patients treated with EPO, while *REVI* expression was increased in patients who did not respond to EPO treatment. This study provided significant clinical associations regarding the expression of *REV3L*, *POLH*, *POLK*, *POLQ*, *POLN*, *POLL*, *POLI*, *REVI* and *PCNA*, demonstrating that these genes may be involved in the pathogenesis and evolution of the disease.

Keywords: Myelodysplastic Syndromes. Tolerance to DNA damage. Translesion Mechanism. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Dados globais da incidência de síndrome mielodisplásica.	19
Figura 2: Representação esquemática sobre a patogênese e evolução da Síndrome Mielodisplásica.	23
Figura 3: Evolução na classificação clínica e estratificação prognóstica da síndrome mielodisplásica.	25
Figura 4: Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R	26
Figura 5: Representação esquemática dos mecanismos de reparo e tolerância a danos no DNA	32
Figura 6: Representação esquemática da ativação do mecanismo translesão	36
Figura 7: Representação esquemática do mecanismo de tolerância a danos no DNA através da síntese translesão e sua implicação na carcinogênese	37
Figura 8: Representação esquemática da metodologia de citogenética clássica por Banda-G.	49
Figura 9: Representação esquemática da metodologia de qPCR.	53
Figura 10: Fluxograma representando o delineamento experimental do estudo.	57
Figura 11: Representação dos resultados citogenéticos encontrados a partir de amostras de medula óssea de pacientes com SMD	65
Figura 12: Nível de expressão dos genes <i>REV3L</i> , <i>POLK</i> e <i>POLQ</i> em pacientes com SMD frente aos controles saudáveis	68
Figura 13: Nível de expressão dos genes, <i>POLL</i> , <i>PCNA</i> e <i>REV3L</i> em pacientes com SMD frente à Hemoglobina categorizada pelo IPSS-R	70
Figura 14: Nível de expressão dos genes, <i>POLL</i> e <i>PCNA</i> em pacientes com SMD frente à presença de citopenias no sangue periférico.	72
Figura 15: Nível de expressão dos genes <i>POLL</i> e <i>PCNA</i> em pacientes com SMD frente à de displasias na medula óssea.	73
Figura 16: Nível de expressão do gene <i>POLL</i> em pacientes com SMD frente as faixas de porcentagens de Sideroblastos em anel.	74
Figura 17: Nível de expressão do gene <i>REV3L</i> , <i>POLQ</i> e <i>POLK</i> em pacientes com SMD frente a celularidade da medula óssea.	75
Figura 18: Nível de expressão do gene <i>REV3L</i> e <i>POLQ</i> em pacientes com SMD frente a variável cariótipo normal e alterado	76

Figura 19: Nível de expressão do gene <i>POLN</i> em pacientes com SMD frente a categorização em subtipos da OMS 2008	78
Figura 20: Nível de expressão do gene <i>PCNA</i> em pacientes com SMD frente a categorização do IPSS-R	79
Figura 21: Nível de expressão do gene <i>POLI</i> em pacientes com SMD frente a dependência transfusional.	80
Figura 22: Nível de expressão dos genes <i>POLN</i> e <i>POLQ</i> em pacientes com SMD frente a evolução para LMA	80
Figura 23: Análise de associação entre o nível de expressão do gene <i>POLL</i> e a sobrevida dos pacientes com SMD	82
Figura 24: Análise de associação entre o nível de expressão do gene <i>PCNA</i> e a sobrevida dos pacientes com SMD	82
Figura 25: Resultados nos níveis de expressão dos genes <i>REV3L</i> , <i>POLK</i> , <i>POLQ</i> , <i>POLL</i> , <i>POLI</i> , <i>POLN</i> , <i>POLH</i> , <i>REVI</i> e <i>PCNA</i> em pacientes com SMD	83
Figura 26: Resultados encontrados nos níveis de expressão dos genes <i>REV3L</i> , <i>POLK</i> , <i>POLQ</i> , <i>POLL</i> , <i>POLI</i> , <i>POLN</i> , <i>POLH</i> , <i>REVI</i> e <i>PCNA</i> em pacientes com SMD	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação clínica da SMD segundo critérios da OMS 2008	26
Tabela 2: Classificação clínica da SMD segundo os critérios da OMS 2016	26
Tabela 3: Sondas utilizadas na reação de qRT-PCR.	51
Tabela 4: Caracterização descritiva das variáveis sócio-demográficas dos pacientes com SMD.	58
Tabela 5: Estratificação clínica dos pacientes pela classificação da OMS 2008.	59
Tabela 6: Frequência das variáveis clínicas relacionadas aos achados da medula óssea em pacientes com SMD.	60
Tabela 7: Frequência dos resultados citogenéticos e seu impacto prognóstico em pacientes com SMD ao diagnóstico.	61
Tabela 8: Descrição clínica dos pacientes com SMD incluídos no estudo.	62
Tabela 9: Frequência das variáveis clínico-laboratoriais relacionadas aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD	66
Tabela 10: Frequência das variáveis associadas aos grupos de risco dos pacientes com SMD ao diagnóstico.	66
Tabela 11: Frequência das escolhas terapêuticas e evolução clínica dos pacientes com SMD	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ANC	<i>Contagem absoluta de neutrófilos</i>
AR	<i>Anemia refratária</i>
AREB I	<i>Anemia refratária com excesso de blastos tipo I</i>
AREB II	<i>Anemia refratária com excesso de blastos tipo II</i>
ARSA	<i>Anemia refratária com sideroblastos em anel</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutada</i>
B2M	<i>β2-microglobulina</i>
BER	<i>Base excision repair</i>
BRCT	<i>BRCA1 C terminal</i>
cDNA	<i>DNA complementar</i>
CPH	<i>Células progenitoras hematopoiéticas</i>
Cq	<i>Quantification cycle</i>
CRDM	<i>Citopenia refratária com displasia multilinear</i>
CRDU	<i>Citopenia refratária com displasia unilinhagem</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>
DDT	<i>DNA damage tolerance</i>
dNTP	<i>Desoxirribonucleotídeo trifosfato</i>
FAB	<i>Franco-Americano-Britânica</i>
FISH	<i>Hibridização in situ por fluorescência</i>
FRA6F	<i>Sítio frágil localizado no cromossomo 6</i>
GAPDH	<i>Gliceraldeído fosfato desidrogenase</i>
Hb	<i>Hemoglobina</i>
HR	<i>Recombinação homóloga</i>
HUWC	<i>Hospital Universitário Walter Cantídio</i>
IPSS	<i>Índice prognostic score system</i>
KCl	<i>Cloreto de potássio</i>
LMA	<i>Leucemia mieloide aguda</i>
MMR	<i>Reparo de erros de emparelhamento de bases</i>
MO	<i>Medula óssea</i>
mRNA	<i>RNA mensageiro</i>
NER	<i>Reparo por excisão de nucleotídeos</i>

NHEJ	<i>Junção por extremidades não-homólogas</i>
NR	<i>Neutropenia refratária</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
PCNA	<i>Antígeno nuclear de proliferação celular</i>
PCR	<i>Reação em cadeia da polimerase</i>
POLH	<i>DNA polymerase eta</i>
POLI	<i>DNA polymerase iota</i>
POLK	<i>DNA polymerase kappa</i>
POLL	<i>DNA polymerase lambda</i>
POLN	<i>DNA polymerase nu</i>
POLQ	<i>DNA polymerase theta</i>
POLZ	<i>DNA polymerase zeta</i>
qPCR	<i>Reação em cadeia da polimerase quantitativa</i>
RAD18	<i>E3 ubiquitin-protein ligase</i>
REF	<i>Referência</i>
REV1	<i>DNA directed polymerase</i>
REV3L	<i>DNA directed polymerase zeta catalytic subunit</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SEER	<i>Surveillance, epidemiology and end Results</i>
SF3B1	<i>Splicing factor 3b subunit 1</i>
SMD	<i>Síndrome mielodisplásica</i>
TdT	<i>Transferase deoxinucleotídica terminal</i>
TLS	<i>Translesão</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
UBC	<i>Ubiquitina C</i>
ub-PCNA	<i>Antígeno nuclear de proliferação celular ubiquitinado</i>
UBZ	<i>Domínio de ligação à ubiquitina</i>
WPSS	<i>WHO Classification-Based Prognostic Scoring System</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Aspectos gerais da síndrome mielodisplásica	17
1.2	Epidemiologia	17
1.3	Etiologia	20
1.4	Mecanismos de patogênese da síndrome mielodisplásica	20
1.5	Citogenética e alterações moleculares na patogênese da SMD	24
1.6	Classificação clínica da síndrome mielodisplásica	25
1.7	Estratificação prognóstica da síndrome mielodisplásica	27
1.8	Lesões ao DNA e mecanismos de resposta aos danos	29
1.9	Mecanismos de reparo do DNA	30
1.10	Mecanismos de tolerância a danos no DNA: Síntese Translesão	33
1.10.1	Baixa fidelidade do mecanismo TLS: indução de mutações	35
1.10.2	Famílias de DNA Polimerases	38
1.10.2.1	<i>Família A: DNA Polimerases TLS θ (POLQ) e ν (POLN)</i>	38
1.10.2.2	<i>Família B: DNA Polimerase TLS ζ (POLZ)</i>	41
1.10.2.3	<i>Família X: DNA polimerases TLS λ (POLL) e μ (POLM)</i>	42
1.10.2.4	<i>Família Y: DNA Polimerases TLS η (POLH), κ (POLK), ι (POLI) e REVI</i>	42
2	OBJETIVOS	47
2.1	Objetivo Geral	47
2.2	Objetivos Específicos	47
3	METODOLOGIA	48
3.1	Aspectos éticos da Pesquisa	48
3.2	Obtenção das amostras de células de medula óssea	48
3.3	Cariótipo por bandeamento-G	49
3.4	Análise de expressão gênica por RT-qPCR	50
3.4.1	Extração de RNA Total	50
3.4.3	Síntese de cDNA	50
3.4.3	RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)	51
3.5	Variáveis analisadas	54
3.6	Análises Estatísticas	55
3.6.1	Análise estatística para avaliação dos dados de expressão gênica	55
3.6.2	Análise estatística para a avaliação da associação dos resultados de expressão dos genes avaliados com a sobrevida dos pacientes com SMD	56
4	RESULTADOS	58
4.1	Caracterização dos pacientes	58
4.2	Análise do nível de expressão gênica por RT-qPCR em amostras de	67

	medula óssea de pacientes com SMD	
4.2.1	Expressão gênica das polimerases TLS em pacientes com SMD e indivíduos saudáveis	68
4.2.2	Expressão gênica das polimerases TLS frente às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD	69
4.2.2.1	<i>Achados de sangue periférico</i>	69
4.2.2.2	<i>Achados medulares</i>	72
4.2.2.3	<i>Achados citogenéticos</i>	76
4.3	Expressão gênica das polimerases TLS na classificação clínica e estratificação prognóstica dos pacientes com SMD.	77
4.3.1	Classificação WHO 2008	77
4.3.2	Classificação dos grupos de risco de acordo com o IPSS-R	78
4.4	Expressão gênica das polimerases TLS em pacientes dependentes de transfusão	79
4.5	Expressão gênica das polimerases TLS na progressão e evolução da doença.	80
4.6	Análise de sobrevida dos pacientes com SMD em relação aos níveis de expressão das enzimas DNA polimerases com atividade TLS	81
4.7	Representação esquemática dos resultados da análise de expressão gênica em pacientes com SMD	83
5	DISCUSSÃO	84
5.1	Aumento da expressão dos genes <i>POLQ</i> , <i>REV3L</i> e <i>POLK</i> em pacientes com SMD	84
5.2	Aumento da expressão de <i>REV3L</i> e <i>POLQ</i> em pacientes com cariótipo alterado	
5.3	Diminuição da expressão dos genes <i>POLL</i> e <i>PCNA</i> em pacientes com anemia grave	86
5.4	Diminuição da expressão do gene <i>POLN</i> nos subtipos de alto risco (AREB I e AREB II) e na evolução para LMA	88
6	CONCLUSÕES	93
7	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	94
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
	APÊNDICE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da Síndrome Mielodisplásica

A classificação de tumores de tecidos hematopoéticos e linfóides da Organização Mundial da Saúde (OMS) define a Síndrome Mielodisplásica (SMD) como um grupo heterogêneo de doenças clonais das células progenitoras hematopoiéticas (CPH) caracterizadas por distúrbios de diferenciação e maturação celular que acarretam displasias em uma ou mais linhagens celulares, citopenia(s) no sangue periférico, medula óssea (MO) hipercelular e risco de evolução para Leucemia Mieloide Aguda (LMA) em 30% a 40% dos casos (SWERDLOW et al, 2016).

A fisiopatologia da doença compreende múltiplos estágios e pode acometer diversas vias de sinalização, sendo a grande heterogeneidade dos fenótipos da SMD o que a torna uma das doenças mais desafiantes da oncohematologia. Seu curso clínico pode ser dividido em duas fases distintas, alto risco e baixo risco de progressão para LMA, tendo como principais critérios o número de linhagens celulares displásicas e a porcentagem de blastos na medula óssea (VARDIMAN et al, 2008; BEJAR, 2014).

Recentemente foram feitos diversos avanços significativos no que tange às pesquisas moleculares, como a incorporação de mutações no gene *Splicing factor 3b subunit 1 (SF3B1)* no algoritmo de diagnóstico do subtipo Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA), posteriormente denominado SMD com sideroblastos em anel (SMD-AS). No entanto, o fenótipo clínico dos indivíduos afetados tende a ter grande variação, consequentemente o diagnóstico da SMD ainda é baseado em critérios clínicos e morfológicos (VARDIMAN et al, 2008; BEJAR, 2014; SHAHRABI et al, 2016). Por conseguinte, a busca por marcadores moleculares que possam auxiliar na classificação, estratificação de risco, prognóstico e decisão terapêutica vem sendo prioridade nas pesquisas relacionadas à esta doença.

1.2 Epidemiologia

Embora a SMD seja cada vez mais diagnosticada, ainda são escassos dados precisos sobre sua prevalência e incidência. Estudos populacionais em larga escala, que são necessários para se obter dados verdadeiramente representativos sobre a epidemiologia, não estão disponíveis atualmente devido às dificuldades enfrentadas durante o diagnóstico, manejo clínico e classificação da doença, a qual passou por alterações nos critérios

diagnósticos nos últimos 30 anos (AUL et al, 2001; STROM; VELEZ-BRAVO; ESTEY, 2008).

A SMD está entre as mais comuns das neoplasias hematológicas, acometendo principalmente indivíduos idosos, com aproximadamente 80% dos pacientes possuindo mais 60 anos ao diagnóstico. (STROM; VELEZ-BRAVO; ESTEY, 2008). É rara na infância, compreendendo menos de 5% das neoplasias hematológicas que acometem indivíduos menores de 14 anos de idade (HASLE et al., 2003; NIEMEYER; BAUMANN, 2008). Sabe-se que, independentemente do sexo, apesar de homens terem uma taxa de incidência significativamente maior do que mulheres (4,5 vs 2,7 por 100.000 por ano), há importante aumento na taxa de incidência com o envelhecimento (PFEILSTÖCKER, 2007; ADES et al, 2014; LEE et al, 2016).

O programa SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) de registro de incidência de SMD nos Estados Unidos relatou, com base nos dados coletados de 2001-2003, uma taxa de incidência global de 3,4 casos por 100.000 habitantes, aumentando para 10 em indivíduos de 60-69 anos e para 36,6 naqueles com 85 anos ou mais (ROLLISON et al, 2008; SEKERES, 2010). Dados mais recentes do SEER realizados entre 2007 e 2011 mostram aumento da incidência, com uma taxa de incidência global de 4,9 casos por 100.000 habitantes (COGLE, 2015). Nas pessoas com menos de 40 anos, essa taxa decaiu para 0,14 caso por 100.000 habitantes. Dados alemães revelam uma taxa de prevalência de SMD de 7 casos por 100.000 habitantes (NEUKIRCHEN et al., 2011).

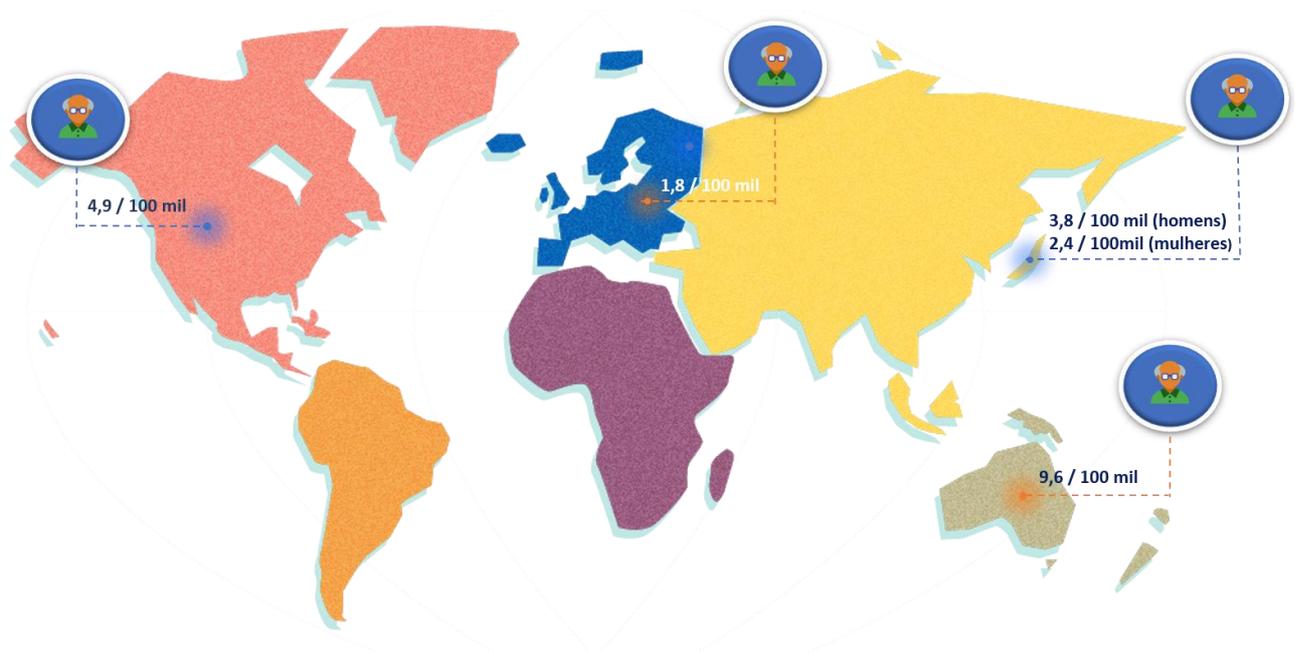
Mesmo existindo dados globais acerca da incidência de SMD em, pelo menos, quatro continentes (América do Norte, Europa, Ásia e Oceania), a América do Sul ainda não conseguiu dispor de dados estatísticos suficientes para definição da incidência da doença (Figura 1) (CHIHARA et al, 2014; VISSER et al, 2012; MCQUILTEN et al, 2013; ROLLISON et al, 2008). Em estudo sul-americano mais recente, envolvendo 1080 pacientes com diagnóstico de SMD *de novo* do Brasil (345), Chile (100) e Argentina (635), foi observado que pacientes chilenos tinham uma menor média de idade (64 anos) ao diagnóstico, predomínio do sexo feminino e maior porcentagem de doentes classificados como de alto risco pelos escores prognósticos (IPSS e IPSS-R), o que lhes conferia menor sobrevida global em relação aos demais grupos. Pacientes argentinos e brasileiros mostraram-se mais semelhantes entre si (BELLI et al., 2015). No entanto, nosso centro da Universidade Federal do Ceará (UFC) apresentou um número bastante significativo de casos do subtipo ARSA.

O primeiro levantamento de SMD no Brasil foi realizado por Magalhães et al (2010). Neste estudo, foi apresentado o Registro Brasileiro de Síndromes Mielodisplásicas – Aspectos

demográficos, clínico-patológicos e terapêuticos em centros de atenção terciária, elaborado com base em um estudo realizado com 476 pacientes com SMD em tratamento em 12 centros das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil, diagnosticados no período de 1º de janeiro de 2003 a 31 de dezembro de 2007 (MAGALHÃES et al., 2010). O estudo demonstrou que a idade mediana do diagnóstico dos pacientes com SMD, no Brasil, é de 68,3 anos, número menor do que o observado nos EUA e Europa, mas muito similar a Japão e Coreia. Destes, 50,8% eram mulheres e 86,6% residentes em zona urbana (MAGALHÃES et al., 2010).

Estimativas acuradas do número de pessoas que vivem com SMD são difíceis de se fazer devido à escassez de registros oficiais de seguimento. Acredita-se, entretanto, que sua incidência seja subestimada principalmente devido à dificuldade no diagnóstico, o que geraria uma baixa notificação dos casos (COGLE et al., 2011; COGLE, 2015).

Figura 1: Dados globais da incidência de Síndrome Mielodisplásica.



Legenda: A taxa de incidência mais recente de SMD que representa a Ásia foi elaborada no Japão em 2008 e relatou 3,8 casos por 100 mil habitantes para homens e 2,4 casos por 100 mil para mulheres. Na Europa, o projeto The Surveillance of Rare Cancers in Europe (RARECARE) publicou, em 2012, a incidência global bruta anual de neoplasias mieloides de 8,6 por 100.000 habitantes, estando a SMD com a incidência de 1,8/100mil. O programa SEER mostrou uma taxa de incidência global de 4,9 casos por 100.000 habitantes. A Oceania, representada pela Austrália, apresentou a maior incidência quando comparada com os outros continentes (9,6 por 100.000).

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.3 Etiologia

A SMD pode não ter causa aparente e apresentar-se como primária ou *de novo* (85% a 90% dos casos), ou secundária ao tratamento com quimioterapia ou radioterapia (10% a 15% dos casos). Estudos epidemiológicos demonstram diversos fatores de risco associados ao desenvolvimento da SMD, como a exposição prolongada ao benzeno e seus derivados, uso prolongado do tabaco, exposição prolongada a agentes químicos agrícolas (pesticidas, herbicidas e fertilizantes) bem como a radiação ionizante (SEKERES, 2010; CHAMSEDDINE et al, 2016; BOWEN et al, 2013; ADES et al, 2014). Embora existam casos raros descritos na literatura de SMD com componente familiar, não foram encontradas correlações significativas da doença como condição hereditária ou congênita. No entanto, algumas doenças congênitas, como a anemia de Fanconi, podem, ocasionalmente, levar ao desenvolvimento da doença (ALTER et al, 2014).

O nítido envelhecimento populacional é o principal fator no aumento da incidência de SMD, uma vez que a idade avançada é o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença e, também, pela maior frequência de indivíduos expostos a tratamentos quimio e/ou radioterápicos. (SOLE, 2005; VASSALO, 2009)

1.4 Mecanismos de Patogênese da Síndrome Mielodisplásica

As causas da SMD são pouco elucidadas e não está claramente definido como a doença progride do estágio inicial para o estágio avançado e/ou para LMA (AGGARWAL et al. 2011). No entanto, o modelo proposto mais aceito para a patogênese da SMD é o modelo de múltiplos passos que engloba alterações funcionais nas células tronco hematopoéticas (CTH) que podem ser causadas pela idade (por exemplo, devido ao encurtamento dos telômeros), pela exposição a agentes genotóxicos ou por alguma condição inflamatória no microambiente medular. Essas alterações funcionais são decorrentes de modificações moleculares, genéticas e epigenéticas e, como consequência, ocasionam imunidade inata desregulada, hematopoese ineficaz e alterações no processo de apoptose, mecanismos de reparo do DNA e maquinaria do ciclo celular. Destaca-se que tais fenômenos podem ser gerados de modo independente ou inter-relacionados (Figura 2) (GARCIA-MANERO et al, 2016; ADES et al, 2014; CHAMSEDDINE et al, 2016).

No modelo de múltiplos passos para a patogênese da SMD, inicialmente, vê-se que condições inflamatórias do microambiente medular decorrente da senescência provocariam

alterações no estroma, citocinas e sistema imune (NAEIM; RAO; GRODY, 2008). Associados a essas alterações, agentes genotóxicos causariam lesão ao DNA das células tronco hematopoiéticas (CTH) levando ao aparecimento de um clone anormal precursor de células hematopoiéticas disfuncionais e morfológicamente displásicas (NAEIM; RAO; GRODY, 2008). O acúmulo dessas lesões em mecanismos, tais como o controle do ciclo celular ou transcrição de genes supressores de tumor podem levar à dominância das CTH anormais (Figura 2).

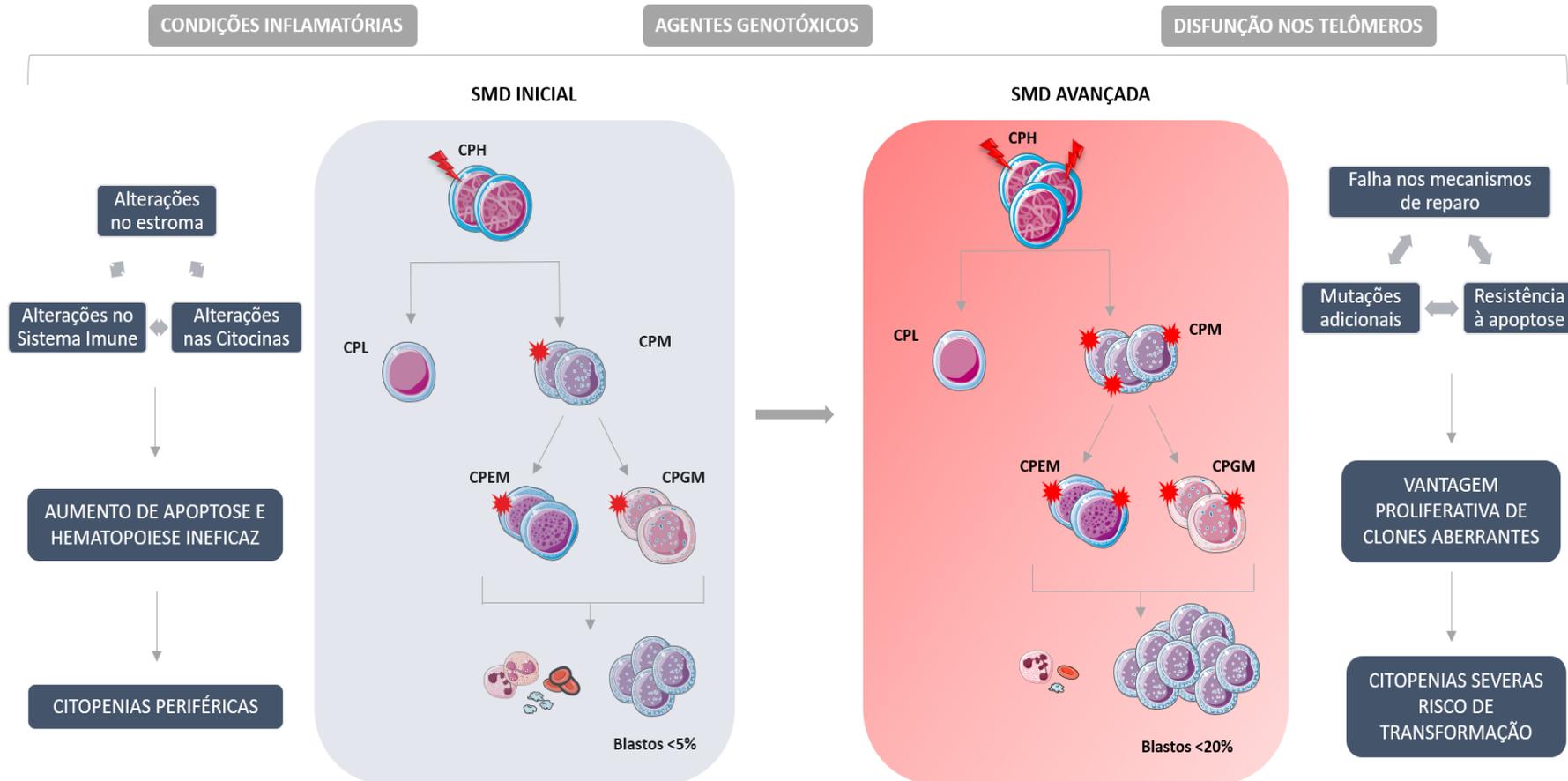
A aquisição de uma ou múltiplas mutações genéticas nas CTH podem causar falhas na diferenciação, enquanto defeitos subsequentes causam o bloqueio da diferenciação, estimulam a proliferação e afetam a susceptibilidade à apoptose de progenitores eritróides e mielóides, causando a expansão do clone anormal. Esse quadro configura a hematopoese ineficaz e o fenótipo clínico característico da doença, que leva a citopenias no sangue periférico apesar da medula óssea hiperclular (OLNEY; LE BEAU, 2002). Quando a SMD evolui para o estágio avançado ocorre a diminuição da apoptose, promovida por falhas nos mecanismos de reparo, pelo bloqueio da diferenciação e o acúmulo de mutações genéticas adicionais no mesmo clone que garantem vantagem proliferativa significativa à população mutante sobre o tipo selvagem, o que pode levar à evolução da doença para LMA (Figura 2).

Embora esse modelo não tenha sido demonstrado em seres humanos, ele se encaixa no fato de que a SMD é uma doença relacionada à idade e a observação de que, dentro do mesmo paciente, o número de anormalidades geralmente aumenta à medida que a doença progride e também pode explicar a variabilidade na duração da doença antes da progressão para LMA.

Aproximadamente, 80% dos pacientes diagnosticados com SMD apresentam pelo menos uma mutação somática e metade dos pacientes podem apresentar alterações cromossômicas (PAPAEMMANUILL et al, 2013). A maioria das alterações somáticas são mutações passageiras, que não têm consequências diretas para a hematopoese. Certas mutações, no entanto, conferem diferenciação anormal, vantagem de sobrevivência à célula mutada e permitem a expansão clonal. A aquisição em série de mutações em um clone expandido pode levar ao fenótipo de SMD e, em alguns casos, evolução para LMA. Apesar de ainda não existir uma alteração patognomônica da doença, as mutações somáticas geralmente identificadas na SMD estão agrupadas em genes que regulam oncogenes e genes supressores de tumor os quais geralmente participam da maquinaria de splicing, regulação epigenética e reparo do DNA (BEJAR et al, 2011; PAPAEMMANUILL et al, 2013; VISCONTE et al, 2014; CHAMSEDDINE et al, 2016).

Na presença de um mecanismo totalmente operante que responda e conserte o dano ao DNA, são poucas as chances de que os dois tipos de mutações, em genes supressores de tumor ou em oncogenes, uma resultando em diferenciação anormal e outra levando ao aumento da proliferação, ocorram dentro da mesma célula. No entanto, essa probabilidade e, portanto, o risco de desenvolver SMD ou LMA, pode aumentar drasticamente quando a maquinaria de reparo é deficiente. Alternativamente, o uso inadequado de um mecanismo de reparo de DNA ou tolerância a danos de baixa fidelidade também pode aumentar o risco de acumular múltiplas mutações no DNA na mesma célula (ZHOU et al, 2015).

Figura 2: Representação esquemática sobre a patogênese e evolução da Síndrome Mielodisplásica.



Legenda: Danos no DNA e alterações epigenéticas são causados pela exposição prolongada a condições inflamatórias, a agentes genotóxicos e/ou disfunção dos telômeros. Tais lesões e alterações tem como consequência mudanças funcionais nas células tronco hematopoéticas (CTH), o que pode levar ao desenvolvimento de SMD. Na SMD inicial, há um aumento da apoptose e hematopoese ineficaz, causadas por alterações no microambiente medular, na secreção de citocinas e no sistema imune inato. Essas mudanças desencadeiam a supressão das células saudáveis, levando à presença de citopenias periféricas. Na SMD avançada, ocorrem falhas nos mecanismos de reparo, mutações adicionais na CTH e, além disso, o clone displásico adquire resistência à apoptose e vantagem proliferativa, o que traz risco aumentado de transformação para LMA. **Abreviações:** CPH: Célula progenitora Hematopoética; CPL: célula precursora linfóide; CPM: célula precursora mielóide; CPEM: Célula Precursora de Eritrócitos e Megacariócitos; CPGM: Célula Precursora de Granulócitos e Monócitos. **Fonte:** Adaptado de Elias et al (2013) e Chamseddine et al (2016).

1.5 Citogenética e alterações moleculares na Patogênese da SMD

A citogenética é a mais importante variável na determinação do prognóstico da SMD (BERNASCONI et al., 2013). Usando o cariótipo convencional (banda-G), aproximadamente 50% dos pacientes com SMD *de novo* e até 80% dos pacientes com SMD secundária apresentam anormalidades. A maioria dessas anormalidades representam eventos genéticos secundários resultantes da instabilidade genômica ao invés de serem parte da patogênese primária, com exceção da del(5q) (LEE et al., 2015). Usando uma coorte de 2902 pacientes diagnosticados com SMD *de novo*, Schanz et al (2012) definiram um novo escore com 5 grupos de prognóstico citogenético (SCHANZ et al., 2012), posteriormente adicionados ao IPSS-R (Índice Internacional de Escore Prognóstico). A Citogenética Molecular pela hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é outra técnica comumente usada para detectar anormalidades cromossômicas quando o cariótipo apresenta menos que 10 metáfases (PINHEIRO et al., 2009). Em um estudo prospectivo de 50 casos de SMD, Pinheiro et al (2009) demonstraram que o benefício adicional da FISH em relação à banda-G era de apenas 10% nos casos que apresentavam número significativo de metáfases (>20 metáfases) (PINHEIRO et al., 2009).

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

Nos últimos anos, diversos estudos importantes têm sido publicados descrevendo uma análise abrangente da incidência e do impacto clínico de múltiplas lesões gênicas na SMD. Em 2011, Bejar e colegas publicaram a primeira análise de 18 genes em 439 pacientes (BEJAR et al, 2011). Recentemente um grupo de pesquisadores europeus (PAPAEMMANUIL et al., 2013) realizou análise de mutação de 111 genes através de técnicas de sequenciamento de última geração em uma coorte de 738 pacientes e encontrou a frequência das mutações mais comuns em portadores de SMD. Esse e outros trabalhos envolvendo centenas de pacientes utilizando conjuntos de mutações genéticas alvo e

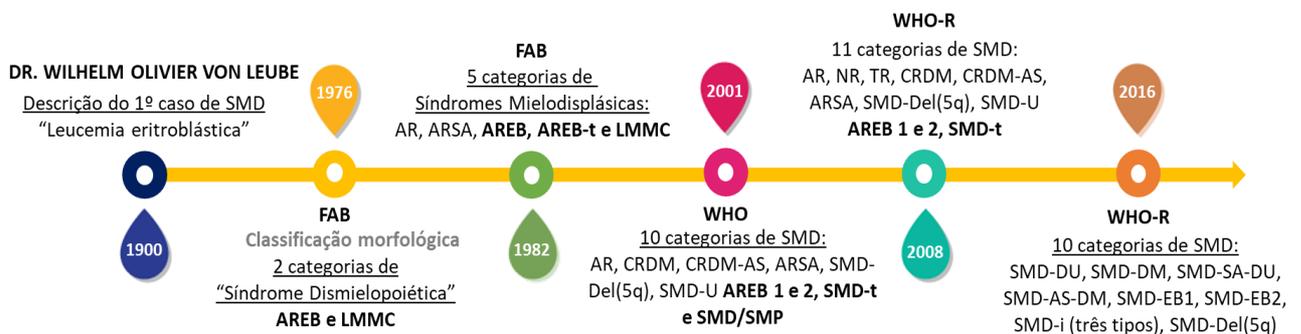
sequenciamento total de genoma (BEJAR et al., 2011 e HAFERLACH et al., 2014) mostram que até 80% dos pacientes com SMD apresentam alguma mutação de interesse, sendo várias delas associadas a impacto prognóstico como se pode ver na tabela 2. Os dados emergentes devem ser não apenas importantes na definição do prognóstico desses pacientes, mas também potencialmente na seleção do tratamento dos mesmos (GARCIA-MANERO,2015).

1.6 Classificação Clínica da Síndrome Mielodisplásica

O termo “Síndrome Mielodisplásica” foi formalmente introduzido em 1982 em uma revisão da classificação Franco-Americano-Britânica (FAB) publicada em 1976 (BENNET et al., 1976). Antes disso, Cole et al, contaram, pelo menos, 16 nomes diferentes que foram usados na literatura para designar distúrbios pré-leucêmicos. Desde então, diversos sistemas de classificação tem sido propostos com o intuito de auxiliar no manejo do paciente, decisão terapêutica, estimar sua sobrevida e risco de transformação para LMA (Figura 3). Esse sistema de classificação foi dominante até os anos 2000 e baseava-se nas linhagens celulares afetadas por displasias e pela porcentagem de blastos no sangue periférico e na medula óssea, assim era um sistema baseado unicamente em critérios morfológicos (Figura 3) (BENNETT et al., 1982; AUL et al, 2011).

No intuito de incluir informações emergentes e aperfeiçoar o valor prognóstico da doença, a OMS sugeriu alterações à classificação FAB. Criada em 2001, revisada em 2008 (SWERDLOW et al., 2008) e atualmente utilizada largamente, a classificação da OMS introduziu características biológicas e genéticas, fazendo uso de toda informação disponível para definir o significado clínico de cada entidade patológica que compunha a Síndrome Mielodisplásica: clínica, morfologia, citoquímica, imunofenotipagem e citogenética (Figura 3) (Tabelas 1 e 2) (SWERDLOW et al, 2016).

Figura 3: Evolução na Classificação Clínica da Síndrome Mielodisplásica



Legenda: A heterogeneidade clínica da SMD teve como consequência a criação de subtipos, inicialmente baseados na morfologia celular proposta pela classificação FAB, que contribuem para melhor entendimento dos fenômenos clínicos e moleculares da doença. Após a classificação FAB, surgiram novas propostas de classificação pela OMS e que passam por atualizações até os dias de hoje.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 1: Classificação clínica da SMD segundo critérios da OMS 2008

SUBTIPO DE SMD	SANGUE PERIFÉRICO	MEDULA ÓSSEA
CRDU (AR, NR, TR)	<1% de Blastos; Uni ou Bicitopenia	<5% de Blastos; Displasia em uma única linhagem
ARSA	Anemia; ausência de blastos	<5% de blastos; ≥15% Sideroblastos em Anel; Displasia apenas eritróide
CRDM	Citopenia(s); Ausência de bastonetes de Auer; <1% de blastos;	Displasia em 2 ou mais linhagens; <5% de blastos; Ausência de bastonetes de Auer
AREB 1	Citopenia(s); Ausência de bastonetes de Auer; <5% de blastos;	Displasia em 1 ou mais linhagens; 5-9% de blastos; Ausência de bastonetes de Auer
AREB 2	Citopenia(s); Pode haver Bastonetes de Auer; 5-19% de blastos	Displasia em 1 ou mais linhagens; 10-19% de blastos; Presença de bastonetes de Auer
SMD inclassificável (SMD-i)	Citopenia(s); <1% de blastos	Displasia em <10% das células; acompanhada de citogenética sugestiva de SMD; <5% de blastos
SMD com del(5q) isolada	Anemia; contagem de plaquetas normal ou aumentada; <1% de blastos	Presença de del(5q) isolada; Aumento de megacariócitos; <5% de blastos; ausência de Bastonete de Auer

Legenda: CRDU (Citopenia refratária com displasia unilinhagem, AR (Anemia refratária), NR (Neutropenia refratária), TR (Trombocitopenia refratária), ARSA (Anemia refratária com sideroblastos em anel), CRDM (Citopenia refratária com displasia multilinhagem), AREB (Anemia refratária com excesso de blastos).

Recentemente, no ano de 2016, foi dado o primeiro passo na nova era de classificação da doença: a era molecular. A OMS revisou novamente sua classificação e adicionou a mutação no gene *SF3B1* na definição da porcentagem de sideroblastos em anel na MO no subgrupo ARSA, agora intitulado como SMD com sideroblastos em anel. Além disso, a nova classificação determina a substituição dos termos “anemia refratária” e “citopenia refratária” por “Síndrome Mielodisplásica com displasia unilinhagem” e “Síndrome Mielodisplásica com displasia multilinhagem” (Tabela 2) (ARBER et al, 2016).

Tabela 2: Classificação clínica da SMD segundo os critérios da OMS 2016

SUBTIPO DE SMD	SANGUE PERIFÉRICO	MEDULA ÓSSEA
(SMD-DU)	≤1% de Blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 linhagem; 5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
(SMD-DM)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; 5% de Sideroblastos em anel*; ≤5% de blastos

SMD COM SIDEROBLASTOS EM ANEL (SMD-SA)		
(SMD-SA-DU)	≤1% de Blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 linhagem; ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
(SMD-SA-DM)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
SMD com Excesso de Blastos (SMD-EB)		
(SMD-EB1)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 2 a 4% de blastos	Displasia em 0,1, 2 ou 3 linhagens; 5 a 9% de blastos
(SMD-EB2)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 5 a 19% de blastos	Displasia em 0,1, 2 ou 3 linhagens; 10 a 19% de blastos
SMD inclassificável (SMD-i)		
SMD-i com 1% de blastos	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% ¹ de blastos	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% de blastos
SMD-i com displasia em única linhagem e pancitopenia	Citopenia em 3 linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 1 linhagem; ≤5% de blastos
SMD-i baseada em alterações citogenéticas	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Ausência de displasias; ≤15% de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
SMD com del(5q) isolada	≤1% de Blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% de blastos; del(5q) isolada ou com 1 alteração adicional, exceto del(7q)-7

Legenda: SMD-DU (SMD com displasia unilinhagem), SMD-DM (SMD com displasia multilinhagem), SMD-SA-DU (SMD com sideroblastos em anel e displasia unilinhagem), SMD-SA-DM (SMD com sideroblastos em anel e displasia multilinhagem), SMD-EB (SMD com excesso de blastos).

1.7 Estratificação Prognóstica da Síndrome Mielodisplásica

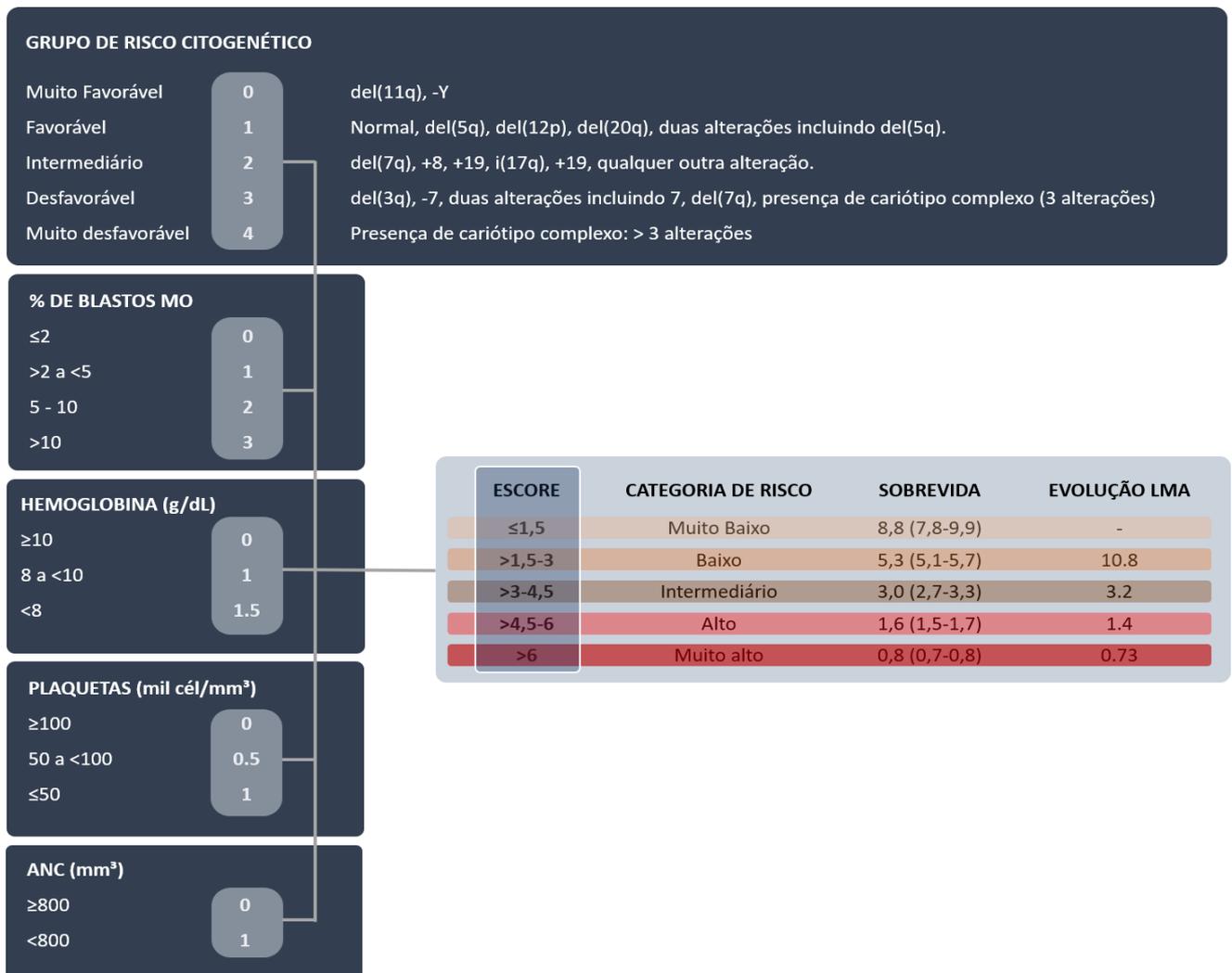
Em 1997, Greenberg e colaboradores criaram o Índice Internacional de Escore Prognóstico (IPSS) para SMD, um tipo de estratificação prognóstica que permite prever o risco de transformação leucêmica assim como a mediana de sobrevida esperada para cada paciente. O sistema de pontuação considera a porcentagem de blastos da MO, o número de citopenias periféricas e o cariótipo dividido em três categorias. O valor de IPSS é obtido pela somatória dos valores individuais das três variáveis. Como resultado, os pacientes são estratificados em quatro grupos de risco: baixo (pontuação 0), intermediário-I (pontuação de 0,5-1), intermediário-II (pontuação de 1,5 a 2,0) e elevado (pontuação > 2,5). As informações utilizadas foram provenientes de sete estudos prévios que compilaram dados de 816 pacientes diagnosticados com SMD *de novo* (GREENBERG, 1997).

Em 2010, uma grande base de dados internacional contendo 7012 pacientes foi utilizada com o intuito de refinar o IPSS de 1997, originando o IPSS-R (revisado). Nessa revisão, a porcentagem de blastos foi melhor estratificada, e o número de citopenias foi substituído pelo grau de citopenias. Houve a incorporação de mais duas categorias

citogenéticas e foi considerada a idade do paciente ao diagnóstico, a quantificação de ferritina sérica, a lactato desidrogenase, a B2-microglobulina e a performance como importantes características para a sobrevida, mas não para a transformação leucêmica (GREENBERG et al., 2012; JONAS e GREENBERG, 2015). Após análise multivariada com tempo de sobrevida e transformação para LMA, foram criadas 5 categorias de risco: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto risco (Figura 4) (GREENBERG et al., 2012).

A natureza heterogênea da SMD tem sido um desafio para os pesquisadores da área. A medida que a compreensão de sua patogênese e prognóstico aumentam, é clara a necessidade de refinamentos adicionais nos sistemas de escores prognósticos. Assim, nas últimas décadas, muitos grupos desenvolveram, de forma independente, sistemas de pontuação prognóstica para dar conta dessa heterogeneidade e fornecer aos médicos informações sobre sobrevivência e evolução leucêmica e auxiliar na tomada de decisões clínicas. Em 2005, unindo informações do IPSS e OMS, Malcovati e colaboradores criaram o WPSS (*WHO Classification-Based Prognostic Scoring System*). Estratificando os pacientes em quatro grupos de risco, o WPSS incorpora a dependência transfusional na análise de sobrevida (MALCOVATI, 2005; MALCOVATI, 2011). Apesar de sua utilidade, nenhum dos sistemas prognósticos disponíveis incorpora anormalidades moleculares relacionadas à doença, como mutações somáticas. Em 2016, deu-se início à tentativa de incorporação de dados moleculares ao IPSS-R através da inclusão da mutação no gene *SF3B1* no subtipo SMD-SA para melhor estratificação prognóstica dos pacientes. Contudo, ainda há imprecisão acerca dos padrões moleculares envolvidos na progressão da doença. Dessa forma, o modelo clássico de IPSS-R ainda é o mais utilizado na prática clínica (NAZHA, 2016).

As informações geradas pelos escores prognósticos guiam a escolha terapêutica, que pode ir desde uma conduta expectante/paliativa (suporte transfusional) até o único tratamento curativo, que é o transplante alogênico de medula óssea. Espera-se que a combinação de análises avançadas de variáveis clínicas, citogenéticas e moleculares deva aumentar acentuadamente a capacidade de futuros modelos para melhorar o prognóstico na SMD. (JONAS e GREENBERG, 2015).

Figura 4: Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R.

Fonte: Adaptado de Bejar (2014).

1.8 Lesões ao DNA e Mecanismos de resposta aos danos

Estima-se que mais de 10.000 lesões de fita simples no DNA sejam produzidas diariamente (HOEIJMAKERS, 2009). Essas lesões podem ser causadas por moléculas reativas endogenamente produzidas ou por agentes exógenos/ambientais, físicos, químicos, e biológicos que incluem luz ultravioleta, radiação ionizante, metais pesados, poluentes do ar, quimioterápicos e respostas inflamatórias (LINDAHL, 1993; HWA YUN, 2018). Se não forem reparadas ou forem reparadas incorretamente, essas lesões podem levar a mutações ou aberrações genômicas em larga escala que ameaçam a viabilidade celular ou do organismo. Por exemplo, a luz UV e o Raio-X induzem dímeros de pirimidina e quebras de fita simples e dupla na hélice do DNA, causando alterações na replicação e transcrição de genes, falhas reprodutivas, mutações e morte celular (OZTURK e DEMIR, 2011). Os efeitos a longo prazo

resultantes dessas falhas e mutações contribuem para o envelhecimento celular, para doenças relacionadas à senescência e neurodegeneração e para a carcinogênese (IYAMA e WILSON, 2013; LANGIE et al., 2015).

Os estudos no campo de respostas a danos no DNA se iniciaram de forma indireta na primeira metade do século XX, nos Estados Unidos da América (EUA) (FRIEDBERG, 2008). O aumento das pesquisas para confecção de armas atômicas trouxe uma maior atenção da comunidade científica para os efeitos da radiação em organismos biológicos. No começo da década de 1940 já se tornava evidente que agentes que levam a alterações mutagênicas (tais como radiação ionizante e ultravioleta) são capazes de interagir e causar danos no material genético das células. Em adição a isso, emergiam evidências que sugeriam que organismos vivos eram capazes de se recuperar dos efeitos letais destes agentes (HOLLAENDER & CURTIS, 1935).

Com o passar dos anos, diversos mecanismos de vigilância, reparo e tolerância aos danos no DNA evoluíram com o intuito de impedir suas consequências deletérias, detectando e sinalizando a presença de lesões e promovendo seu reparo. Existem situações em que as lesões no DNA não podem ser totalmente reparadas e as células são forçadas a tolerar esses danos. Assim, a resposta aos danos no DNA pode resultar em reparo ou em tolerância aos danos e podem diferir quanto as várias classes de lesões, mas todas tem o mesmo objetivo: manutenção da estabilidade genômica (Figura 5) (LINDAHL et al, 1999).

1.9 Mecanismos de Reparo do DNA

Para neutralizar lesões no DNA, a célula coloca em funcionamento uma rede coordenada de cascata de sinalização denominada *DNA Damage Response* (DDR). A DDR detecta a lesão no DNA e transmite um sinal para ativar o controle do ponto de verificação do ciclo celular a fim de retardar a progressão do ciclo celular e permitir que o dano seja reparado pelo recrutamento do mecanismo de reparo do DNA (GHOSAL, 2013).

Pelo menos cinco vias principais de reparação de danos, parcialmente sobrepostas, operam em mamíferos: reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo por excisão de bases (BER), o reparo de erros de emparelhamento de bases (MMR), que são mecanismos de reparo de fita simples e a recombinação homóloga (HR) e junção por extremidades não-homólogas (NHEJ) que figuram entre os mecanismos de reparo de fita dupla de DNA (Figura 5) (IYAMA e WILSON, 2013).

Os mecanismos atuantes no reparo de fita simples por excisão consistem na remoção de uma região danificada por nucleases especializadas e, em seguida, para preencher a lacuna, a síntese de DNA é realizada por uma DNA polimerase que utiliza a fita não-danificada como molde. Estes mecanismos reparam os dímeros timina-timina, o tipo mais comum de dano causado pela luz UV, que interferem tanto na replicação quanto na transcrição do DNA. O reparo por excisão também pode corrigir regiões de DNA contendo bases alteradas pela inserção de grandes grupos químicos, por exemplo, carcinógenos como benzo-pireno. A NER lida com a ampla classe de lesões exógenas que distorcem a hélice, interferem no pareamento de bases e geralmente obstruem a transcrição e a replicação normal. Por sua vez, pequenas alterações químicas de bases, que podem ou não impedir a transcrição e a replicação, são alvos de BER. As lesões reparadas por BER estão principalmente, mas não exclusivamente, relacionadas a danos de origem endógena (KAO et al., 2005; IYAMA e WILSON, 2013). Já o mecanismo MMR atua principalmente no reconhecimento e reparação de erros nas inserções de bases e presença de deleções incorporadas no DNA que podem surgir durante a replicação e na recombinação do DNA (LYER et al., 2006; IYAMA e WILSON, 2013).

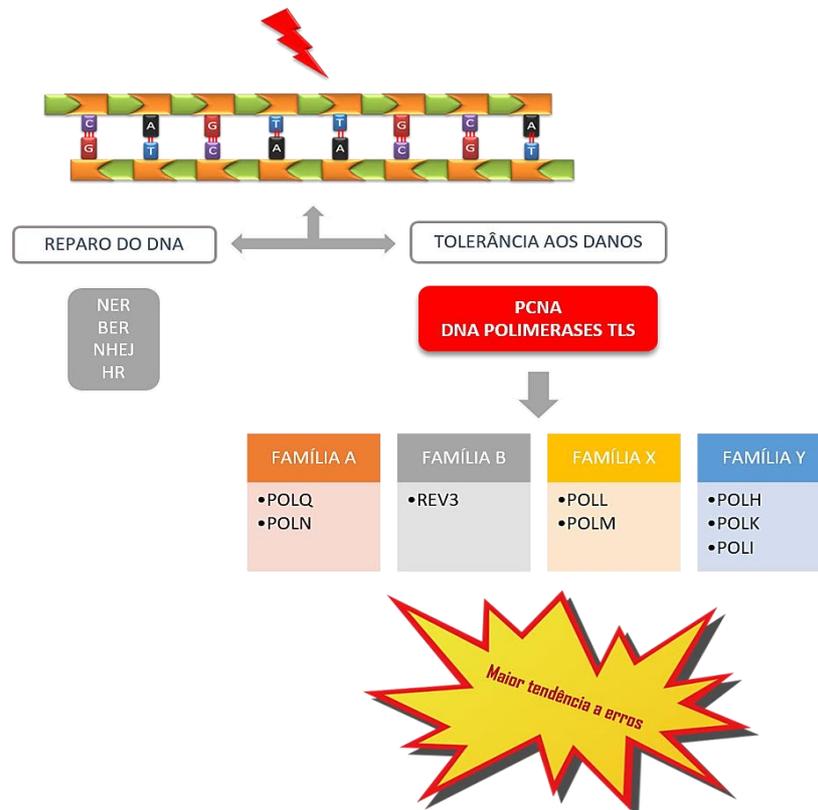
As lesões de fita dupla são as mais deletérias formas de dano ao DNA, uma vez que as ambas as fitas da molécula são afetadas e podem contribuir para a formação de anormalidades cromossômicas, morte celular e transformação neoplásica (BOHGAKI; HAKEM, 2010; IYAMA e WILSON, 2013). Surgem pela ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou induzidos por fontes exógenas como terapia antineoplásica, radiação ionizante e produtos químicos genotóxicos (IYAMA e WILSON, 2013).

A via HR requer uma cromátide-irmã homóloga para sua execução, ao passo que a via NHEJ pode ocorrer em células que estejam ou não em divisão, não necessitando de uma sequência homóloga de controle, o que faz dela uma via com maior chances de erro (OZTURK e DEMIR, 2011). Diversas doenças humanas derivam-se de deficiências em HR e NHEJ e exibem defeitos no desenvolvimento, imunológicos e neurológicos, assim como sensibilidade à radiação, fenótipos de envelhecimento precoce e predisposição ao câncer (IYAMA e WILSON, 2013).

No estudo de Ribeiro e colaboradores (2013), o qual compõe o nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que variações polimórficas do gene *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutada* – gene com importante atividade de sinalização de lesão no DNA) são associadas ao desenvolvimento de SMD de baixo risco e que polimorfismos dos genes de reparo do DNA são associados à patogênese da SMD (RIBEIRO, 2013).

Uma vez reparado o dano, a célula volta a entrar no ciclo celular, o genoma é duplicado de uma maneira livre de erros por DNA polimerases de alta fidelidade e transmitido para as células filhas. Durante a fase S, quando o DNA está sendo replicado, se as DNA polimerases de alta fidelidade encontram lesões volumosas ou distorções na estrutura secundária da molécula de DNA elas param a replicação, uma vez que seus sítios ativos são incapazes de acomodar esse tipo de lesão. Isso resulta na imobilização da forquilha de replicação e desacoplamento das polimerases replicativas. Essa prolongada estagnação pode levar ao colapso da forquilha de replicação e, em última análise, à instabilidade do genoma. Diversas enzimas atuam nesse ponto à fim de reestabilizar a forquilha e reiniciar a replicação. Assim, uma segunda resposta ao DNA danificado, denominado *DNA Damage Tolerance* (DDT) atua para promover a replicação através e além de um modelo alterado, deixando que o dano seja reparado em um momento posterior, reduzindo assim o risco geral de colapso e instabilidade do genoma (POWERS, 2018; GHOSAL, 2013; ANDERSEN, 2008)

Figura 5: Representação esquemática dos Mecanismos de Reparo e Tolerância a danos no DNA



Legenda: NER: Reparo por excisão de nucleotídeos; BER: Reparo por excisão de bases; NHEJ: junção por extremidades não-homólogas; HR: Recombinação Homóloga; PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferação Celular; TLS: Translesão; POLQ: DNA Polimerase theta; POLN: DNA Polimerase nu; POLL: DNA Polimerase lambda; POLI: DNA Polimerase iota; POLH: DNA Polimerase eta; POLK: DNA Polimerase kappa; REV3L: DNA Directed Polymerase Zeta Catalytic Subunit; REV1: DNA Directed Polymerase.

Fonte: Elaborada pelo autor

1.10 Mecanismos de tolerância a danos no DNA: Síntese Translesão

As DNA polimerases replicativas são particularmente específicas para pares de bases de DNA normais, mas não podem acomodar bases alteradas ou com presença de lesões volumosas, em seu sítio ativo. Dessa forma, elas replicam o DNA até encontrarem lesões que causam o bloqueio da maquinaria de replicação (Figura 6). As células dispõem de um importante mecanismo para promover a passagem através destes danos: a síntese translesão. Este mecanismo envolve a atividade de DNA polimerases especializadas capazes de sintetizar o DNA através da lesão (LIVNEH, 2010; POWERS e WASHINGTON, 2018). Essas polimerases não replicativas com atividade translesão (TLS) são uma classe de polimerases com baixa processabilidade e baixa fidelidade, mas que possuem grande flexibilidade conformacional, com um sítio catalítico maior que as permitem moldar-se sobre distorções no DNA. Essas enzimas replicam o DNA danificado de uma maneira livre de erros (quando fazem o pareamento correto de bases), de uma maneira propensa a erros (quando fazem o pareamento incorreto de bases) ou transpassam a lesão sem removê-la e continuam a replicar um curto trecho do DNA evitando o colapso da forquilha de replicação e a geração de instabilidade cromossômica (Figura 7). Após isso, elas saem da forquilha e as DNA polimerases replicativas retomam a replicação (CHANG, 2009; FRIEDBERG, 2002; LIVNEH, 2010)

A ativação e regulação do mecanismo TLS é mediada em 3 fases: (1) Acesso ao DNA. Como as polimerases TLS são mutagênicas, seu acesso ao DNA deve ser restrito ao local da lesão. (2) A seleção de uma DNA polimerase específica para sua lesão cognata e (3) Troca ou não da Polimerase TLS por outra no momento da extensão da fita. Essas regulações são intermediadas por modificações do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (DAIGAKU, 2010; ZHOU, 2017). Após a parada na forquilha de replicação, a proteína PCNA é mono ou poliubiquitinada pelo complexo RAD6-RAD18 (ubiquitina conjugada E2-ubiquitina ligase) na lisina 164 (Figura 6). Embora o mecanismo TLS ainda não esteja totalmente explicado, existe uma teoria que afirma que a mono-ubiquitinação ativa o mecanismo translesão através de uma via indutora de erro, enquanto que a poli-ubiquitinação induz uma via livre de erros. Outra teoria é a de que a monoubiquitinação promove o recrutamento das DNA polimerases TLS, enquanto a poliubiquitinação promove a prevenção de danos através de um mecanismo que ainda não está claro (DAIGAKU, 2010; KANNOUCHE, 2004; BIENKO, 2005; ANDERSEN, 2008; FOX, 2011; MCINTYRE, 2015; KANAO, 2017).

Além disso, sabe-se que a exposição do DNA de mamíferos a agentes causadores de dano e a ativação do TLS resultam de ambos eventos: ativação de proteínas que induzem a ubiquitinação de PCNA (Rad6 e Rad18) e degradação da proteína USP1, responsável pela desubiquitinação (LEHMANN, 2006; FOX, 2011).

Em leveduras e linhagens celulares DT40, demonstrou-se que a monoubiquitinação de PCNA (ub-PCNA) aumenta a sua afinidade pelas polimerases TLS POLH, POLI e REV1 (KANNOUCHE, 2004; GUO, 2006;). Este aumento da afinidade é mediado pelos domínios de ligação à ubiquitina (domínios UBM ou UBZ) identificados em todas as polimerases da família Y e, portanto, fornecem um mecanismo possível para a troca da polimerase replicativa pela polimerase TLS. Assim a DNA polimerase replicativa bloqueada é substituída pela polimerase TLS que pode contornar a lesão (BIENKO, 2005; PLOSKY, 2004; FRIEDBERG, 2005). O modelo atual para o processo TLS envolve pelo menos dois eventos de troca de polimerase. Na primeira troca, a DNA polimerase replicativa bloqueada é substituída por uma polimerase TLS capaz de replicar sobre a lesão do DNA. O segmento de fita adjacente à lesão é então estendido pela mesma ou outra polimerase TLS. A etapa de extensão permite que a lesão escape da detecção da atividade de revisão exonucleásica 3' a 5' da DNA polimerase replicativa. Isto é seguido pelo segundo interruptor, que restaura a DNA polimerase replicativa de alta fidelidade ao molde de DNA para retomar a replicação do DNA (ANDERSEN, 2008; ZHAO, 2017)

Uma vez que existe uma grande diversidade química de lesões ao DNA, cada uma dessas polimerases possui uma ou mais lesões que podem contornar com precisão e eficiência. Essas lesões são conhecidas como lesões cognatas das polimerases não replicativas ou polimerases TLS. A precisão e a eficiência do mecanismo TLS depende de qual das polimerases TLS disponíveis é escolhida para contornar o dano ao DNA. Se o dano for uma lesão cognata para a polimerase escolhida, a precisão e a eficiência da TLS serão relativamente altas. Se o dano não for uma lesão cognata da polimerase, a precisão e a eficiência serão muito menores (POWERS e WASHINGTON, 2018).

Dessa forma, além dos mecanismos de reparo do DNA, maquinaria celular dispõe dessas polimerases especializadas em corrigir ou transpassar as lesões, porém, por serem de baixa fidelidade, elas possuem maior tendência à incorporar erros, isto é, tem grande potencial mutagênico (ANDERSEN et al, 2008; BERTOLIN, MANSILLA, GOTTIFREDI, 2015).

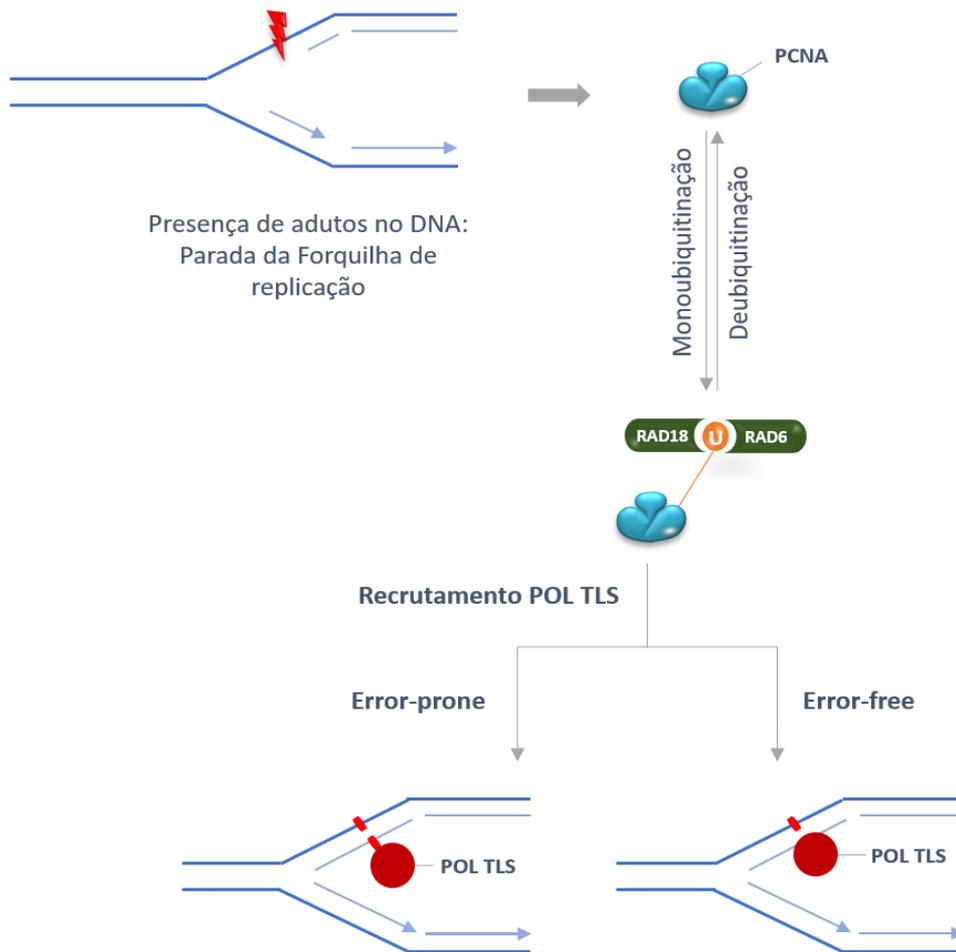
1.10.1 Baixa fidelidade do mecanismo TLS: indução de mutações

As paradas na forquilha de replicação são resolvidas com maior frequência usando o mecanismo livre de erros da translesão citado anteriormente. No entanto, a replicação pode prosseguir em um processo propenso a erros. As células arriscam induzir mutações pela incorporação incorreta de bases causadas pelo processo TLS a fim de desbloquear a forquilha de replicação causada pelos adutos de DNA e evitar, assim, a instabilidade cromossômica por quebras de fita dupla e a morte celular. Assim, a solução de tolerância a danos geralmente vem às custas de uma maior taxa de erros de incorporação, uma vez que as DNA polimerases TLS são de baixa fidelidade e isso faz com que sejam propensas a cometer erros. Diante disso, esse processo acaba sendo responsável pela maioria das mutações pontuais induzidas por danos e, portanto, é particularmente relevante para a oncogênese (CHANG, 2009; FRIEDBERG, 2015).

Embora seja responsável por menos de 10% de todos os eventos de síntese de bypass em levedura (BAYNTON, 1998), a frequência de TLS potencialmente mutagênica pode estar acima de 50% em eucariotos superiores. A propensão e o potencial mutagênico do mecanismo TLS explica por que ele é etiológico na maioria dos cânceres induzidos por fatores ambientais e tem sido o foco de inúmeras investigações na última década (ADAR, 2009; SABINE, 2011; JANSEN, 2015).

A multiplicidade de polimerases TLS permite a especialização para tipos particulares de danos no DNA, cada um contornado de forma mais eficaz e precisa por uma polimerase cognata específica. Sob a regulação apropriada, isso poderia levar a uma carga mutacional mais baixa. Os papéis obviamente conflitantes dessas enzimas, tanto na prevenção quanto na promoção da instabilidade genética, são refletidos no rígido controle celular da via TLS (LIVNEH, 2006).

Figura 6: Representação esquemática da Ativação do Mecanismo Translesão



Legenda: Ao se deparar com lesões no DNA que causam o bloqueio da forquilha de replicação, a DNA Polimerase replicativa não consegue dar continuidade à replicação por não conseguir acomodar lesões volumosas em seu sítio ativo. Dessa forma, ocorre a ativação do mecanismo de síntese translesão. A ubiquitinação da proteína PCNA pelo complexo RAD18-RAD6 na lisina 164 proporciona a troca da Polimerase replicativa pela DNA Polimerase TLS cognata da lesão presente na fita de DNA. A POL TLS realiza a síntese translesão por meio de um mecanismo que pode ser livre de erros (error-free) ou propenso a erros (error-prone).

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 7: Representação esquemática do Mecanismo de tolerância a danos no DNA através da síntese translesão e sua implicação na carcinogênese



Legenda: A presença de lesões no DNA bloqueia as forquilha de replicação e impede o seguimento da replicação. **A.** Após a parada da forquilha de replicação, uma polimerase TLS é recrutada para o ponto da lesão. No entanto, a POL TLS pode incorporar uma base errada a fim de continuar a replicação. Na próxima replicação, esse nucleotídeo que foi incorporado erroneamente dará origem a uma mutação pontual. Essa mutação pontual pode contribuir para o desenvolvimento de neoplasias ou, em células neoplásicas, garantir resistência à agentes terapêuticos. **B)** No mecanismo TLS livre de erros, a POL TLS incorpora uma base pareada de forma correta e uma mudança para uma segunda DNA polimerase especializada pode ocorrer para estender parte da fita. Após isso, ocorre a troca para uma POL Replicativa, dando continuidade à replicação. **C)** Na ausência completa de uma polimerase TLS, não ocorre desvio translesão, o que acarreta o colapso da forquilha de replicação, levando a quebras na dupla fita e instabilidade cromossômica, que podem contribuir para a carcinogênese.

Fonte: Adaptado de Lange et al (2010)

1.10.2 Famílias de DNA Polimerases

A partir dos dados de análise filogenética e caracterização bioquímica foram reportadas, até agora, pelo menos oito enzimas atuantes no mecanismo de síntese TLS em mamíferos, estando agrupadas em quatro famílias: família Y, que inclui Pol η (POLH), Pol ι (POLI), Pol κ (POLK) e REV1. Família B, que inclui Pol ζ (POLZ), cuja subunidade catalítica é REV3L. Família A, que inclui Pol θ (POLQ) e Pol ν (POLN) e família X, a qual inclui Pol λ (POLL) (Figura 5). Cada uma das polimerases TLS tem diferentes especificidades de substrato para diferentes tipos de danos no DNA (POWERS, 2018; LANGE, 2011; MAKRIDAKIS, 2012; GHOSAL, 2013).

1.10.2.1 Família A: DNA Polimerases TLS θ (POLQ) e ν (POLN)

Descrita pela primeira vez em 1999 por Sharief e colaboradores, POLQ foi a oitava polimerase a ser descoberta. No entanto sua atividade enzimática em células humanas foi observada apenas três anos depois e seu gene, *POLQ*, localizado no braço longo do cromossomo 3, foi isolado por Seki e colaboradores em 2003 (SHARIEF, 1999; MAGA, 2002; SEKI, 2003; SEKI, 2004).

Estudos posteriores descreveram POLQ como um polipeptídeo de 2.592 aminoácidos com uma estrutura bioquímica composta pela fusão gênica de um domínio polimerase na região C-terminal, um domínio helicase do tipo *Hel218* na região N-terminal e um terceiro domínio central com função ainda indeterminada. Embora a fusão gênica do tipo helicase-polimerase seja única para os eucariotos superiores, as proteínas do tipo polimerase-helicase são multifuncionais, já foram previamente identificadas em bactérias e vírus e normalmente atuam no início da replicação, bem como no reparo do DNA e no mecanismo de tolerância a danos. O domínio polimerase permite a atuação de POLQ na síntese translesão, enquanto o domínio helicase aparenta possibilitar sua atuação nos mecanismos de reparo do DNA. Dentro da Família A, essa multifuncionalidade é exclusiva da enzima POLQ (BEAGAN, 2016; MALABY, 2017;

POLQ realiza a síntese translesão através de sítiosapurínicos e apirimidínicos (AP), lesões causadas por espécies reativas de oxigênio, como sítios de timina glicol (Tg) e tem a capacidade de catalisar tanto a inserção de nucleotídeos opostos às lesões quanto as etapas de extensão (SEKI, 2004). Por outro lado, POLQ não consegue incorporar bases em sítios opostos a lesões causadas por radiação UV, sendo necessária a coparticipação de POLI para realizar a extensão (SEKI e WOOD, 2008). Dentre as polimerases da família A, a

fidelidade durante a incorporação de dNTP's de POLQ é a mais baixa (YOUSEFZADEH, WOOD, 2013).

Camundongos com a mutação missense do tipo *chaos1* (fenótipo atribuído a transição de T>C que causa uma alteração de aminoácidos de serina para prolina no resíduo 1932 de POLQ) se desenvolvem normalmente, mas demonstram frequências elevadas de micronúcleos espontâneos e micronúcleos induzidos por radiação, indicando algum papel desta enzima na manutenção da instabilidade genômica nos eritroblastos (SHIMA, 2003). No entanto, a viabilidade de camundongos com defeitos em *POLQ* é severamente comprometida com a ocorrência de uma mutação adicional no gene *ATM*, demonstrando que estas enzimas tem relações de semiletalidade sintética, mas operam de formas distintas na embriogênese de mamíferos (SHIMA, 2004).

Adicionalmente, Goff e colaboradores (2009) realizaram experimentos com cultura de célula da medula óssea de camundongos do tipo *chaos 1*. Células Polq (-/-) apresentaram um fenótipo mais sensível à radiação gama do que as células Polq (+/+). Adicionalmente, células Polq (-/-) apresentaram moderada sensibilidade à bleomicina em comparação com células Polq (+/+) e não demonstraram hipersensibilidade ao paraquat ou ao peróxido de hidrogênio. Camundongos Polq (-/-) apresentaram mais reticulócitos micronucleados espontâneos e induzidos por radiação do que os camundongos Polq (+/+) e (+/-). A sensibilidade à radiação ionizante e bleomicina de células do estroma da medula óssea defeituosas para POLQ e o aumento de micronúcleos nas hemácias demonstram o papel dessa DNA polimerase na tolerância a danos no DNA que podem levar a quebras na dupla fita (GOFF, 2009)

Alguns estudos realizados em invertebrados, como *Drosophila*, mostraram que mutações no gene *mus308* (gene ortólogo de *POLQ*) promove hipersensibilidade a agentes genotóxicos que causam lesões formadoras de pontes inter-cadeia de DNA (do inglês *interstrand crosslink* - ICL), as quais separam a cadeia de DNA impedindo sua replicação e transcrição (BEAGAN, 2017) Normalmente essas lesões são reparadas através de ações em conjunto entre as vias de HR, TLS e NER. No entanto, ainda não foi totalmente elucidado o papel de POLQ no reparo de lesões ICL em mamíferos. Assim, a base bioquímica e molecular para o aparente papel de POLQ na reparação de ICL em vertebrados permanece incerta (HARRIS, 1996).

Ainda sobre alterações em *POLQ* que promovem hipersensibilidade à agentes genotóxicos, um estudo com siRNA (RNA de interferência) identificou que o *knockdown* de POLQ resulta na radiosensibilização de linhagens celulares tumorais, tendo pouco ou nenhum efeito nas linhagens celulares de tecidos normais. Esses achados levantam a

possibilidade de que a inibição de *POLQ* possa ser usada clinicamente para causar radiosensibilização de células neoplásicas (HIGGINS, 2010).

A literatura mostra a superexpressão de *POLQ* em câncer de mama e câncer colorretal e associações do aumento de expressão com diminuição da sobrevida nesses pacientes (HIGGINS, 2010). O estudo de Lemée e colaboradores (2010) relatou, inclusive, níveis de expressão mais elevados em pacientes com tumores do tipo triplo-negativo, um subtipo mais agressivo de câncer de mama, bem como demonstraram que altos níveis de expressão de *POLQ* levam ao atraso na progressão da forquilha de replicação e aumentam a quantidade de alterações cromossômicas (LEMÉE, 2010). Adicionalmente, estudos demonstram, também, aumento de sua expressão em câncer de pulmão, estômago, cólon, carcinoma de células escamosas bucal e câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC) (KAWAMURA, 2004; ALLERA-MOREAU, 2012; LESSA, 2013). O aumento da expressão de *POLQ* também foi associado a aumento do número de mutações somáticas pontuais em câncer de mama (CECCALDI ET AL., 2015).

POLN está localizado na região cromossômica 4p16.2, codificando, apenas em genomas de vertebrados, uma proteína de 900 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular de 100 kDa. Diferente da enzima *POLQ*, *POLN* possui apenas o domínio DNA polimerase e *POLQ* possui tanto um domínio de helicase como um domínio de DNA polimerase. Estudos *in vitro* demonstraram que a polimerase ν é uma enzima altamente propensa a erros, no entanto passa eficientemente sítios de Tg. Geralmente sua atividade enzimática favorece a incorporação de Timina (T) quase tão frequentemente quanto Citosina (C) para o nucleotídeo Guanina (G), resultando em frequentes transições de GC para AT (ARANA, 2007). Quase 50% dos carcinomas de mama exibem mutações no gene *POLN*, o que faz aventar a hipótese de que *POLN* pode estar associada a esta neoplasia. *POLN* é fracamente expresso na maioria dos tecidos, com a maior expressão relativa nos testículos. A baixa expressão de *POLN* tem sido correlacionada com a menor eficiência do mecanismo de recombinação homóloga (HR), demonstrando que deve existir correlação entre sua atividade translesão e esse mecanismo (MOLDOVAN et al, 2010).

A literatura aponta que *POLQ* e *POLN* estão envolvidas em várias vias de reparo, embora não haja muitos estudos que demonstrem como acontece essa participação e como seria a regulação.

1.10.2.2 Família B: DNA Polimerase TLS ζ (POLZ)

A maioria das informações bioquímicas atuais acerca da DNA polimerase zeta (POLZ) vem de estudos realizados na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Sabe-se que é uma holoenzima tetramérica, a qual possui uma subunidade catalítica REV3L e uma subunidade estrutural REV7, assim como duas subunidades acessórias, POLD2/p50 e POLD3/p66, sendo a primeira enzima com atividade TLS identificada (BARANOVSKIY, 2012). É importante salientar que POLZ não possui atividade exonucleásica de revisão, 3'-5'. Sua subunidade catalítica *REV3L* localiza-se na região cromossômica 6p21, sendo essa a posição do sítio frágil FRA6F, que se encontra deletada em diversos tipos de leucemias e tumores sólidos (MORELLI et al, 2002). Ademais de ser a polimerase mais propensa a causar erros devido a sua alta atividade de ultrapassar as lesões, POLZ e sua subunidade catalítica REV3L são de extrema importância na defesa contra agentes genotóxicos (MAKAROVA, 2015; SUZUKIA, 2016).

Em modelos murinos, camundongos deficientes de *REV3L* morrem ainda na embriogênese, que é acompanhada pela apoptose maciça de células dentro do embrião, demonstrando que a presença de mutações nessa polimerase, ainda no período embrionário, é letal para camundongos (O-WANG et al, 2002). Além disso, estudos demonstram aumento da expressão de *REV3L* após indução de danos no DNA de um modo dependente da proteína p53 e após tratamento das células com cisplatina (KRIEG, ET AL 2006; WU ET AL, 2004). Foi demonstrado que o *knockout* de *REV3L* concomitantemente com a deficiência de *TP53* em fibroblastos leva ao aumento da instabilidade cromossômica (WITTSCHIEBEN ET AL, 2010). No tecido hematopoiético, camundongos com supressão do gene *REV3L* desenvolveram linfoma de células T, assim como também houve o aparecimento de tumores mamários. Foram identificadas também alterações pré-neoplásicas em tecidos glandulares adjacentes aos tumores mamários em camundongos com silenciamento do gene *REV3L*, o que sugere que sua deleção pode ocasionar a tumorigênese (WITTSCHIEBEN ET AL, 2010).

Em humanos, a baixa fidelidade da *POLZ* manifesta-se pela instabilidade cromossômica e possível carcinogênese causada por alterações em sua expressão (LANGE ET AL., 2011; WITTSCHIEBEN ET AL., 2006)

1.10.2.3 Família X: DNA polimerases TLS λ (POLL) e μ (POLM)

A proteína POLL é composta por 575 aminoácidos e seu gene está localizado no cromossomo 10. Essa polimerase possui um domínio BRCT, que é amplamente encontrado em proteínas envolvidas no reparo de danos ao DNA e no controle do ciclo celular (YU ET AL, 2003). Ao contrário de outras polimerases de DNA, POLL gera exclusões de base única a taxas médias que excedem substancialmente as taxas de substituição de base. Esta capacidade, juntamente com a capacidade de preencher as lacunas curtas no DNA a baixas concentrações de dNTP, sugerem que ela pode ter participação no reparo de junções por extremidades não homólogas (NHEJ) e no reparo por excisão de bases (BER) (YU ET AL, 2003). Em 2010 foi demonstrado que um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) de POLL leva ao aumento de mutações, alterações cromossômicas e defeitos no mecanismo de NHEJ (TERRADOS ET AL, 2009). A proteína POLM é composta por 492 resíduos de aminoácidos e seu gene está localizado no cromossomo 7. Assim como POLL, possui um domínio BRCT e atividade de transferase deoxinucleotídica terminal (TdT). No entanto, essa polimerase é altamente propensa a erros durante a síntese do DNA (TERRADOS ET AL, 2009). Alguns estudos sugerem que POLM também pode estar correlacionada com mecanismos de reparo de fita dupla, como as NHEJ, uma vez que compartilha do mesmo domínio BRCT, que interage com a proteína Ku (TERRADOS ET AL, 2012).

1.10.2.4 Família Y: DNA Polimerases TLS η (POLH), k (POLK), ι (POLI) e REVI

As DNA polimerases da família Y compartilham cinco motivos de sequências conservadas, bem como uma arquitetura estrutural comum que se assemelha à forma de uma mão. Esta estrutura é formada pelos domínios *fingers*, *palm* e *thumb*, os quais estão diretamente envolvidos na atividade enzimática de polimerase. A porção N-terminal do motivo I e os motivos III e IV formam o domínio *palm*, o qual coordena os dois íons metálicos que ativam a incorporação de nucleotídeos. A porção C terminal do motivo I e o motivo II formam o domínio *fingers*, envolvido na seleção do nucleotídeo correto a ser incorporado. O motivo V forma o domínio *thumb*, que participa no acoplamento ao DNA (ZHOU ET AL., 2001)

Além destes cinco motivos conservados, as DNA polimerases da família Y apresentam outras particularidades, as quais podem estar presentes em apenas uma delas ou que pode ser compartilhada por mais de uma. A enzima REVI, por exemplo, possui uma

extensão na porção N-terminal na qual se encontra o domínio BRCT. Este domínio é importante para a regulação da síntese translesão, já que ele se liga a proteínas fosforiladas por ATR e ATM, essenciais para a resposta a estresse durante a replicação celular (MANKE ET AL., 2003). Outras duas regiões conservadas de grande importância são os domínios de ligação ao PCNA e os motivos estruturais dedos de zinco, conhecidos por terem participação no acoplamento de uma proteína ao DNA.

REV1 é composta por 1251 aminoácidos e tem um peso molecular de 138kDa. Ela possui dois domínios de ligação à Ubiquitina, UBM1 e UBM2, um domínio C-terminal de ~100 aminoácidos e um domínio BRCT. Como a levedura Rev1, o REV1 humano possui uma atividade de dCMP transferase que, preferencialmente, insere uma Citosina oposta a uma Guanina. No entanto, o REV1 humano pode inserir uma citosina oposta a um sítio AP ou a um uracila. (LIN, 1999). Apesar da atividade catalítica de REV1, tem sido demonstrando que sua função mais importante na síntese translesão é a reguladora e não a catalítica (LAWRENCE, 2004; SASATANI, 2017).

A possibilidade da função reguladora de REV1 começou a ser cogitada quando percebeu-se que ela possuía um domínio de interação com as outras polimerases TLS, o domínio terminal C, composto por ~100 aminoácidos e um domínio BRCT, comum em proteínas que participam dos mecanismos de reparo do DNA. Foi demonstrado que o domínio C-terminal interage com outras polimerases TLS, por exemplo, POLH, POLI, POLK e REV3L (GUO, 2003). Estes estudos conduziram a um modelo que demonstra que REV1 tem a função principal de alocar as polimerases TLS em regiões com danos no DNA e modular a mudança da polimerase no local da lesão. Assim, pensa-se que REV1 possa desempenhar um papel de recrutadora e reguladora, assim como PCNA (GUO, 2003).

A proteína POLH é composta por 713 resíduos de aminoácidos e seu gene está localizado no cromossomo 6. Estruturalmente, ela consiste em uma região de interação com REV1 (RIR), um domínio de ligação à ubiquitina (UBZ), um domínio de localização nuclear e regiões peptídicas de interação com PCNA (PIP) (KNOBEL E MARTI, 2011; UCHIYAMA, TERUNUMA, HANAOKA, 2015).

Até o momento, POLH é a única polimerase descrita cuja deficiência está associada a uma doença humana, o Xeroderma Pigmentosum Variante (XP-V). Em 1999, após a clonagem do cDNA do gene XPV/POLH, identificou-se seu produto gênico como sendo POLH. Esses pacientes representam aproximadamente 20% dos pacientes diagnosticados com XP e exibem um fenótipo clínico mais favorável do que os pacientes com XP clássico. Além

disso, pacientes que apresentam mutações no gene POLH/XPV exibem maior incidência de tumores de pele (CORDONNIER, 1999; JOHNSON, 1999a; MASUTANI, 1999a)

Essa associação é evidenciada, também, pelo fato de que POLH é especializada na síntese translesão de danos causados pela luz UV, adicionando, na maioria dos casos, A-A (adeninas) opostas a fotoprodutos de dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPDs) formados por T-T. Na ausência de POLH, outra polimerase TLS pode ser recrutada para fazer o bypass (síntese translesão), dos CPDs mas de forma menos eficiente e menos precisa. Isso resulta no aumento da taxa de mutagênese induzida por UV e carcinogênese em células XP-V. (BIERTUMPFEL, 2010; MASUTANI, 2000).

Além da síntese translesão de CPDs, POLH também está envolvida no bypass dos 6,4 PPs (do inglês, 6-4 photoproducts). A diferença é que enquanto o primeiro mecanismo necessita apenas de uma polimerase, o segundo necessita da participação de mais de duas polimerases TLS e tem maior potencial mutagênico: POLH ou POLI incorporam o nucleotídeo oposto à lesão e POLZ (REV3L) realiza a extensão da fita. Sua participação também é evidenciada em outras lesões não relacionadas a fotolesão, como 8-oxoG, O⁶-MeG, timina glicol (Tg), adutos de cisplatina e sítios AP (CHAI, 2010; HARACKSA, 2000a; HARACKSA 2000b; KUSUMOTO, 2002)

A proteína POLK é composta por 870 resíduos de aminoácidos e seu gene está localizado na região cromossômica 5q13. POLK se distribui uniformemente pelo núcleo de células não danificadas, porém, pode se concentrar em focos de replicação quando essas células sofrem algum dano genotóxico (BERGOGLIO ET AL., 2002), característica essa compartilhada pelas demais DNA polimerases que realizam síntese translesão. A enzima POLK participa ativamente da etapa de extensão da fita após o pareamento de bases. Seu diferencial das outras DNA polimerases da família Y é a especificidade de incorporação, sendo a enzima mais fiel dentre as DNA polimerases, ela incorpora nucleotídeos erroneamente com uma frequência de aproximadamente 10^{-3} a 10^{-4} (JOHNSON ET AL., 2000), frequência esta menor que a da Pol η , Pol ι , Rev1. Entretanto, a DNA polimerase kappa tem uma alta capacidade de estender extremidades 3'OH que estão pareadas incorretamente (mismatches), fazendo isso a uma frequência de 10^{-1} a 10^{-2} (WASHINGTON ET AL., 2002).

Uma das características mais marcantes de POLK é a sua tendência a gerar erros de mudança de fase de leitura, as chamadas mutações frameshifts, principalmente por deleção de um nucleotídeo. Essas frameshifts são geradas quando POLK desloca – para fora da hélice do DNA – o nucleotídeo da fita molde que está pareado errado, fazendo com que o nucleotídeo do iniciador fique corretamente pareado com a próxima base da fita molde (WOLFLE, ET

AL., 2003). Uma vez que cada códon determina um aminoácido, a ocorrência de deleções, duplicações ou inserções pode acarretar modificações no tripleto de bases que forma cada códon, tendo como consequência mudanças na codificação dos aminoácidos e havendo ainda a possibilidade de se formar um códon de parada prematuro.

Estudos *in vitro*, avaliando os tipos de lesões nas quais a DNA polimerase kappa consegue realizar a síntese translesão, demonstraram que esta enzima é capaz de replicar DNA contendo resíduos de 8-oxoguanina (8-oxoG) induzidos por benzopireno, mas é ineficiente na síntese através de dímeros de timina e TT (6-4) fotoprodutos (ZHANG ET AL., 2000; OGI, 2002).

Com relação à expressão de *POLK* em tecidos normais, constatou-se que ela apresenta maior expressão nos testículos, ovários e glândulas adrenais (V L Gerlach et al., 1999; T Ogi et al., 2001). Nestes tecidos ocorre alta produção de hormônios derivados do colesterol (tais como testosterona, aldosterona e estrógeno). Observando isso e tendo como base os dados anteriores que demonstraram a síntese translesão de *POLK* através de lesões induzidas por benzopireno (ZHANG et al., 2000), alguns pesquisadores propuseram que *POLK* poderia estar envolvida na replicação de DNA contendo adutos de benzo[a]pireno-dihidrodiol epóxido (BPDE). Esse composto possui grande semelhança química com a molécula de colesterol (da qual ele é um derivado), e a sua ligação à guanina provoca uma distorção espacial na dupla hélice do DNA, impedindo sua replicação normal. O BPDE é um dos compostos químicos presentes nos cigarros, e alguns estudos apontam uma forte associação entre o câncer de pulmão e o aumento da expressão de *POLK*, inclusive induzindo a danos no DNA e correlacionando-a com presença de aneuploidias (O-WANG et al., 2009; BAVOUX ET AL., 2005).

Em testículos de camundongos, o gene *POLK* é transcrito em estágios específicos da espermatogênese, sugerindo que esta enzima tenha uma participação especial no processo de gametogênese masculina (VELASCO-Miguel et al., 2003) e recentemente foi relatada alta frequência de mutações no gene *POLK* em pacientes com câncer de próstata (YADAV et al., 2015).

Existem fortes associações de super-expressão de *POLK* em tecidos onde há altas taxas de produção de espécies reativas de oxigênio. Esse fato aventou a hipótese de que *POLK* seria uma adaptação de células que sofrem alta taxa de danos oxidativos. De fato, camundongos *knockout* *Polk* *-/-* apresentam um fenótipo mutante ligado ao envelhecimento e acúmulo de lesões endógenas. Em adição a isto, ensaios *in vitro* mostraram que *POLK* possui

a capacidade de replicar DNA contendo resíduos de timina glicol (Tg), um tipo bem conhecido de lesão oxidativa (PAULA L FISCHHABER ET AL., 2002)

A proteína POLI é composta por 715 resíduos de aminoácidos e seu gene está localizado no cromossomo 18. Um estudo com fibroblastos humanos revelou que células com baixa expressão de POLI exibiam hipersensibilidade a danos no DNA induzidos por peróxido de hidrogênio ou menadiona. Adicionalmente linhagens celulares com baixa expressão de *POLI* demonstraram redução da atividade do reparo por excisão de bases (BER). Estes estudos revelam o importante papel de POLI na proteção de danos contra o estresse oxidativo (BAVOUX ET AL, 2005; SALE, J. E.; LEHMAN, A. R.; WOODGATE, R., 2012)

É importante notar que as polimerases na família Y são expressas em todos os três reinos da vida, indicando um papel crítico e evolutivamente conservado para estas proteínas (OHMORI, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os níveis de expressão gênica das enzimas DNA polimerases com atividade TLS em pacientes portadores de SMD, associando os achados com alterações citogenéticas, variáveis clínicas, variáveis laboratoriais, prognóstico e sobrevida desses pacientes.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar os níveis de expressão gênica das enzimas *POLH*, *POLK*, *POLL*, *REV3L*, *POLN*, *POLQ*, *POLI*, *REVI* e *PCNA* através da utilização da metodologia de qPCR;
2. Comparar os níveis de expressão gênica das enzimas *POLH*, *POLK*, *POLL*, *REV3L*, *POLN*, *POLQ*, *POLI*, *REVI* e *PCNA* entre indivíduos saudáveis e portadores de SMD;
3. Associar os níveis de expressão gênica das enzimas *POLH*, *POLK*, *POLL*, *REV3L*, *POLN*, *POLQ*, *POLI*, *REVI* e *PCNA* às alterações citogenéticas;
4. Associar os níveis de expressão gênica das enzimas DNA Polimerases TLS às características clínico-laboratoriais de pacientes portadores de SMD;
5. Associar os níveis de expressão gênica das enzimas DNA Polimerases TLS à sobrevida e evolução para LMA;

3 PACIENTES, MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos da Pesquisa

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará/PROPESQ-UFC (número de processo: 96542518.8.0000.5054) através do sistema da Plataforma Brasil, utilizando-se de Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentados na sessão apêndice. A equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. A representação esquemática das metodologias utilizadas neste estudo encontram-se apresentadas na figura 10.

3.2 Obtenção das amostras de células de medula óssea

Foram coletados, em tubos de vidro Vacutainer® contendo EDTA, 3ml de medula óssea de 86 pacientes diagnosticados com SMD e 06 indivíduos saudáveis para os procedimentos de Citogenética Clássica e 5mL para os procedimentos de extração de RNA a fim de realizar os experimentos de expressão gênica. Foram analisados dados de expressão de mRNA de 9 genes em 86 amostras de *pool* celular de medula óssea de pacientes diagnosticados com SMD de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (SWERDLOW et al, 2008), atendidos em um hospital terciário de referência da Universidade Federal do Ceará no período de 2008 a 2017. A medula óssea dos doadores saudáveis foi coletada após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Os dados de expressão gênica foram correlacionados com dados citogenéticos e dados clínico-laboratoriais obtidos a partir de revisão de prontuário (Figura 10).

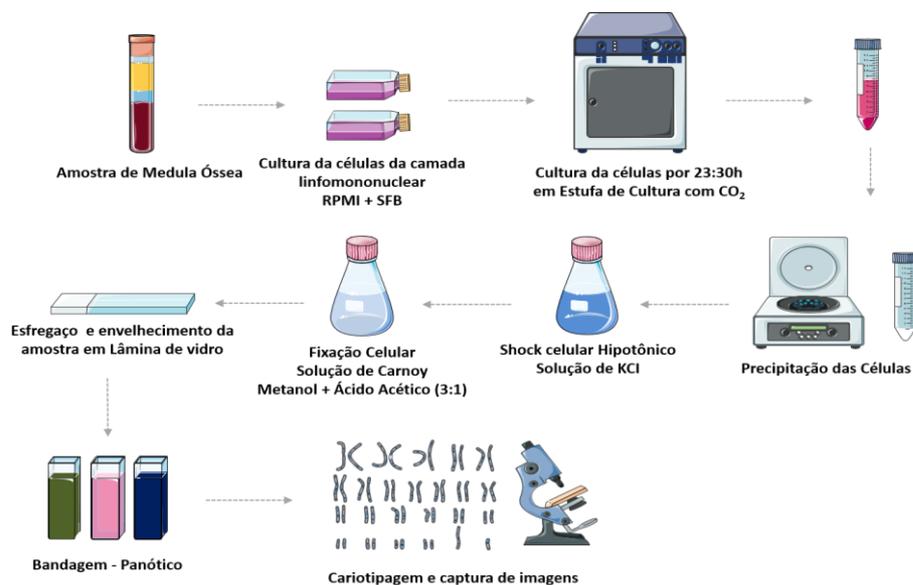
Para a separação das células do pool celular da medula óssea, realizou-se a transferência da amostra de medula óssea para um tubo do tipo Falcon de 50mL onde foi lavada com solução de lise (25mL de solução de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato de amônio 0,01 M). O conteúdo foi agitado lentamente por 3 minutos e centrifugado a 13200 rpm por 10 minutos a 4° C. Em seguida foi desprezada a fase aquosa e acrescentado 250µL de PBS, dependendo do volume do material obtido. Posteriormente foi acrescentado 750uL de Trizol LS Reagent® (Invitrogen, EUA) para cada 250uL de volume de PBS aplicado no pool

medular. O material foi homogeneizando com pipeta até dissolução completa. Após este procedimento, o material foi armazenado no freezer a -80°C .

3.3 Cariótipo por bandeamento-G

A Citogenética foi realizada de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceará, segundo a técnica descrita por Chauffaille e adaptada por Pinheiro (PINHEIRO et al, 2009). A medula óssea foi colhida em heparina e de forma estéril foi dividida em dois frascos contendo 7mL de meio RPMI 1640 (pH 7,0), 3mL de soro fetal bovino e 100 μL de L-glutamina. Este material foi cultivado por 24 horas em estufa a 37°C . Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 50 μL de colchicina (Colcemid®) por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspensão em solução hipotônica de KCl 0,075M e fixado em solução de ácido acético e metanol (proporção 3:1), por 4 vezes. Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia óptica e em seguida foram aquecidas por 3 minutos em micro-ondas na potência alta. O bandeamento foi realizado pela técnica de tripsina e as bandas coradas com o Kit Panótico®. Foram analisadas pelo menos 20 metáfases de cada paciente, sendo capturadas e analisadas em sistema computadorizado com software para cariotipagem: CytoVision® (Figura 8). Os resultados das análises citogenéticas de medula óssea foram estabelecidos de acordo com os critérios do Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (SHAFFER E TOMMERUP, 2014).

Figura 8: Representação esquemática da Metodologia de Citogenética por Bandeamento-G.



Fonte: Elaborada pelo autor

3.4 Análise de Expressão Gênica por RT-qPCR

3.4.1 Extração de RNA Total

A extração de RNA das células do pool medular dos pacientes com SMD e dos controles foi realizada a partir da utilização do Trizol LS Reagente® de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para cada 10⁶ células armazenadas em 1mL de Trizol Reagente® foram adicionados 200µL de Clorofórmio para desproteinização e 10µL de glicogênio, foram homogeneizadas em vórtex e, em seguida, centrifugadas a 14.000rpm por 15 minutos a 4° C. Retirou-se o sobrenadante de cada amostra, transferindo para novos tubos, seguidos de precipitação com 400µL de isopropanol, e incubado por 60 minutos a -20°C, após esse período, foi realizada outra centrifugação a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O pellet formado foi ressuspensão em etanol 70% (v/v) e novamente centrifugado por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado por inversão e, após seco, o pellet foi diluído em água livre de RNase.

Foram realizadas leituras espectrofotométricas em Nanodrop nos comprimentos de ondas de 230, 260 e 280nm, 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%.

3.4.2 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada com a utilização do Kit para Transcrição Reversa (RT) da Applied Biosystems® (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada reação de transcrição reversa foram utilizados uma quantidade otimizada de RNA total para uma concentração final de 2000ng/uL. Para cada reação, utilizou-se de 2,0µL de buffer, 0,8µL de dNTP, 2,0µL de Random Primers, 1,25µL de Multiscribe Reverse Transcriptase™ e 1,0µL de RNase Inhibitor. A quantidade citada de cada reagente foi multiplicada pelo número de amostras de RNA total para a confecção de um “Mix” de reação. Posteriormente, 6,8µL deste Mix foi adicionado a cada microtubo de PCR de 0,2mL. Em seguida foram adicionados as quantidades otimizadas de RNA total para cada amostra nos microtubos devidamente identificados em um volume final de 3,2µL. Por fim, o volume final de 10µL de cada reação foram submetidos ao termociclador onde foram realizados os seguintes ciclos de termociclagem para a síntese de cDNA: 25°C por 10 minutos e 37°C por 120 minutos. Por fim, as amostras de cDNA foram armazenadas em um freezer a uma temperatura de -20°C.

3.4.3 RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)

A quantificação da expressão gênica dos nove genes avaliados neste estudo (Tabela 3) foi realizada a partir da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) realizada no aparelho *7500 Real-Time PCR System®* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) disponível no Laboratório de Citogenômica do Câncer. As reações foram preparadas utilizando-se o Kit *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) otimizado para reações com sonda *TaqMan assay®* (Tabela 3) e contendo a *AmpliTaq Gold DNA polimerase*.

Tabela 3. Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR.

Símbolo	Nomenclatura	Cromossomo	Ensaio Taqman
<i>POLH</i>	DNA polymerase eta	6p21.1	Hs00197814_m1
<i>POLL</i>	DNA polymerase lambda	10q24.32	Hs00203191_m1
<i>REV3L</i>	DNA directed polymerase zeta catalytic subunit	6q21	Hs00161301_m1
<i>POLN</i>	DNA polymerase nu	4p16.3	Hs00394916_m1
<i>POLQ</i>	DNA polymerase theta	3q13.33	Hs00981375_m1
<i>POLI</i>	DNA polymerase iota	18q21.2	Hs00969214_m1
<i>POLK</i>	DNA polymerase kappa	5q13.3	Hs00211965_m1
<i>REVI</i>	DNA directed polymerase	2q11.2	Hs01019768_m1
<i>PCNA</i>	Proliferating cell nuclear antigen	20p12.3	Hs00427214_g1

Os preparos e armazenamentos dos materiais foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, excetuando o volume final de cada reação otimizado em 10µL. Para cada reação foram utilizados 5,0µL de TaqMan PCR Master Mix, 0,5µL de sonda TaqMan assay® e 2,5µL de cDNA (diluído 1:5). Após esta etapa, as placas das reações foram centrifugadas por 1 minuto a 4500 rpm. As condições para a reação de PCR foram as seguintes: pré-aquecimento a 50° C por 2 minutos, ativação da polimerase a 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação (15 segundos a 95° C) e anelamento e extensão (60 segundos a 60°C). Na preparação das reações foram utilizadas placas de polipropileno para 96 reações (MicroAmp 96-well Plates, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) cobertas com adesivos para microplacas ópticas resistentes a álcool e a altas temperaturas (Optical Adhesive film, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). Todas as etapas do procedimento descrito foram realizadas com as amostras imersas em gelo com pouca exposição à luz (Figura 9).

Cada amostra foi avaliada em duplicata e foram consideradas para análise somente as amostras cujas diferenças de amplificação não excederam a 0,8 ciclos ($\Delta Cq \leq 0,8$)

(VANDESOMPELE et al., 2002). As duplicatas das amostras que apresentaram diferenças maiores que um ciclo e meio, mesmo após repetição do experimento, foram desconsideradas. Em todas as placas foram realizados controles negativos (NTC) das reações para todos os genes estudados sendo que, para estas reações, foram adicionados 2,5 μ L de água no lugar da amostra de cDNA. Todas as reações que mostraram amplificação para qualquer um dos controles negativos foram desconsideradas (Figura 9).

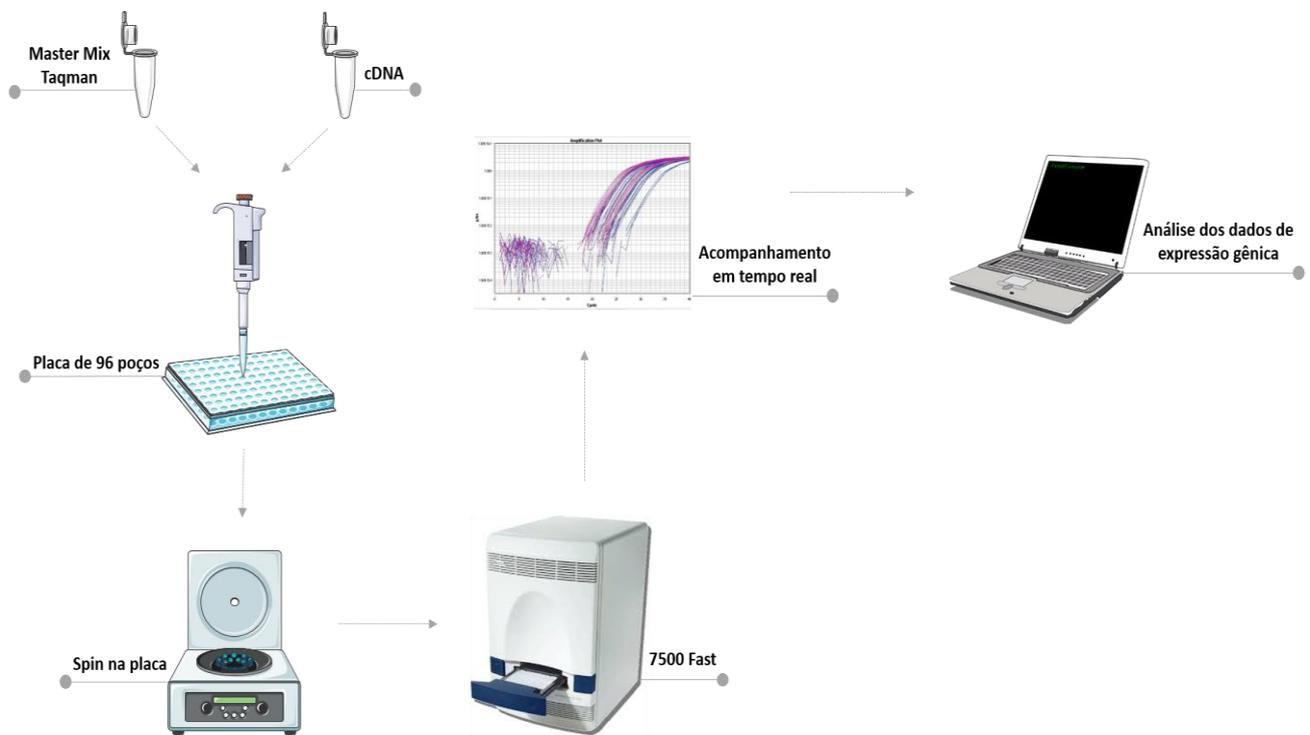
Adicionalmente, foi utilizado para cada placa e por cada gene estudado, uma amostra de referência (REF), em duplicata, a fim de padronizar e validar todas as placas do experimento. A amostra referência foi composta por cDNA oriundo de mRNA de um pool de duas linhagens celulares oriundas de tumores humanos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

Para validar a estabilidade dos níveis de expressão gênica foram utilizados três genes referência: β 2-microglobulina (*B2M*), Ubiquitina C (*UBC*) e Gliceraldeído fosfato desidrogenase (*GAPDH*). Para a escolha do par de genes de referência mais estável, foi calculado o desvio padrão de cada gene endógeno com base em valores brutos (*Cq* - quantification cycle). Entende-se como gene endógeno mais estável, aquele ou aqueles que obtiverem o menor valor de desvio padrão. Após a análise do desvio padrão, foi realizado um cálculo de coeficiente de correlação de Pearson para cada par de genes de referência candidatos. Em seguida, foi feita a média geométrica de todos os genes, conhecida como média de tendência central (INDEX), e feita correlação de Pearson de cada gene, separadamente, com o INDEX obtido. Os genes de referência que apresentaram menor valor de desvio padrão e maior correlação entre si e com o valor INDEX ($r > 0,7$) (VANDESOMPELE et al, 2002) foram considerados os mais estáveis.

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

outliers frente as amostras avaliadas em um dado estudo podem interferir na precisão da estimativa correta das análises realizadas. Assim, inicialmente, antes de quaisquer avaliações dos dados para realização de análises estatísticas, a fim de determinar a qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras dos pacientes avaliadas, foram retirados do estudo todas as amostras que apresentaram elevados valores de desvio padrão. Neste sentido, iniciamos este estudo com um total de 102 amostras de cDNA, mantendo-se, o total de 86 amostras para prosseguimento das análises estatísticas.

Figura 9: Representação esquemática da Metodologia de qRT-PCR



Fonte: Elaborada pelo autor

3.5 Variáveis analisadas

As variáveis analisadas neste estudo foram assim subdivididas:

- ❖ Grupo: Caso e controle
- ❖ Sexo: masculino e feminino;
- ❖ Idade (categorização 1): ≤ 60 anos e > 60 anos;
- ❖ Idade (categorização 2): ≤ 60 anos, $> 60 - \leq 70$ anos, > 70 anos;
- ❖ Origem: urbano e rural;
- ❖ Quanto à classificação da OMS (2008): CRDU (Citopenia Refratária com Displasia de Única Linhagem), ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel), CRDM (Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas Linhagens), AREB I (Anemia Refratária com Excesso de Blastos I), AREB II (Anemia Refratária com Excesso de Blastos II), t-SMD (SMD Secundária ao tratamento), LMMC (Leucemia Mielomonocítica Crônica);
- ❖ Forma da SMD: Iniciais (CRDU, ARSA e CRDM) e Avançadas (AREB I e AREB II);
- ❖ Celularidade da medula óssea: Hipocelular, Normocelular e Hiper celular;
- ❖ Fibrose na medula óssea: Presença e Ausência;
- ❖ Displasias na medula óssea: 0, 1 displasia, 2 displasias e 3 displasias;
- ❖ Diseritropoiese: Presença e Ausência;
- ❖ Disgranulopoiese: Presença e Ausência;
- ❖ Dismegacariopoiese: Presença e Ausência;
- ❖ Sideroblastos em anel: Presença e ausência;
- ❖ Faixas de porcentagens de Sideroblastos em anel: 0, 1-14% e $> 15\%$;
- ❖ Porcentagens de Blastos categorizada: $< 10\%$ e $> 10\%$;
- ❖ Cariótipo - Quanto à alteração: normal e alterado;
- ❖ Cariótipo (Aneuploidia): normal, alterado não aneuplóide e alterado aneuplóide;
- ❖ Cariótipo (Alteração no cromossomo 5): normal, alterado com $-5/5q$ e alterado sem $-5/5q$;
- ❖ Cariótipo (Alteração no cromossomo 7): normal, alterado com $-7/7q$ e alterado sem $-7/7q$;
- ❖ Cariótipo (Número de alterações): normal, 1 alteração, 2 alterações e Complexo (3 ou mais alterações);
- ❖ Quanto ao prognóstico (IPSS-R): muito favorável, favorável, intermediário, desfavorável e muito desfavorável;

- ❖ Classificação dos valores de hemoglobina (Hb) (IPSS-R): $\geq 10\text{g/dL}$, $8 < 10\text{g/dL}$ e $< 8\text{g/dL}$;
- ❖ Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) (IPSS-R): ≥ 800 por mm^3 e < 800 por mm^3 ;
- ❖ Classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R): ≥ 100.000 por mm^3 , $50.000 - < 100.000$ por mm^3 e ≤ 50.000 por mm^3 ;
- ❖ Classificação do número de citopenias no sangue periférico: 0/1 citopenia e 2/3 citopenias;
- ❖ Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- ❖ Classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- ❖ Dependência Transfusional: sim e não (utilizando-se o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (MALCOVATI et al., 2005);
- ❖ Resposta ao tratamento com Eritropoietina: Com resposta e sem resposta;
- ❖ Óbito: sim e não;
- ❖ Evolução para LMA: sim e não.

3.6 Análises Estatísticas

3.6.1 Análises Estatísticas para avaliação dos dados de expressão gênica

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

Os testes de Skinner's/kurtosis e Shapiro-Wilk foram utilizados para verificar se os dados de cada variável analisada apresentavam-se com distribuição normal (O primeiro para variáveis com mais de 50 casos e o segundo para variáveis com menos de 50 casos). Os valores de *outliers* foram retirados (quando ocorreram), por não representarem os resultados que o estudo tinha o objetivo de generalizar. Os dados com distribuição normal foram analisados através dos seguintes testes paramétricos: t de Student, para a comparação da média entre dois grupos, e teste

de *one-way* ANOVA para a comparação das médias em variáveis com mais de dois grupos. As variáveis que não possuíam distribuição normal foram analisadas através dos seguintes testes não-paramétricos: Mann-Whitney para a comparação da mediana entre dois grupos, e teste de Kruskal-Wallis para a comparação da mediana em variáveis com três ou mais grupos.

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

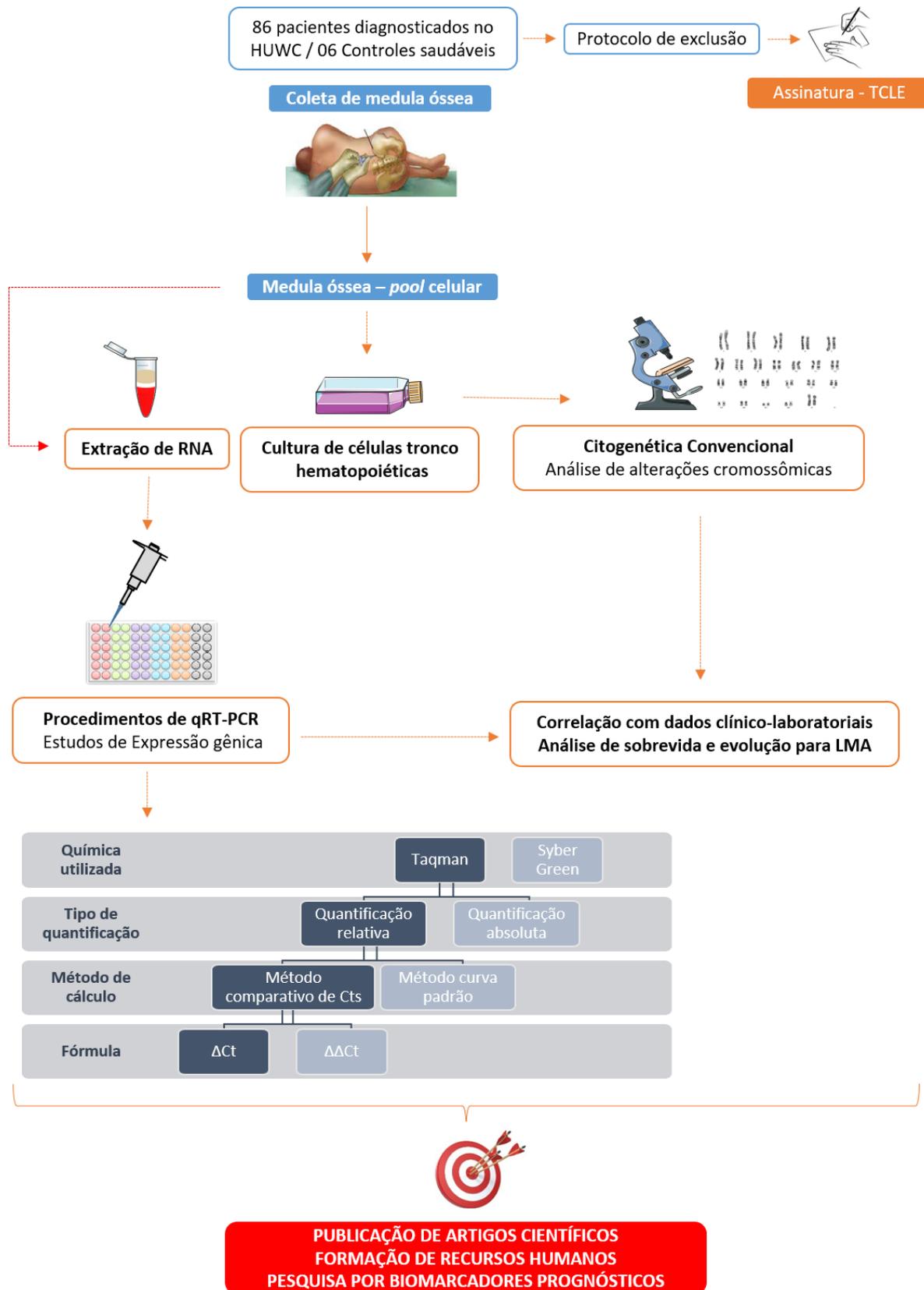
3.6.2 Análise estatística para a avaliação da associação dos resultados de expressão dos genes avaliados com a sobrevida dos pacientes com SMD.

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

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

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

Figura 10: Fluxograma representando o delineamento experimental do estudo.



Fonte: Elaborada pelo autor

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos pacientes

O número amostral do estudo (n) foi de 86 pacientes para o grupo SMD e 6 voluntários saudáveis para o grupo controle (Tabela 4). Quanto às variáveis sócio-demográficas dos pacientes com SMD, frente à variável gênero, foram incluídos 45 indivíduos do sexo feminino (52,3%) e 41 do sexo masculino (47,7%) (Tabela 4).

A variável idade foi estratificada de duas formas: idade categorizada (≤ 60 anos, >60 anos) e idade categorizada de acordo com o IPSS-R (GREENBERG et al, 2012) (≤ 60 anos, $>60 - \leq 70$ anos, $>70 - \leq 80$ anos e >80 anos). Para o grupo SMD, a média de idade foi de 66,3 anos (mediana = mínimo de 15 anos e máximo de 92 anos) (Tabela 6).

Quanto à variável origem (estratificada em urbano ou rural), foram obtidas informações de 73 pacientes, onde 51 (55,4%) eram de origem urbana e 22 pacientes eram de origem rural (30,1%) (Tabela 4). As percentagens de cada variável foram calculadas tendo como base a quantidade de casos em que foi possível obter a informação referente àquela variável. Os casos omissos foram retirados deste cálculo.

Tabela 4: Caracterização descritiva das variáveis sociodemográficas dos pacientes com SMD.

VARIÁVEIS		Nº	%
Grupo	Controle	06	6,5%
	Caso	86	93,5%
Etiologia	SMD Primária	71	94,7%
	SMD Secundária	4	4,3%
Sexo	Feminino	45	52,3%
	Masculino	41	47,7%
Idade (Categorizada de acordo com o IPSS 2012)	≤ 60 anos	26	31,3%
	$>60 - \leq 70$ anos	18	21,7%
	$>70 - \leq 80$ anos	25	30,1%
	>80 anos	14	16,9%
Idade (categorizada)	≤ 60 anos	26	31,3%
	> 60 anos	57	68,7%
Origem	Urbana	51	69,9%
	Rural	22	30,1%

Em relação às variáveis clínicas dos pacientes com SMD, identificou-se que 71 (94,7%) dos pacientes foram classificados como SMD primária e 4 (4,3%) foram classificados como SMD secundária ao tratamento (t-SMD) (Tabela 5). No que se refere à

classificação OMS (2001/2008) (JAFFE et al., 2001; BRUNNING et al., 2008), os pacientes foram categorizados da seguinte forma: 9 pacientes (11,8%) como CRDU, 14 (18,4%) pacientes como ARSA, 30 (39,5%) pacientes como CRDM, 10 (13,2%) pacientes classificados como AREB I, 7 (9,2%) pacientes como AREB II, 4 (5,3%) pacientes como SMD secundária, 2 (2,6%) pacientes como LMMC (Tabela 5).

Categorizamos, também, a doença nas suas formas iniciais (CRDU, CRDM e ARSA) e avançadas (AREB I e AREB II). Observou-se que 53 (75,7%) dos casos foram inseridos nas formas iniciais e 17 (18,5%) foram inseridos nas formas avançadas (Tabela 5).

Tabela 5: Estratificação clínica dos pacientes pela classificação da OMS (2008).

VARIÁVEIS		Nº	%
Classificação da OMS	CRDU	09	11,8%
	ARSA	14	18,4%
	CRDM	30	39,5%
	AREB I	10	13,2%
	AREB II	07	9,2%
	LMMC	02	2,6%
	SMD SEC	04	5,3%
Formas da SMD	Iniciais	53	75,7%
	Avançadas	17	18,5%

Quanto à variável celularidade da medula óssea, avaliada através da biópsia de medula óssea, 51 pacientes realizaram o exame de biópsia e observamos que 04 pacientes (7,8%) apresentaram medula óssea hipocelular, seguidos de 13 pacientes com medula óssea normocelular (25,5%) e 34 pacientes com medula hipercelular (66,7%). Adicionalmente, foi observado que 11 (37,9%) pacientes apresentaram fibrose na medula óssea (Tabela 6).

Quanto à presença de displasias na medula óssea, avaliada através do exame de mielograma, observou-se que houve um predomínio de displasias na linhagem eritroide (diseritropoiese), em 51 (71,8%) casos, seguidos de displasias na linhagem megacariocítica (dismegacariopoiese) (30/42,3%), e, por último, displasias na linhagem granulocítica (disgranulopoiese) (28/39,4%) (Tabela 6).

Quanto à porcentagem de blastos na medula óssea, obtivemos resultado de 79 dos 86 pacientes. Identificamos que 57 (66,3%) dos pacientes estavam inclusos na faixa de $\leq 2\%$, seguido de 9 (10,5%) pacientes na faixa de 5%-10%, 8 (9,3%) na faixa de >2 a $<5\%$ e, por fim, 5 (5,8%) pacientes incluídos na faixa $>10\%$ (Tabela 6). No que se refere a presença de Sideroblastos em anel, 58 (73,4%) pacientes não apresentaram sideroblastos em anel na análise do mielograma ao diagnóstico. Em contrapartida, observou-se que 6 (7,6%) pacientes

foram inclusos na faixa de 1% - 14%, seguidos de 15 (19%) pacientes inclusos na faixa de $\geq 15\%$ (Tabela 6)

Tabela 6: Frequência das variáveis clínicas relacionadas aos achados da medula óssea em pacientes com SMD.

VARIÁVEIS		Nº	%
Celularidade da medula óssea	Hipocelular	04	7,8%
	Normocelular	13	25,5%
	Hiper celular	34	66,7%
Fibrose na medula óssea	Ausência	18	62,1%
	Presença	11	37,9%
Displasias na medula óssea	1	21	29,2%
	2	35	48,6%
	3	07	9,7%
Diseritropoese	Presença	51	71,8%
	Ausência	20	28,2%
Dismegacariopoese	Presença	30	42,3%
	Ausência	41	57,7%
Disgranulopoese	Presença	28	39,4%
	Ausência	43	60,6%
Presença de Sideroblastos em anel	0%	58	73,4%
	$\geq 1\%$ - $\leq 14\%$	06	7,6%
	$\geq 15\%$ - $< 50\%$	15	19,0%
Faixas das percentagens de blastos	$\leq 2\%$	57	66,3%
	> 2 a $< 5\%$	08	9,3%
	$> 5\%$ - $\leq 10\%$	09	10,5%
	$> 10\%$	05	5,8%

Com relação à análise citogenética dos pacientes, observou-se que 60 deles (69,8%) apresentaram resultados e 26 (30,2%) apresentaram ausência de metáfase ao diagnóstico (Tabela 7). Dentre os 60 pacientes com resultado citogenético identificou-se que 36 (41,9%) pacientes possuíam cariótipo normal (Tabela 7) e 24 (27,9%) pacientes apresentaram cariótipo alterado. Quanto as alterações citogenéticas mais comuns que acometem os pacientes com SMD, observou-se que 11 (18,3%) pacientes apresentaram alteração relacionada ao cromossomo 5 (-5/5q), 2 (3,3%) pacientes apresentaram alteração relacionada ao cromossomo 7 (-7/7q-) e 12 (20,3%) dos pacientes apresentaram cariótipo com aneuploidia (Tabela 7).

Dos pacientes que apresentaram resultado citogenético (exceto os pacientes com SMD-sec), realizamos a classificação prognóstica frente ao cariótipo, estabelecida pelo IPSS-

R (GREENBERG et al., 2012). Verificamos que houve um predomínio de pacientes com prognóstico favorável em 46 (76,7%) casos (Tabela 9).

Tabela 7: Frequência dos resultados citogenéticos e seu impacto prognóstico em pacientes com SMD ao diagnóstico.

VARIÁVEIS		Nº	%
Cariótipo	Normal	36	60,0%
	Alterado	24	40,0%
Aneuploidia	Normal	36	62,7%
	Alterado não Aneuploide	10	16,9%
	Aneuploide	12	20,3%
Alterações no cromossomo 5	Normal	36	60,0%
	Alterado com 5q-	11	18,3%
	Alterado sem 5q-	13	21,7%
Alterações no cromossomo 7	Normal	36	60,0%
	Alterado com 7q-	2	3,3%
	Alterado sem 7q-	22	36,7%
Classificação do cariótipo de acordo com o IPSS-R	Muito favorável	2	3,3%
	Favorável	46	76,7%
	Intermediário	8	13,3%
	Desfavorável	0	0,0%
	Muito desfavorável	4	6,7%

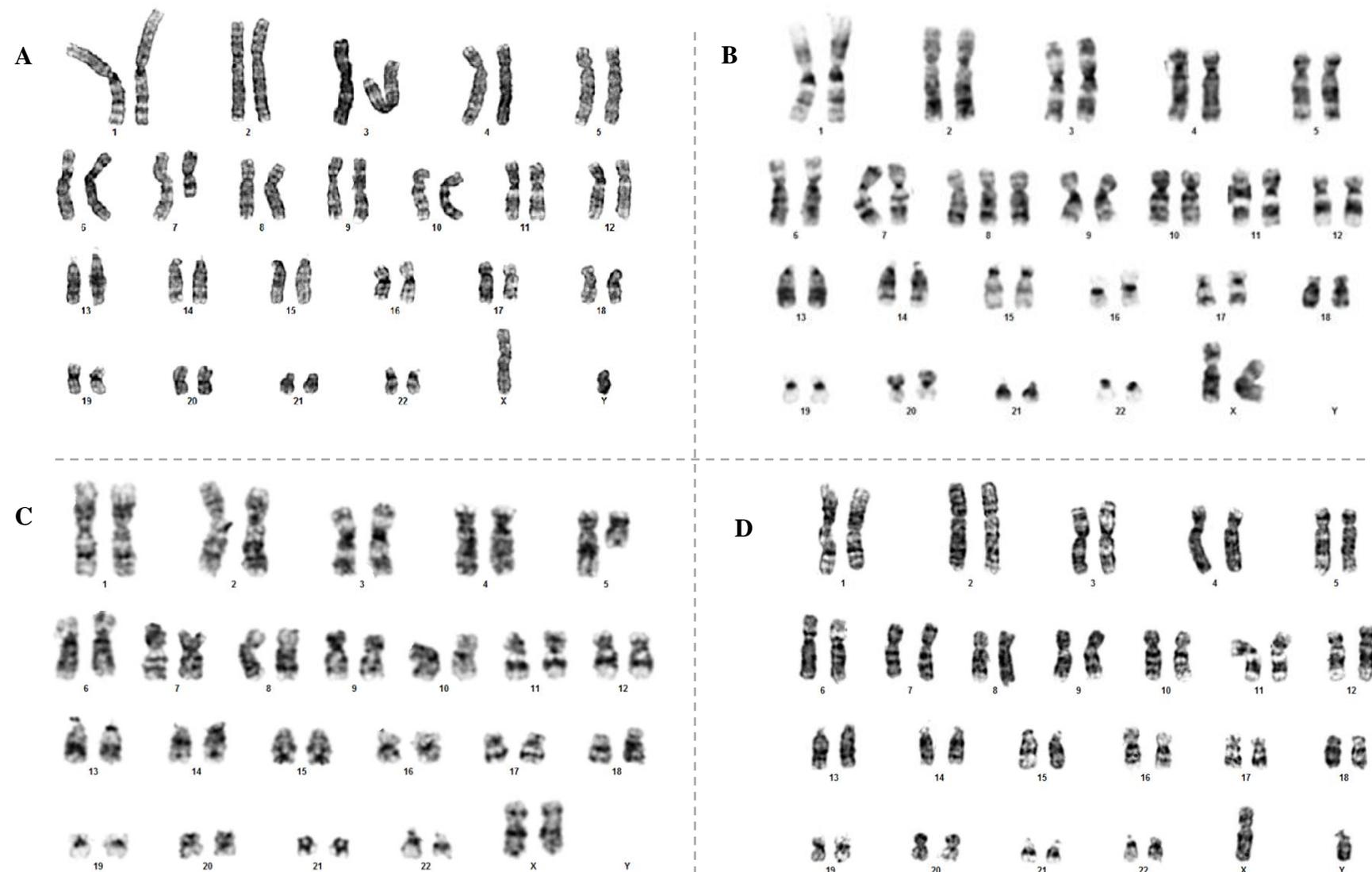
Tabela 8: Descrição clínica dos pacientes com SMD incluídos no estudo.

Paciente	Sexo	Idade	Celularidade	Cariótipo - ISCN 2016	OMS	IPSS-R	DT	e-LMA	Óbito
1	F	74	-	46,XX[22]	-	-	N	N	N
2	F	81	-	46,X,i(x)(q10),del(17)(q22q23.3)[7]/46,XX[13]	CRDU	Baixo	N	-	N
3	F	69	Normocelular	46,XX,del(5)(q12q33)[18]/46,XX[2]	CRDM	Baixo	S	N	N
4	F	45	Normocelular	46,XX[7]	AREB I	Muito Baixo	N	-	N
5	M	77	-	46,XY[20]	LMMC	Intermediario	N	N	N
6	M	47	Normocelular	47,XY,+mar[5]/46,XY,del(5)(q31)[5]/46,XY[15]	CRDM	Baixo	S	-	S
7	M	31	-	46,XY[24]	CRDM	Baixo	N	N	N
8	M	73	-	46,XY[20]	AREB I	Baixo risco	N	-	N
9	M	78	-	46,XY[20]	AREB II	-	N	N	N
10	M	62	-	AUSENCIA DE METAFASE	CRDM	-	S	N	S
11	M	55	-	46,XY[15]	CRDM	Muito baixo	N	N	N
12	F	-	-	AUSENCIA DE METAFASE	-	-	-	-	-
13	F	65	Hipercelular	46,XX[20]	CRDM	-	N	N	N
14	F	70	Hipercelular	AUSENCIA DE METAFASE	ARSA	-	S	N	N
15	M	91	-	46,X-Y[4]/46,XY[16]	ARSA	Muito baixo	N	N	S
16	M	85	Normocelular	46,XY[20]	AREB I	Intermediario	N	N	S
17	F	65	-	46,XY[9]	SMD SEC	-	N	N	N
18	F	84	-	46,XX,del(20)(q13.1)[7]/46,XX[16]	CRDU	Muito baixo	-	N	N
19	F	72	Hipercelular	46,XX[6]	CRDU	Muito baixo	N	N	N
20	F	51	Hipercelular	46,XX[11]	ARSA	Muito baixo	N	N	N
21	F	77	-	AUSENCIA DE METAFASE	AREB I	-	S	N	S
22	M	67	Hipercelular	46,XY[20]	AREB I	Alto risco	N	N	S
23	M	79	-	AUSENCIA DE METAFASE	AREB II	-	S	-	S
24	M	62	Hipercelular	47,XY,+15[10]/46,XY[10]	ARSA	Intermediario	S	N	N
25	M	73	Hipercelular	46,XY[18]/47,XY,+20[5]	CRDU	Baixo risco	N	N	N
26	M	82	Hipercelular	46,XX[20]	ARSA	Baixo risco	S	N	S
27	M	68	Hipercelular	AUSENCIA DE METAFASE	AREB II	-	S	S	S
28	F	87	-	46,XX[20]	AREB I	Intermediario	N	N	S
29	F	42	Normocelular	AUSENCIA DE METAFASE	ARSA	-	S	N	S
30	M	74	Hipercelular	46,XY[20]	CRDM	Intermediario	N	N	S
31	F	73	Hipercelular	46,XX[7]	CRDM	Baixo risco	N	N	S
32	M	15	Hipocelular	46,XY,del(5)(q22q33)[5]/46,XY[7]	CRDM	Muito baixo	N	N	N
33	M	79	Hipercelular	AUSENCIA DE METAFASE	CRDM	-	S	S	S
34	M	92	-	46,XY,del(5)(q32)[13]/46,XY[17]	ARSA	Baixo risco	N	N	N
35	M	82	-	AUSENCIA DE METAFASE	CRDM	-	N	N	S

36	M	75	-	92,XXYY[4	AREB I	Muito alto	S	-	S
37	M	81	Hiper celular	46,XY[20]	LMMC	Intermediario	N	S	S
38	M	43	Hiper celular	46,XY[5]	CRDM	Baixo risco	S	N	S
39	M	70	Hiper celular	46,XY,add(17)(p13)[8]/46,XY,del(9)(q15),add(17)(p13)[10]/46,XY[2]	AREB II	Muito alto	S	S	N
40	M	62	Hiper celular	AUSENCIA DE METAFASE	CRDM	-	-	N	N
41	M	41	Hipocelular	47,XY,+mar[6]/46,XY,del(5)(q31)[3]/46,XY,del(7)(q32)[2]/46,XY,del(5)(q31),del(7)(q32)[2]/46,XY[7]	AREB I	Baixo risco	-	N	S
42	M	45	Normocelular	46,XY,-?10,+mar[5]/46,XY[1]	CRDM	Intermediario	S	N	S
43	M	77	-	46,XY,add(13)(p11)[12]/46,XY,del(7)(q32),add(13)(p11)[4]/48,XY,add(13)(p11),+22,+mar[9]/48,XY,del(7)(q32),add(13)(p11),+22,+mar[3]/46,XY[2]	CRDM	Muito alto	S	N	S
44	M	82	Hiper celular	46,XY[25]	CRDM	Baixo risco	S	N	N
45	M	49	Hiper celular	47,XY,+mar[6]/48,XY,+8,del(16)(?q22),+mar[4]/47~50,XY,del(4)(?q35),+8,+10,+11,del(16)(?q22),+21,+mar[cp8]	CRDM	Muito alto	S	-	S
46	M	70	Hiper celular	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	S	S	S
47	M	56	Normocelular	AUSENCIA DE METAFASE	-	-	-	-	S
48	M	87	Normocelular	46,XY[6]	CRDU	Intermediario	N	N	N
49	M	59	-	AUSENCIA DE METAFASE	CRDM	-	N	N	N
50	M	64	Hiper celular	37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/46,XY,del(5)(q15q33)[5]/46,XY[6]	AREB II	Muito alto	S	N	N
51	F	47	-	46,XX[15]	CRDU	Baixo risco	S	N	S
52	F	59	-	AUSENCIA DE METAFASE	CRDM	-	S	S	N
53	F	68	Normocelular	46,XX[20]	CRDM	Muito baixo	N	N	S
54	F	41	-	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(?q25)[7]/46,XX[4]	CRDM	Baixo risco	S	-	S
55	F	57	Hiper celular	46,XX[8]	CRDM	Intermediario	S	N	S
56	F	76	Hiper celular	47,XX,+22[4]/46,XX[16]	CRDM	Baixo risco	N	N	S
57	F	65	-	AUSENCIA DE METAFASE	SMD SEC	-	-	N	N
58	F	-	-	AUSENCIA DE METAFASE	-	-	-	-	-
59	F	65	Hiper celular	AUSENCIA DE METAFASE	CRDM	-	S	N	N
60	F	45	Hipocelular	AUSENCIA DE METAFASE	-	-	-	-	S
61	F	66	Hiper celular	46,XX[26]	ARSA	Baixo risco	N	N	N
62	F	71	-	175,XXXXXXXXX,-5,-6,-7,-8,-9,-11,-13,-14[4]/46,XX,del(5)(q15q33)[8]/46,XX[19]	SMD SEC	-	-	N	N
63	F	47	Normocelular	46,XX[20]	CRDM	Baixo risco	N	N	S
64	F	60	Normocelular	AUSENCIA DE METAFASE	CRDU	-	-	N	N
65	F	-	-	46,XX[20]	-	-	-	-	-
66	F	77	-	AUSENCIA DE METAFASE	CRDU	-	S	-	S
67	F	84	Hiper celular	AUSENCIA DE METAFASE	ARSA	-	N	N	N
68	F	87	Hiper celular	AUSENCIA DE METAFASE	ARSA	-	N	N	S
69	F	73	Normocelular	AUSENCIA DE METAFASE	-	-	-	-	S

70	F	44	-	46,XX[20]	AREB II	Muito alto	S	-	S
71	F	82	Hiper celular	46,XX[5]	ARSA	Baixo risco	S	-	S
72	F	76	-	46,XX[15]	ARSA	Baixo risco	N	N	N
73	F	77	-	AUSENCIA DE METAFASE	SMD SEC	-	S	N	S
74	F	46	Hiper celular	46,XX[8]	CRDU	Baixo risco	S	N	S
75	M	76	Hiper celular	71~99<4N>,XY...[4]/46,XY,del(17)(p11.2)[9]/46,XY[7]	CRDM	Baixo risco	N	N	N
76	F	27	Hiper celular	46,XX,del(5)(q31q33)[7]/46,XX[18]	-	Muito baixo	-	-	S
77	M	69	-	46XY[10]	-	Muito baixo	-	-	S
78	M	74	Normocelular	46,XY[11]	AREB I	Alto risco	S	N	S
79	F	24	Hipocelular	46,XX,del(5)(q15q33)[4]/46,XX[18]	CRDM	Baixo risco	N	N	S
80	F	44	-	AUSENCIA DE METAFASE	CRDM	-	N	N	N
81	F	81	Hiper celular	47,XX,t(4;11)(q27;q32),+mar[4]/46,XX[16]	CRDM	Baixo risco	N	N	S
82	F	73	Hiper celular	46,XX[12]	ARSA	Baixo risco	N	N	S
83	F	60	-	46,XX[20]	-	-	S	-	S
84	M	74	Hiper celular	46,XY[6]	ARSA	Baixo risco	N	N	N
85	M	73	-	AUSENCIA DE METAFASE	AREB II	-	S	-	S
86	M	66	Hiper celular	AUSENCIA DE METAFASE	AREB I	-	S	N	S

Figura 11: Representação dos resultados citogenéticos encontrados a partir de amostras de medula óssea de pacientes com SMD.



A. Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo alterado 46,XY,del(7)(q32)[2], de prognóstico desfavorável de acordo com a classificação do IPSS (GREENBERG et al., 1997). **B.** Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo alterado 47,XX,+8[3], de prognóstico intermediário de acordo com a classificação do IPSS (GREENBERG et al., 1997). **C.** Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo alterado 46,XX,del(5)(q31q35)[9], de prognóstico favorável de acordo com a classificação do IPSS (GREENBERG et al., 1997). **D.** Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo normal 46,XY[10] de prognóstico favorável de acordo com a classificação do IPSS (GREENBERG et al., 1997).

Quanto aos achados clínico-laboratoriais observados no sangue periférico dos pacientes, foi observado, ao hemograma, que 25 (30,5%) pacientes apresentaram Hb inferior a 8g/dL, que 20 (24,7%) pacientes apresentaram contagem de neutrófilos (ANC) inferior a 800 por mm^3 e, por fim, 35 (42,7%) pacientes apresentaram contagem de plaquetas inferior a 100.000/ mm^3 (Tabela 9). Frente ao número de citopenias identificados no sangue periférico, em acordo com os pontos estabelecidos Greenberg et al. (2012), foi observado que houve um predomínio de pacientes com a presença de 1 (uma) citopenia em 53 (66,3%) casos avaliados (Tabela 9).

Tabela 9: Frequência das variáveis clínico-laboratoriais relacionadas aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD.

VARIÁVEIS		Nº	%
Classificação dos valores de hemoglobina (HB)	$\geq 10\text{g/dL}$	32	39,0%
	$\geq 8 - <10\text{g/dL}$	25	30,5%
	$< 8 \text{ g/dL}$	25	30,5%
Classificação dos valores de neutrófilos (ANC)	$\geq 800/\text{mm}^3$	61	75,3%
	$< 800/\text{mm}^3$	20	24,7%
Classificação dos valores de plaquetas	$\geq 100.000/\text{mm}^3$	47	57,3%
	$\geq 50.000 - < 100.000/\text{mm}^3$	18	22,0%
	$< 50.000/\text{mm}^3$	17	20,7%
Classificação dos valores de plaquetas (categorizada)	≥ 100.000	47	57,3%
	< 100.000	35	42,7%
Número de citopenias de acordo com o IPSS-R	0/1	53	66,3%
	2/3	27	33,8%

Frente aos grupos de risco estabelecidos pelo IPSS-R (GREENBERG et al., 2012), verificou-se que 10 (18,5%) pacientes foram classificados como muito baixo risco; 27 (50,0%) pacientes foram definidos como baixo risco; 9 (16,7%) pacientes definidos como risco intermediário; 2 (3,7%) e 6 (11,1%) pacientes foram estratificados como alto risco e risco muito alto, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10: Frequência das variáveis associadas aos grupos de risco dos pacientes com SMD ao diagnóstico.

VARIÁVEIS		Nº	%
Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R	Muito baixo (≤ 1.5)	10	18,5%
	Baixo ($> 1.5-3$)	27	50,0%
	Intermediário ($> 3-4.5$)	09	16,7%
	Alto ($> 4.5-6$)	02	3,7%
	Muito alto (> 6)	06	11,1%

Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R (categorizada)	Muito Baixo+Baixo	36	66,7%
	Intermediário	10	18,5%
	Muito Alto + Alto	08	14,8%

Quanto ao acompanhamento terapêutico, observamos que 34 (47,9%) pacientes tornaram-se dependentes transfusionais, quando utilizado o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses estabelecido por Malcovati et al. (2005) (Tabela 11); 39 (54,9%) fizeram uso de EPREX. Dentre os pacientes que fizeram uso de EPREX, 11 (36,7%) responderam ao tratamento e 19 (63,3%) não responderam. Em relação ao uso de hipometilantes, 16 (22,2%) fizeram uso e 56 (77,8%) não fizeram uso (Tabela 11).

No que se refere à progressão da doença e evolução, constatamos que 6 (9,2%) dos pacientes evoluíram para LMA e, por fim, verificou-se que 47 (56,6%) pacientes foram a óbito e no decorrer da execução do presente estudo (Tabela 11).

Tabela 11: Frequência das escolhas terapêuticas e evolução clínica dos pacientes com SMD

VARIÁVEIS		Nº	%
Tratamento com Eprex®	Sim	39	54,9%
	Não	32	45,1%
Resposta ao tratamento com Eprex®	Sim	11	36,7%
	Não	19	63,3%
Tratamento com agentes hipometilantes	Sim	16	22,2%
	Não	56	77,8%
Dependência transfusional	Sim	34	47,9%
	Não	37	52,1%
Óbito	Sim	47	56,6%
	Não	36	43,4%
Evolução para LMA	Sim	06	9,2%
	Não	59	90,8%

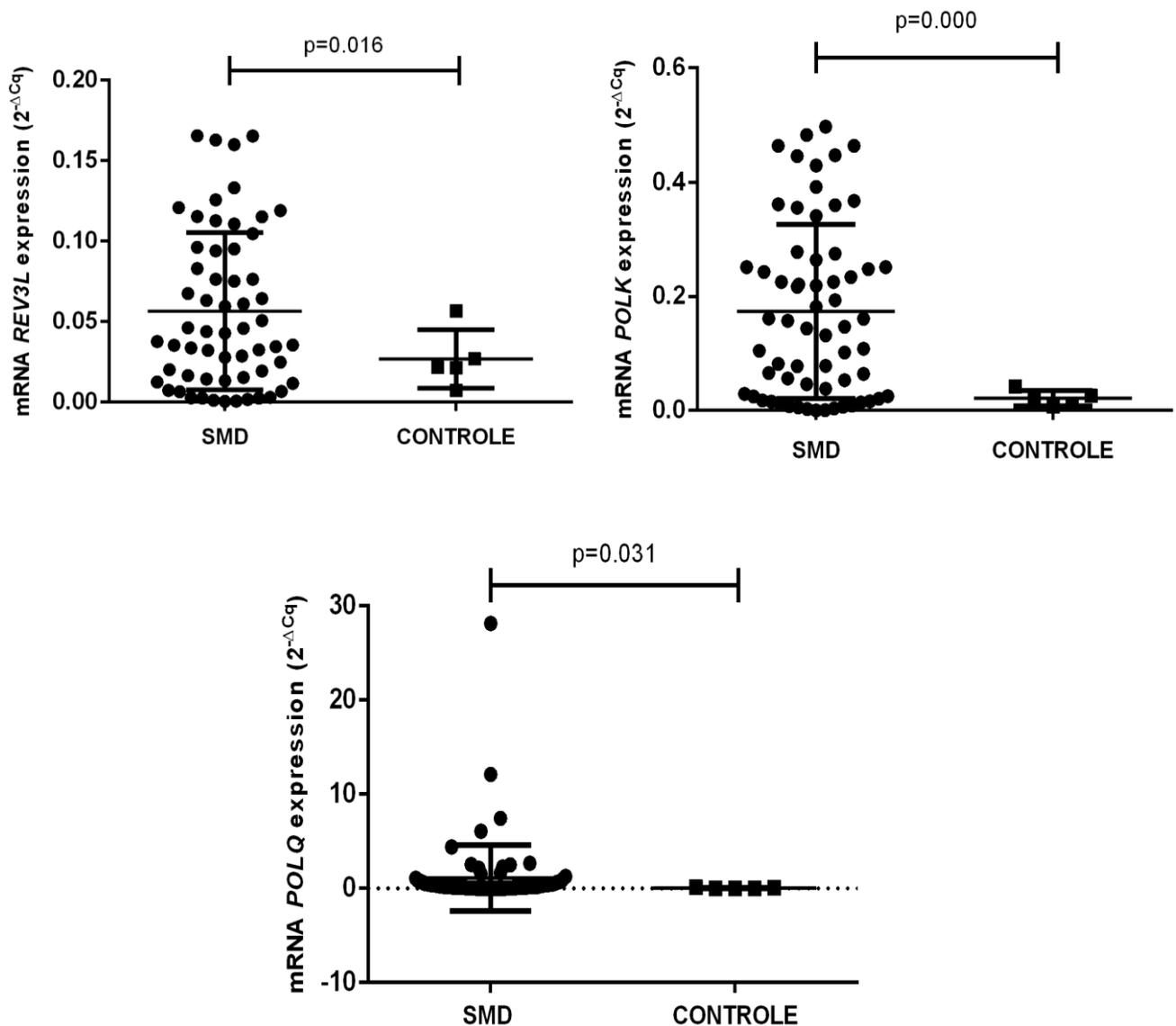
4.2 Análise do nível de expressão gênica por qRT-PCR em amostras de medula óssea de pacientes com SMD

As associações entre os níveis de expressão dos genes *POLH*, *POLK*, *POLQ*, *POLL*, *POLI*, *POLN*, *REVI*, *REV3L* e *PCNA* e as variáveis clínico-laboratoriais, bem como a associação com o grupo controle (indivíduos saudáveis) serão apresentados a seguir. Para melhor compreensão, os resultados serão apresentados por variável analisada.

4.2.1 Expressão gênica das Polimerases TLS em pacientes com SMD e indivíduos saudáveis

Ao avaliar os níveis de expressão gênica em pacientes com SMD e indivíduos saudáveis, verificamos que houve aumento dos níveis de expressão dos genes *REV3L* ($p = 0.016$), *POLK* ($p = 0.000$) e *POLQ* ($p=0,031$) nos indivíduos portadores de SMD quando comparados com controles saudáveis (Figura 11)

Figura 12: Nível de expressão dos genes *REV3L*, *POLK* e *POLQ* em pacientes com SMD frente aos controles saudáveis



GENE <i>REV3L</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)					
GRUPO	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	Teste de Levene	p-valor†
SMD	,0565698712	,04875535313	,00674650106	,05275780131	0.016	0.016
CONTROLE	,0268177200	,01823362219				

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

GENE <i>POLK</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)					
GRUPO	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	Teste de Levene	p-valor†
SMD	,1733240492	,1524372275	,11136491778	,19188970063	0.001	0.000
CONTROLE	,0216967400	,0137019270				

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

GENE <i>POLQ</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)				
GRUPO	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de MannWhitney†
SMD	,2025909680	3,5020847103	,0001708810	28,15724672	0.031
CONTROLE	,0285020900	,0405106259	,0117310360	,1106210760	

†Mann-Whitney: Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

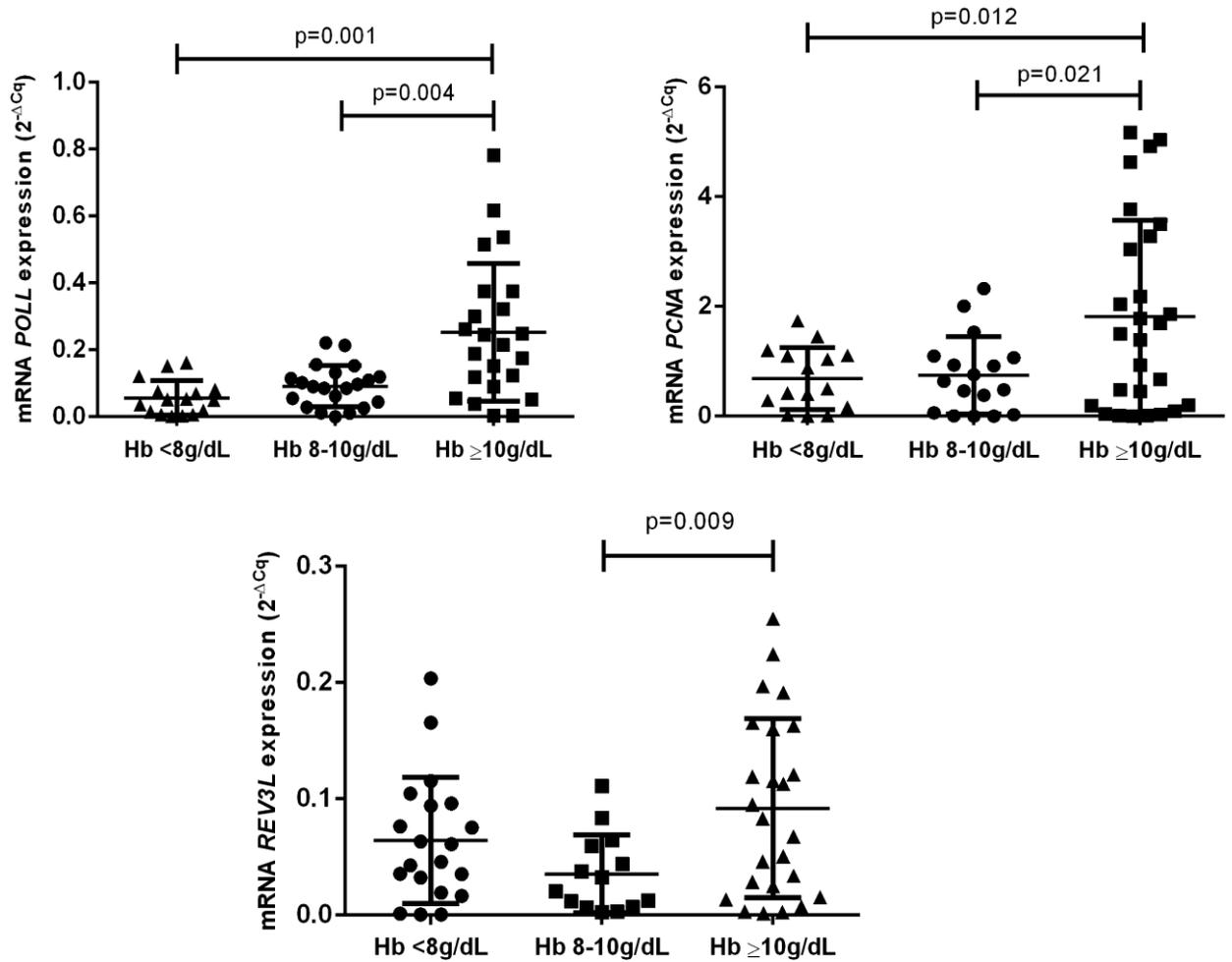
Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão dos demais genes avaliados no grupo SMD versus controles saudáveis ($p > 0,05$).

4.2.2 Expressão gênica das Polimerases TLS frente às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD

4.2.2.1 Achados de sangue periférico

Para a variável Hemoglobina (Hb), estratificada de acordo com o IPSS-R, constatamos a diminuição da expressão dos genes *POLL* ($p=0,001/0,004$) e *PCNA* ($p=0,012/0,021$) em pacientes que apresentaram Hb $<8\text{g/dL}$, em comparação com os pacientes que apresentaram $\geq 10\text{g/dL}$ e diminuição da expressão em pacientes com Hb $8-10\text{g/dL}$ em comparação com pacientes com Hb $\geq 10\text{g/dL}$, respectivamente. Curiosamente, o gene *REV3L* ($p=0,009$) apresentou-se com a expressão reduzida em pacientes com Hb $8-10$, frente à pacientes com Hb $\geq 10\text{g/dL}$, mas não apresentou alterações na expressão em pacientes com Hb $<8\text{g/dL}$, frente a pacientes com Hb $\geq 10\text{g/dL}$ (Figura 13).

Figura 13: Nível de expressão dos genes, *POLL*, *PCNA* e *REV3L* em pacientes com SMD frente à hemoglobina categorizada pelo IPSS-R



GENE <i>POLL</i>	Nível de Expressão (2 ^{-ΔCq})						ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell
	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior					
Hb	<8g/dL	,0566354938	,05170291323	,1628769332	,3409173277	0,000	0,000	0,001	
	8-10 g/dL	,0915161381	,06202682783	,0632818646	,1197504116			0,004	
	≥10g/dL	,2518971304	,20585920841	,1628769332	,3409173277			0,001/0,004	

‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos. Hb: hemoglobina

GENE <i>PCNA</i>		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						
		Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell
Hb	<8g/dL	,688462788733	,5645422486	,3758297120	1,001095865	0,008	0,000	0,012
	8-10 g/dL	,747144538647	,7042206825	,3850676742	1,109221403			0,021
	≥10g/dL	1,810179872185	1,756450147	1,115351335	2,505008409			0,012/0,021

‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos. Hb: hemoglobina

GENE <i>REV3L</i>		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						
		Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell
Hb	<8g/dL	,0643108500	,05426832222	,0389124934	,0897092066	0,027	0,003	-
	8-10 g/dL	,0354202143	,03353486468	,0160577599	,0547826687			0,009
	≥10g/dL	,0919187360	,07697849537	,0601435748	,1236938972			0,009

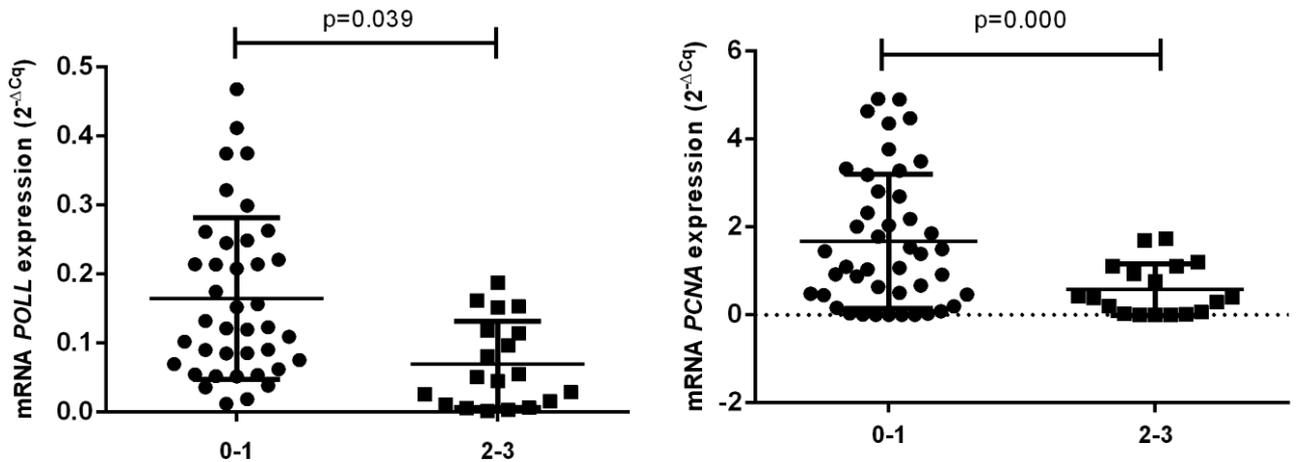
‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos. Hb: hemoglobina

Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão dos demais genes avaliados no grupo SMD versus níveis de Hemoglobina categorizada pelo IPSS-R ($p > 0,05$).

Para a variável citopenias periféricas, estratificada em dois grupos: 0-1 citopenias e 2/3 citopenias, constatamos a diminuição na expressão dos genes *POLL* ($p=0,039$) e *PCNA* ($p=0,000$) nos pacientes que apresentaram 2-3 citopenias no sangue periférico. Não identificamos associação entre a expressão gênica de *POLL*, *PCNA* e *REV3L* com as demais variáveis relacionadas a achados no sangue periférico ($p > 0,05$) (Figura 13).

Não foram encontradas associações significantes com relação aos níveis de expressão dos genes *POLN*, *POLH*, *POLQ*, *POLI*, *POLK* e *REVI* e as variáveis relacionadas a achados no sangue periférico: Níveis de Hemoglobina, Contagem absoluta de neutrófilos (ANC), Níveis de Plaquetas e Número de citopenias no sangue periférico ($p > 0,05$).

Figura 14: Nível de expressão dos genes, *POLL* e *PCNA* em pacientes com SMD frente à presença de citopenias no sangue periférico.



GENE <i>POLL</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)				
CITOPENIAS	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de MannWhitney‡
0-1	,19137515	5,96251116	,00357880	42,37346750	0.039
2-3	,08897820	4,27283404	,00062860	21,90175550	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de casos

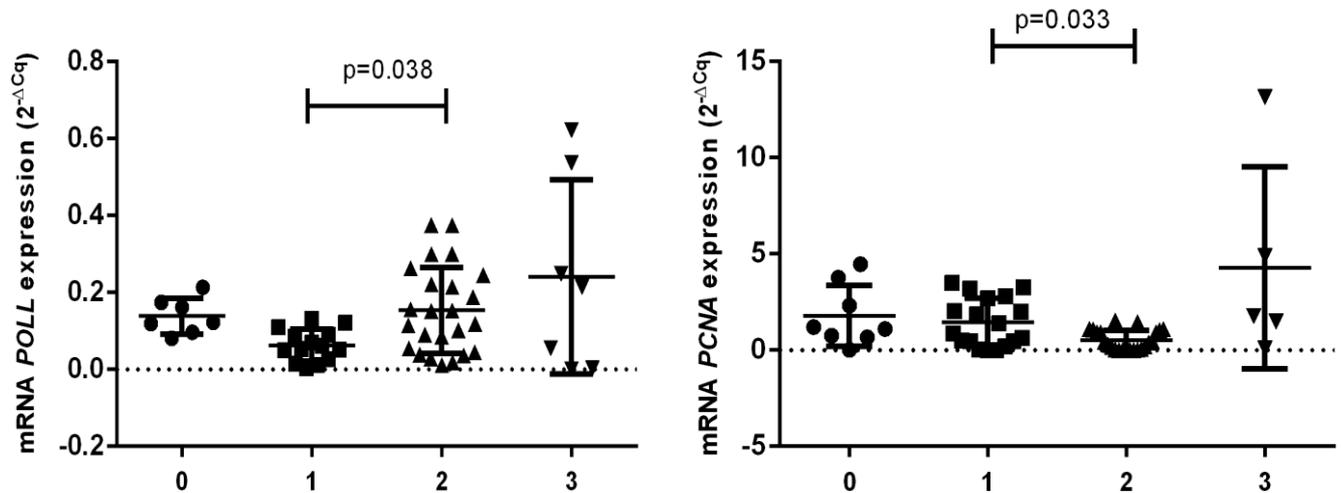
GENE <i>PCNA</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)					
CITOPENIAS	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	Teste de Levene	p-valor‡
0-1	1,672606543	1,529637021	,559944687879	1,636479507	0.000	0.000
2-3	,5743944454	,5883324719				

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

4.2.2.2 Achados Medulares

Ao avaliarmos a presença de displasias na células da medula óssea (diseritropoiese, disgranulopoiese ou dismegacariopoiese), categorizada em ausência de displasias ou presença de displasia em uma, duas ou três linhagens celulares, constatamos o aumento de expressão do gene *POLL* ($p=0,038$) em pacientes com duas displasias frente aos que apresentaram apenas uma. Em contrapartida, detectamos diminuição da expressão do gene *PCNA* ($p=0,033$) em pacientes que apresentaram duas displasias frente aos que apresentaram apenas uma (Figura 14).

Figura 15: Nível de expressão dos genes *POLL* e *PCNA* em pacientes com SMD frente à de displasias na medula óssea.



GENE <i>PCNA</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							
		Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell
DISPLASIA	0	1,79309089	1,588092244	,4654125561	3,120769239	0,001	0,000	-
	1	1,499025046	1,259633205	,8513814132	2,146668679			0,033
	2	,528175846	,5205602213	,3030687257	,7532829662			0,033
	3	4,282851675	5,261081140	-2,249643369	10,81534672			-

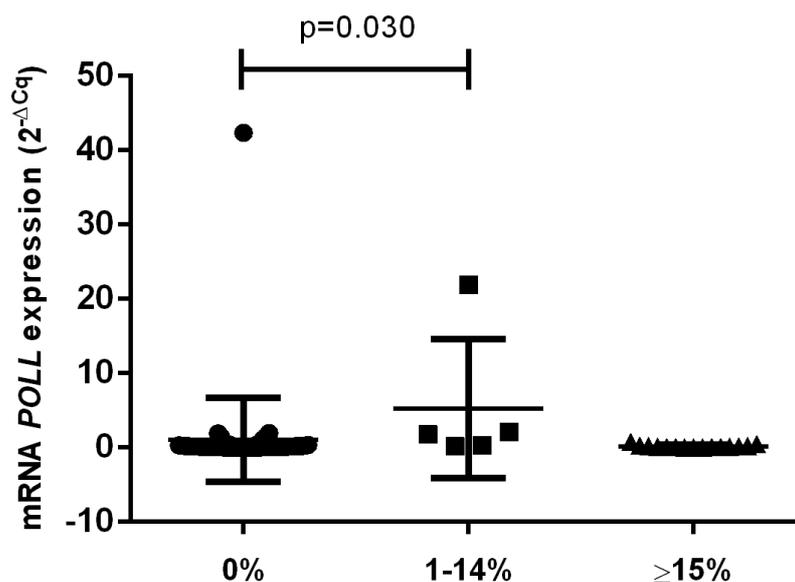
‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

GENE <i>POLL</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)							
		Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell
DISPLASIA	0	,1387480857	,04683699538	,0954310897	,1820650818	0,035	0,000	0,050
	1	,0729402000	,05437527706	,0428281752	,1030522248			0,038/0,050
	2	,1477323120	,11337588772	,1009330457	,1945315783			0,038
	3	,2402521857	,25265983887	,0065808080	,4739235635			-

‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

Ainda para o gene *POLL*, foi identificada uma importante associação frente à variável faixas de porcentagens de Sideroblastos em anel na medula óssea dos pacientes com SMD. Nesta análise, verificou-se, que pacientes que possuem um valor inserido na faixa de 1-14% de sideroblastos em anel possuem maior nível de expressão de *POLL* frente aos pacientes inseridos na faixa 0% de sideroblastos em anel na MO (Figura 15).

Figura 16: Nível de expressão do gene *POLL* em pacientes com SMD frente as faixas de porcentagens de sideroblastos em anel.



GENE <i>POLL</i>		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)				Teste de Kruskal- Wallis†
		Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
SIDEROBLASTOS EM ANEL CATEGORIZADOS	0%	,11961520	5,69330451	,00062860	42,37346750	0,030
	1-14%	1,79319380	9,34608442	,15201540	21,90175550	
	≥15%	,10925770	,20655492	,00624680	,78199920	

Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

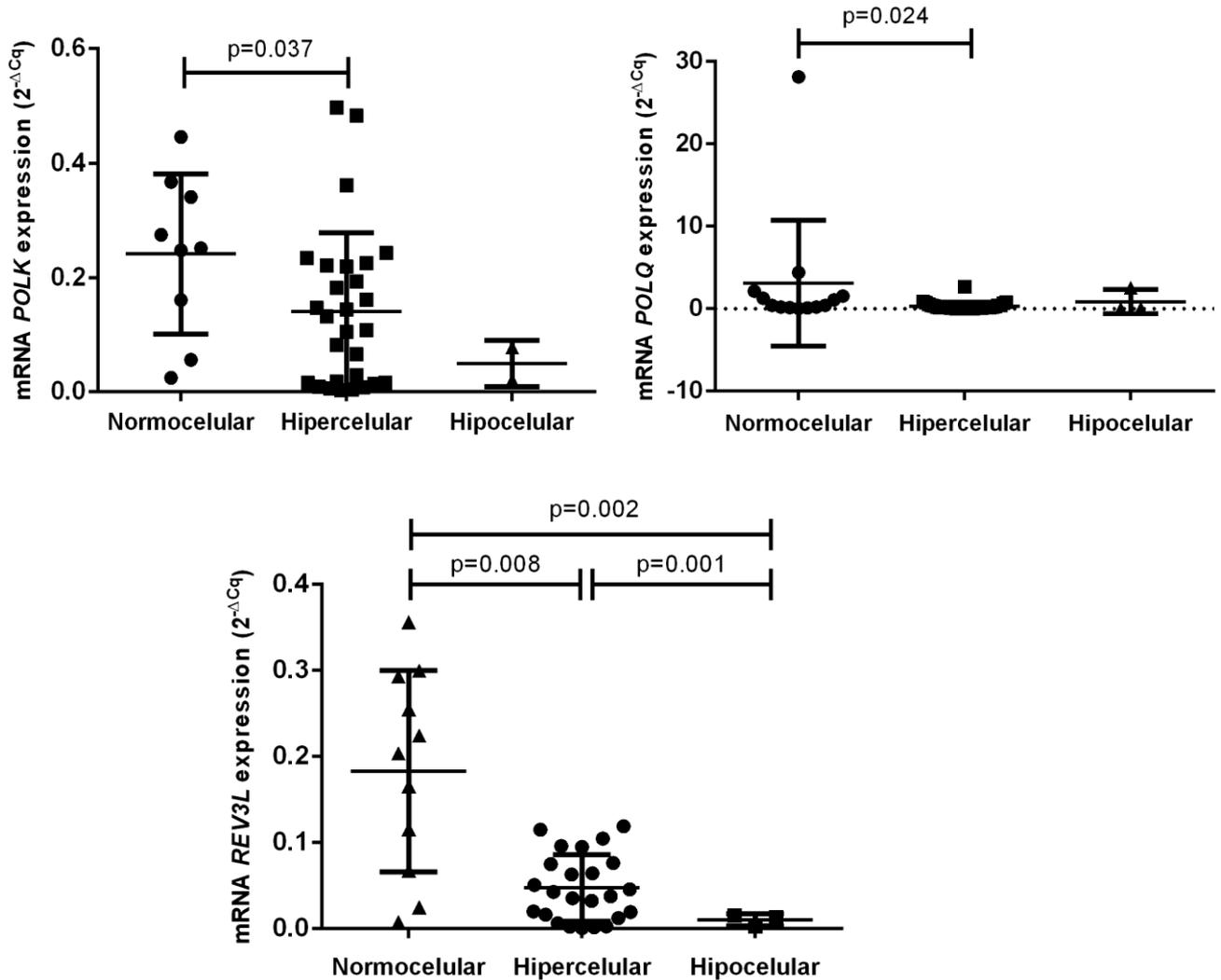
Não foram obtidas associações significantes entre o nível de expressão dos genes *POLK*, *POLQ*, *POLH*, *POLN*, *POLI*, *REVI*, *REV3L* e *PCNA* e a presença de Sideroblastos em anel categorizada de acordo com o IPSS-R ($p > 0,05$).

Em relação à celularidade da medula óssea, encontramos associações significantes para os genes *REV3L*, *POLK* e *POLQ*. Quanto à associação do nível de expressão do gene *REV3L* e o perfil de celularidade da medula óssea de pacientes com SMD, identificou-se que o gene *REV3L* está menos expresso em pacientes com medula óssea hipocelular frente a pacientes com medula normocelular ($p=0,002$) e hiper celular ($p=0,001$) (Figura 16). Destaca-se, ainda, que pacientes com medula hiper celular também apresentaram menor expressão do *REV3L* quando comparados com pacientes com medula normocelular ($p=0,008$) (Figura 16).

Nas avaliações de expressão dos genes *POLK* e *POLQ* frente à celularidade da medula óssea, identificamos diminuição da expressão destes genes em pacientes com medula óssea hiper celular quando comparados com pacientes com medula normocelular ($p=0,037$ e

$p=0,024$, respectivamente) (Figura 16). Não encontramos associações significativas na avaliação da expressão dos demais genes com a celularidade da medula óssea.

Figura 17: Nível de expressão dos genes *REV3L*, *POLQ* e *POLK* em pacientes com SMD frente a celularidade da medula óssea.



GENE <i>REV3L</i>		Nível de Expressão (2 ^{-ΔCq})						
		Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	ANO VA‡	Teste de Levene	Games-Howell
CELULA- RIDADE	Normo	,1829738636	,1170692672	,1043256598	3,120769239	0,000	0,000	0,002/0,008
	Hiper	,0474281917	,0384350062	,8513814132	,0311985119			0,001/0,008
	Hipo	,0104287000	,0068930741	,3030687257	-,0066946453			0,002/0,001

‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

GENE <i>POLQ</i>		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)				Teste de Kruskal- Wallis†
		Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
CELULARIDADE	Normo	,4220757480	7,6285832833	,0375913910	28,1572467200	0,024
	Hiper	,1386989700	,5020173965	,0005868730	2,6984207510	
	Hipo	,0350988130	1,4538213628	,0134222630	2,5422830280	

†Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

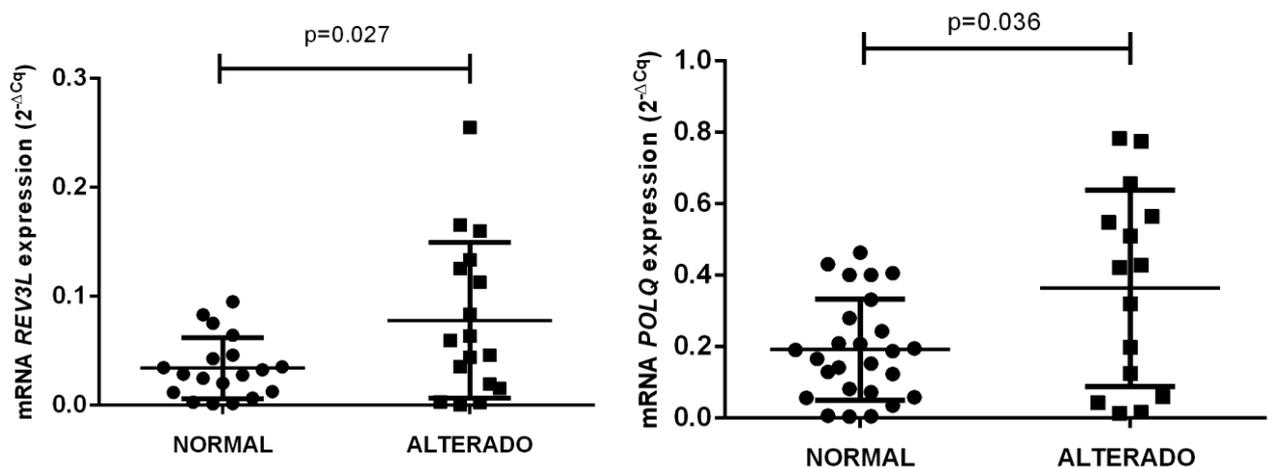
GENE <i>POLK</i>		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)				Teste de Kruskal- Wallis†
		Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
CELULARIDADE	Normo	,34054640	5,54769565	,02457990	19,99710260	0,037
	Hiper	,14521130	,72282467	,00287760	3,29709830	
	Hipo	,07791850	1,27405856	,02091260	2,25559740	

†Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

4.2.2.3 Achados Citogenéticos

Na análise do nível de expressão gênica associada ao perfil citogenético dos pacientes com SMD, identificamos que pacientes com cariótipo alterado apresentaram maior expressão dos genes *REV3L* e *POLQ* em relação à pacientes com resultado de cariótipo normal ($p=0,027$ e $p=0,036$, respectivamente) (Figura 17).

Figura 18: Nível de expressão dos genes *REV3L* e *POLQ* em pacientes com SMD frente a variável cariótipo normal e alterado



GENE <i>REV3L</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)					
	CARIÓTIPO	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	Teste de Levene
Normal	,0341194789	,0280263939	-,08231359102	-,00537668638	0.001	0.027
Alterado	,0779646176	,07136140932				

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

GENE <i>POLQ</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)					
	CARIÓTIPO	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	Teste de Levene
Normal	,1918633521	,1413695179337	-,3321864711960	-,0123032089170	0.000	0.036
Alterado	,3641081921	,2750376016341				

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

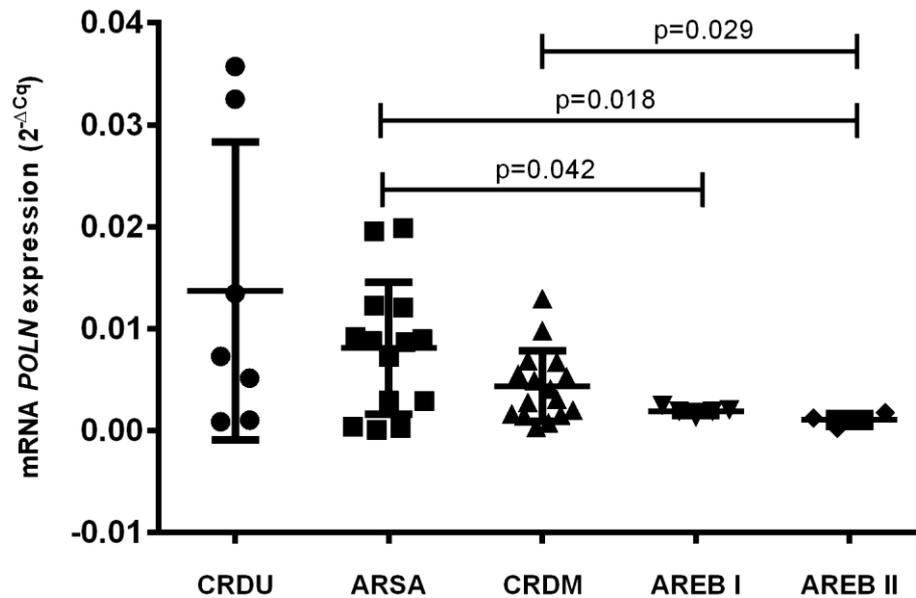
Não encontramos associações significantes com relação ao nível de expressão dos genes *POLK*, *POLL*, *POLI*, *POLN*, *POLH*, *REVI* e *PCNA* e as variáveis relacionadas a análise do cariótipo: cariótipo normal *versus* cariótipo alterado, cariótipo com presença de deleção no cromossomo 5, cariótipo com presença de deleção no cromossomo 7, cariótipo com aneuploidias ou cariótipo complexo. Ademais, também não identificamos outras associações significativas da expressão dos genes *REV3L* e *POLQ* com as demais variáveis relacionadas ao cariótipo

4.3 Expressão gênica das Polimerases TLS na classificação clínica e estratificação prognóstica dos pacientes com SMD.

4.3.1 Classificação WHO 2008

Quanto a classificação dos pacientes de acordo com os subtipos estabelecidos pela OMS (BRUNNING et al., 2008), verificamos a diminuição da expressão do gene *POLN* entre os subtipos CRDM, ARSA, AREB I e AREB II (Figura 18). Constatamos que pacientes classificados como AREB II apresentaram menor expressão do gene *POLN* em relação aos pacientes diagnosticados como CRDM e ARSA ($p=0,029$ e $p=0,018$, respectivamente), e pacientes classificados como AREB I apresentaram diminuição da expressão de *POLN* frente a pacientes diagnosticados com ARSA ($p=0,042$) (Figura 18).

Figura 19: Nível de expressão do gene *POLN* em pacientes com SMD frente a categorização em subtipos da OMS 2008



GENE <i>POLN</i>		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						
		Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	ANOVA†	Teste de Levene	Games-Howell
OMS 2008	CRDU	,0137227714	,0145963280	,0002234196	,0272221233	0,028	0,000	-
	ARSA	,0080923357	,0064719852	,0043555227	,0118291487			0,042/0,018
	CRDM	,0043715125	,0034653421	,0025249620	,0062180630			0,029
	AREB I	,0019254000	,0004261504	,0013962644	,0024545356			0,042
	AREB II	,0010720750	,0006274680	,0000736334	,0020705166			0,018/0,029

†ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

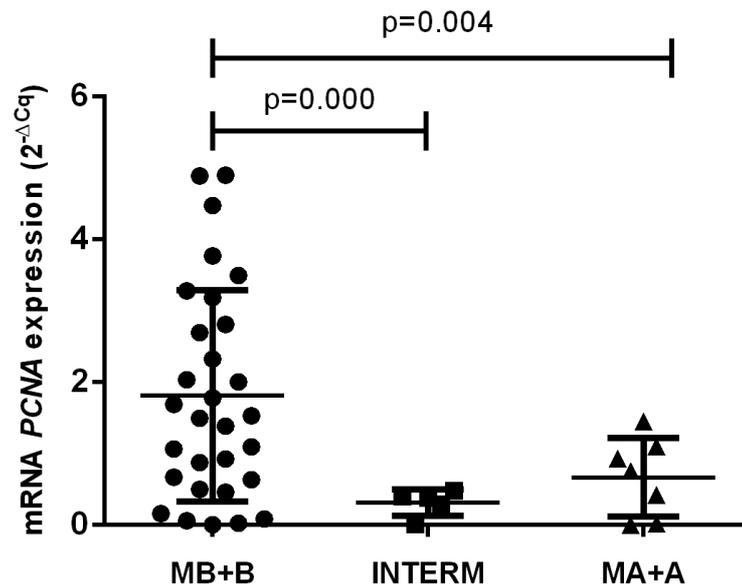
Em relação à forma da doença, categorizada em formas iniciais (CRDU, CRDM e ARSA) e formas avançadas (AREB I e AREB II), não verificamos alterações na expressão de nenhum dos genes estudados. (Figura 26).

4.3.2 Classificação dos Grupos de Risco de acordo com o IPSS-R

Quanto à classificação de risco segundo o IPSS-R, não foram observadas diferenças nas expressões dos genes *POLH*, *POLQ*, *POLK*, *POLL*, *POLI*, *POLN*, *REV1*, *REV3L* e *PCNA* dentre os grupos de risco do IPSS-R (muito baixo risco, baixo risco, intermediário, alto risco, muito alto risco). Em contrapartida, ao agruparmos os grupos de risco em três categorias: muito baixo + baixo, intermediário e muito alto + alto, observamos diminuição na expressão

do gene *PCNA* nos pacientes incluídos na categoria muito alto + alto e intermediário, quando comparados a pacientes incluídos na categoria muito baixo + baixo risco ($p = 0,004$ e $p=0,000$, respectivamente) (Figura 19).

Figura 20: Nível de expressão do gene *PCNA* em pacientes com SMD frente a categorização do IPSS-R



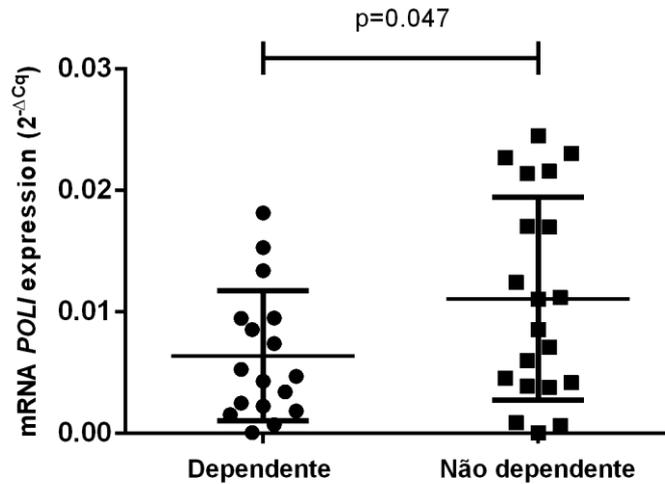
GENE <i>PCNA</i>		Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)						
		Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	ANOVA‡	Teste de Levene	Games-Howell
IPSS-R CAT	MB+B	1,874524409	1,465693683	1,317004349	2,432044470	0,013	0,003	0,000/0,004
	INT	,3125010892	,1848420880	,0829893232	,5420128552			0,000
	A+MA	,6693433070	,5482649450	,1622828036	1,176403810			0,004

‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. CAT: Categorizado. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

4.4 Expressão gênica das Polimerases TLS em pacientes dependentes de transfusão.

Quanto a dependência transfusional, identificamos que pacientes que se tornaram dependentes de transfusão apresentaram diminuição na expressão do gene *POLI* quando comparados com pacientes que não eram dependentes transfusionais ($p=0,047$) (Figura 20). Os demais genes avaliados neste estudo não apresentaram associações significativas com seus níveis de expressão gênica e dependência transfusional.

Figura 21: Nível de expressão do gene *POLI* em pacientes com SMD frente a Dependência Transfusional.



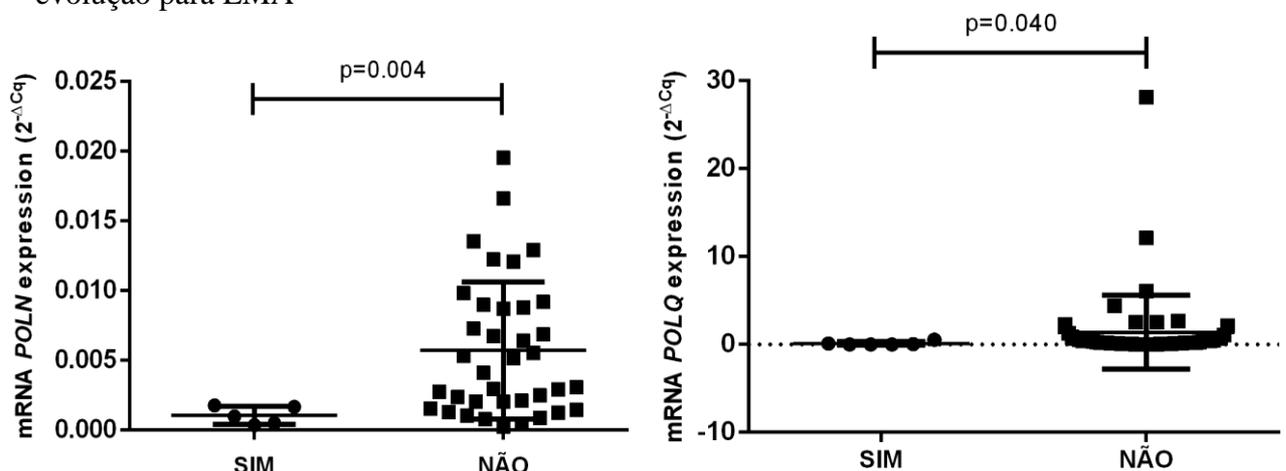
GENE <i>POLI</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)					
	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	Teste de Levene	p-valor†
Dependente	,1918633521	,0063924706	-,00931911752	-,00006326131	0.025	0.047
Não Dependente	,3641081921	,0110836600				

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

4.5 Expressão gênica das Polimerases TLS na progressão e evolução da doença.

Com relação à evolução da doença para LMA, constatamos que pacientes que apresentaram quadro clínico de evolução para LMA tiveram menor expressão dos genes *POLN* e *POLQ* em relação aos pacientes que não evoluíram para LMA ($p=0,004$ e $p=0,040$, respectivamente) (Figura 23).

Figura 22: Nível de expressão dos genes *POLN* e *POLQ* em pacientes com SMD frente a evolução para LMA



GENE <i>POLL</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)				Teste de MannWhitney‡
EVOLUÇÃO PARA LMA	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
Sim	,03100480	,10620554	,00304510	,26323950	0.004
Não	,12144290	6,40131085	,00357880	42,37346750	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

GENE <i>POLQ</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)				Teste de MannWhitney‡
EVOLUÇÃO PARA LMA	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
Sim	,0373457180	,2182263994	,0011704540	,5647418380	0.040
Não	,2079909480	4,1489405369	,0010172920	28,1572467200	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Não encontramos correlações estatisticamente significantes nos níveis de expressão dos demais genes avaliados em comparação com a evolução dos pacientes para LMA.

Para as demais variáveis analisadas: idade, forma da SMD, fibrose na medula óssea, diseritropoiese, disgranulopoiese, dismegacariopoiese, presença de micromegacariócito, porcentagens de blastos (IPSS-R), classificação dos valores de neutrófilos (IPSS-R), classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R), classificação do prognóstico citogenético de acordo com o IPSS-R, WPSS, classificação WHO 2016 e óbito ($p > 0,05$), não encontramos correlações estatisticamente significantes em nenhum dos genes avaliados neste estudo.

4.6 Análise de sobrevida dos pacientes com SMD em relação aos níveis de expressão das enzimas DNA Polimerases com atividade TLS

Para a realização das análises de associação entre os níveis de expressão das polimerases TLS e a sobrevida dos pacientes com SMD definimos o *cutoff* (baseado no algoritmo estabelecido pelo software *Cutoff Finder*) do perfil de expressão de cada gene, para que se tornasse possível realizar o teste de log-rank associado com o gráfico de curva de sobrevida estabelecido por Kaplan-Meier.

A figura 24 apresentam a análise de correlação da sobrevida dos pacientes com SMD e o nível de expressão do gene *POLL*, demonstrando que 33 (39,8%) pacientes com níveis de expressão inferior ao *cutoff* de 0,05453 possuem menor sobrevida (Figura 24), com uma taxa de risco (HR, *hazard ratio*) de 0.42 (IC= 0.21-0.83) e com uma correlação significativa ($p=0,0099$) conforme apresentado na figura 24.

A figura 25 apresentam a análise de correlação da sobrevida dos pacientes com SMD e o nível de expressão do gene *PCNA*, demonstrando que 31 pacientes com níveis de expressão

inferior ao cutoff de 1.933 possuem menor sobrevida (Figura 25), com uma taxa de risco (HR, hazard ratio) de 0.16 (IC= 0.04-0.66) e com uma correlação significativa ($p=0,0037$) conforme apresentado na figura 25.

Não foram encontradas associações significantes entre os níveis de expressão dos genes *REV3L*, *POLK*, *POLQ*, *REVI*, *POLN*, *POLI* e *POLH* em relação a sobrevida dos pacientes com SMD ($p>0,05$).

Figura 23 Análise de associação entre o nível de expressão do gene *POLL* e a sobrevida dos pacientes com SMD.

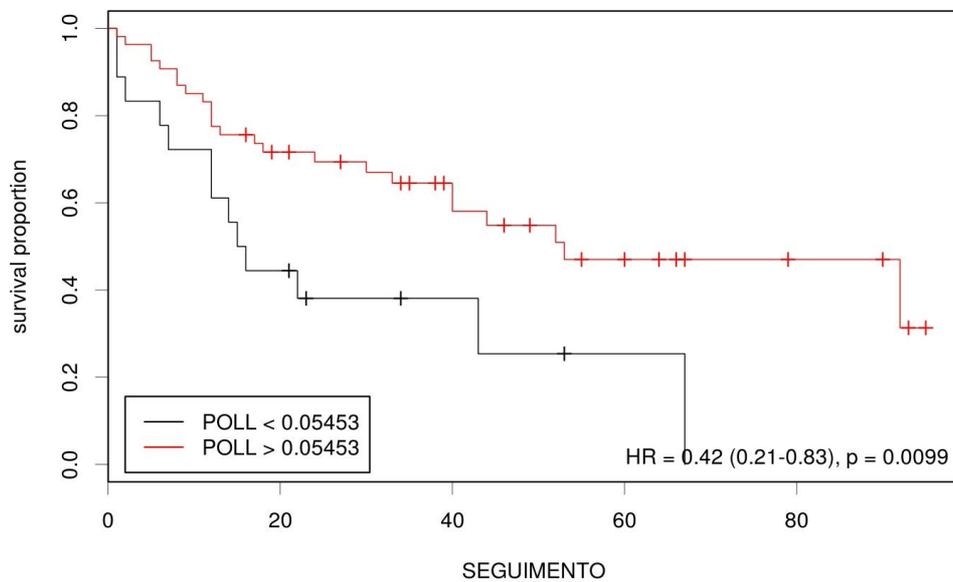
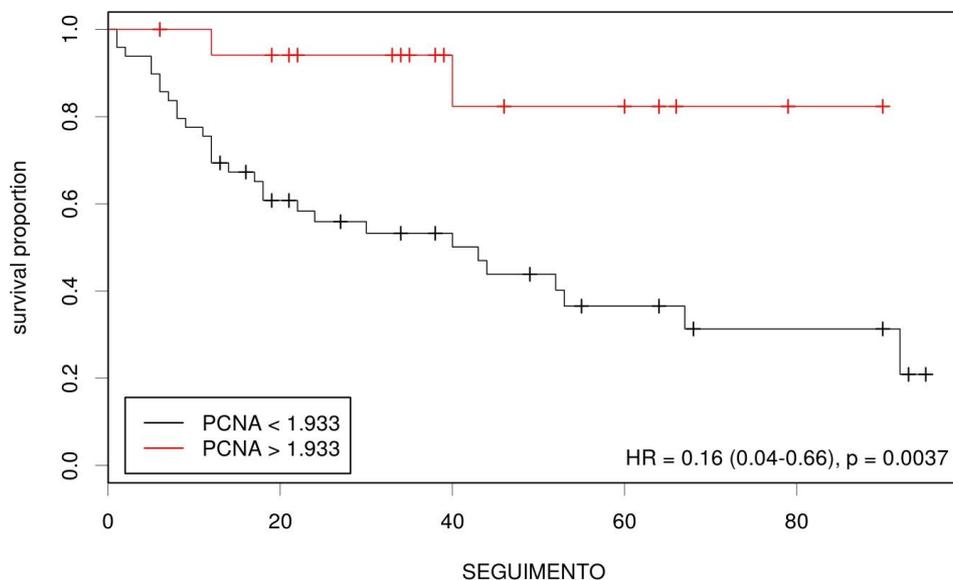


Figura 24: Análise de associação entre o nível de expressão do gene *PCNA* e a sobrevida dos pacientes com SMD.



4.9 Representações esquemáticas dos resultados da análise de Expressão Gênica em pacientes com SMD

Figura 25: Resultados nos níveis de expressão dos genes *REV3L*, *POLK*, *POLQ*, *POLL*, *POLI*, *POLN*, *POLH*, *REV1* e *PCNA* em pacientes com SMD.

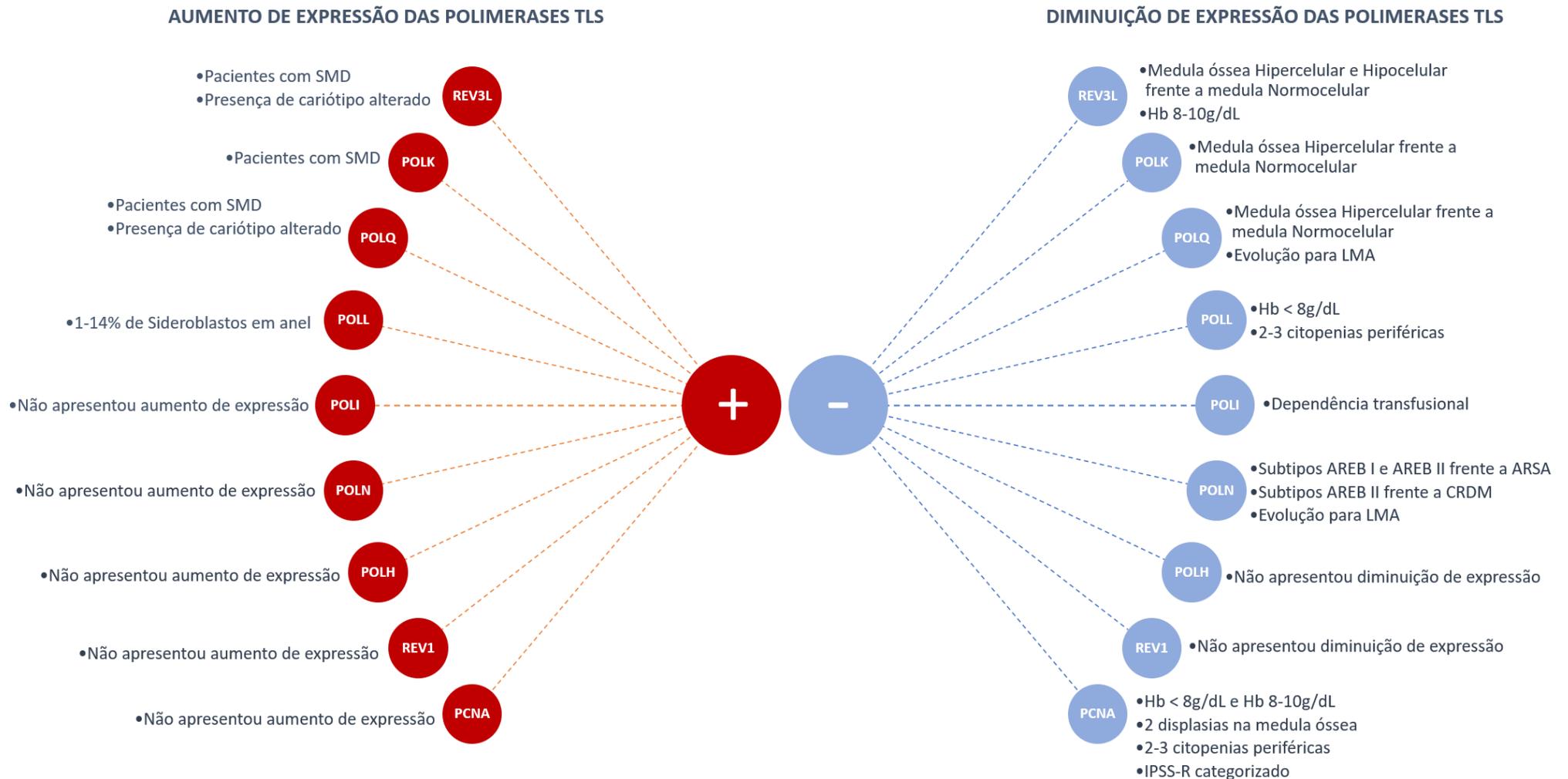


Figura 26: Resultados encontrados nos níveis de expressão dos genes *REV3L*, *POLK*, *POLQ*, *POLL*, *POLI*, *POLN*, *POLH*, *REV1* e *PCNA* em pacientes com SMD

GENE	RESULTADO ENCONTRADO	SIGNIFICÂNCIA (p<0,05)	RESULTADO ENCONTRADO	SIGNIFICÂNCIA (p<0,05)
<i>REV3L</i>	Pacientes com SMD em comparação com indivíduos saudáveis	0,016	Medula óssea hipercelular frente à medula normocelular	0,008
	Presença de cariótipo alterado	0,027	Medula óssea hipocelular frente à medula normocelular	0,002
<i>POLK</i>	Pacientes com SMD em comparação com indivíduos saudáveis	0,000	Medula óssea hipocelular frente a medula hipercelular	0,001
	Presença de cariótipo alterado	0,031	Nível de hemoglobina de 8-10g/dL	0,009
<i>POLQ</i>	Pacientes com SMD em comparação com indivíduos saudáveis	0,031	Medula óssea hipercelular frente à medula normocelular	0,037
	Presença de cariótipo alterado	0,036	Evolução para LMA	0,024
<i>POLL</i>	Presença de 1-14% de sideroblastos em anel	0,030	Nível de hemoglobina <8g/dL frente a Hb >10g/dL	0,040
	Presença de 2 displasias na MO frente a 1 displasia	0,038	Nível de hemoglobina de 8-10g/dL frente a Hb >10g/dL	0,001
<i>POLI</i>	Não apresentou aumento de expressão		Presença de 2-3 citopenias frente a 0-1 citopenia	0,004
			Dependência transfusional	0,039
<i>POLN</i>	Não apresentou aumento de expressão		Subtipos AREB I frente ao subtipo ARSA	0,047
			Subtipos AREB II frente ao subtipo ARSA	0,042
<i>POLH</i>	Não apresentou aumento de expressão		Subtipo AREB II frente ao subtipo CRDM	0,018
			Evolução para LMA	0,029
<i>REV1</i>	Não apresentou aumento de expressão		Não apresentou diminuição de expressão	0,004
			Não apresentou diminuição de expressão	
<i>PCNA</i>	Não apresentou aumento de expressão		Níveis de hemoglobina <8g/dL frente a >10g/dL	0,012
			Níveis de hemoglobina de 8-10g/dL frente a >10g/dL	0,021
			Presença de 2 displasias na MO frente a 1 displasia	0,033
			Presença de 2-3 citopenias frente a 0-1 citopenia	0,000
			IPSS-R categorizado em INTER frente a MB+B	0,000
		IPSS-R categorizado em MA+A frente a MB+B	0,004	

Legenda: Resultados em vermelho: aumento de expressão; Resultados em azul: diminuição de expressão.

5. DISCUSSÃO

Durante o processo evolutivo, as células, assim como o organismo como um todo, desenvolveram um amplo espectro de dispositivos de resposta ao estresse para garantir a homeostase. Os mecanismos de resposta aos danos acarretados ao genoma, proteoma e transcriptoma constituem os pilares desses dispositivos e estão, muitas vezes, entrelaçados ou sobrepostos, o que faz com que alterações no funcionamento dos componentes de uma via possam implicar em modificações em outras vias. Conseqüentemente, a desregulação dessas vias está diretamente associada à senescência e a vários estados fisiopatológicos, incluindo o câncer (HOEIJMAKERS, 2009; RIBEZZO, 2016; PILIÉ, 2018)

A instabilidade genômica pode gerar mutações aleatórias, incluindo rearranjos cromossômicos, e é uma característica compartilhada por grande parte das neoplasias sendo considerada um facilitador para a aquisição dos seis principais marcadores do câncer, como definido por Douglas Hanahan, no artigo “*Hallmarks of Cancer: The Next Generation*” (HANAHAN, 2011). Como a instabilidade genômica é um dos processos que ocasionam a perda da homeostase, ela é monitorada por vários mecanismos de vigilância, pontos de verificação de danos ao DNA, mecanismos de reparo e tolerância a danos e checkpoint mitótico. Defeitos na regulação de qualquer um desses mecanismos geralmente resulta em perda da integridade genômica, que predispõe a célula à transformação maligna (YAO, 2014; LANGIE, 2015)

Alguns dos processos que proporcionam a integridade do genoma são os mecanismos de resposta a danos no DNA que as células desenvolveram para remover a maioria das lesões. Apesar da proteção proporcionada pelos mecanismos de reparo, eles podem ser lentos, incompletos e não funcionarem da forma correta. Isso pode ocasionar o bloqueio da forquilha de replicação do DNA e gerar instabilidade genômica. Para superar esse desastre potencial, as células desenvolveram mecanismos adicionais para evitar o dano ou sintetizar lesões passadas, os mecanismos de síntese translesão, os quais nos dedicamos a analisar neste estudo (PAGEÁS, 2002; RIBEZZO, 2016; VAISMAN, 2017; POWERS, 2018)

5.1 Aumento da expressão dos genes *POLQ*, *REV3L* e *POLK* em pacientes com SMD

Devido à falta de acurácia das polimerases TLS, sua expressão precisa ser cuidadosamente regulada, pois alterações como aumento de expressão poderiam levar à um fenótipo mutado e acelerar o processo de tumorigênese (HOFFMANN E CAZAUX, 2010). Acredita-se que muitas das mutações de ponto encontradas em células saudáveis e, em maior

número, nas neoplásicas, sejam em virtude deste mecanismo (BIELAS, 2006; WATERS, 2009).

Nos resultados aqui apresentados, avaliamos a expressão de pacientes com SMD frente a indivíduos saudáveis e demonstramos esses pacientes apresentam aumento de expressão das DNA Polimerases *REV3L*, *POLQ* e *POLK*. Numerosos estudos já relataram a superexpressão das polimerases TLS associada a diversos tipos de câncer. Exemplos incluem: *POLI* e câncer de mama (YANG, 2004), *POLN* e câncer de pulmão (CEPPI, 2009), *POLK* em gliomas e câncer de pulmão (O-WANG, 2001; WANG, 2010), e *POLQ* em casos de câncer de colorretal, gástrico, pulmão e câncer de mama (KAWAMURA, 2004; PILLIAIRE, 2010).

Em 2010, Wang e colaboradores estudaram a expressão de *POLK* em amostras de Glioma e relataram que a superexpressão de *POLK* foi observada em 57,5% (23 de 40) dos pacientes e associada à estágios avançados da doença, bem como com uma menor sobrevivência desses pacientes (WANG, 2010). *POLK* também já apresentou aumento de expressão em um subtipo de glioma, o glioblastoma, e em câncer pulmão, no qual, inclusive, foi associado à presença de aneuploidias (O-WANG, 2001; BAVOUX, 2005; BOSTIAN, 2016). Zhou e colaboradores (2013) realizaram um estudo com 64 amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e demonstraram que 67% das amostras apresentaram aumento de expressão de *POLH* (ZHOU, 2013)

Em 2004 foi relatada a primeira evidência de superexpressão de *POLQ*, ao nível transcricional, em biópsias tumorais de pulmão, estômago e cólon quando comparados a tecidos adjacentes ao tumor (KAWAMURA, 2004). Em 2010, Lemée e Pillaire estudaram a expressão das DNA Polimerases replicativas e Polimerases TLS em pacientes com carcinomas de mama e colon/reto. Dentre todas as polimerases, *POLQ* apresentou o maior nível de expressão quando comparados tecidos neoplásicos e normais e sua superexpressão também foi associada a menor sobrevivência com um aumento de 4,3 vezes do risco de morte. Adicionalmente, Lemée e colaboradores (2010) também observaram atrasos na forquilha de replicação e quebras cromossômicas em células transfectadas com um vetor que induzia a superexpressão do gene *POLQ* (WANG, 2008; BRANDALIZE, 2013; BRANDALIZE, 2014).

POLQ é uma DNA Polimerase TLS que atua, na maioria das vezes, pelo mecanismo de síntese translesão “propenso a erros”. Além da participação na tolerância a danos no DNA, é provável que esta enzima também esteja envolvida em vias de reparo de DNA, como o reparo por excisão de bases (BER), o *cross-link* de DNA (ICL) e as vias de reparo de quebra de dupla fita de DNA, como o reparo de Junção de Extremidades mediada por Micro

Homologia (MMEJ), do qual será falado mais adiante. O estudo de Lemée (2010) investigou as consequências moleculares do aumento de expressão de *POLQ* em fibroblastos *MRC5-SV* que superexpressavam a enzima. O estudo detectou que células *MRC5-SV* que superexpressam de forma estável o *POLQ* apresentaram maior formação de focos γ -H2AX (a forma fosforilada da histona H2AX, que se acumula nas células contendo lesões no DNA) e maior frequência de alterações cromossômicas em comparação com as células controle.

Em uma análise de expressão por Northern Blot em tecidos tumorais de diversas neoplasias, a expressão elevada de *POLQ* foi observada em 11 dos 28 (39%) tecidos de pacientes com câncer no estômago, 20 dos 26 (77%) tecidos de carcinomas do cólon e em 17 de 27 (63%) dos tumores NSCLC.

Diante dos resultados contrastados com a literatura, conjecturamos que alterações na expressão gênica das DNA Polimerases *POLQ*, *POLK* e *REV3L* estão associadas com a patogênese da SMD, assim como já foram associadas ao mecanismo de patogênese de diversos tumores. A via “propensa a erros” das polimerases é um dos grandes responsáveis pelo aumento nas mutações pontuais encontradas nos genomas das neoplasias em comparação com os tecidos normais, demonstrando que essas enzimas tem um papel importante no processo de carcinogênese e, possivelmente, podem garantir a sobrevivência das células neoplásicas. É por este motivo que as células recorrem ao mecanismo TLS em última instância, quando as vias de reparo do DNA já estão sobrecarregadas e atuando de forma imprecisa.

5.2 Aumento da expressão de *REV3L* e *POLQ* em pacientes com cariótipo alterado

Outro resultado importante do nosso estudo é que pacientes com cariótipo alterado apresentaram aumento de expressão das polimerases TLS *REV3L* e *POLQ*. A literatura demonstra que aproximadamente 50% dos pacientes diagnosticados com SMD apresentam alterações cromossômicas clonais ao diagnóstico. Em nossos resultados observamos que 40% dos pacientes apresentaram alguma alteração citogenética, um percentual menor do que o observado na literatura. Diversos estudos multicêntricos disponíveis na literatura, mostram que o cariótipo é um dos mais importantes parâmetros prognósticos e foi incorporado ao IPSS visando melhorar a predição do prognóstico individual de cada paciente (HAASE, 2007; GREENBERG, 1997; BACHER, 2015)

A diversidade de alterações citogenéticas na SMD mostra que além da heterogeneidade clínica e morfológica, a doença também vem demonstrando heterogeneidade genética e, diferentemente de outras neoplasias hematológicas, como a Leucemia mieloide

crônica (LMC), a SMD não possui um marcador citogenético. Apesar de não dispor de um biomarcador, a doença tem um perfil citogenético característico, com alterações cromossômicas não balanceadas, onde é mais frequentemente observada a perda de material genético na forma de deleções ou monossomias. Dentre as alterações cromossômicas mais frequentes na SMD, podemos citar: deleções ou monossomia no cromossomo 5 (5q-/-5), deleções ou monossomia do cromossomo 7 (7q-/-7), deleções no cromossomo 20 (20q-), trissomia do cromossomo (+8), e nulissomia do cromossomo Y (-Y) (HAASE, 2008). Em relação às alterações cromossômicas mais comuns citadas acima, observamos em nosso estudo que 18,3% dos pacientes apresentaram alterações no cromossomo 5; 3,3% apresentaram alterações no cromossomo 7 e 76,7% das alterações citogenéticas foram classificadas como de prognóstico favorável pelo IPSS-R.

O perfil citogenético dos pacientes com SMD geralmente pode se apresentar de três formas: 1. Uma alteração isolada; 2. Uma alteração acompanhada de outra alteração adicional, e 3. Um cariótipo complexo, com três ou mais alterações no mesmo clone. Conforme a complexidade do perfil citogenético vai aumentando, ocorre o agravamento da doença e maior é o risco de evolução para LMA (OLNEY E LE BEAU, 2002). A presença mais comum de deleções cromossômicas na SMD, as quais podem ser resultados típicos de quebras de dupla fita (DSB) reparadas de forma errônea ou até não reparadas, aponta para defeitos na maquinaria de reparo de DNA. (MUFTI, 1992; KURAMOTO, 2002).

Um estudo do nosso grupo de pesquisa conduzido por Ribeiro (RIBEIRO, 2016) demonstrou que pacientes diagnosticados com SMD que apresentavam cariótipo alterado exibiam diminuição da expressão do gene *XRCC6*. O gene *XRCC6*, que codifica a proteína Ku70, participa do dímero Ku70/Ku80 e é responsável por um papel crucial na via de NHEJ. A via de reparo NHEJ é uma forma potencialmente imprecisa de reparação de DSB por resultar na perda de alguns nucleotídeos nas extremidades quebradas do DNA (PFEIFFER et al., 2004; SHRIVASTAV; DE HARO; NICKOLOFF, 2008).

Atrelado a isto, pacientes com doenças genéticas resultantes de alterações em genes de reparo de quebras de dupla fita, por exemplo a anemia de Fanconi, tem uma incidência aumentada de desenvolvimento de SMD (CIOCCO, 2010). Diante desse achado, levanta-se a questão se a SMD está, em parte, relacionada à incapacidade da célula de lidar adequadamente com os danos ao DNA (JANKOWSKA, 2008; ZHOU, 2015)

A partir de pesquisas disponíveis na literatura e de nossos resultados, levantamos a hipótese de que o acúmulo dessas lesões, que acontece com o aumento da idade, nos pacientes com SMD pode sobrecarregar as vias de reparo do DNA, devido ao aumento da demanda por

reparos. Uma vez sobrecarregadas, as vias de reparo não conseguem lidar com algumas das lesões, que podem ter como consequência as alterações cromossômicas. Dessa forma, a célula precisa recorrer em última instância às polimerases TLS mesmo correndo o risco de que a síntese translesão seja efetivada através da via “propensa a erros”, com potencial mutagênico, para evitar o aumento da instabilidade genômica e a apoptose. Sugerimos que o aumento da expressão das polimerases TLS *REV3L*, *POLQ* e *POLK* em pacientes com SMD e, adicionalmente, de *POLQ* e *POLK* em pacientes com cariótipo alterado acontece como um feedback compensatório celular em resposta ao acúmulo de lesões e alterações cromossômicas devido à atuação inadequada dos mecanismos de reparo.

Diversos estudos tem identificado a DNA Polimerase *POLQ* como um componente essencial para o reparo por MMEJ (SFEIR, 2015; MATEOS-GOMEZ, 2015; WYATT, 2016; BLACK, 2016; ZELENSKY, 2017), o que ratifica nossa hipótese de que o aumento da expressão desse gene pode estar associado à sua ativação por conta de alterações na expressão dos mecanismos de reparo. Levantamos a hipótese de que nos pacientes com SMD, ademais de sua atividade TLS, *POLQ* também estaria sendo mais expressa devido à sua participação no mecanismo MMEJ. Adicionalmente, *POLQ* é frequentemente superexpresso em neoplasias deficientes no mecanismo de HR e sua superexpressão está ligada a um mau prognóstico (CECCALDI ET AL., 2015; HIGGINS ET AL., 2010; LEMÉE ET AL., 2010).

Inferimos aqui, também, através da alteração de expressão em *POLQ*, a influência do aumento da expressão gênica de *POLQ* na via NHEJ alternativa (altNHEJ) que conta com sua participação: a Junção de Extremidades mediada por Micro Homologia (MMEJ). Neste mecanismo, o reparo de quebras de dupla fita requer micro homologia de 5pb a 25pb para alinhar as extremidades quebradas, antes de torna-las compatíveis e torna-se necessário para garantir a sobrevivência de células com as vias de reparo de HR e NHEJ comprometidas (BENNARDO, 2008). Estudos evidenciaram que o MMEJ é ativado na ausência ou frente a menor expressão de componentes da via NHEJ. No entanto, essa via é ainda mais propensa a erros porque sempre resulta em deleções, em geral maiores do que as observadas no reparo de NHEJ (BLACK, 2016; MATEOS-GOMEZ, 2015).

5.3 Diminuição da expressão dos genes *POLL* e *PCNA* em pacientes com anemia grave

A anemia é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um nível de hemoglobina abaixo de 13g/dl para os homens e 12g/dl para as mulheres (WHO, 1968; WHO, 2011). Mais de dois terços dos pacientes com SMD apresentam anemia ao diagnóstico com

um nível de Hb <10g/dL e exibem uma sintomatologia de astenia, fraqueza, déficit de atenção, tonturas, *angina pectoris* e palpitação, dependendo do grau de anemia, com 85% deles desenvolvendo anemia mais grave à medida que a doença progride (SANTINI, 2011)

Como os pacientes com SMD são predominantemente idosos, a progressão da anemia leve para uma anemia mais grave aumenta os efeitos negativos das comorbidades, como insuficiência cardíaca e pulmonar, e os pacientes adquirem necessidade regular de transfusão de hemácias, que pode levar à sobrecarga de ferro e complicações subsequentes (SANTINI, 2011). É importante ressaltar que a literatura demonstra que a falência dos eritrócitos reflete uma forma mais grave de SMD com um prognóstico desfavorável, levando a um maior risco de transformação leucêmica, mesmo em pacientes sem aumento de blastos de medula óssea, e que afeta a sobrevivência dos pacientes (MALCOVATI, 2007; PFEILSTÖCKER, 2016).

Shima (2003) e Goff (2009) demonstraram que camundongos e linhagens celulares da medula óssea com depleção e mutação da polimerase *POLQ* (*POLQ*^{-/-} e *POLQ*^{+/-}) apresentaram frequências elevadas de micronúcleos espontâneos e induzidos por radiação, indicando que esta enzima tem algum papel na manutenção da instabilidade genômica nos eritroblastos (GOFF, 2009; SHIMA, 2003). Assim como *POLQ*, as DNA polimerases *POLL* e *PCNA* (atuando como proteína recrutadora e reguladora) atuam no mecanismo de síntese translesão e, apesar de não ter sido relatado na literatura a atuação dessas enzimas nos eritroblastos, nós levantamos a hipótese de que, assim como *POLQ*, essas enzimas estariam envolvidas no processo de manutenção da integridade genômica dessas células, uma vez que elas apresentaram-se diminuídas em pacientes com anemia grave (Hb < 8g/dL). A diminuição da expressão dessas polimerases aumentaria a instabilidade genômica nas células precursoras eritroides, o que pode levar ao aumento dos níveis de apoptose dessas células e, conseqüentemente, à anemia.

Em estudos anteriores, assim como as polimerases translesão *POLL* e *PCNA*, nosso grupo demonstrou que os genes relacionados aos mecanismos de reparo de dupla fita e de fita simples, *LIG4*, *BRCA2* e *ERCC6* também apresentam-se com diminuição de expressão em pacientes com Hb < 8g/dL (RIBEIRO, 2016). Assim, acreditamos que o funcionamento incorreto dos mecanismos de reparo, a primeira linha de defesa celular contra agentes genotóxicos, e dos mecanismos de tolerância a danos no DNA, a segunda linha de defesa celular contra agentes genotóxicos, estão acarretando maior instabilidade genômica a esses pacientes com anemia.

Adicionalmente, verificamos, também a diminuição da expressão do gene *POLL* e *PCNA* em pacientes que apresentaram 2-3 citopenias em comparação com pacientes que

apresentaram uma ou nenhuma citopenia e a expressão desses mesmos genes em relação ao está associada a menor sobrevida dos pacientes com SMD. Estes achados corroboram com o perfil mais agressivo da doença, uma vez que pacientes citopênicos e com anemia grave crônica tornam-se dependentes de suporte transfusional e acabam tendo redução da qualidade de vida, pior sobrevida e maior risco de evolução para LMA.

É importante salientar que as modificações na proteína PCNA são fundamentais para a capacidade dessa enzima de alternar eficientemente entre as DNA polimerases replicativas e as DNA polimerases TLS. Alterações na sua expressão podem levar a desregulação do mecanismo translesão como um todo. Assim, ao considerarmos que o perfil “*downregulated*” dos genes *PCNA* e *POLL* é um fator de prognóstico desfavorável para os pacientes com SMD, a diminuição da expressão destes gene caracteriza aumento da instabilidade genômica e pior prognóstico.

5.4 Diminuição da expressão do gene *POLN* nos subtipos de alto risco (AREB I e AREB II) e na evolução para LMA

Identificamos que pacientes dos subtipos AREB I e AREB II apresentaram menor expressão da Polimerase *POLN* quando comparados com pacientes do subtipo ARSA e pacientes do subtipo AREB I apresentaram, também, diminuição da expressão quando comparado com pacientes do subtipo CRDM. Adicionalmente, pacientes que evoluíram para LMA também encontram-se com *POLN* menos expresso.

Durante o curso natural da doença, cerca de 30 a 40% dos pacientes em estágios iniciais progridem para AREB e, 40% a 50% destes apresentam uma sobrevida média de poucos meses e progridem para LMA (MANO, 2006). Dessa forma, as AREB's são consideradas um subtipo de alto risco pelo sistema de classificação IPSS-R. No entanto, o prognóstico é muito heterogêneo, tanto para sobrevida como para o risco de evolução, provavelmente devido à variação no percentual de blastos. (BRECCIA, 2009; GHARIANI et al, 2013; MA et al., 2007; SHADDUCK et al., 2007).

Sabe-se que com a progressão da doença a célula tronco hematopoiética apresenta falhas nos mecanismos de reparo e adquire mutações e/ou alterações cromossômicas adicionais que levam ao desenvolvimento de subclones com bloqueio de diferenciação e capacidade de maturação ainda mais prejudicada o que aumenta a instabilidade genômica. Vinculado a isto, a célula tronco neoplásica adquire resistência à apoptose e vantagem

proliferativa, o que traz risco de evolução para leucemia mieloide aguda. (BEJAR, 2011; ZHOU, 2015; CHAMSEDDINE et al, 2016)

Alguns estudos identificaram mutações recorrentes em genes candidatos durante a evolução da SMD para LMA secundária, por exemplo: *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1*, *TP53* e *NRAS* (SHIH, 2014; SCHNITTGER, 2011; CHEN, 2007; DICKER, 2010). Walter e colaboradores (2012) demonstraram, em seu estudo sobre a arquitetura clonal da LMA secundária, que a progressão para LMA foi caracterizada pela persistência do clone mielodisplásico antecedente e pelo surgimento de um subclone contendo novas mutações somáticas (WALTER, 2012).

Adicionalmente, a progressão da doença também leva à aquisição de alterações cromossômicas adicionais e que, na maioria das vezes, tornam-se cada vez mais complexas (ZHOU, 2015). Em 2007, Haase e colaboradores apresentaram dados que mostravam claramente que a sobrevida mediana era significativamente reduzida apenas quando mais de três anormalidades estão presentes ao cariótipo de pacientes com SMD. A sobrevida diminui de 17 meses nos casos com três anormalidades para menos de 9 meses nos casos com quatro ou mais anomalias (HAASE, 2007).

Neste cenário, hipotetizamos que a Polimerase TLS POLN possivelmente esteja atuando nos subtipos AREB I e AREB II através do mecanismo de síntese translesão livre de erros e que sua menor expressão pode levar à ausência do mecanismo TLS, que tem como consequência o colapso da forquilha de replicação ou a persistência da lesão para posterior ação dos mecanismos de reparo. O colapso da forquilha, por sua vez, gera as quebras de dupla fita, que levam à maior incidência de alterações cromossômicas e ao aumento da instabilidade genômica, características que vão se tornando prevalentes conforme a doença progride dos subtipos de baixo risco (CRDU, CDRM, ARSA) para os subtipos de alto risco (AREB I e AREB II).

POLN é uma das mais recente polimerases descobertas e pouco se sabe sobre sua forma de atuação e se o seu mecanismo mais prevalente é o “livre de erros” ou o “propenso a erros”. Em 2006, Takata e colaboradores purificaram pela primeira vez a enzima POLN e analisaram suas características bioquímicas. Eles reportaram que POLN atua através do mecanismo livre de erros em lesões do tipo Tg, inserindo “corretamente” uma Adenina oposta a sítios Tg e realiza a extensão da fita eficientemente após a lesão (TAKATA, 2006). O estudo de Takata ratifica a nossa hipótese de que POLN estaria trabalhando “livre de erros” nos pacientes classificados como alto risco.

Nosso estudo demonstrou que a diminuição de expressão do gene *POLN* em SMD está associada à progressão da doença, pior prognóstico e a maior risco de evolução para LMA.

Dessa forma, é possível que *POLN* tenha o papel de supressor tumoral e que a perda ou diminuição de sua função possa acelerar a instabilidade do genoma.

6. CONCLUSÕES

- I. Os níveis de expressão dos genes *REV3L*, *POLQ* e *POLK* são mais elevados em pacientes com SMD em comparação com indivíduos saudáveis;
- II. O aumento de expressão dos genes *POLQ* e *POLK* está associado à presença de alterações cromossômicas em pacientes com SMD;
- III. A diminuição na expressão do gene *POLN* foi associada a subtipos de alto risco e à evolução para LMA, portanto, inferimos que *POLN* esteja atuando como gene supressor tumoral na SMD.
- IV. O aumento da expressão dos genes *POLL* e *PCNA* foi associado a pacientes com 2-3 citopenias e pacientes com anemia grave e com pior sobrevida, caracterizando esses genes como marcadores de prognóstico desfavorável;
- V. A diminuição da expressão dos genes *REV3L*, *POLK* e *POLQ* está associada a medula óssea hiperclular quando comparada com medula óssea normocelular.
- VI. Estes resultados suportam a importância da regulação da expressão gênica das DNA Polimerases com atividade TLS na manutenção da estabilidade genômica das células tronco hematopoiéticas promovendo um melhor entendimento da etiologia, estratificação diagnóstica, prognóstica e do processo de evolução clonal da Síndrome Mielodisplásica.

7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este é o primeiro estudo do mecanismo de síntese translesão em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica e estudar um mecanismo complexo como o TLS não é fácil. Por conta da sua natureza ambígua “livre de erros” ou “propensa a erros” muitas podem ser as possibilidades de atuação dessas enzimas no processo de carcinogênese, atuando como genes supressores de tumor ou como oncogenes. Neste estudo, a partir de resultados de expressão genica, nós inferimos que cada uma dessas enzimas pode atuar de forma diferente na patogênese da Síndrome Mielodisplásica ou durante a progressão da doença para seus subtipos avançados e, posteriormente, para LMA.

Estamos cientes das limitações quanto ao estudo de expressão gênica, uma vez que o mRNA pode passar por diversas alterações pós-transcricionais e a proteína por modificações pós-traducionais que possibilitam uma expressão proteica diferente da expressão gênica. Sabendo disso, pretendemos avaliar os níveis dessas proteínas através de Western Blot e associar os achados com os resultados do presente estudo.

Além de associar os achados de expressão proteica e expressão gênica, já iniciamos, através de sequenciamento de última geração (NGS), a avaliação da presença de mutações e polimorfismos nas DNA Polimerases com atividades translesão e esperamos identificar se elas tem um efeito funcional significativo sobre a atividade dessas enzimas e se são importantes para o desenvolvimento da SMD. Adicionalmente, pretendemos avaliar se a metilação desses genes também estaria culminando na diminuição da sua expressão. Esperamos inter-relacionar os resultados obtidos a partir dessas quatro metodologias para conseguir traçar um perfil da atuação do mecanismo de síntese translesão na Síndrome Mielodisplásica e, possivelmente, partir para estudos funcionais com linhagens celulares e/ou camundongos *knockout*.

Esse é um caminho longo e árduo e teremos muitas dificuldades no percurso, especialmente pela natureza multifacetada das Polimerases TLS e heterogênea da SMD. No entanto, nosso anseio por biomarcadores prognósticos que possam auxiliar no manejo clínico e tratamento dos pacientes com SMD torna essa jornada mais leve.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, S. S.; CHRISTOPHER, J. G.; BENJAMIN L. E.; The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal hematopoiesis to secondary leukemia. **Nat Rev Cancer**. 2017 Jan; 17(1): 5–19.

ADAR, S.; IZHAR, L.; HENDEL, A.; GEACINTOV, N.; LIVNEH, Z. Repair of gaps opposite lesions by homologous recombination in mammalian cells. **Nucleic Acids Research**, vol. 37, no. 17, pp. 5737–5748, 2009.

ADÈS, L.; ITZYKSON, R.; FENAUX, P. **Myelodysplastic syndromes**. *The Lancet*, v. 383, n. 9936, p. 2239 - 2252, 2014.

ALISON J.; RATTRAY AND JEFFREY N. STRATHERN. ERROR-PRONE DNA POLYMERASES: When Making a Mistake is the Only Way to Get Ahead. **Annu Rev Genet**. 2003;37:31-66.

ALLERA-MOREAU, C. et al. DNA replication stress response involving PLK1, CDC6, POLQ, RAD51 and CLASPIN upregulation prognoses the outcome of early/mid-stage non-small cell lung cancer patients. **Oncogenesis**, v. 1, p. e30, Oct 2012.

ALTER, P. B. Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2014 ;

ANDERSEN PL.; XU F.; XIAO W. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. **Cell Res**. 2008 Jan;18(1):162-73.

ARANA, ME.; TAKATA, K.; GARCIA-DIAZ, M.; WOOD, RD.; KUNKEL, TA. A unique error signature for human DNA polymerase η . **DNA Repair (Amst)**. 2007 Feb 4;6(2):213-23.

ARBER, D.A.; HASSERJIAN, R.P. Reclassifying myelodysplastic syndromes: what's where in the new WHO and why. **Hematology**, p. 294–298, 2015.

AUL, C.; GIAGOUNIDIS, A.; GERMING, U.; Epidemiological features of myelodysplastic syndromes: results from regional cancer surveys and hospital-based statistics. *Int J Hematol*. 2001 Jun;73(4):405-410.

BAVOUX, C.; LEOPOLDINO, A. M.; BERGOGLIO, V. Up-Regulation of the Error-Prone DNA Polymerase κ Promotes Pleiotropic Genetic Alterations and Tumorigenesis. **Cancer Res** 2005 65; 325.

BAYNTON, K.; BRESSON-ROY, A.; FUCHS, RP.; Analysis of damage tolerance pathways in *Saccharomyces cerevisiae*: a requirement for Rev3 DNA polymerase in translesion synthesis. **Mol Cell Biol**. 1998 Feb; 18(2):960-6.

BEAGAN, K. et al. *Drosophila* DNA polymerase theta utilizes both helicase-like and polymerase domains during microhomology-mediated end joining and interstrand crosslink repair. **PLoS Genet**. 2017. May, v. 13, n. 5, p. e1006813.

BEJAR R, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. **N Engl J Med**, 2011; 364(26):2496-506.

BEJAR R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. **Haematologica**. 2014; 99(6):956-964.

BELLI, C. B. et al. Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients. *Am J Hematol*, Jun 2015.

BENNARDO, N.; CHENG, A.; HUANG, N.; STARK, JM. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. **PLoS Genet**. 2008 Jun 27;4(6):e1000110

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol**, v. 33, n. 4, p. 451-8, Aug 1976.

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

BERGOGLIO, V.; BAVOUX, C.; VERBIEST, V.; HOFFMANN, JS.; CAZAUX, C. Localisation of human DNA polymerase kappa to replication foci. **Journal of Cell Science**, 2002. 115(Pt 23), 4413-8.

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

BERTOLIN, A.P.; MANSILLA, S.F.; GOTTIFREDI, V. The identification of translesion DNA synthesis regulators: Inhibitors in the spotlight. **DNA Repair** (Amst). 2015 Aug;32:158-64

BIELAS, J. H. et al. Human cancers express a mutator phenotype. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 48, p. 18238-42, Nov 2006.

BIENKO M.; GREEN CM.; CROSETTO N.; RUDOLF F.; ZAPART G.; COULL B.; KANNOUCHE P.; WIDER G.; PETER M.; LEHMANN AR.; HOFMANN K.; DIKIC I. Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. **Science**. 2005 Dec 16;310(5755):1821-4.

BIERTÜMPFEL, C.; ZHAO, Y.; KONDO, Y.; RAMÓN-MAIQUES, S.; GREGORY, M.; LEE, JY. Structure and Mechanism of Human DNA Polymerase η . **Nature**. 2010 Jun 24; 465(7301): 1044–1048.

BLACK, SJ.; KASHKINA, E.; KENT, T.; POMERANTZ, RT. DNA Polymerase θ : A Unique Multifunctional End-Joining Machine. **Genes (Basel)**. 2016 Sep; 7(9): 67.

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

BOSTIAN, AC.; MADDUKURI, L.; REED, MR.; SAVENKA, T.; HARTMAN, JH1.; DAVIS, L. Kynurenine Signaling Increases DNA Polymerase Kappa Expression and

Promotes Genomic Instability in Glioblastoma Cells. **Chem Res Toxicol.** 2016 Jan 19;29(1):101-8.

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

BRANDALIZE, A. P. C. et al. Genetic variants involved in specialized DNA replication and their relation with breast cancer risk, disease progression and patient prognosis. **BMC Proceedings**, v. 7, n. Suppl 2, p. P7-P7, 04/04 2013.

BRANDALIZE, A. P. et al. A DNA repair variant in POLQ (c.-1060A > G) is associated to hereditary breast cancer patients: a case-control study. **BMC Cancer**, v. 14, p. 850, Nov 2014.

BRECCIA, M., et al. Analysis of prognostic factors in patients with refractory anemia with excess of blasts (RAEB) reclassified according to WHO proposal. **Leuk Res**, 2009. Mar, v.33, n.3, p.391-4,

BRUNNING, R. D.; ORAZI, A.; GERMING, U. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: **IARC Press**, 2008. p. 88-93.

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

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

CECCALDI, R. et al. Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Polθ-mediated repair. **Nature**. 2015; Feb, v. 518, n. 7538, p. 258-62.

CEPPI, P. et al. Polymerase eta mRNA expression predicts survival of non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 3, p. 1039-45, Feb 2009.

CGOWAN-JORDAN, J.; SIMONS, A.; SCHMID, M. ISCN : an international system for human cytogenomic nomenclature (2016). Basel ; New York : Karger, 2016.

CHAMSEDDINE AN et al. Unraveling Myelodysplastic Syndromes: Current Knowledge and Future Directions. **Curr Oncol Rep.** 2016; 18(4): 1-11.

CHANG DJ, CIMPRICH KA. DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. **Nat Chem Biol.** 2009;5:82–90.

CHEN, CY.; LIN, LI.; TANG, JL., et al. RUNX1 gene mutation in primary myelodysplastic syndrome -- the mutation can be detected early at diagnosis or acquired during disease progression and is associated with poor outcome. **Br J Haematol** 2007;139:405-414

CHIHARA, D.; ITO, H.; KATANODA, K.; SHIBATA, A.; MATSUDA, T.; SOBUE, T.; MATSUO, K.; Incidence of Myelodysplastic Syndrome in Japan. **J Epidemiol.** 2014;24(6):469-73

CHIU, RK. et al. Lysine 63-polyubiquitination guards against translesion synthesis-induced mutations. *PLoS Genet*, v. 2, n. 7, p. e116, Jul 2006.

CHOI, J.; LIM, S.; KIM, E.; JO, A.; GUENGERICH, FP. Translesion Synthesis Across Abasic Lesions by Human B-family and Y-family DNA Polymerases α , δ , η , ι , κ , and REV1. **J Mol Biol.** 2010 Nov 19; 404(1): 34–44.

CIOC, AM1.; WAGNER, JE.; MACMILLAN, ML.; DEFOR, T.; HIRSCH, B. Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with fanconi anemia: morphologic and cytogenetic characteristics. **Am J Clin Pathol.** 2010 Jan;133(1):92-100.

COGLE, C. R. et al. Incidence of the myelodysplastic syndromes using a novel claims-based algorithm: high number of uncaptured cases by cancer registries. *Blood*, v. 117, n. 26, p. 7121-5, Jun 2011.

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

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

DAIGAKU Y.; DAVIES AA.; ULRICH HD. Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication. **Nature.** 2010 Jun 17;465(7300):951-5.

DICKER, F.; HAFERLACH, C.; SUNDERMANN, J., et al. Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML. **Leukemia** 2010;24:1528-1532

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

FOX, JT.; LEE, KY.; MYUNG K. Dynamic regulation of PCNA ubiquitylation/deubiquitylation. **FEBS Lett.** 2011 Sep 16;585(18):2780-5

FRIEDBERG EC.; LEHMANN AR.; FUCHS RP. Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? **Mol Cell.** 2005;18:499–505

FRIEDBERG, EC. A brief history of the DNA repair field. **Cell research**, 2008; 18(1), 3-7.

FRIEDBERG, EC.; WAGNER, R.; RADMAN, M. Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. **Science.** 2002 May 31;296(5573):1627-30.

GARCIA-MANERO, G. Myelodysplastic syndromes: 2015 Update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*, v. 90, n. 9, p. 831-41, Sep 2015.

GHOSAL G.; CHEN J. DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. **Transl Cancer Res.** 2013;2(3):107-129.

GOFF, JP.; SHIELDS, DS.; SEKI, M.; CHOI, S.; EPPERLY, MW.; DIXON, T.; WANG, H et al. Lack of DNA polymerase theta (POLQ) radiosensitizes bone marrow stromal cells in vitro and increases reticulocyte micronuclei after total-body irradiation. **Radiat Res.** 2009 Aug;172(2):165-74.

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

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

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

GUO C, et al. REV1 protein interacts with PCNA: significance of the REV1 BRCT domain in vitro and in vivo. **Mol Cell.** 2006. 23(2):265-71

GUO, C.; FISCHHABER, PL.; LUK-PASZYC, L.; MASUDA, Y.; ZHOU, J.; KAMIYA, K.; KISKER, C.; FRIEDBERG, EC. Mouse Rev1 protein interacts with multiple DNA polymerases involved in translesion DNA synthesis. **EMBO J.** 2003. 22:6621–6630.

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

HAASE, D.; GERMING, U.; SCHANZ, J.; PFEILSTÖCKER, M.; NÖSSLINGER, T.; HILDEBRANDT, B. 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.** 2007 Dec 15; 110(13):4385-95.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, AR. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell.** 2011 Mar 4;144(5):646-74.

HARACSKA, L.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Replication past O(6)-methylguanine by yeast and human DNA polymerase eta. **Mol Cell Biol.** 2000b Nov;20(21):8001-7.

HARACSKA, L.; YU, SL.; JOHNSON, RE.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase eta. **Nat Genet.** 2000a Aug;25(4):458-61.

HARRIS, PV.; MAZINA, OM.; LEONHARDT, EA.; CASE, RB.; BOYD, JB.; BURTIS, KC. Molecular cloning of *Drosophila* mus308, a gene involved in DNA cross-link repair with homology to prokaryotic DNA polymerase I genes. **Mol Cell Biol.** 1996 Oct;16(10):5764-71.

HASLE, H.; NIEMEYER, C. M.; CHESSELLS, J. M.; BAUMANN, I.; BENNETT, J. M.; KERNDRUP, G.; HEAD, D. R. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. **Leukemia**. 2003 Feb;17(2):277-82.

HIGGINS, GS.; HARRIS, AL.; PREVO, R.; HELLEDAY, T.; MCKENNA, WG.; BUFFA, FM. Overexpression of POLQ confers a poor prognosis in early breast cancer patients. **Oncotarget**. 2010 Jul;1(3):175-84.

HIGGINS, GS.; PREVO, R.; LEE, YF.; HELLEDAY, T.; MUSCHEL, RJ.; TAYLOR, S. A Small interfering RNA screen of genes involved in DNA repair identifies tumor-specific radiosensitization by POLQ knockdown. **Cancer Res**. 2010. 70, 2984–2993.

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

HOFFMANN, JS.; CAZAUX, C. Aberrant expression of alternative DNA polymerases: a source of mutator phenotype as well as replicative stress in cancer. **Semin Cancer Biol**, v. 20, n. 5, p. 312-9, Oct 2010.

HOLLAENDER, A.; CURTIS, JT. Effect of sublethal doses of monochromatic ultraviolet radiation on bacteria in liquid suspension. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. 1935; 33, 61-62.

HWA YUN, B.; GUO, J.; BELLAMRI, M.; TURESKY, RJ. DNA adducts: Formation, biological effects, and new biospecimens for mass spectrometric measurements in humans. **Mass Spectrom Rev**. 2018 Jun 11.

IYAMA T.; WILSON DM. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair (Amst)**. 2013 Aug;12(8):620-36

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

JANKOWSKA, AM.; GONDEK, LP.; SZPURKA, H.; NEARMAN, ZP.; TIU, RV.; MACIEJEWSKI, JP. Base excision repair dysfunction in a subgroup of patients with myelodysplastic syndrome. **Leukemia**. 2008 Mar;22(3):551-8.

JANSEN, JG.; TSAALBI-SHTYLIK, A.; DE WIND, N. Roles of mutagenic translesion synthesis in mammalian genome stability, health and disease. **DNA Repair (Amst)**. 2015 May;29:56-64

JOHNSO, RE.; WASHINGTON, MT.; HARACSKA, L. et al. Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. **Nature**. 2000;406:1015–9.

JOHNSON, RE.; KONDRATICK, CM.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. **Science**. 1999 Jul 9;285(5425):263-5.

JOHNSON, RE.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. The human DINB1 gene encodes the DNA polymerase Poltheta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2000. 97(8), 3838-43.

JONAS, B. A.; GREENBERG, P. L. MDS prognostic scoring systems – past, present, and future. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 28, n. 1, p. 3-13, Mar 2015.

KANAO, R.; MASUTANI, C. Regulation of DNA damage tolerance in mammalian cells by post-translational modifications of PCNA. **Mutat Res**. 2017 Oct;803-805:82-88.

KANNOUCHE PL.; LEHMANN AR. Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. **Cell Cycle**. 2004 Aug;3(8):1011-3.

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

KAWAMURA, K. et al. DNA polymerase theta is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers. **Int J Cancer**, v. 109, n. 1, p. 9-16, Mar 2004.

KNOBEL, PA.; MARTI, T. M.; Translesion DNA synthesis in the context of cancer research. **Cancer Cell Int**. 2011 Nov 2;11:39.

KRIEG AJ, HAMMOND EM, GIACCIA AJ. Functional analysis of p53 binding under differential stresses. **Mol Cell Biol**. 2006;26:7030-45.

KURAMOTO, K.; BAN, S.; ODA, K.; TANAKA H.; KIMURA, S.; SUZUKI, G. Chromosomal instability and radiosensitivity in myelodysplastic syndrome cells. **Leukemia**. 2002 Nov;16(11):2253-8.

KUSUMOTO, R.; MASUTANI, C.; IWAI, S.; HANAOKA, F. Translesion synthesis by human DNA polymerase eta across thymine glycol lesions. **Biochemistry**. 2002 May 14;41(19):6090-9.

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

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

LEHMANN AR. Translesion synthesis in mammalian cells. **Exp Cell Res**. 2006 Aug 15;312(14):2673-6

LEMÉE, F. et al. DNA polymerase theta up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 30, p. 13390-5, Jul 2010.

LEMÉE, F.; BERGOGLIO, V.; FERNANDEZ-VIDAL, A.; MACHADO-SILVA, A.; PILLAIRE, MJ.; BIETH, A. et al. DNA polymerase theta up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 30, p. 13390-5, Jul 2010.

LESSA, RC. et al. Identification of upregulated genes in oral squamous cell carcinomas. **Head Neck**, v. 35, n. 10, p. 1475-81, Oct 2013.

LINDAHL T.; WOOD RD. Quality control by DNA repair. *Science*. 1999 Dec 3;286(5446):1897-905.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, 1993; 362(6422):709-15.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) method. **Methods.**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LIVNEH Z1.; ZIV O.; SHACHAR S. Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis. **Cell Cycle**. 2010 Feb 15;9(4):729-35

LIVNEH, Z. Keeping mammalian mutation load in check. Regulation of the activity of error-prone DNA polymerases by p53 and p21. **Cell Cycle**. 2006; 5:1918-22.

MA, X., et al. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. **Cancer**, v.109, n.8, p.1536-42, Apr 15 2007.

MAGA, G. et al. DNA polymerase theta purified from human cells is a high-fidelity enzyme. **J Mol Biol**. 2002. May v. 319, n. 2, p. 359-69.

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

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

MALCOVATI, L. 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**, 2011; 96:1433-1440.

MALCOVATI, L.; GERMING, U.; KUENDGEN, A. et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. **J Clin Oncol**. 2007;25(23):3503–10.

MANKE, IA.; LOWERY, DM.; NGUYEN, A.; YAFFE, MB.; BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. **Science** (New York, N.Y.), 2003; 302(5645), 636-9.

MARTIN, MJ.; JUAREZ, R.; BLANCO, L.; DNA-binding determinants promoting NHEJ by human Pol μ . **Nucleic Acids Res**. 2012 Dec; 40(22): 11389–11403.

MASUTANI, C.; ARAKI, M.; YAMADA, A.; KUSUMOTO, R.; NOGIMORI, T.; MAEKAWA, T. et al. Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. **EMBO J**. 1999 Jun 15;18(12):3491-501.

MASUTANI, C.; KUSUMOTO, R.; IWAI, S.; HANAOKA, F. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase η . **EMBO J**. 2000 Jun 15; 19(12): 3100–3109.

MATEOS-GOMEZ, PA.; GONG, F.; NAIR, N.; MILLER, KM.; LAZZERINI-DENCHI, E.; SFEIR, A. Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. **Nature**. 2015 Feb 12;518(7538):254-7.

MCINTYRE, J.; WOODGATE, R. Regulation of translesion DNA synthesis: Posttranslational modification of lysine residues in key proteins. **DNA Repair** (Amst). 2015 May;29:166-79.

MCQUILTEN ZK.; POLIZZOTTO MN.; WOOD EM.; SUNDARARAJAN V. Myelodysplastic syndrome incidence, transfusion dependence, health care use, and complications: an Australian population-based study 1998 to 2008.

MCVEY, M1.; LEE, SE. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. **Trends Genet**. 2008 Nov;24(11):529-38.

MOLDOVAN, G. L.; MADHAVAN, M. V.; MIRCHANDANI et al. DNA polymerase POLN participates in cross-link repair and homologous recombination. **Mol Cell Biol**. 2010 Feb;30(4):1088-96.

MUFTI, GJ. Chromosomal deletions in the myelodysplastic syndrome. **Leuk Res**. 1992;16(1):35-41.

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

NATELSON, E. A.; PYATT, D. Acquired myelodysplasia or myelodysplastic syndrome: clearing the fog. **Adv Hematol**, 2013; 309637.

NAZHA A.; NARKHEDE M.; RADIVOYEVITCH T.; SEASTONE DJ.; PATEL BJ.; GERDS AT.; MUKHERJEE S.; KALAYCIO M.; ADVANI A.; PRZYCHODZEN B.; CARRAWAY HE.; MACIEJEWSKI JP.; SEKERES MA. Incorporation of molecular data into the Revised International Prognostic Scoring System in treated patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**. 2016 Nov;30(11):2214-2220

NEUKIRCHEN, J.; SCHOONEN, W. M.; STRUPP, C.; GATTERMANN, N.; AUL, C.; HAAS, R.; GERMING, U. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS-registry. **Leuk Res**. 2011 Dec;35(12):1591-6.

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

OGI, T.; SHINKAI, Y.; TANAKA, K et al. Polkappa protects mammalian cells against the lethal and mutagenic effects of benzo[a]pyrene. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2002;99:15548-53.

OHMORI, H.; FRIEDBERG, EC.; FUCHS, RPP et al. The Y-family of DNA polymerases. **Molecular Cell**, vol. 8, no. 1, pp. 7-8, 2001.

OLNEY, H. J.; LE BEAU, M. M. The Cytogenetics and molecular biology of the Myelodysplastic syndromes. In: STEENSMA, D. P. (Ed.). **Myelodysplastic syndromes:**

pathobiology and clinical management. 2nd ed. New York: Informa Healthcare, 2002. p. 49-86.

O-WANG J.; KAJIWARA, K.; KAWAMURA, K.; KIMURA, M.; MIYAGISHIMA, H.; KOSEKI, H.; TAGAWA, M.; An essential role for REV3 in mammalian cell survival: absence of REV3 induces p53-independent embryonic death. **Biochem Biophys Res Commun.** 2002 May 10;293(3):1132-7.

O-WANG, J. et al. DNA polymerase kappa, implicated in spontaneous and DNA damage-induced mutagenesis, is overexpressed in lung cancer. **Cancer Res**, v. 61, n. 14, p. 5366-9, Jul 2001.

OZTURK, S.; DEMIR, N. DNA repair mechanisms in mammalian germ cells. **Histol Histopathol**, 2011; 26(4):505-17.

PAGÈS, V.; FUCHS, RP. How DNA lesions are turned into mutations within cells? **Oncogene.** 2002 Dec 16;21(58):8957-66.

PAPAEMMANUIL, E. et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood**, 2013; 122(22):3616-27.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; KUHFITTIG-KULLE, S.; OBE, G. Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. **Cytogenet Genome Res.** 2004;104(1-4):7-13.

PFEILSTÖCKER, M.; TUECHLER, H.; SANZ, G. et al. Time-dependent changes in mortality and transformation risk in MDS. **Blood.** 2016;128:902–10.

PFEILSTÖCKER, M; TUECHLER, H; SANZ, G; SCHANZ J4, GARCIA-MANERO, G; SOLÉ, F; BENNETT, J. M; BOWEN, D.; FENAUX, P.; DREYFUS, F1.; KANTARJIAN, H.; KUENDGEN, A.; MALCOVATI, L.; CAZZOLA, M.; CERMAK, J.; FONATSCH, C.; LE BEAU M. M.; SLOVAK, M. L; LEVIS, A.; LUEBBERT, M.; MACIEJEWSKI, J.; MACHHERNDL-SPANDL, S.; MAGALHAES, S. M.; MIYAZAKI, Y.; SEKERES, M. A.; SPERR, W. R.; STAUDER, R.; TAURO, S.; VALENT, P.; VALLESPI, T.; VAN DE LOOSDRECHT A. A.; GERMING, U.; HAASE, D.; GREENBERG, P. L.; Time-dependent changes in mortality and transformation risk in MDS. **Blood.** 2016 Aug 18;128(7):902-10

PILIÉ, PG.; TANG, C.; MILLS, GB.; YAP, TA. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. **Nat Rev Clin Oncol.** 2018 Oct 24.

PILLAIRE, MJ. et al. A 'DNA replication' signature of progression and negative outcome in colorectal cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 6, p. 876-87, Feb 2010.

PINHEIRO, R. F.; CHAUFFAILLE, M. L. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. **Braz J Med Biol Res.** 2009 Nov;42(11):1110-2

PLOSKY, BS.; WOODGATE, R.; Switching from high-fidelity replicases to low-fidelity lesion-bypass polymerases. **Curr Opin Genet Dev.** 2004;14:113–9.

POWERS, KT.; WASHINGTON MT. Eukaryotic translesion synthesis: Choosing the right tool for the job. **DNA Repair (Amst).** 2018 Aug 24. pii: S1568-7864(18)30181-2.

RIBEIRO, H. L. JR.; OLIVEIRA, R. T.; MAIA, A.R.; SOUSA, J.C.; HEREDIA, F.F.; MAGALHÃES, S.M.; PINHEIRO R.F. ATM polymorphism is associated with low risk myelodysplastic syndrome. **DNA Repair** (Amst). 2013 Feb 1;12(2):87-9.

RIBEIRO, HR. Expressão de genes relacionados às vias de reparo de danos em fita dupla no DNA em pacientes com síndrome mielodisplásica. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2016.

RIBEZZO, F.; SHILOH, Y.; SCHUMACHER, B. Systemic DNA damage responses in aging and diseases. **Semin Cancer Biol.** 2016 Jun;37-38:26-35.

ROLLISON, D. E. et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. **Blood**, 2008; 112(1):45-52.

ROSSI, DJ1.; BRYDER, D.; SEITA, J.; NUSSENZWEIG, A.; HOEIJMAKERS, J.; WEISSMAN, IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. **Nature**. 2007 Jun 7;447(7145):725-9.

SALE, J. E.; LEHMAN, A. R.; WOODGATE, R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2012; 13(3): 141–152.

SANTINI, V. Clinical Use of Erythropoietic Stimulating Agents in Myelodysplastic Syndromes. **Oncologist**. 2011;16 Suppl 3:35-42.

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

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

SCHNITTGER, S.; BACHER, U.; HAFERLACH, C, et al. Characterization of NPM1-mutated AML with a history of myelodysplastic syndromes or myeloproliferative neoplasms. **Leukemia** 2011;25:615-621

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

SEKI, M. et al. High-efficiency bypass of DNA damage by human DNA polymerase Q. **EMBO J.** 2004.v. 23, n. 22, p. 4484-94, Nov.

SEKI, M.; MARINI, F.; WOOD, RD. POLQ (Pol theta), a DNA polymerase and DNA dependent ATPase in human cells. **Nucleic Acids Res.** 2003. Nov v. 31, n. 21, p. 6117-26.

SFEIR, A.; SYMINGTON, LS. Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway?. **Trends Biochem Sci.** 2015 Nov;40(11):701-714.

SHADDUCK, R.K., et al. Recent advances in myelodysplastic syndromes. **Exp Hematol**, v.35, n.4 Suppl 1, p.137-43, Apr 2007.

SHAHRABI, S.; et al. Genetics and epigenetics of myelodysplastic syndromes and response to drug therapy: new insights. **Oncology Reviews**. 2016; 10(4): 311.

SHARIEF, FS. et al. Cloning and chromosomal mapping of the human DNA polymerase theta (POLQ), the eighth human DNA polymerase. **Genomics**. v. 59, n.1, p. 90-6, Jul 1999.

SHIH, LY.; HUANG, CF.; WANG, PN. et al. Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. **Leukemia** 2004;18:466-475

SHIMA, N.; HARTFORD, SA.; DUFFY, T.; WILSON, LA.; SCHIMENTI, KJ.; SCHIMENTI, JC. Phenotype-based identification of mouse chromosome instability mutants. **Genetics**. 2003 Mar;163(3):1031-40.

SHIMA, N.; MUNROE, RJ.; SCHIMENTI, JC.; The mouse genomic instability mutation chaos1 is an allele of Polq that exhibits genetic interaction with Atm. **Mol Cell Biol**. 2004 Dec;24(23):10381-9.

SHRIVASTAV, M.; DE HARO, LP.; NICKOLOFF, JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. **Cell Res**. 2008 Jan;18(1):134-47.

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

SUZUKIA, T.; GRÚZA, P.; HONMAA, M.; ADACHIB, N.; NOHMIA, T. The role of DNA polymerase ζ in translesion synthesis across bulkyDNA adducts and cross-links in human cells. **Mutation Research**. 791–792 (2016) 35–41

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

SWERDLOW, SH; CAMPO, E; PILERI, SA; HARRIS, NL; STEIN, H. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood**. 2016 May 19;127(20):2375-90.

TAKATA, K.; SHIMIZU, T.; IWAI, S.; WOOD, RD. Human DNA polymerase N (POLN) is a low fidelity enzyme capable of error-free bypass of 5S-thymine glycol. **J Biol Chem**. 2006 Aug 18;281(33):23445-55

TERRADOS, G.; CAPP, J. P.; CANITROT, Y. et al. Characterization of a natural mutator variant of human DNA polymerase lambda which promotes chromosomal instability by compromising NHEJ. **PLoSOne**. 2009;4:e7290.

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

UCHIYAMA, M.; TERUNUMA, J.; HANAOKA, F. The Protein Level of Rev1, a TLS Polymerase in Fission Yeast, Is Strictly Regulated during the Cell Cycle and after DNA Damage. **PLoS One**. 2015 Jul 6;10(7):e0130000.

VAISMAN, A.; MASUTANI, C.; HANAOKA, F.; CHANEY, SG. Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase eta. **Biochemistry**. 2000 Apr 25;39(16):4575-80.

VAISMAN, A.; WOODGATE, R Translesion DNA polymerases in eukaryotes: what makes them tick? **Crit Rev Biochem Mol Biol**. 2017 Jun;52(3):274-303

VALERIA, V.; RAMON, V.; TIU AND HEESUN J. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. **Blood Res**. 2014 Dec; 49(4): 216–227.

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

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**. 2009; 114(5): 937-951.

VISSER O.; TRAMA A.; MAYNADIÉ M.; STILLER C.; MARCOS-GRAGERA R.; DE ANGELIS R.; MALLONE S.; TEREANU C.; ALLEMANI C.; RICARDI U.; SCHOUTEN HC.; RARECARE WORKING GROUP. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. **Eur J Cancer**. 2012 Nov;48(17):3257-66

WALTER, MJ.; SHEN, D.; DING, L. et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**. 2012;366(12): 1090-1098.

WANG, H. et al. Analysis of specialized DNA polymerases expression in human gliomas: association with prognostic significance. **Neuro Oncol**, v. 12, n. 7, p. 679-86, Jul 2010

WANG, X. et al. Mutational analysis of thirty-two double-strand DNA break repair genes in breast and pancreatic cancers. **Cancer Res**, v. 68, n. 4, p. 971-5, Feb 2008.

WASHINGTON, MT.; JOHNSON, ROBERT E, PRAKASH, LOUISE, PRAKASH, SATYA. Human DINB1-encoded DNA polymerase kappa is a promiscuous extender of mispaired primer termini. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2002. 99(4), 1910-4.

WATERS, LS. et al. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 73, n. 1, p. 134-54, Mar 2009.

WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, **World Health Organization**, 2011 (WHO/NMH/NHD/MNM/11.1) (<http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>, acesso em 10/08/2018).

WHO. Nutritional anaemias. Report of a WHO scientific group. **World Health Organ Tech Rep Ser**. 1968;405:5-37.

WITTSCHIEBEN, J. P.; PATIL, V.; GLUSHETS, V. et al. Loss of DNA polymerase zeta enhances spontaneous tumorigenesis. **Cancer Res**. 2010 Apr 1;70(7):2770-8.

WOLFLE, W. T., WASHINGTON, M. T., PRAKASH, LOUISE, & PRAKASH, SATYA. Human DNA polymerase kappa uses template – primer misalignment as a novel means for extending mispaired termini and for generating single-base deletions. **Genes & Development**, 2003. 17(17), 2191-9.

WU F, LIN X, OKUDA T, HOWELL SB. DNA polymerase zeta regulates cisplatin cytotoxicity, mutagenicity, and the rate of development of cisplatin resistance. **Cancer Res**. 2004;64:8029-35.

WYATT, DW.; FENG, W.; CONLIN, MP.; YOUSEFZADEH, MJ.; ROBERTS, SA.; MIECZKOWSKI, P. et al. Essential Roles for Polymerase θ -Mediated End Joining in the Repair of Chromosome Breaks. **Mol Cell**. 2016 Aug 18;63(4):662-673.

YADAV S.; MUKHOPADHYAY S.; ANBALAGAN M.; MAKRIDAKIS N. Somatic Mutations in Catalytic Core of POLK Reported in Prostate Cancer Alter Translesion DNA Synthesis. **Hum Mutat**. 2015 Sep;36(9):873-80.

YANG, J. et al. Altered DNA polymerase iota expression in breast cancer cells leads to a reduction in DNA replication fidelity and a higher rate of mutagenesis. **Cancer Res**, v. 64, n. 16, p. 5597-607, Aug 2004.

YAO, Y.; DAI, W. Genomic Instability and Cancer. **J Carcinog Mutagen**. 2014; 5.

YOUSEFZADEH, M. J.; WOOD, R. D. DNA polymerase POLQ and cellular defense against DNA damage. **DNA Repair** (Amst). 2013 Jan 1;12(1):1-9.

YU, X.; CHINI, C. C.; HE, M.; MER, G.; CHEN, J. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. **Science**. 2003;302:639-42

ZELENSKY, NA.; SCHIMMEL, J.; KOOL, H.; KANAAR, R.; TIJSTERMAN, M. Inactivation of Pol θ and C-NHEJ eliminates off-target integration of exogenous DNA. **Nat Commun**. 2017. Jul 7;8(1):66

ZHOU T, et al. Potential Relationship between Inadequate Response to DNA Damage and Development of Myelodysplastic Syndrome. **Int J Mol Sci**. 2015; 16:966-989.

ZHOU, BL.; PATA, JD.; STEITZ, TA. Crystal structure of a DinB lesion bypass DNA polymerase catalytic fragment reveals a classic polymerase catalytic domain. **Molecular Cell**, 2001; 8(2), 427-37.

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

ZHOU, W.; CHEN, Y.; LIU, X.; CHU, P.; LORIA, S.; WANG, Y. Expression of DNA Translesion Synthesis Polymerase η in Head and Neck Squamous Cell Cancer Predicts Resistance to Gemcitabine and Cisplatin-Based Chemotherapy. **PLoS One**. 2013; 8(12): e83978

APÊNDICE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA E MUTAÇÕES DAS ENZIMAS DNA POLIMERASES COM ATIVIDADE TLS EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

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

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

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

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

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

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

Serão coletadas somente 3mL 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. O procedimento de coleta esternal da medula óssea, pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxeadada) ao redor do local de onde foi retirado, 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 participantes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral. A coleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise.

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

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

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

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

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

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

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

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

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

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja algum imprevisto ou dúvidas, você deverá entrar em contato solicitar contato direto com o pesquisador responsável pelo estudo: **Roberta Taiane Germano de Oliveira (99662327)** ou com seu **Orientador acadêmico: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (81881972)** ou entre em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ** - Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo / Telefone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

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.

Não receberei nenhum ressarcimento monetário por participar da pesquisa.

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