



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**JOÃO VICTOR ALVES CORDEIRO**

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES ALFA E BETA  
*KLOTHO* EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME  
MIELODISPLÁSICA**

**FORTALEZA**

**2019**

JOÃO VICTOR ALVES CORDEIRO

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES ALFA E BETA  
*KLOTHO* EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA

2019

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)

---

C819a Cordeiro, João Victor Alves.  
Avaliação dos níveis de expressão dos genes alfa e beta Klotho em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica. / João Victor Alves Cordeiro. – 2019.  
69 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

1. Klotho. 2. Síndrome Mielodisplásica. 3. Expressão Gênica. 4. Biomarcador. 5. Senescência. I.  
Título.

CDD 661

---

JOÃO VICTOR ALVES CORDEIRO

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES ALFA E BETA  
*KLOTHO* EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

Aprovada em: 13 / 12 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Ma. Roberta Taiane Germano de Oliveira

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Nicholas Costa Barroso Lima

Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por toda a força que eu precisei ter todos os dias para conseguir enfrentar os meus objetivos.

Aos meus pais, **Junior** e **Amanda**, por terem investido na minha educação desde cedo, me mostrando sempre os valores corretos e me ensinando ser humilde e persistente nos meus sonhos.

Ao meu querido irmão, **Gabriel**, por todo o companheirismo e apoio.

À minha amada avô, **Marlene**, a qual eu tenho o maior amor do mundo e por sempre me ensinar a ver os problemas de maneira calma.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Ronald Feitosa Pinheiro**, por ter me ensinado a encarar o mundo da pesquisa sempre com os pés no chão, mas sempre pensando bem longe. Além disso, quero agradecer imensamente pela oportunidade que me concedeu no laboratório e por ter me ensinado tanto sobre assuntos que eu jamais imaginaria conhecer.

Ao Prof. Dr. **Nicholas Costa Barroso Lima**, por contribuir com tanto entusiasmo na minha formação durante o curso de Biotecnologia e por ter disponibilizado do seu tempo para participar da banca examinadora. Jamais vou esquecer que ele foi um dos únicos professores que me deixou tranquilo durante as apresentações de trabalho, e isso para mim é um grande marco.

À minha coorientadora Ma. **Roberta Taiane Germano de Oliveira**, por ter me ensinado tudo que aprendi na prática sobre todas as técnicas utilizadas no laboratório com tanta paciência e com tanta genialidade. Agradeço demais por me motivar a ser competitivo, porque sempre busco o melhor de mim, e por ser um grande exemplo de pesquisadora.

Às pessoas mais importantes que conheci na UFC **Sávio** e **Ana Júlia**, por terem me mostrado o verdadeiro significado de companheirismo e irmandade. Eu não sei o que seria de mim se eu não tivesse o apoio de vocês.

À **Mayara, Sharlene e Gabrielle**, por estarem comigo no dia-a-dia do laboratório me ensinando, não só diversas lições de vida, mas também me auxiliando nos diversos afazeres do laboratório.

Aos demais membros do laboratório, **Daniela, Cris, Marília, Isabelle, Manu, Gabriel, Letícia, Breno, Vanessa, Ramon, Thayres e Gustavo**, por estarem sempre presentes e tornando as nossas rotinas mais leves e prazerosas, e por mostrarem que durante toda essa caminhada acadêmica e pessoal é possível ter muita parceria e confiança.

Aos **professores** do curso de Biotecnologia, por terem contribuído com todo os seus conhecimentos e recursos cedidos durante o meu processo de aprendizado.

Ao **NPDM**, por ter me dado toda uma estrutura desejável durante a minha formação iniciante como pesquisador.

A todos os meus **familiares** e **amigos**, por jamais me abandonarem e me incentivarem sempre a ser uma pessoa melhor. Em especial à **Thayna Tavares**.

“Somos feitos de material de estrelas.”  
(Carl Sagan).

## RESUMO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) se caracteriza por ser uma doença hematopoiética e heterogênea, manifestando variações clínicas e patológicas devido a ineficiente diferenciação celular. Essa ineficiência ocasiona citopenias periféricas, que deverão servir como parâmetro para a caracterização da doença. A SMD é uma doença muito comum no hemisfério ocidental e afeta em sua maioria a população senil. Essa associação da SMD com a idade está ligada com a quiescência das células-tronco hematopoiéticas (CTH) causada provavelmente pelo avanço da idade e da senescência. Estudos recentes vêm mostrando o gene *Kltho* como um importante biomarcador para o câncer associado a proliferação e apoptose de células tumorais. O impacto clínico do *Kltho* na SMD ainda não é definido. Neste estudo, hipotetiza-se que a patogênese da SMD pode ser afetada pelo bloqueio de expressão de *Kltho*, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no microambiente medular, atenuando assim os danos ao DNA nas CTH e levando ao aparecimento dos quadros de citopenias, perfil característico dos pacientes. Para validar essa hipótese, um estudo clínico de caso-controle foi realizado com amostras de medula óssea de pacientes com SMD para mostrar os diferentes níveis de expressão dos genes  $\alpha$ -*Kltho* (*KL*) e  $\beta$ -*Kltho* (*KLB*), e como estes genes podem estar associados com as variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes. Foram coletadas amostras de medula óssea de 69 indivíduos, distribuídos em 61 pacientes diagnosticados com SMD em hospital terciário e 8 controles saudáveis. O estudo citogenético foi realizado por Banda-G e para analisar os níveis de expressão foi utilizado o protocolo de PCR em tempo real (qRT-PCR). Dentre as variáveis analisadas, observou-se que os pacientes tiveram seus níveis de expressão aumentados em relação ao grupo controle ( $p=0,000$ ), assim como o grupo de apenas uma citopenia ou nenhuma em relação ao grupo de duas ou três citopenias ( $p=0,001$ ); o que corrobora de certa forma com os achados das variáveis hemoglobina e contagem absoluta de neutrófilos (ANC), em que o gene *KL* estava mais expresso nos indivíduos com anemia leve (8-10 g/dL) em relação aos indivíduos com anemia severa ( $<8$  g/dL) ( $p=0,008$ ) e nos indivíduos com o ANC favorável ( $\geq 0,8$  células/mm<sup>3</sup>) em relação aos indivíduos com ANC desfavorável ( $<0,8$  células/mm<sup>3</sup>), segundo o IPSS-R ( $p=0,008$ ). Além disso, o *KL* se mostrou mais expresso em pacientes do sexo feminino ( $p=0,002$ ) e em pacientes não dependentes de transfusão ( $p=0,001$ ). O gene *KLB* não apresentou relações significativas entre os indivíduos e as variáveis

analisadas ( $p > 0,005$ ). Estas abordagens podem definir o *Klotho* como um novo marcador patológico para SMD e melhorar os avanços com a terapêutica.

**Palavras-chave:** Klotho, síndrome mielodisplásica, expressão gênica, biomarcador e senescência.

## ABSTRACT

Myelodysplastic syndrome (MDS) is characterized by a heterogeneous hematopoietic disease, manifesting clinical and pathological changes due to inefficient cellular differentiation. This inefficiency causes a peripheral cytopenia, which uses as a parameter for the characterization of the disease. MDS is a very common disease in the western hemisphere and mostly affects the senile population. This association of MDS with age is linked to hematopoietic stem cell (CTH) quiescence caused by advancing age and senescence. Recent studies show the Klotho gene as an important biomarker for cancer associated with tumor cell proliferation and apoptosis. The clinical impact of Klotho on MDS is not yet defined. In this study, hypothetically, if an SMD pathogen can be affected by Klotho expression blockade, it reduces the production of reactive oxygen species (ROS) in the medullary microenvironment, attenuating CTH DNA damage and displaying cytopenic pictures, profile characteristic of the patients. To validate this hypothesis, a large case-control clinical study was performed with bone marrow samples from patients with MDS to show the different levels of  $\alpha$ -Klotho (KL) and  $\beta$ -Klotho (KLB) genes expression, and how these genes may be associated with clinical laboratory variables of patients. Bone marrow tests were collected from 69 patients, distributed in 61 patients diagnosed with MDS at the tertiary hospital and 8 recommended controls. The cytogenetic study was performed by G-Band and analyzed the expression levels used by the real time PCR protocol (qRT-PCR). Among the variables analyzed, patients with increased expression levels in relation to the control group ( $p = 0.000$ ), as well as the group of only one cytopenia or none compared to the group of two or three cytopenias ( $p = 0.001$ ). ; which corroborates the form with the findings of hemoglobin and absolute neutrophil count (ANC) variables, in which the KL gene was more expressed in mild anemia levels (8-10 g / dL) in relation to anemia levels. (<8 g / dL) ( $p = 0.008$ ) and in cases with favorable ANC ( $\geq 0.8$  cells /  $\text{mm}^3$ ) compared to individuals with unfavorable ANC (<0.8 cells /  $\text{mm}^3$ ), second or IPSS-R ( $p = 0.008$ ). In addition, KL was more expressed in female patients ( $p = 0.002$ ) and in non-transfusion dependent patients ( $p = 0.001$ ). The KLB gene showed no relationship between the variables and variables analyzed ( $p > 0.005$ ). These approaches may define Klotho as a new pathological marker for MDS and improve advances in therapy.

Keywords: Klotho, myelodysplastic syndrome, gene expression, biomarker and senescence.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 01</b>	As principais características causadas pelo envelhecimento.....	20
<b>Figura 02</b>	Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R.....	27
<b>Figura 03</b>	Imagem esquemática do Klotho.....	29
<b>Figura 04</b>	Níveis de expressão do gene <i>KL</i> em pacientes com SMD e controles....	48
<b>Figura 05</b>	Nível de expressão do <i>KL</i> em relação a variável sexo.....	49
<b>Figura 06</b>	Níveis de expressão do <i>KL</i> em relação a variável hemoglobina IPSS-R.	50
<b>Figura 07</b>	Níveis de expressão da variável ANC.....	51
<b>Figura 08</b>	Níveis de expressão da variável Citopenias.....	52
<b>Figura 09</b>	Níveis de expressão da variável Dependência Transfusional.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b>	Classificação da SMD seguindo os critérios estabelecidos da revisão da OMS em 2016.....	25
<b>Tabela 02</b>	Dados informativos do gene Klotho em humanos, ratos e camundongos.....	30
<b>Tabela 03</b>	Relação dos níveis de expressão do Klotho com diversas neoplasias encontradas na literatura.....	33
<b>Tabela 04</b>	Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR.....	38
<b>Tabela 05</b>	Descrição clínica dos pacientes com SMD que participaram do estudo.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANC	Contagem Absoluta de Neutrófilos
AREB	Anemia Refratária com Excesso de Blastos
cAMP	Adenosina 3',5'-Monofosfato Cíclico
cDNA	DNA complementar
Cq	Quantitative Cycle
CTH	Células-tronco Hematopoiéticas
Epo	Eritropoietina
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FGFR	Receptor de Fator de Crescimento de Fibroblasto
Hb	Hemoglobina
HSPG	Proteoglicano Sulfato de Heparina
IGF	Fator de Crescimento dependente de Insulina
IPSS	Sistema Internacional de Escores Prognósticos
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana
KL	$\alpha$ -Klotho
KL $\beta$	$\beta$ -Klotho
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica
MMP-2	Matriz Metaloproteinase-2
mRNA	RNA Mensageiro
NMP	Neoplasias Mieloproliferativas
OMS	Organização Mundial da Saúde

PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PKC	Proteína Quinase C
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
SASP	Senescence-Associated Secretory Phenotype
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SMD-DM	SMD com Displasia de Múltipla Linhagem
SMD-DU	SMD com Displasia de Única Linhagem
SMD-EB	SMD com Excesso de Blastos
SMD-SA	SMD com Sideroblastos em Anel
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TME	Transição Mesenquimal-Epitelial

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Envelhecimento e Senescência celular.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Aspectos gerais da Síndrome Mielodisplásica.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Etiologia.....</b>	<b>21</b>
<b>1.4 Epidemiologia.....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Patogênese da SMD.....</b>	<b>23</b>
<b>1.6 Citogenética e alterações moleculares da SMD.....</b>	<b>24</b>
<b>1.7 Classificação Clínica da SMD.....</b>	<b>25</b>
<b>1.8 Estratificação Prognóstica da SMD.....</b>	<b>26</b>
<b>1.9 Klotho.....</b>	<b>27</b>
<b>1.9.1 Estrutura, função e atividades do Klotho.....</b>	<b>29</b>
<b>1.9.1.1 <math>\alpha</math>-klotho (KL).....</b>	<b>29</b>
<b>1.9.1.2 <math>\beta</math>-klotho (KLB).....</b>	<b>31</b>
<b>1.10 Klotho e o câncer.....</b>	<b>31</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>3 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Aspectos Éticos da Pesquisa.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Obtenção das amostras de células de medula óssea.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Cariótipo por bandeamento-G.....</b>	<b>36</b>
<b>3.4 Análise de Expressão do mRNA por qRT-PCR.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4.1 Extração do RNA total.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4.2 Síntese de cDNA.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4.3 qRT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) .....</b>	<b>38</b>
<b>3.5 Variáveis Analisadas.....</b>	<b>40</b>
<b>3.6 Análises Estatísticas.....</b>	<b>41</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1 Caracterização dos Pacientes.....</b>	<b>42</b>

<b>4.2</b>	<b>Análise de expressão gênica por RT-qPCR.....</b>	<b>48</b>
4.2.1	<i>Expressão gênica do KL e KLB em pacientes com SMD e controles saudáveis.....</i>	48
4.2.2	<i>Expressão gênica do KL e KLB em relação a variável sexo.....</i>	49
4.2.3	<i>Expressão gênica do KL e KLB em relação às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD.....</i>	49
4.2.3.1	<i>Achados de sangue periférico.....</i>	49
4.2.3.2	<i>Achados Medulares.....</i>	52
4.2.3.3	<i>Achados Citogenéticos.....</i>	53
<b>4.3</b>	<b>Expressão gênica do KL e KLB na classificação clínica e estratificação prognóstica dos pacientes com SMD.....</b>	<b>53</b>
<b>4.4</b>	<b>Expressão gênica do KL e KLB em pacientes com dependência transfusion.....</b>	<b>53</b>
<b>4.5</b>	<b>Expressão gênica do KL e KLB em relação a evolução para LMA.....</b>	<b>54</b>
<b>4.6</b>	<b>Expressão gênica do KLB.....</b>	<b>54</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>
	<b>APÊNDICE: TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO...64</b>	
	<b>ANEXO: RESUMO SUBMETIDO PARA O AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY (ASH).....</b>	<b>67</b>

# 1 INTRODUÇÃO

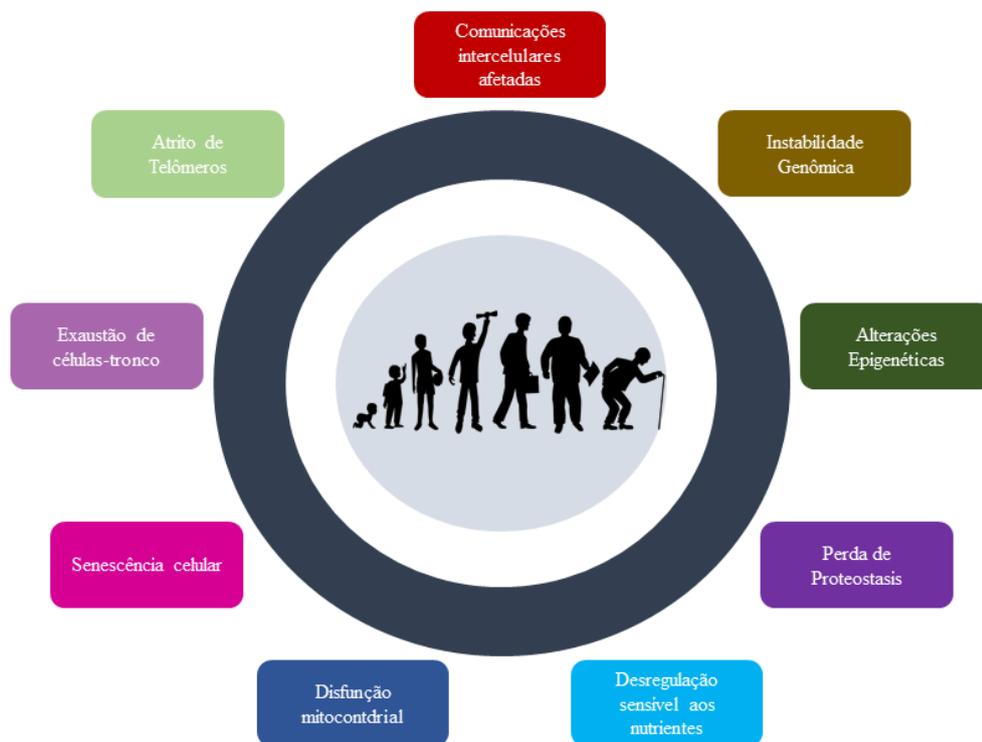
## 1.1 Envelhecimento e Senescência celular

O envelhecimento é um processo natural do corpo de qualquer organismo e é dependente do tempo, com isso, existe um declínio das funções fisiológicas, da adaptabilidade e da resistência dos órgãos diante das intensas exposições (Figura 01) (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013; SHENGHUI; SHARPLESS, 2017). Sendo assim, o envelhecimento traz consigo o acúmulo de diversos danos celulares, responsáveis pela manifestação de doenças, como o câncer. Dessa maneira, quando as células acumulam um grande número de danos, elas podem manifestar duas respostas: a ativação de um suicídio programado (apoptose) ou entrar em um processo de senescência celular, na qual as células apresentam uma parada no ciclo celular (SILVA-ÁLVAREZ *et al.*, 2019).

A senescência celular também apresenta características de expressar moléculas anti-proliferativas (p16<sup>INK4a</sup>) e ativação de vias de sinalização sensíveis a danos (p38<sup>MAPK</sup> e NF-κB), gerando por consequência o grande número de transcritos relacionados a senescência (SHENGHUI; SHARPLESS, 2017). Além disso, outros sinais são capazes de induzir essa senescência, como a disfunção da telomerase, estresses oxidativos, mudanças na conformação da cromatina, disfunções mitocondriais, estresses mitóticos e proteotoxicidade. Sabe-se que as células que entram em processos de senescência são capazes de induzir outras células a entrarem também em processo, por vias parácrinas (SHENGHUI; SHARPLESS, 2017).

Apesar dos estudos relacionados ao mecanismo do processo de senescência celular *in vivo* serem ainda pouco elucidados, sabe-se que em culturas de células, esse processo se inicia como uma resposta à alguma injúria celular, o que leva a célula a entrar no estado transiente de parada do ciclo celular, mediado pela ativação da via p53 e expressão de mediadores de regiões *downstream* (p21<sup>CIP1</sup>). A partir daí, se a célula consegue resolver essa injúria, o processo de senescência não continua. Entretanto, se os danos sofridos são contínuos, existe uma ativação dos locus CDKN2A, reforçando essa parada do ciclo celular. Com a intensificação dos danos, a via do p53 acaba sendo afetada, por exemplo, aumentando processos de heterocromatização de alvos E2F (NARITA *et al.*, 2003), os efeitos de citocinas SASP (ACOSTA *et al.*, 2013), desregulação da cromatina (DOU *et al.*, 2015) e sinalização de danos no DNA auto-infligidos (PASSOS *et al.*, 2010) (SHENGHUI; SHARPLESS, 2017).

**Figura 01:** As principais características causadas pelo envelhecimento.



**Fonte:** Adaptado de López-Otín (2013)

Durante o processo de envelhecimento, as células-tronco hematopoiéticas (CTHs) perdem a capacidade de regeneração, levando a produção fenotípica de envelhecimento, como imunossenescência, anemia e desbalanceamento da produção de células mieloides (DE HAAN; LAZARE, 2018). Dessa forma, pode ocorrer um aumento da taxa de risco de desenvolver neoplasias hematológicas e doenças autoimunes (MCKERREL; VASSILIOU, 2015).

O envelhecimento no processo hematopoiético é gerado tanto por fatores extrínsecos (conferido por elementos do endotélio e microambiente estromal), quanto intrínsecos (acumulo de danos no DNA, estresses oxidativos e autofagia) (RAAIJMAKERS, 2019). Esses fatores podem provocar um aumento expressivo de um nicho inflamatório induzindo certos distúrbios que determinam o balanço entre as linhagens celulares na medula óssea, auxiliando dessa maneira no entendimento de certas patologias, como uma certa predisposição para neoplasias mieloides, como a SMD, a NMP (Neoplasias Mieloproliferativas) e a LMA (RAAIJMAKERS, 2019).

Um dos genes que está intrinsecamente ligado ao processo de senescência celular é o *klotho*. Este gene é responsável pela manutenção quantitativa e funcional das células tronco, por meio do antagonismo produzido pelo seu transcrito em vias celulares importantes, como a sinalização de Wnt, responsável por processos de organogênese, diferenciação, polarização e migração celular (MING CHANG HU., 2015). Além disso, esse gene pode acelerar esses processos de senescência, por meio da desregulação mineral homeostática, alterações nos processos de autofagia e amplificação de estresses oxidativos (MING CHANG HU., 2015).

## **1.2 Aspectos gerais da Síndrome Mielodisplásica**

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é definida como um conjunto de alterações clonais na medula óssea, que causam uma ineficiência hematopoiética, e manifestando características anômalas, como displasia (as) e/ou citopenia (as) periféricas (HASSERJIAN *et al*, 2018). Em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentou uma revisão de caracterização dos tumores de tecidos hematopoiéticos e linfoides, adicionando novos achados relacionados a características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas, citogenéticas e moleculares, a partir das quais é feita a classificação diagnóstica de SMD, em seus diferentes subtipos (ARBER *et al*, 2019). A SMD é dita como uma doença senil (idade média de 70 a 75 anos) (WEINBERG *et al*, 2019) e pode levar a uma evolução para Leucemia Mielóide Aguda (LMA) em torno de 30 a 40% dos casos.

## **1.3 Etiologia**

A SMD é uma doença que pode não apresentar causa conhecida, sendo assim é dita como primária ou *de novo* (85% a 90% dos casos) ou pode ser derivada de exposição a terapias naqueles pacientes que apresentam algum tipo de neoplasia e se submetem a terapias com quimioterapia e/ou radioterapia, nesse caso são ditas secundárias (10% a 15% dos casos) (CHAMSEDDINE *et al.*, 2015). Entretanto, já existem estudos que associam a etiologia da SMD com a exposição à solventes químicos (benzenos e derivados) (IRONS, KERZIC *et al.*, 2014) e ao estilo de vida (etilismo, tabagismo e obesidade) (SCHATZKIN *et al.*, 2009, TAIOLI *et al.*; 2010).

## 1.4 Epidemiologia

A SMD está entre as doenças neoplásicas hematológicas mais comum em pacientes acima de 60 anos ao diagnóstico (em torno de 80% deles) (STROM; VELEZ-BRAVO; ESTEY, 2008). Na infância, ela está presente em aproximadamente 5% das neoplasias em indivíduos menores de 14 anos de idade (HASLE *et al.*, 2003; NIEMEYER; BAUMANN, 2008). Em relação ao sexo, a taxa de incidência em homens é mais prevalente do que em mulheres (4,5 vs 2,7 por 100.000 por ano) e há um acentuado aumento há medida que o envelhecimento aumenta (PFEILSTOCKER, 2007; ADES *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2016).

O SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*), um programa que coleta informações sobre as incidências de câncer e os dados de sobrevividas nos Estados Unidos desde do ano de 1973. Este programa coletou dados nos anos de 2001 a 2003 e estimou a taxa de incidência para 3.4 para 100.000 habitantes, resultando em aproximadamente 10.000 novos casos por ano. Tal incidência é similar ao que é reportado na Inglaterra e Suécia (3.6 para 100.000), na Alemanha (4.1 para 100.000) e França (3.2 para 100.000), entretanto é maior do que no Japão (1.0 por 100.000) (AUL; GATTERMANN *et al.*, 1992; MAYNADIÉ *et al.*, 1996; RADLUND *et al.*, 2009; SEKERES, 2010). Mais recentemente, o SEER coletou dados entre 2007 e 2011 e mostrar aumento da incidência com uma taxa de incidência global de 4.9 pacientes por 100.000 habitantes (COGLE, 2015).

Recentemente, um estudo multinacional foi realizado analisando 1.080 pacientes com SMD primária derivados da Argentina (635 pacientes), Brasil (345) e Chile (100). Neste estudo, foi observado que os chilenos tinham uma menor idade média (64 anos) ao diagnóstico, seu predomínio era de pacientes do sexo feminino e maior porcentagem dos doentes foram classificados como alto risco, o que resultava em uma menor sobrevida global em relação aos outros grupos. Já os pacientes argentinos e brasileiros apareceram com resultados mais similares, tanto em características clínicas e epidemiológicas, quanto em relação a sobrevida desses pacientes (maior ao serem comparados com o grupo chileno). O Brasil apresentava uma média de idade de 68 anos, com predomínio do sexo masculino e do subgrupo CRDM (OMS 2008), além de serem de baixo risco (IPSS-R) (BELLI *et al.*, 2015).

No Brasil, o estudo pioneiro sobre o levantamento dos casos de SMD foi apresentado o *Registro Brasileiro de Síndromes Mielodisplásicas – Aspectos demográficos, clínico-patológicos e terapêuticos em centros de atenção terciária*, realizado com base em um estudo que utilizou 476 pacientes com SMD em tratamento, provenientes de 12 centros das regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, diagnosticados no período de janeiro de 2003 até dezembro de 2007. Foi visto que a mediana das idades dos pacientes se encontrava em torno de 68,3 anos, e destes, 50,8% eram mulheres e 86,6% residentes em zona urbana (MAGALHAES *et al.*, 2010).

### **1.5 Patogênese da SMD**

O modelo mais aceito que busca explicar a patogênese da SMD é o modelo de múltiplos passos, em que a partir de clones anormais citogenéticos nas células medulares e no microambiente medular, os clones mielodisplásicos se tornam predominantes, ocasionando a doença e, em alguns casos, levando ao desenvolvimento de leucemia (FENAUX, 2004). Em suma, o clone anômalo originado após sofrer alterações genéticas, epigenéticas e citogenéticas, leva ao surgimento de mudanças morfológicas nas células ou perdas de linhagens celulares, gerando a síndrome mielodisplásica e levando a uma possível evolução para LMA (Leucemia Mielóide Aguda) (GIAGOUNIDIS *et al.*, 2013).

Anormalidades no cariótipo podem ser detectadas nos pacientes com SMD (tanto primária, quanto secundária). Essas alterações podem ser tanto a nível numérico quanto estrutural, podendo afetar apenas um cromossomo ou mais (chamado de cariótipo complexo quando se tem a partir de 3 alterações em uma mesma metáfase). As alterações mais frequentes encontradas na SMD estão relacionadas com translocações balanceadas, perdas de partes de cromossomos e de cromossomos completos. O acúmulo dessas alterações pode levar a uma instabilidade cromossômica, impedindo que as células hematopoiéticas consigam se reparar (DELFORGE *et al.*, 2000). Essas alterações também podem ser causadas pelo avanço da idade (devido ao encurtamento dos telômeros) ou por alguma condição inflamatória (ADES *et al.*, 2014).

As condições inflamatórias decorrentes dos processos de senescência podem provocar alterações nos estromas, citocinas e sistema imune (NAEIM; RAO; GRODY, 2008). Essas condições aliadas as alterações já citadas levam ao aparecimento de um clone anormal, originado de uma célula tronco hematopoiética (CTH) (NAEIM; RAO; GRODY, 2008). Todos esses processos podem prejudicar processos vitais para a

manutenção da célula, como ciclo celular e transcrição de genes supressores de tumor podendo levar a dominância das CTH anômalas.

Ademais, alguns tipos de mutações somáticas nas células troncos pluripotentes podem contribuir para a patogênese da SMD. Em torno de 80% dos pacientes, apresentam mutações em mais de um gene, tais mutações podem alterar a sequência e, conseqüentemente, a função de oncogenes e genes supressores tumorais (BEJAR *et al.*, 2011; PAPAMMANUILL *et al.*, 2013). A maioria delas são mutações passageiras, ou seja, não apresenta conseqüências diretas com a hematopoiese. Entretanto, algumas mutações podem conferir às células com diferenciação anormal alguma vantagem de sobrevivência, favorecendo a expansão clonal. Essas mutações podem levar ao fenótipo de SMD e, em alguns casos, evolução para LMA (BEJAR *et al.*, 2011; PAPAMMANUILL *et al.*, 2013).

### **1.6 Citogenética e alterações moleculares da SMD**

A citogenética é uma das técnicas mais importantes no momento de estabelecer o prognóstico do paciente (BERNASCONI *et al.*, 2013). As anormalidades citogenéticas estão presentes em torno de 40 – 50% dos casos de SMD primária e mais de 80% dos casos de SMD secundária. As alterações mais comuns encontradas são: -7/7q-, 5q-, i(17q), t(17p), -13/13q-, del(11q), del/t(12p), del(9q), idic(Xq), t(11;16), t(3;21), t(1;3), t(2;11), inv/t(3) e t(6 ;9) (PERAZZIO; CHAUFFAILLE, 2019). Durante a evolução dessa técnica, houve uma grande contribuição para acompanhar a resposta dos tratamentos e analisar se houve uma progressão ou não durante o percurso da doença.

Diferente de outras neoplasias, a SMD compõe aquelas alterações que são ditas não balanceadas, em que a troca desses materiais pode resultar em um gene a mais ou a menos (FEARON *et al.*, 2002). Estas alterações cromossômicas tão recorrentes podem inativar alguns genes supressores tumorais. Além disso, a perda de função do gene pode ocorrer devido a alguma perda ou deleção, mutações pontuais ou pelo silenciamento transcricional decorrente de metilações das ilhas CPGs (regiões ricas em citosinas e guaninas) (OLNEY; LE BEAU, 2002).

As alterações cromossômicas devem de certa forma correlacionarem-se com o curso clínico da doença e com a transformação. Aqueles pacientes que apresentam determinadas alterações respondem melhor a tratamentos específicos, ressaltando assim a importância da citogenética (CHAUFFAILLE, 2019). A frequência e a alteração do

cariótipo estão relacionadas também com a área geográfica e as características étnicas. Nas alterações que envolvem o cromossomo 5 (-5/5q) são mais comumente reportadas em diversas regiões do mundo, incluindo o Brasil, seguidas das alterações no cromossomo 7(-7/7q) (KAWANKAR; VUNDINTI, 2011).

A citogenética tem proporcionado um papel crucial na base molecular para a descoberta de diversos genes envolvidos na transformação para Leucemia em pacientes com SMD, além disso, são extremamente importantes para a definição do prognóstico dos pacientes, apesar dos grandes avanços da era genômica (CAZZOLA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2014; GARCIA-MANERO, 2015).

### 1.7 Classificação Clínica da SMD

A definição mais utilizada para SMD traz consigo uma variedade de doenças que pode determinar as variações genéticas e biológicas durante o desenvolvimento da doença, assim como determinar o tratamento mais indicado. A classificação utilizada para SMD sofreu diversas mudanças ao longo do tempo.

Desde 1976, a SMD foi primeiramente categorizada como uma entidade que não se sabia ao certo o quão diferente ela era da Leucemia Aguda, sendo chamadas inicialmente de Síndromes Dismielopoiéticas. A partir daí, com o avanço de maiores esclarecimentos morfológicos, genéticos, clínicos, citoquímicos, imunofenotipagem e citogenético, e mais recentemente, com a contribuição de toda a tecnologia disponível na era molecular, a classificação mais recente revisada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016 (SANZ-DE PEDRO *et al.*, 2018; ARBER *et al.*, 2019) (Tabela 01).

**Tabela 01:** Classificação da SMD seguindo os critérios estabelecidos da revisão da OMS em 2016.

<i>SUBTIPO DE SMD</i>	<b>SANGUE PERIFÉRICO</b>	<b>MEDULA ÓSSEA</b>
<i>SMD-DU</i>	≤1% de blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 linhagem; 5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
<i>SMD-DM</i>	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; 5% de Sideroblastos em anel*; ≤5% de blastos
<i>SMD com Sideroblastos em Anel (SMD-SA)</i>		

<i>SMD-SA-DU</i>	≤1 % de blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 linhagem; ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
<i>SMD-SA-DM</i>	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
<b><i>SMD com Excesso de Blastos (SMD-EB)</i></b>		
<i>SMD-EB1</i>	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 2 a 4% de blastos	Displasia em 0,1,2 ou 3 linhagens; 5 a 9% de blastos
<i>SMD-EB2</i>	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 5 a 19% de blastos	Displasia em 0,1,2 ou 3 linhagens; 10 a 19% de blastos
<b><i>SMD inclassificável (SMD-i)</i></b>		
<i>SMD-i com 1% de blastos</i>	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1%× de blastos	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% de blastos
<i>SMD-i com displásia em única linhagem e pancitopenia</i>	Citopenia em 3 linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 1 linhagem; 5% de blastos
<i>SMD-i baseada em alterações citogenéticas</i>	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Ausência de displasias; ≤15% de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
<b><i>SMD com del(5q) isolada</i></b>	≤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

\*Condição na presença da mutação do gene SF3B1; ×1% de blastos deve ser encontrado em pelo menos duas situações isoladas.

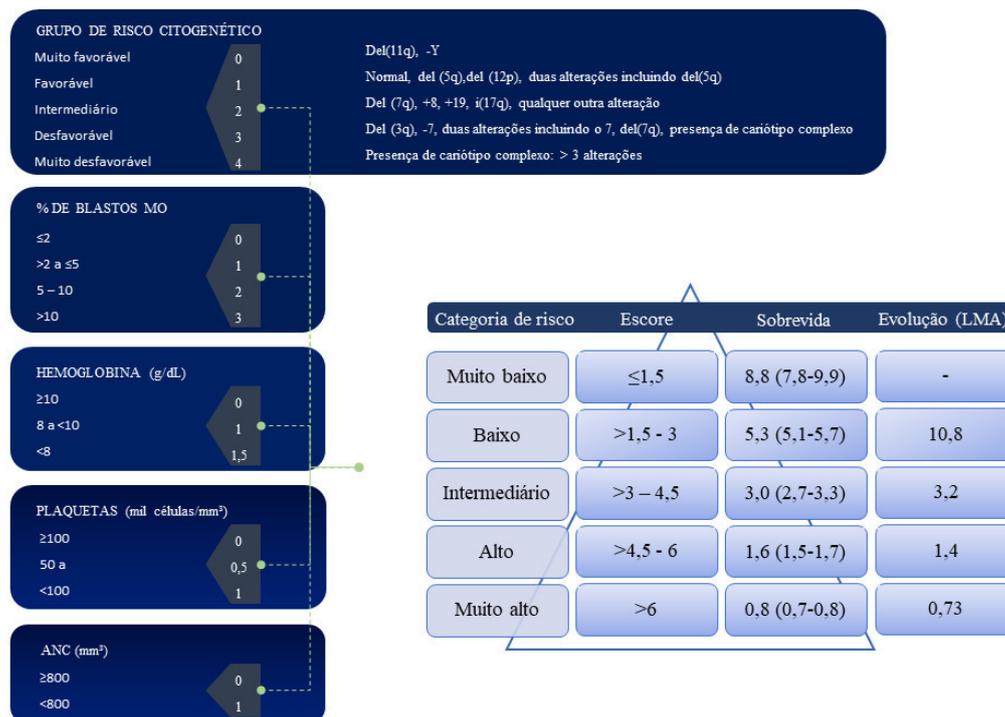
Fonte: Adaptado de Arber *et al* (2016)

## 1.8 Estratificação Prognóstica da SMD

O Sistema Internacional de Escores Prognósticos (IPSS) foi desenvolvido em 1997 e revisado em 2012 (IPSS-R), direcionando para a SMD uma maneira de classificação baseado em escores prognósticos de acordo com os dados de citogenética, morfologia e aspectos clínicos, podendo permitir a predição do risco de transformação leucêmica e a mediana de sobrevida esperada para cada paciente. A estratificação de risco mais recente é baseada nas seguintes pontuações: muito baixo (escore ≤1,5), baixo (escore entre >1,5 - 3,0), intermediário (escore entre >3,0 - 4,0), alto (escore >4,5 - 6,0) e muito alto (escore >6) (Figura 02) (GREEBERG *et al.*, 1997; GREEBERG *et al.*, 2012).

As informações do IPSS foram obtidas de dados coletados de 816 pacientes com SMD *de novo*, enquanto o IPSS-R utilizou um número bem maior (7012 pacientes com SMD) de diversos centros especializados (GREEBERG *et al.*, 2012). O sistema revisado trouxe o número de citopenias substituído pelo grau de citopenias nas três linhagens (Hb, ANC e plaquetas), categorias de citogenéticas que aumentaram de três para cinco e melhor estratificação da porcentagem de blastos (GREEBERG *et al.*, 2012).

**Figura 02:** Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R.



Fonte: Adaptado de Bejar (2014)

## 1.9 Klotho

No final do século passado, pesquisadores identificaram um gene até então desconhecido que parecia estar ligado com os processos de senescência celular. Para investigar as descobertas, um grupo de pesquisadores utilizou várias linhagens de camundongos que apresentavam diversas mutações em vários genes candidatos a estarem associados com síndromes relacionadas ao envelhecimento. Os pesquisadores então geraram uma linhagem acidental a partir de técnicas de microinjeção pronuclear de DNA recombinante. Foi verificado que os camundongos homocigotos para o gene mutado apresentavam um exponencial avanço em características comuns no envelhecimento, como arteriosclerose, enfisemas, displasias gonadais, hipoglicemima, osteoporose e baixa

sobrevida. Os pesquisadores decidiram nomear o gene de *Klotho* em alusão a deusa da mitologia grega, uma das três irmãs que tinham o total destino dos deuses e dos humanos (KURO-O *et al.*, 1997).

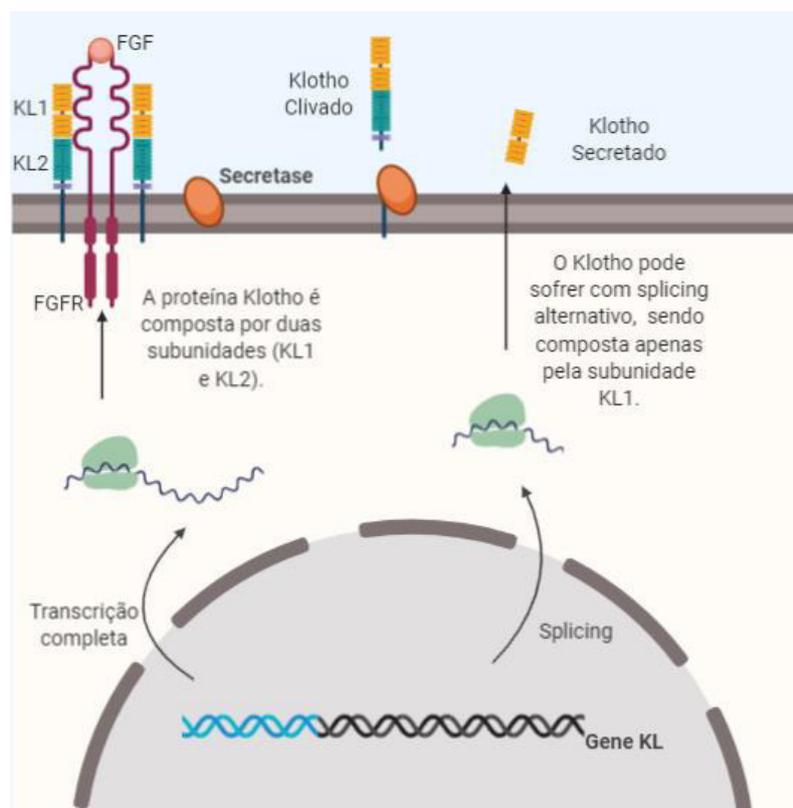
A grande descoberta permitiu que muitos pesquisadores pudessem entender como o processo de envelhecimento acontece. Além disso, sabe-se que durante esse processo, os níveis séricos de *Klotho* tendem a diminuir depois dos 40 anos (YAMAZAKI *et al.*, 2010; PEDERSEN *et al.*, 2013). Alguns estudos já associam os níveis de *Klotho* com diversas doenças relacionadas à idade, como o câncer, a hipertensão e as doenças renais (WANG; SUN, 2009; ABOLGHASEMI *et al.*, 2019).

O gene  $\alpha$ -*klotho* (*kl*) foi o primeiro a ser descoberto e em seguida foram relatados alguns parálogos como o  $\beta$ -*klotho* (*klb*) e o  $\gamma$ -*klotho* (*Lctl* ou *KLPH*) (CHA; KIM *et al.*, 2015). Além disso, ele pode ser secretado na forma de hormônio em sua forma solúvel (S-*Klotho*), podendo ser identificado em amostras de sangue, urina, plasma e fluido cerebrospinal, ou atuando como correceptor de fatores de crescimento (Figura 03) (AMARO-GAHETE *et al.*, 2018).

Os níveis de expressão do *Klotho* são encontrados em número pequeno de tecidos, e em grande abundância nos túbulos renais, glândulas paratireoides e plexo coroide (região que é produzido a maior parte do líquido cefalorraquidiano). Dentre eles, o sistema renal é o grande produtor do *Klotho* circulante, expressando a proteína em grandes níveis (OLAUSON *et al.*, 2017).

O *klotho* é encontrado na medula óssea em uma expressão bem reduzida, sendo dita como uma expressão virtual, tanto nos humanos, quanto nos camundongos. Esses níveis de expressão foram corroborados de acordo com análises de RNA-seq de medula óssea humana, além disso, não foi encontrada expressão de proteína *Klotho* nessas amostras (OLAUSON *et al.*, 2017). Em amostras de modelo murino, que apresentam uma homologia próxima dos humanos, foi mostrado que esses níveis de expressão na medula óssea podem chegar a ser 1000 vezes menor do que os níveis de expressão nos rins (MADATHIL *et al.*, 2013).

**Figura 03:** Imagem esquemática do Klotho



Fonte: Adaptado pelo autor

**Legenda:** Imagem esquemática do processo de transcrição gênica do Klotho na sua forma de proteína transmembranar, atuando como correceptor de fatores de crescimento, e na sua forma secretada, gerada por um processo de splicing alternativo.

## 1.9.1 Estrutura, função e atividades do Klotho

### 1.9.1.1 $\alpha$ -klotho (*kl*)

O gene *KL* humano está localizado no cromossomo 13 na porção do braço longo na região 12 (13q12), é composto por cinco exons e quatro introns com um tamanho de 50 kb. O *KL* codifica uma proteína do tipo transmembranar unipasso do tipo 1, ou seja, atravessa a bicamada lipídica apenas uma vez e é composta por 1012 aminoácidos, podendo também ser secretada na forma de uma proteína truncada (derivada de um *splicing* alternativo) ou ter sofrido atuações de determinadas secretases, liberando assim a sua forma solúvel composta por 549 aminoácidos (LI *et al.*, 2004). O domínio extracelular que compõe a proteína do  $\alpha$ -klotho apresenta similaridades com a família das  $1\beta$ -glicosidases de bactérias e plantas (em torno de 20 - 40% de homologia), entretanto elas não apresentam determinada atividade enzimática devido à falta dos resíduos de aminoácidos essenciais das atividades de exoglicosidade. Este domínio é onde se

concentra a principal função e atividade da proteína, portanto são compostas por duas regiões (KL1 e KL2) que dividem entre si uma homologia de 28% (WANG *et al.*, 2014; RUBINEK *et al.*, 2016).

O *KL* é altamente conservado entre os mamíferos (Tabela 02) (MING CHANG HU *et al.*, 2015). Entretanto, nos humanos, a maior expressão do *KL* é responsável por direcionar a sua transcrição para a forma de proteína secretada (MATSUMURA *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2004). Esses níveis de expressão são influenciados por inúmeras condições fisiológicas e patológicas (KOH *et al.*, 2001; ARKING *et al.*, 2002; DUCE *et al.*, 2008), incluindo estresses oxidativos (MITOBE *et al.*, 2005).

Com um papel fundamental nos diversos processos relacionados à idade e as doenças que são associadas com o envelhecimento em mamíferos, o *KL* se apresenta como um dos grandes genes responsáveis por esses processos (WANG; SUN, 2009). Dentre essas funções, o *Klotho* pode atuar como hormônio circulante, e nesse caso, atua como um fator humoral, participando do sistema circulatório por meio de três vias: *splicing* alternativo (MATSUMURA *et al.*, 1998), clivagem proteolítica (CHEN *et al.*, 2007) e movimentos da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase (IMURA *et al.*, 2004).

**Tabela 02:** Dados informativos do gene *Klotho* em humanos, ratos e camundongos.

<i>Gene Klotho</i>	Humanos	Ratos	Camundongos
<i>Locus gênico (chromossomo)</i>	13q12	12q12	13q12
<i>Número de exons</i>	5	5	5
<i>Tamanho de cDNA (kb)</i>	5,2	5,2	5,2

Fonte: Adaptado pelo autor

Ademais, o *Klotho* pode apresentar funções regulatórias da sinalização de fatores de crescimento de insulina/insulina-like do tipo 1 (IGF1), além de suprimir estresses oxidativos. Diversos modelos animais comprovaram os achados (MORRIS *et al.*, 1996; CLANCY *et al.*, 2001; BARTKE *et al.*, 2001; TAGUCHI *et al.*, 2003; KUROSU *et al.*, 2005), e suportaram a ideia de que a supressão da sinalização mediada por IGF1 pode estender a vida útil, além disso as vias de sinalização que estão relacionadas com o IGF-1R (Relacionada aos receptores) pode participar de diversas vias de neoplasias

hematológicas (ZHOU *et al.*, 2017). Foi verificado também, a partir da utilização de camundongos transgênicos que superexpressavam o *klotho*, que a inibição dessa via de sinalização pode levar a diminuição da sinalização de alguns fatores transcricionais, como os FOXOs (forkhead box O), ativando-as e aumentando a expressão de enzimas mitocondriais, reduzindo os níveis de estresses oxidativos (WANG; SUN, 2009).

Apesar da sua recente descoberta, o gene *Klotho* também deve influenciar diversas vias de sinalização celular, como a do p53/p21, cAMP, PKC e Wnt. As células de certa maneira possuem uma capacidade limitada de proliferação, conhecida como limite Hayflick (RUBIN, 1997), e dessa maneira, acabam apresentando aspectos fenotípicos de senescência (WANG; SUN, 2009).

### 1.9.1.2 $\beta$ -klotho (*klb*)

No final do século 20, o gene *KLB* foi identificado pela similaridade com *KL* em torno de 41,2% (ITO; KINOSHITA *et al.*, 2000). Os dois genes também compartilham de uma grande similaridade entre os seus domínios extracelulares, entretanto diferenças como a falta de mecanismos de geração de *splicing* alternativos (para a produção de uma proteína secretada) são bem característicos do *klb*.

É um gene composto por cinco exons e quatro introns de tamanho 44,68 kpb e é encontrado no cromossomo 4. E a sua forma é encontrada apenas como proteína transmembranar (119,8 kDa) e é homólogo a proteína do *KL* (WÓJCIK- KROWIRANDA *et al.*, 2018). Este gene é encontrado em sua forma mais expressa no fígado e no tecido adiposo branco.

O *KLB* é capaz de formar um complexo binário com fatores de crescimento, como o FGFR4, funcionando assim como um coreceptor obrigatório para auxiliar na ligação do FGF19 com alta afinidade e assim exercer suas funções biológicas (KUROSU *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2007). Outro fator de crescimento é o FGFR1c, funcionando também como coreceptor para permitir a ligação com o FGF21, responsável por atuar como um hormônio estimulante da captura de glicose (KHARITONENKOV *et al.*, 2005; KUROSU *et al.*, 2007).

## 1.10 Klotho e o câncer

Mecanismos que atuam na desregulação dos níveis de *Klotho* já foram observados em diversas neoplasias, como carcinoma cervical (LEE *et al.*, 2010), carcinoma

hepatocelular (SHU *et al.*, 2013), gástrico (WANG *et al.*, 2011), de mama (RUBINEK *et al.*, 2012) e de colorretal (PAN *et al.*, 2011) (Tabela 03). Existem estudos também que o associam a patogênese de diversos tumores, sendo considerada como uma molécula antitumoral, por outro lado, diversos estudos afirmam que o gene estimula a angiogênese e que ele inibe a apoptose (MAO *et al.*, 2018).

O *kl*, por ser encontrado nos humanos em maior proporção na sua forma circulante, pode atuar como um tipo de hormônio inibindo o crescimento celular, processos migratórios e a proliferação de células neoplásicas. Essa modulação de respostas afeta as vias de transdução de sinais, como as vias IGF-1/insulina, Wnt/ $\beta$ -catenina e PI3K/Akt (XUAN *et al.*, 2017). A expressão do *KL* pode atuar nessas vias e subsequentemente reduzir a proliferação celular, demonstrado em alguns tipos de câncer, como o de mama e o de ovário (LIGUMSKY *et al.*, 2005; LOJKIN *et al.*, 2015).

O sistema IGF (Fator de crescimento dependente de insulina) contém diferentes ligantes, receptores de superfície e proteínas de ligação que participam da regulação adequada do crescimento natural e diferenciação de diversos órgãos (BRUCHIN *et al.*, 2013). A superativação dessa via participa da progressão e sobrevivência das células neoplásicas, além de responderem aos tipos de quimioterapia utilizados (LIEFERS-VISSER *et al.*, 2017). A expressão aumentada do Klotho influencia nessa determinada via reduzindo a proliferação celular, por meio do bloqueio de IGF-1 (XUAN *et al.*, 2018).

Os FGFs são proteínas que atuam como fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. São compostos por uma família que contém 22 subtipos e classificados em 7 tipos. A interação dessas proteínas com seus receptores (FGFR) são mediadas por um proteoglicano sulfato de heparina (HSPG), formando um complexo responsável por promover toda a atividade biológica (PRESTA *et al.*, 2017). Essa ativação deve levar a proliferação, sobrevivência celular e angiogênese tumoral. O Klotho é essencial para a função do FGF23, participando do metabolismo da glicose, lipídio, fosfato e vitamina D (KHARITONENKOV *et al.*, 2009). Tanto o alfa, quanto o beta Klotho, podem participar como cofatores de FGFs, e eles não só participam de processos regulatórios do metabolismo, como também da tumorigênese (ZHOU *et al.*, 2015).

A via Wnt participa da modulação de processos que envolvem a diferenciação e proliferação na embriogênese, no ciclo celular e na progressão do tumor (CHANG *et al.*, 2012). A desregulação dessa via é prevalente em diversas neoplasias, já que ela participa

na produção de transcritos, como o c-Myc e ciclinas, a partir da correta estabilidade da  $\beta$ -catenina (PAUL *et al.*, 2008).

**Tabela 03:** Relação dos níveis de expressão do Klotho com diversas neoplasias encontradas na literatura

<b>Tipo de câncer</b>	<b>Função</b>	<b>Referência</b>
<b>Colo</b>	O klotho diminui os níveis de expressão de IGF-1R, p-P13K, p-Akt, PCNA e MMP-2.	Prasad <i>et al</i>
<b>Linfoma de Células B</b>	IGF1 induz a proliferação de células DLBCL pela inibição da superexpressão de <i>Klotho</i>	Liefers-Visser <i>et al</i>
<b>Mama</b>	<i>Klotho</i> inibe a ativação das vias de insulina/IGF e superregulação da supressão tumoral C/EBP $\beta$	Sharma <i>et al</i>
<b>Linfoma de Células T</b>	A super expressão do <i>Klotho</i> inibe alvos <i>downstream</i> da sinalização IGF1R, incluindo Akt e Erk1/2	Tang <i>et al</i>
<b>Pulmão</b>	A super expressão do <i>Klotho</i> é associada com a baixa fosforilação do IGF-1R	Zhou <i>et al</i>
<b>Prostata</b>	FGF19 pode usar o <i>KL</i> ou o <i>KLB</i> como correceptor e promover o início e progressão do câncer	Zhu <i>et al</i>
<b>Carcinoma Hepatocelular Humano</b>	A super expressão do <i>KL</i> pode reprimir vias Wnt/ $\beta$ -Catenina	Feng <i>et al</i>
<b>Melanoma</b>	<i>Klotho</i> pode levar uma supressão da expressão de Wnt5A	Chen <i>et al</i>

**Fonte:** Adaptado de Abolghasemi (2018)

Existem poucos relatos de avaliação do perfil de expressão de *KL* e nenhum relato de *KLB* em amostras de medula óssea, buscamos nesta pesquisa avaliar a expressão destes alvos moleculares em amostras de pacientes com Síndrome Mielodisplásica, a fim de correlacionar seus achados com a fisiopatologia da doença, uma patologia onco-hematológica associada ao envelhecimento.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar os níveis de expressão do mRNA dos genes *alfa* e *beta KLOTHO* 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 do mRNA dos genes *KL* e *KLB* através da utilização da metodologia de RT-qPCR;
2. Comparar os níveis de expressão do mRNA dos genes *KL* e *KLB* entre indivíduos saudáveis e portadores de SMD;
3. Associar os níveis de expressão gênica às características clínico-laboratoriais de pacientes portadores de SMD;
4. Associar os níveis de expressão gênica dos genes *KL* e *KLB* às alterações citogenéticas;
5. Associar os níveis de expressão gênica à evolução para LMA.

### **3. PACIENTES, MATERIAIS 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.

#### **3.2 Obtenção das amostras de células de medula óssea**

A partir da coleta de 8 ml de medula óssea de 61 pacientes portadores de SMD e 08 indivíduos saudáveis em tubos de vidro Vacutainer® contendo EDTA, são separados 05 ml para os procedimentos de extração de RNA total a fim de realizar os experimentos de expressão gênica e 03 ml para os procedimentos de Citogenética Clássica. Os 61 pacientes diagnosticados com SMD de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde revisado de 2016 (VARDIMAN *et al*, 2019) tiveram 02 de seus genes analisados em amostras de *pool* celular de medula óssea. Os pacientes foram atendidos em um hospital terciário de referência da Universidade Federal do Ceará no período de 2008 a 2017. A medula óssea dos pacientes e dos indivíduos saudáveis foi coletada, após eles assinarem um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os dados de expressão gênica foram então correlacionados com os dados clínico-laboratoriais e os dados citogenéticos, após revisão de prontuários.

Para o processo de separação das células dos tubos que continham o material medular, realizou-se uma centrifugação a 1811g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foram retirados o sobrenadante que continha o plasma e armazenado em microtubos para futuras pesquisas proteômicas. O material restante foi lavado com 1ml de solução de lise (25ml de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato de amônio 0,01M) e transferido para um tubo do tipo Falcon de 50mL que continha 24ml de solução de lise. É necessário deixar o tubo com o material descansando em gelo por 15 minutos para então ele ser homogeneizado e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. Logo após, o sobrenadante é descartado e o pellet lavado mais uma vez com 5ml de solução de lise. Deixar descansando o

conteúdo novamente em gelo por 10 minutos, homogeneizar o tubo e centrifugar nas especificações anteriores. Em seguida, foi desprezado o sobrenadante e acrescentado 250µL de PBS. Posteriormente, adicionou-se 750µL de Trizol LS Reagent® (Invitrogen, EUA) e homogeneizado com pipeta até a dissolução completa do pellet sendo transferido para um eppendorf de 1,5mL. Após todo o procedimento, o material foi armazenado no freezer a -80°C.

### **3.3 Cariótipo por bandeamento-G**

A técnica de citogenética foi realizada a partir dos protocolos 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 amostra de medula é colhida em tubos estéreis contendo heparina e são divididas em dois frascos contendo 8mL de meio RPMI 1640 (pH 7,0), 2 mL de soro fetal bovino e 100µL de streptomina e penicilina. O material foi cultivado por 24 horas em estufa à 37°C. Em seguida, adiciona-se 70µL de colchicina (Colcemid®) por 30 minutos. O material é então centrifugado e ressuspenso em solução hipotônica de KCl 0,075M por 20 minutos. Antes de centrifugar novamente, é adicionado 0,5mL de Carnoy (solução 3:1 de metanol e ácido acético) e homogeneizado. Após a centrifugação, o material foi lavado por até 4 vezes em solução de Carnoy até completar o volume de 10mL, ressaltando que para cada lavagem foi necessário centrifugar a amostra. Por fim, retirou-se a solução de lavagem de cada tubo até um limite proporcional a quantidade de pellet, seguido de uma homogeneização até a dissolução do pellet. Para a confecção das lâminas, o material foi gotejado em lâminas utilizadas para microscopia óptica e secadas na placa aquecedora a 45°C. Estas lâminas são depois aquecidas por 10 minutos na placa aquecedora a 85°C. O bandeamento é realizado pela técnica de tripsina e as lâminas coradas com corante Wright. Para cada paciente, são analisadas 20 metáfases e todas capturadas em sistema computadorizado com software para cariotipagem: CytoVision®. Os resultados das análises citogenéticas de medula óssea foram confirmados segundo os critérios estabelecidos pelo Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (MCGOWAN-JORDAN, 2016).

### **3.4 Análise de Expressão do mRNA por qRT-PCR**

#### **3.4.1 Extração do RNA total**

A extração de RNA das células do *pool* medular dos pacientes com SMD e dos controles saudáveis foi realizada a partir da utilização do Trizol LS Reagente® de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Em cada 1mL de Trizol LS Reagente® deve-se encontrar  $10^6$  células armazenadas, sendo assim, foram adicionados 200µL de clorofórmio para desproteíntização e 10µL de glicogênio, em seguida, foram homogeneizados em vórtex e centrifugados a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado de cada amostra e transferido para novos tubos, seguidos de precipitação com 400µL de isopropanol e incubados por 60 minutos a -20°C. Após esse período, foi realizada outra centrifugação com as mesmas especificações, porém pelo dobro do tempo (30 minutos), o sobrenadante foi depois descartado por inversão e, após o pellet ter secado, ele foi diluído em água livre de RNase.

Por fim, para a quantificação das amostras, realizou-se leituras espectrofotométricas em Nanodrop nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm, obtendo suas correlações e concentrações adquiridas.

#### **3.4.2 Síntese de cDNA**

O experimento seguiu as recomendações do fabricante do kit para Transcrição Reversa da Applied Biosystems® (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems®). Para cada reação, foram utilizados uma quantidade otimizada de RNA total para uma concentração final de 2000 ng/µL. Para cada reação, utilizou-se de 2,0 µL de buffer, 0,8 µL de dNTP, 2,0 µL de Random Primers, 1,0 µL de Multiscribe Reverse Transcriptase™ e 1,0 µL de RNase Inhibitor. As quantidades que foram citadas tiveram que ser multiplicadas pelo número total de amostras com RNA total para a produção de um “Mix” de reação. Em seguida, 6,8 µL desse Mix foram adicionados em microtubos de 0,2 mL apropriados para PCR com o volume calculado de RNA seguindo o protocolo (Quantificação de ácidos nucleicos em Nanodrop®). Os volumes de cada microtubo foram completados com água ultrapura até o volume final padrão de 20 µL. Os tubos foram fechados e submetidos à agitação com spin por aproximadamente 10 segundos. Por fim, as amostras foram submetidas ao termociclador, onde foram realizados os seguintes ciclos: Desnaturação a 25°C por 10 minutos; Anelamento a 37°C por 120 minutos; Extensão a 85°C por 5 minutos; e Finalização a 4°C.

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

A quantificação da expressão gênica dos dois genes avaliados nesse estudo (Tabela 04) foi realizada a partir da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) realizado no aparelho *7500 Real-Time PCR System*® (*Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*). As reações foram preparadas utilizando o Kit *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*) otimizado para reações com sonda *TaqMan assay*® (Tabela 04).

**Tabela 04:** Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR

Símbolo	Nomenclatura	Ensaio Taqman
<i>KL</i>	alpha-Klotho	Hs00934627_m1
<i>KLB</i>	beta-Klotho	Hs00545621_m1

**Fonte:** Elaborado pelo autor

O armazenamento e os preparados foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, exceto pelo volume final de cada reação que foi otimizado em 5 µL. Para cada reação foram utilizados 2,5 µL de TaqMan PCR Master Mix, 0,25 µL de sonda TaqMan assay®, 1,0 µL de água ultrapura e 1,25 µL de cDNA. Na preparação das reações foram utilizadas placas de polipropileno para 96 reações (MicroAmp 96-well Plates, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) recobertas com adesivos para microplacas ópticas resistentes a álcool e a altas temperaturas (Optical Adhesive film, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). Após o preparo dos poços, as placas foram centrifugadas por 1 minuto a 4500 rpm. As condições para a PCR foram: 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. Em todas as etapas, as amostras estavam imersas no gelo com pouca exposição à luz.

Para cada amostra, foi realizada uma duplicata e foram consideradas para análise somente amostras cujas diferenças de amplificação não excederam a 0,8 ciclos ( $\Delta Cq \leq 0,8$ ) (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Não foram consideradas as duplicatas das amostras que apresentaram diferenças maiores que um ciclo e meio, mesmo após repetição do experimento. Foram realizados controles negativos (NTC) das reações para todos os genes estudados, sendo que para estas reações foram adicionados 1,25 µL de água no

lugar da amostra de cDNA. Todas as reações que mostraram amplificação para qualquer um dos controles negativos foram desconsideradas.

Além disso, foi utilizado para cada placa e por cada gene estudado uma amostra de referência (REF), também em duplicata, com o intuito de padronizar e validar todas as placas do experimento. Tal amostra de referência foi composta por cDNA originado de mRNA de um pool de duas linhagens celulares oriundas de tumores humanos disponibilizados pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FRMP/USP.

Foram utilizados três genes endógenos para confirmar a estabilidade dos níveis de expressão gênica:  $\beta$ 2-microglobulina (*B2M*), Ubiquitina C (*UBC*) e Gliceraldeído fosfato desidrogenase (*GAPDH*). Foi calculado o desvio padrão de cada endógeno com base em valores absolutos ( $C_q$  - *quantification cycle*) para a escolha do par de genes de referência mais estável. Aqueles que obtiveram o menor valor de desvio padrão foram considerados os mais estáveis. 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.

Portanto, após os cálculos realizados, os genes mais estáveis nas amostras de cDNA utilizados foram a *UBC* e o *GAPDH*. Os resultados foram analisados através do software *Sequence Detection System v1.3* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) para a obtenção dos valores de *quantitative cycle* ( $C_q$ ). Foi estabelecido um *threshold*, no qual os valores de  $C_q$  foram fornecidos pelo software do aparelho 7500 *Real-Time PCR System*® (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) para a realização das análises estatísticas. Em seguida, os dados foram exportados para planilhas do software Microsoft Excel (formato .xlsx) para os cálculos de  $\Delta C_q$  e de  $2^{-\Delta C_q}$  tanto dos genes endógenos quanto dos genes alvos (LIVAK *et al.*, 2001). A nomenclatura utilizada para os experimentos da PCR quantitativa em tempo real foi padronizada e seguida de acordo com o MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN *et al.*, 2009). Sabe-se que os valores em *outliers* frente a amostras avaliadas podem apresentar algum tipo de interferência na precisão correta das análises realizadas. Por isso, foi necessário retirar do estudo as amostras que se

distanciavam em seus desvios padrões, a fim de determinar a qualidade, integridade e estabilidade dos níveis de expressão. Diante disso, o estudo se iniciou com 86 amostras de cDNA, mantendo-se no total 69 amostras para prosseguimento das análises estatísticas.

### 3.5 Variáveis Analisadas

- ♣ Grupo: Caso e Controle;
- ♣ Sexo: Feminino e Masculino;
- ♣ Idade:  $\leq 60$  anos e  $> 60$  anos;
- ♣ Idade:  $\leq 60$  anos,  $> 60 - \leq 70$  anos,  $> 70$  anos (Classificação IPSS-R);
- ♣ Celularidade: Hipocelular, Normocelular e Hipercelular;
- ♣ Diseritropoiese: Ausência e Presença;
- ♣ Disgranulopoiese: Ausência e Presença;
- ♣ Dismegacariopoiese: Ausência e Presença;
- ♣ Faixas de porcentagem de sideroblastos em anel: 0, 1-14% e  $> 15\%$ ;
- ♣ Dependência Transfusional: Ausência e Presença [utilizando-se o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (MALCOVATI *et al.*, 2005)];
- ♣ Cariótipo: Normal e Alterado;
- ♣ 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):  $\geq 800$  por  $\text{mm}^3$  e  $< 800$  por  $\text{mm}^3$ ;
- ♣ Classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R):  $\geq 100.000$  por  $\text{mm}^3$ ,  $50.000 - < 100.000$  por  $\text{mm}^3$  e  $\leq 50.000$  por  $\text{mm}^3$ ;
- ♣ Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R: muito baixo e baixo, intermediário, alto e muito alto;
- ♣ Classificação do número de citopenias no sangue periférico: nenhuma, 1 citopenia, 2 citopenias e 3 citopenias;
- ♣ Quanto a classificação da OMS (2016): SMD-DUL (SMD com Displasia de Única Linhagem), SMD-DML (SMD com Displasia de Múltipla Linhagem), SMD-EB (SMD com Excesso de Blastos), SMD-SA (SMD com Sideroblastos em Anel);
- ♣ Cariótipo (Aneuploidia): normal, alterado não aneuplóide e alterado aneuplóide;

- ♣ Cariótipo (Alteração no cromossomo 7): normal, alterado com -7/7q e alterado sem -7/7q;
- ♣ Cariótipo (Alteração no cromossomo 5): normal, alterado com -5/5q e alterado sem -5/5q;
- ♣ Classificação do número de citopenias no sangue periférico: 0/1 citopenia e 2/3 citopenias;
- ♣ Evolução para LMA: Ausência e Presença;

### 3.6 Análises Estatísticas

Os resultados gerados pelas análises de expressão gênica foram avaliados pelos resultados de cada Cq (*quantitative cycle*) de cada amostra de cDNA (em duplicatas). Em seguida, para normalizar os valores de Cq com o objetivo de diminuir as diferenças geradas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o Cq de uma amostra foi subtraído pela média geométrica dos Cq's dos genes constitutivos utilizados (UBC e GAPDH) da mesma amostra, gerando assim os valores de  $\Delta Cq$  e, posteriormente, convertidos para  $2^{-\Delta Cq}$  (LIVAK *et al.*, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Para as variáveis maiores ou iguais a 50 casos, foi realizado o teste de Skinner's/Kurtosis com objetivo de avaliar se as amostras apresentavam distribuição normal. Com essa mesma finalidade, para as variáveis com menos de 50 casos, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Os valores de *outliers* foram retirados do estudo, porque apresentavam valores contrastantes com os demais. A partir da normalização dos casos, foram realizados testes paramétricos por meio de testes T de Student, quando se comparavam médias entre dois grupos, e o teste de ANOVA, quando se comparavam três ou mais grupos.

O pós-teste (*post-hoc*) para o ANOVA foi definido pela análise de homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Se a homogeneidade fosse confirmada (p-valor  $\geq 0,05$ ), o pós-teste utilizado foi o teste de Tukey. Se não tivesse homogeneidade (p-valor  $< 0,05$ ), o pós-teste foi o teste de Games-Howell.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização dos Pacientes

O número total de pacientes utilizados no estudo foi de 61 para o grupo SMD (Tabela 05) e 08 para o grupo controle, somando 69 indivíduos. Destes, em relação a variável gênero, o estudo compôs 34 pacientes do sexo feminino (55,7%) e 27 do sexo masculino (44,3%).

A variável idade foi categorizada em dois grupos: idade categorizada ( $\leq 60$  anos e  $>60$  anos) e idade categorizada de acordo com o IPSSR (GREENBERG *et al.*, 2012) ( $\leq 60$  anos,  $>60 - \leq 70$  anos,  $>70 - \leq 80$  anos e  $>80$  anos). Nesta variável, o primeiro grupo se concentrou em indivíduos maiores que  $>60$  anos (72,4%), em contraste ao demais que representavam 27,6%. Em relação ao segundo grupo, a distribuição foi relativamente homogênea, o de maior grupo estava relacionado à idade  $\leq 60$  anos (27,6%) e o de menor grupo,  $>60 - \leq 70$  anos (22,4%).

Em relação à variável celularidade, apenas 34 pacientes apresentavam biopsia medular. Desses, 10 pacientes apresentaram medula normocelular (29,4%) e 24 apresentaram medula hipercelular (70,6%).

Dos achados relacionados ao mielograma, 50 pacientes apresentaram dados sobre o número de suas displasias. Destes, foi observado que a maioria apresentava 1 ou 2 displasias (40% e 36%, respectivamente). Destes, observou-se um predomínio de displasias da linhagem eritróide (diseritropoiese) (74%), seguida por 19 pacientes (38%) com dismegacariopoiese e 15 pacientes (30%) com disgranulopoiese. Quanto à porcentagem de blastos, 55 pacientes tiveram resultados, dos quais a maioria apresentou  $\leq 2\%$  de blastos (74,5%). Adicionalmente, foi observado que apenas 7 pacientes (33,3%) de 21 apresentaram fibrose na medula óssea.

Em relação à variável sideroblastos em anel, apenas 55 pacientes tiveram seus dados obtidos, destes 39 não apresentavam sideroblastos (70,9%) e 16 apresentaram (29,1%), dos que apresentaram, foi observado que a maioria tinha  $>15\%$  de sideroblastos (25,5%).

Sobre os achados em relação a variável citopenia, apenas 57 pacientes tinham seus dados informados, e destes a maioria se apresentava com pelo menos 1 citopenia, para uma citopenia, 27 pacientes (47,4%); para duas, 17 (29,8%); e para três, 8 (14%). Em

relação aos achados clinico-laboratoriais, foi observado que dos 57 pacientes que tinham informações sobre a hemoglobina, os três grupos verificados ( $\geq 10$ ; 8-10 e  $< 8$  g/dL) tinham o mesmo número amostral de 19 pacientes (27,5%). De 56 pacientes, a maioria apresentava a contagem de neutrófilos (ANC)  $\geq 800/\text{mm}^3$ , confirmado em 44 pacientes (78,6%). E, por fim, em relação a contagem de plaquetas, dos 57 pacientes, 38 deles apresentavam valores acima de  $100.000/\text{mm}^3$ .

Em relação a análise citogenética dos pacientes, foi observado que dos 61 pacientes; 14 deles não apresentavam metáfase (23%), 30 deles apresentavam cariótipo normal (49,2%) e 17 apresentavam cariótipo alterado (27,9%). Dos 47 cariótipos observados, 9 apresentaram cariótipo com apenas 1 alteração (19,1%), 4 pacientes com 2 alterações (8,5%) e apenas 2 pacientes apresentaram 3 alterações ou mais (4,3%), caracterizando um cariótipo complexo.

Quanto as alterações citogenéticas mais comuns encontradas na SMD, observou-se que 6 pacientes (9,8%) apresentavam alterações no cromossomo 5 (-5/5q) e apenas 1 apresentava alteração no cromossomo 7 (-7/7q-). Além disso, 7 pacientes (11,4%) apresentavam cariótipo alterado com aneuploidia. Em relação ao prognóstico, segundo dados do IPSS-R, dos 47 que se aplicavam, 35 apresentavam prognóstico favorável (74,5%).

Foi observado também para a variável grupo de risco, que dos 42 pacientes que se aplicavam, 30 pacientes apresentavam risco baixo ou muito baixo (71,4%), 8 apresentavam risco intermediário (19%) e 4 apresentavam risco alto ou muito alto (9,5%). Quanto a evolução para LMA, foi obtido dados de 48 pacientes e 43 deles não apresentaram evolução (89,6%).

Em relação a dependência transfusional, foram levadas em considerações aqueles que eram dependentes e aqueles que não eram. Os dependentes eram compostos por 22 pacientes (43,1%) e os que não eram, 29 pacientes (56,9%), dos 51 pacientes que apresentavam esses dados de dependência.

**Tabela 05:** Descrição clínica dos pacientes com SMD que participaram do estudo.

1Paciente	Sexo	Idade	Celularidade	Cariótipo	OMS	IPSS-R	DT	Ev. LMA	Óbito
1	F	42	Normocelular	Ausência de Metáfase	SMD-SA	-	Sim	Não	Sim
2	F	84	Hiper celular	Ausência de Metáfase	SMD-SA	-	Não	Não	Sim
3	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]	SMD-DM	Risco muito alto	Sim	Não	Sim
4	M	82	Hiper celular	46,XX[20]	SMD-SA	Baixo risco	Sim	Não	Sim
5	F	46	Hiper celular	46,XX[8]	SMD-DU	Baixo risco	Sim	Não	Não
6	M	85	Normocelular	46,XY[20]	SMD-EB	Risco Intermediário	Não	Não	Sim
7	M	74	Hiper celular	46,XY[6]	SMD-SA	Baixo risco	Não	Não	Não
8	M	81	Hiper celular	46,XY[20]	-	Risco Intermediário	Não	Sim	Sim
9	F	85	-	46,XX[20]	SMD-SA	Risco Intermediário	Não	Não	Não
10	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]	SMD-EB	Risco muito alto	Sim	Não	Não
11	M	91	-	46,x-y[4]/46,XY[16]	SMD-SA	Muito baixo	Não	Não	Sim
12	F	81	-	46,X,i(x)(q10),del(17)(q22q23.3)[7]/46,XX[13]	SMD-DU	Baixo risco	Não	-	Não
13	F	84	-	46,XX,del(20)(q13.1)[7]/46,XX[16]	SMD-DU	Muito baixo	-	Não	Não
14	F	69	Normocelular	46,XX,del(5)(q12q33)[18]/46,XX[2]	SMD-DM	Baixo risco	Sim	Não	Não

15	F	41	-	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(?Q25)[7]/46,XX[4]	SMD-DM	Baixo risco	Sim	-	Sim
16	F	27	Hipercelular	46,XX,del(5)(q31q33)[7]/46,XX[18]	-	Muito baixo	-	-	Sim
17	F	51	Hipercelular	46,XX[11]	SMD-SA	Muito baixo	Não	Não	Não
18	F	73	Hipercelular	46,XX[12]	SMD-SA	Baixo risco	Não	Não	Não
19	F	76	-	46,XX[15]	SMD-SA	Baixo risco	Não	Não	Não
20	F	47	-	46,XX[15]	SMD-DU	Baixo risco	Sim	Não	Sim
21	F	88	-	46,XX[20]	-	-	-	-	-
22	F	87	-	46,XX[20]	SMD-EB	Risco Intermediário	Não	Não	Sim
23	F	68	Normocelular	46,XX[20]	SMD-DM	Muito baixo	Não	Não	Sim
24	F	60	-	46,XX[20]	SMD-DU	-	Sim	-	Não
25	F	47	Normocelular	46,XX[20]	SMD-DM	Baixo risco	Não	Não	Sim
26	F	74	-	46,XX[22]	-	-	-	Não	Não
27	F	66	Hipercelular	46,XX[26]	SMD-SA	Baixo risco	Não	Não	Não
28	F	82	Hipercelular	46,XX[5]	SMD-SA	Baixo risco	Sim	-	Sim
29	F	72	Hipercelular	46,XX[6]	SMD-DU	Muito baixo	Não	Não	Não
30	F	73	Hipercelular	46,XX[7]	SMD-DM	Baixo risco	Não	Não	Sim
31	F	45	Normocelular	46,XX[7]	SMD-SA	Muito baixo	Não	-	Não
32	M	45	Normocelular	46,XY,-?10,+mar[5]/46,XY[1]	SMD-DM	Risco Intermediário	Sim	Não	Sim

33	M	70	Hipercelular	46,XY,add(17)(p13)[8]/46,XY,del(9)(q15),add(17)(p13)[10]/46,XY[2]	SMD-EB	Risco muito alto	Sim	Sim	Não
34	M	92	-	46,XY,del(5)(q32)[13]/46,XY[17]	SMD-SA	Baixo risco	Não	Não	Não
35	M	83	Hipercelular	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[2]/46,XY[18]	-	Risco Intermediário	Sim	Não	Não
36	M	74	Normocelular	46,XY[11]	SMD-EB	Alto risco	Sim	Não	Sim
37	M	55	-	46,XY[15}	SMD-DM	Muito baixo	Não	Não	Não
38	M	73	Hipercelular	46,XY[18]/47,XY,+20[5]	SMD-DU	Baixo risco	Não	Não	Não
39	M	78	-	46,XY[20]	SMD-SA	-	Não	Não	Não
40	M	73	-	46,XY[20]	SMD-SA	Baixo risco	Não	-	Não
41	M	31	-	46,XY[24]	SMD-DM	Baixo risco	Não	Não	Não
42	M	43	Hipercelular	46,XY[5]	SMD-DM	Baixo risco	Sim	Não	Sim
43	M	87	Normocelular	46,XY[6]	SMD-DU	Risco Intermediário	Não	Não	Não
44	F	65	-	46,XY[9]	T-SMD	-	Não	Não	Não
45	M	69	Hipercelular	46XY[10]	SMD-DM	Muito baixo	-	-	Sim
46	F	76	Hipercelular	47,XX,+22[4]/46,XX[16]	SMD-DM	Baixo risco	Não	Não	Sim
47	F	81	Hipercelular	47,XX,t(4;11)(q27;q32),+mar[4]/46,XX[16]	SMD-DM	Baixo risco	Não	Não	Não
48	M	62	Hipercelular	47,XY,+15[10]/46,XY[10]	SMD-SA	Risco Intermediário	Sim	Não	Não

49	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].	SMD-DM	Baixo risco	Sim	Sim	Sim
50	F	70	Hiper celular	Ausência de metáfase	SMD-SA	-	Sim	Não	Não
51	M	68	Hiper celular	Ausência de metáfase	SMD-EB	-	Sim	Sim	Sim
52	F	59	-	Ausência de Metáfase	SMD-DM	-	Sim	Sim	Não
53	F	88	-	Ausência de Metáfase	-	-	-	-	-
54	F	88	-	Ausência de Metáfase	-	-	-	-	-
55	M	82	-	Ausência de Metáfase	SMD-DM	-	Não	Não	Sim
56	M	79	-	Ausência de Metáfase	SMD-EB	-	Sim	-	Sim
57	F	77	-	Ausência de Metáfase	SMD-EB	-	Sim	Não	Sim
58	F	65	-	Ausência de Metáfase	T-MDS	-	-	Não	Não
59	M	62	Hiper celular	Ausência de Metáfase	SMD-DM	-	-	Não	Não
60	M	56	Normocelular	-	-	-	-	-	Sim
61	F	44	-	-	SMD-DM	-	Não	Não	Não

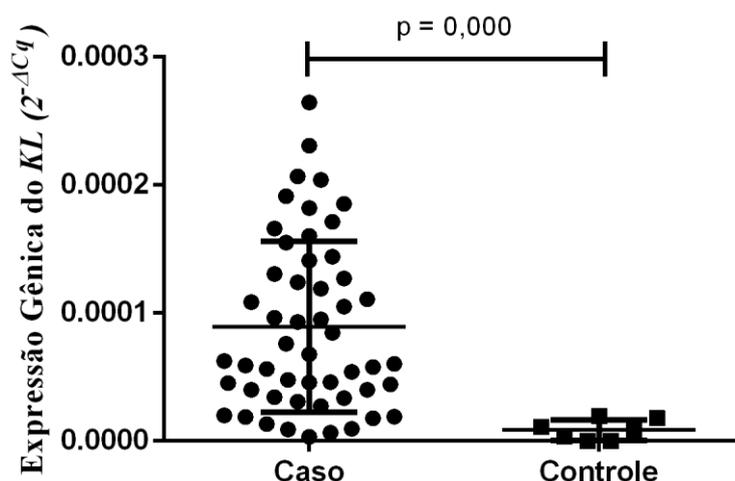
## 4.2 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

### 4.2.1 Expressão gênica do *KL* e *KLB* em pacientes com SMD e controles saudáveis

Em relação aos níveis de expressão gênica dos pacientes com SMD e indivíduos saudáveis, foi verificado que todos os pacientes com SMD apresentaram aumento no nível de expressão do gene *KL* ( $p=0,000$ ) quando comparados aos controles saudáveis (Figura 04).

Além disso, verificou-se que em 8 pacientes com SMD, o *KLB* foi expresso. Entretanto, não foi identificadas associações significativas entre os níveis de expressão do gene *KLB* dos indivíduos com grupo SMD e grupos controles ( $p=0,532$ ).

**Figura 04:** Níveis de expressão do gene *KL* em pacientes com SMD e controles.



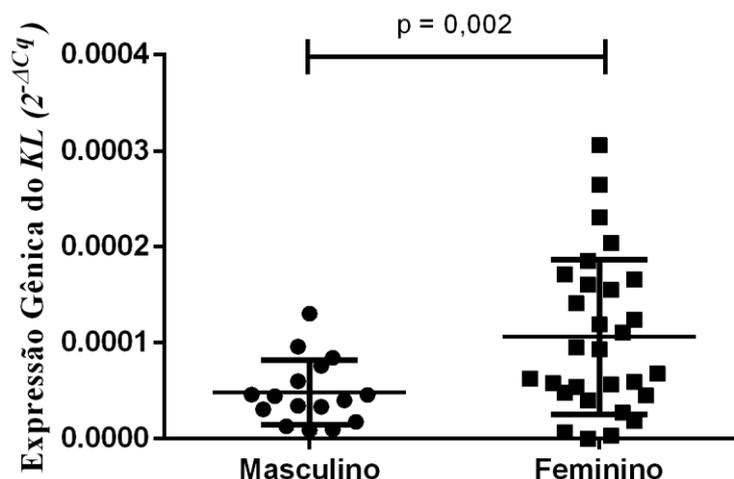
Gene <i>kl</i>	Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>KL</i> $2^{-\Delta Cq}$ )					
Grupo	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor
SMD	,0000893665	,00006669778	,00006123530	,00010022634	,000	,000
Controle	,0000086357	,00000803908				

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

#### 4.2.2 Expressão gênica do *KL* e *KLB* em relação a variável sexo

Em relação a variável sexo, foi verificado um aumento na expressão do *KL* nos indivíduos de sexo feminino ( $p=0,002$ ) (Figura 05). O gene *KLB* não apresentou dados significativos para a realização de análises.

**Figura 05:** Nível de expressão do *KL* em relação a variável sexo



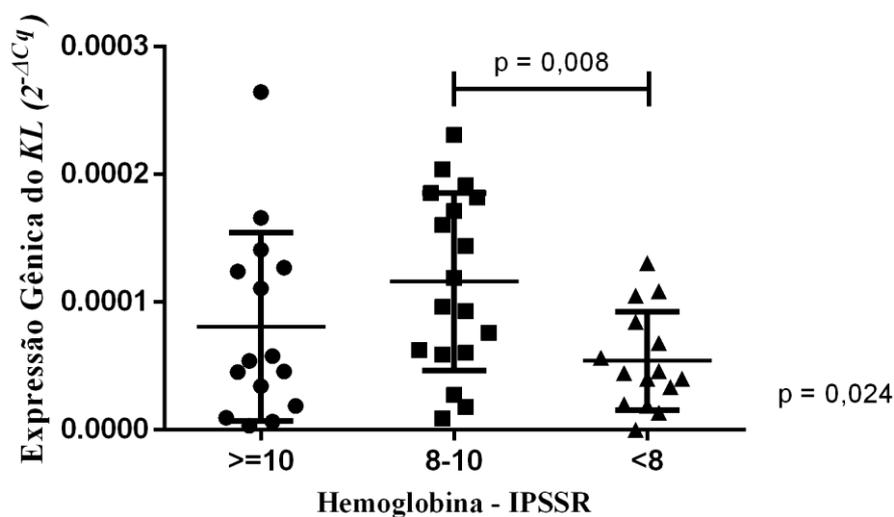
Gene <i>kl</i>	Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>KL</i> $2^{-\Delta Cq}$ )					
Grupo	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor
Feminino	,0001060283	,00008057803	,00002295225	,00009243306	,001	,002
Masculino	,0000483356	,00003394583				

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

#### 4.2.3 Expressão gênica do *KL* e *KLB* em relação às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD

##### 4.2.3.1 Achados de sangue periférico

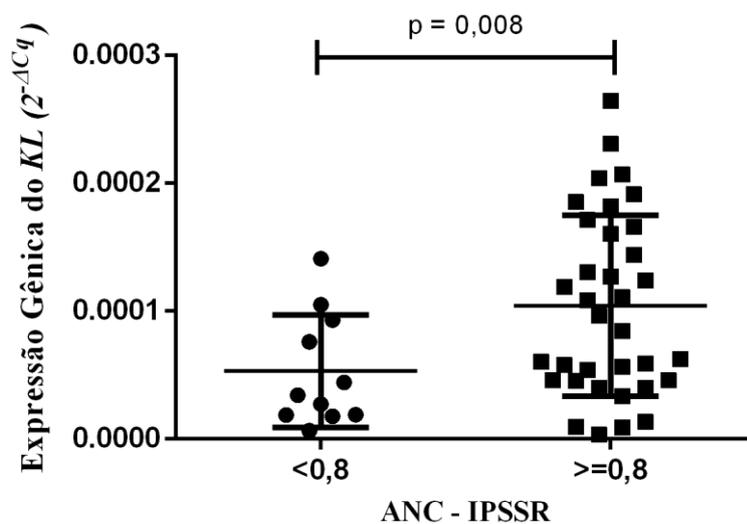
Para a variável hemoglobina, foi realizado a estratificação segundo o IPSS-R e percebeu-se um aumento moderado nos níveis de expressão nos pacientes que apresentavam níveis de hemoglobina entre 8-10g/dL quando comparados aqueles que tinham  $<8\text{g/dL}$  ( $p=0,008$ ) (Figura 06).

**Figura 06:** Níveis de expressão do *KL* em relação a variável hemoglobina IPSS-R

Gene <i>kl</i>	Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>KL</i> $2^{-\Delta Cq}$ )						
Hemoglobina (IPSSR)	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova	Teste de Levene	Games-Howell
<8g/dL	,0000540007	,00003826576	,0000328098	,0000751915	,024	,016	0,008
8-10g/dL	,0001161539	,00006956945	,0000815578	,0001507500			0,008
≥10g/dL	,0000806980	,00007365264	,0000399105	,0001214855			-

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

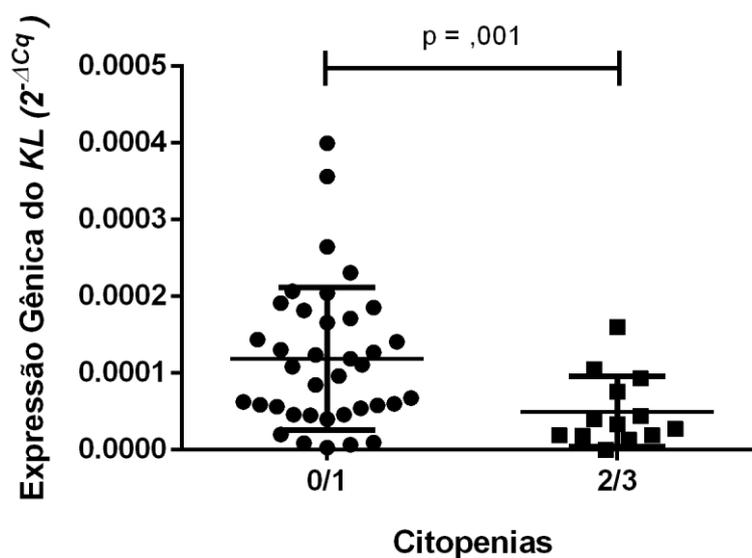
Para a variável de contagem de neutrófilos (ANC), foi observado um aumento dos níveis de expressão naqueles que apresentavam valores  $\geq 800/\text{mm}^3$  em relação aqueles que apresentavam valores menores que  $800/\text{mm}^3$  ( $p=0,030$ ) (Figura 07).

**Figura 07:** Níveis de expressão da variável ANC

Gene <i>kl</i>	Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>KL</i> 2 <sup>-ΔCq</sup> )					
ANC	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor
≥0,8	,0001041697	,00007082404	-,00008771877	-,00001438429	,044	,008
<0,8	,0000531182	,00004407193				

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

Para a variável citopenias periféricas, optou-se por estratificar o grupo em 0-1 citopenias e 2-3 citopenias. Foi observado um aumento de expressão no grupo que apresentava de 0-1 citopenias ( $p=0,001$ ) (Figura 08).

**Figura 08:** Níveis de expressão da variável Citopenias

Gene <i>kl</i>	Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>KL</i> $2^{-\Delta Cq}$ )					
Citopenia	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor
0/1	,0001186689	,00009318775	,00002847160	,00010898316	,039	,001
2/3	,0000499415	,00004607803				

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

Não foram verificadas associações significativas na variável de Plaquetas, estratificadas segundo o IPSSR ( $p > 0,05$ ). O gene *KLB* não apresentou dados significativos para a realização de análises.

#### 4.2.3.2 Achados Medulares

Em relação aos achados medulares, não foi encontrado significância nas variáveis: Celularidade, Displasias, Diseritropoiese, Disgranulopoiese, Dismegacariopoiese e Sideroblastos em anel ( $p > 0,05$ ). O gene *KLB* não apresentou dados significativos para a realização de análises.

#### 4.2.3.3 Achados Citogenéticos

As variáveis desses achados: cariótipo (normal ou alterado), número de alterações, aneuploidia, alterações envolvendo o cromossomo 5 (-5/5q-) e alterações envolvendo o cromossomo 7 (-7/7q-); não apresentaram significância ( $p > 0,05$ ). O gene *KLB* não apresentou dados significativos para a realização de análises.

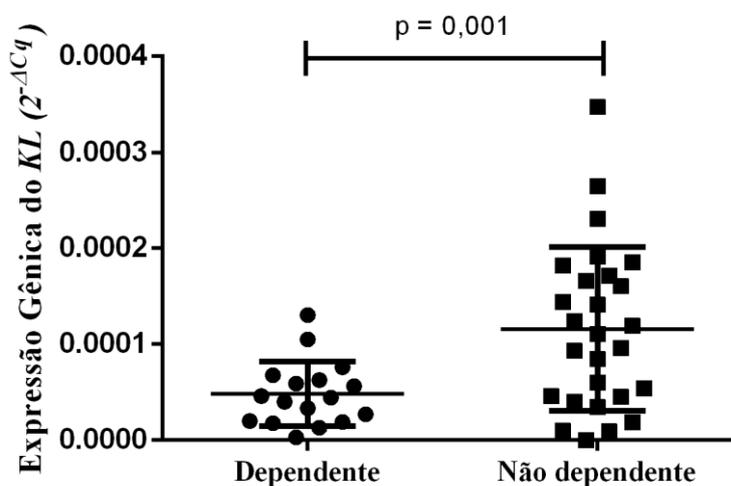
#### 4.3 Expressão gênica do *KL* e *KLB* na classificação clínica e estratificação prognóstica dos pacientes com SMD.

Não encontramos associações em relação a classificação da WHO 2016 e no IPSSR, demonstrando ausência de significância ( $p > 0,05$ ). O gene *KLB* não apresentou dados significativos para a realização de análises.

#### 4.4 Expressão gênica do *KL* e *KLB* em pacientes com dependência transfusional.

De acordo com os dados obtidos dos pacientes que relacionados a dependência transfusional, foi verificado aumento de expressão nos pacientes não dependentes quando relacionados aqueles que são dependentes ( $p = 0,001$ ) (Figura 09).

**Figura 09:** Níveis de expressão da variável Dependência Transfusional



Gene <i>kl</i>	Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>KL 2</i> <sup>-ΔCq</sup> )					
	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor
Dependências Transfusional						
Dependentes	,0001186689	,00009318775	,00002847160	,00010898316	,039	,001
Não dependentes	,0000499415	,00004607803				

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

#### 4.5 Expressão gênica do *KL* e *KLB* em relação a evolução para LMA

Não foi encontrado nenhuma associação significativa dos pacientes em relação a evolução para LMA ( $p > 0,05$ ). O gene *KLB* não apresentou dados significativos para a realização de análises.

#### 4.6 Expressão gênica do *KLB*

A expressão do *KLB* se manteve sem nenhuma associação significativa frente às variáveis analisadas. Entretanto, foi verificado que o gene se expressou em apenas 8 pacientes dos 61 e 2 controles.

Diante das variáveis clínico-laboratoriais, foi percebido que a maioria desses pacientes se encontrava na classificação de risco, segundo o IPSS-R, nos níveis de baixo risco (3 pacientes de 8) e intermediário (2 pacientes de 8), totalizando 5 pacientes (62,5%). Esses pacientes apresentavam em comum cariótipo normal e prognóstico favorável.

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram feitas análises de expressão de dois genes ( $\alpha$ -klotho e  $\beta$ -klotho), que estão ligados a processos carcinogênicos e de senescência celular, em 61 pacientes que apresentavam Síndrome Mielodisplásica correlacionando com diversas variáveis clínico-laboratoriais. Vale ressaltar que o estudo em questão é completamente inédito, sem nenhuma demonstração prévia que relacione os genes selecionados com a doença estudada.

Em estudos encontrados na literatura, foi demonstrado que em indivíduos saudáveis, a expressão dos níveis de Klotho na medula óssea era extremamente baixa, sendo dita como uma expressão apenas basal (OLAUSON *et al.*, 2017). Em contraste com esses estudos, foi observado que a medula óssea de indivíduos portadores de síndrome mielodisplásica apresentava um aumento nos níveis de expressão do gene  $\alpha$ -klotho, o que corrobora com alguns achados que relacionam os níveis alterados de expressão desse gene com o desequilíbrio do processo hematopoiético, tanto nas etapas de diferenciação quanto de maturação (MADATHIL *et al.*, 2013). Além disso, sabe-se que esses processos são atenuados devido ao envelhecimento, característica encontrada na maioria dos pacientes com SMD (DE HAAN; LAZARE, 2018).

Em relação a variável sexo, foi observado um aumento de expressão nos pacientes do sexo feminino, seguindo com o encontrado na literatura, em que os níveis de  $\alpha$ -klotho tendem a ser maiores em mulheres do que em homens (BEHRINGER *et al.*, 2018), entretanto, o estudo não conseguiu encontrar associações que possam explicar com os achados. Além disso, os pacientes do sexo feminino com SMD apresentam melhor prognóstico do que os pacientes masculinos.

A síndrome mielodisplásica é caracterizada por ser uma doença que apresenta ineficiência no processo hematopoiético. Esse processo é gerado por uma intensa proliferação celular na medula óssea, porém acompanhada de um excesso de apoptose, o que gera uma desregulação no processo de diferenciação das células tronco em células maduras, em sua fase inicial. A partir daí, temos o surgimento de diversas citopenias.

Durante as análises, foi observado que os pacientes de SMD que apresentavam nenhuma citopenia ou apenas uma citopenia em qualquer linhagem celular tinham os seus níveis de expressão maiores do que nos pacientes que apresentavam duas ou três citopenias. Outros resultados também corroboraram com esses achados, como a variável

ANC que se mostrou mais expressa em pacientes que apresentavam seus níveis favoráveis ( $> 800/\text{mm}^3$ ) e os níveis de hemoglobina que estavam mais expressos nos pacientes com anemia leve (8-10 g/dL) quando comparados aos que apresentavam anemia severa ( $< 8$  g/dL).

O processo de eritropoiese é um mecanismo intimamente ligado entre os rins e o microambiente medular, a partir da produção de Epo (Eritropoetina), um hormônio secretado pelo córtex-renal e que age na medula óssea nos progenitores eritróides. Em respostas a quadros de anemia, a produção de Epo é aumentada com o objetivo de aumentar a produção de eritrócitos. Alguns estudos já demonstraram que o Epo pode induzir na expressão de Klotho (SUGIURA *et al.*, 2010) por meio da ativação de vias de sinalização HIF (Fator induzível por hipóxia), o que corrobora com os achados em relação a anemia leve em sobreposição a anemia severa.

Uma meta-análise realizada por MAO *et al.*, mostrou que a expressão do nível de Klotho está associada ao baixo risco e baixa progressão de diversas neoplasias (MAO *et al.*, 2018). O estudo também demonstrou que os altos níveis de Klotho estavam associados com bons prognósticos, o que confirma com os resultados encontrados no estudo aqui demonstrado. O Klotho participa de maneira fundamental na manutenção da homeostase celular. Este gene participa de processos importantes contra inflamação, estresses oxidativos e transição mesenquimal-epitelial (TME) (HAN *et al.*, 2018), conhecido por ser um processo em que células neoplásicas passam por um processo de conversão de seus fenótipos para invadir, migrar e gerar metástases em tecidos e órgãos distantes.

A anemia é uma das maiores prevalências encontradas nos pacientes com SMD (em torno de 90%), diante disso, muitos deles precisam se submeter a suportes transfusionais. O critério utilizado para a indicação de tratamento baseado na dependência transfusional é a dosagem de hemoglobina, e foi percebido que a maioria dos pacientes estudados apresentavam hemoglobina acima de 8 g/dL, faixa considerada o limite entre os dependentes e os não. Foi observado também que naqueles que não era dependentes, a expressão de Klotho foi maior, corroborando com os achados de bom prognóstico para pacientes com SMD.

O gene  $\beta$ -klotho não demonstrou nenhuma expressão significativa entre as variáveis selecionadas no estudo, porém dos 8 pacientes que expressaram esse gene, 5 deles (62,5%) apresentavam displasias na linhagem eritróide, sugerindo uma resposta

compensatória do microambiente medular em um bloqueio por expansão clonal do desenvolvimento hematopoiético, principalmente nas linhagens eritróide.

Sabe-se que há diversos marcadores moleculares associados à patogênese da SMD, como por exemplo, mutações no gene do Splicing SF3B1, definidor da SMD com sideroblastos em ANEL (ARBER, 2016). Neste contexto, concluí-se que a expressão do gene *KL* é importante para a compreensão da fisiopatologia da SMD, especialmente quando se verifica a sua alta expressão em variáveis clínicas de bom prognóstico, podendo considerá-la como um biomarcador de compensação da doença. Estudos futuros e complementares (por exemplo a nível de ensaios funcionais, modelos murinos e sequenciamento genômico) são necessários para confirmar esta hipótese.

## 6. CONCLUSÃO

Conclui-se que os genes apresentaram dados inéditos dos seus níveis de expressão em indivíduos portadores de Síndrome Mielodisplásica. Além disso, foi demonstrado que eles podem estar associados como biomarcadores de bom prognóstico, abrindo grandes oportunidades para estudos mais complexos e com grande potencial terapêutico.

- I. Foi encontrado aumento nos níveis de expressão do *KL* em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica;
- II. Em pacientes femininos, os níveis de expressão do *KL* eram mais altos;
- III. Nos pacientes com uma ou nenhuma citopenia tinham níveis de expressão maiores;
- IV. As variáveis hemoglobina e ANC, seguindo a classificação proposta pelo IPSS-R, tiveram níveis de *KL* maiores em pacientes com anemia leve e não neutropênicos;
- V. Os pacientes que não tinham dependência transfusional demonstraram possuírem maiores níveis de expressão de *kl*;
- VI. O *KLB* não demonstrou associações significativas nos pacientes com SMD.

## REFERÊNCIAS

- ADAM MOSER, KEVIN RANGE, AND D. M. Y. NIH Public Access. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.
- ABOLGHASEMI, M. et al. The interplay of Klotho with signaling pathway and microRNAs in cancers. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 9, p. 14306–14317, 2019.
- AMARO-GAHETE, F. J. *et al.* Role of Exercise on S-Klotho Protein Regulation: A Systematic Review. **Current Aging Science**, v. 11, n. 2, p. 100–107, 2018.
- ARBER, D. A. WHO Classification 2016. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 2016.
- ARKING, D. E. *et al.* Association of human aging with a functional variant of klotho. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 2, p. 856–861, 2002.
- AUL, C.; GATTERMANN, N.; SCHNEIDER, W. Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes. **British Journal of Haematology**, v. 82, n. 2, p. 358–367, 1992.
- BEHRINGER, V. *et al.* Aging and sex affect soluble alpha klotho levels in bonobos and chimpanzees. **Frontiers in Zoology**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2018.
- BELLI, C. B. *et al.* Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 10, p. 851–858, 2015.
- BERNASCONI, P. *et al.* Validation of the new comprehensive cytogenetic scoring system (NCCSS) on 630 consecutive de novo MDS patients from a single institution. **American Journal of Hematology**, v. 88, n. 2, p. 120–129, 2013.
- BIAN, A. *et al.* Klotho, stem cells, and aging. **Clinical Interventions in Aging**, v. 10, p. 1233–1243, 2015.
- BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CAZZOLA, M.; DELLA PORTA, M. G.; MALCOVATI, L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. **Blood**, v. 122, n. 25, p. 4021–4034, 2013.
- CHAMSEDDINE, A. N. *et al.* Unraveling Myelodysplastic Syndromes: Current Knowledge and Future Directions. **Current Oncology Reports**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2016.
- COGLE, C. R. Incidence and Burden of the Myelodysplastic Syndromes. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 10, n. 3, p. 272–281, 2015.

CORRÊA DE SOUZA, D. *et al.* Cytogenetic as an important tool for diagnosis and prognosis for patients with hypocellular primary myelodysplastic syndrome. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

DE HAAN, G.; LAZARE, S. S. Aging of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 131, n. 5, p. 479–487, 2018.

DELFORGE, M. Understanding the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. **Hematology Journal**, v. 4, n. 5, p. 303–309, 2003.

DU, Y. *et al.* Smoking and alcohol intake as risk factors for myelodysplastic syndromes (MDS). **Leukemia Research**, v. 34, n. 1, p. 1–5, 2010.

EDITOR, C.; TEFFERI, A.; GARCIA-MANERO, G. CME Information: Annual Clinical Updates 2015: Myelodysplastic Syndromes Instructions on Receiving Credit. v. 90, n. 9, p. 831–841, 2015.

ERUM, J. VAN; DAM, D. VAN; DEYN, P. P. DE. Journal P of. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, p. 100632, 2019.

FENAUX, P. Myelodysplastic syndromes: From pathogenesis and prognosis to treatment. **Seminars in Hematology**, v. 41, n. 2 SUPPL. 4, p. 6–12, 2004.

GIAGOUNIDIS, A.; HAASE, D. Morphology, cytogenetics and classification of MDS. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, v. 26, n. 4, p. 337–353, 2013.

HAN, S. T. *et al.* The mechanism of attenuation of epithelial-mesenchymal transition by a phosphodiesterase 5 inhibitor via renal klotho expression. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 45, n. 3, p. 269–277, 2018.

HARRISON, J. F. *et al.* Notch Signaling Modulates the Activation of Microglial Cells. **Glia**, v. 55, n. 14, p. 1416–1425, 2007.

HASLE, H. *et al.* A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. **Leukemia**, v. 17, n. 2, p. 277–282, 2003.

HASSERJIAN, R. P. Myelodysplastic Syndrome Updated. **Pathobiology**, v. 86, n. 1, p. 53–61, 2019.

IRONS, R. D.; KERZIC, P. J. Cytogenetics in benzene-associated myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: New insights into a disease continuum. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1310, n. 1, p. 84–88, 2014.

ITO, S. *et al.* Molecular cloning and expression analyses of mouse  $\beta$ klotho, which encodes a novel Klotho family protein. **Mechanisms of Development**, v. 98, n. 1–2, p. 115–119, 2000.

KHARITONENKOV, A. *et al.* FGF-21 as a novel metabolic regulator. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 6, p. 1627–1635, 2005.

KIM, J.-H. *et al.* Biological Role of Anti-aging Protein Klotho. **Journal of Lifestyle Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 2015.

KOH, N. *et al.* Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, n. 4, p. 1015–1020, 2001.

KURO-O, M. *et al.* Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. **Nature**, v. 390, n. 6655, p. 45–51, 1997.

KUROSU, H. *et al.* Tissue-specific expression of  $\beta$ klotho and Fibroblast Growth Factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 37, p. 26687–26695, 2007.

LEE, E. J. *et al.* The evolving field of prognostication and risk stratification in MDS: Recent developments and future directions. **Blood Reviews**, v. 30, n. 1, p. 1–10, 2016.

LI, S. A. *et al.* Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. **Cell Structure and Function**, v. 29, n. 4, p. 91–99, 2004.

LIGUMSKY, H. *et al.* **Tumor suppressor activity of klotho in breast cancer is revealed by structure-function analysis.** [s.l: s.n.]. v. 13

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOJKIN, I. *et al.* Reduced expression and growth inhibitory activity of the aging suppressor klotho in epithelial ovarian cancer. **Cancer Letters**, v. 362, n. 2, p. 149–157, 2015.

LÓPEZ-OTÍN, C. *et al.* The Hallmarks of Aging Longevity. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 2013.

MA, X. *et al.* Obesity, lifestyle factors, and risk of myelodysplastic syndromes in a large US cohort. **American Journal of Epidemiology**, v. 169, n. 12, p. 1492–1499, 2009.

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. *et al.* Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: A basis for clinical decision making. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 30, p. 7594–7603, 2005.

MALYSHEVA, G. V. Predicting the endurance of adhesive joints. **Polymer Science - Series D**, v. 7, n. 2, p. 145–147, 2014.

MAO, S. *et al.* Association between klotho expression and malignancies risk and progression: A meta-analysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 484, n. March, p. 14–20, 2018.

MATSUMURA, Y. *et al.* Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 242, n. 3, p. 626–630, 1998.

MAYNADIÉ, M. *et al.* Epidemiological characteristics of myelodysplastic syndrome in a well-defined French population. **British Journal of Cancer**, v. 74, n. 2, p. 288–290, 1996.

MCKERRELL, T.; VASSILIOU, G. S. Europe PMC Funders Group Ageing as a driver of leukemogenesis. **Sci Transl Med.**, v. 7, n. 306, p. 1–7, 2016.

MITOBE, M. *et al.* Oxidative stress decreases klotho expression in a mouse kidney cell line. **Nephron - Experimental Nephrology**, v. 101, n. 2, p. 67–74, 2005.

NGUYEN, P. L.; HASSERJIAN, R. P. Myelodysplastic Syndromes. **Hematopathology: A Volume in the Series: Foundations in Diagnostic Pathology**, p. 539- 563.e2, 2017.

NIEMEYER, C. M.; BAUMANN, I. Myelodysplastic Syndrome in Children and Adolescents. **Seminars in Hematology**, v. 45, n. 1, p. 60–70, 2008.

OLAUSON, H. *et al.* Tissue expression and source of circulating  $\alpha$ Klotho. **Bone**, v. 100, n. 2016, p. 19–35, 2017.

PAPAEMMANUIL, E. *et al.* Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 122, n. 22, p. 3616–3627, 2013.

PEDERSEN, L. *et al.* Soluble serum Klotho levels in healthy subjects. Comparison of two different immunoassays. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 1079–1083, 2013.

PERAZZIO, A. DOS S. B.; CHAUFFAILLE, M. DE L. L. F. When karyotype is decisive for myelodysplastic syndromes diagnosis. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, n. x x, p. 10–12, 2019.

PINHEIRO, R. F.; CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 11, p. 1110–1112, 2009.

RAAIJMAKERS, M. H. G. P. Aging of the Hematopoietic Stem Cell Niche: An Unnerving Matter. **Cell Stem Cell**, v. 25, n. 3, p. 301–303, 2019.

RÅDLUND, A. *et al.* Incidence of myelodysplastic syndromes in a Swedish population. **European Journal of Haematology**, v. 54, n. 3, p. 153–156, 1995.

RAFAEL BEJAR, M.D., PH.D., KRISTEN STEVENSON, M.S., OMAR ABDEL-WAHAB, M.D., N. G. *et al.* Clinical effect of myelodysplastic syndromes. **N Eng J Med**, v. 144, n. 5, p. 724–732, 2011.

RUBIN, H. Cell aging in vivo and in vitro. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 98, n. 1, p. 1–35, 1997.

RUBINEK, T.; WOLF, I. **The Role of Alpha-Klotho as a Universal Tumor Suppressor**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 101.

SANZ-DE PEDRO, M. *et al.* Myelodysplastic Syndromes: Laboratory Workup in the Context of New Concepts and Classification Criteria. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 13, n. 6, p. 467–476, 2018.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SEKERES, M. A. The epidemiology of myelodysplastic syndromes. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 24, n. 2, p. 287–294, 2010.

SUGIURA, H. *et al.* Recombinant human erythropoietin mitigates reductions in renal klotho expression. **American Journal of Nephrology**, v. 32, n. 2, p. 137–144, 2010.

USSELMAN, C. W. N. S. S. J. R. B. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

VADAKKE MADATHIL, S. *et al.* Klotho deficiency disrupts hematopoietic stem cell development and erythropoiesis. **American Journal of Pathology**, v. 184, n. 3, p. 827–841, 2014.

WEINBERG, O. K.; HASSERJIAN, R. P. The current approach to the diagnosis of myelodysplastic syndromes☆. **Seminars in Hematology**, v. 56, n. 1, p. 15–21, 2019.

WÓJCIK-KROWIRANDA, K.; SZCZEPANIEC, S.; BIENKIEWICZ, A. The role of the  $\beta$ Klotho gene in uterine endometrial cancer. **Ginekologia Polska**, v. 89, n. 10, p. 563–567, 2018.

XUAN, N. T. *et al.* Regulation of dendritic cell function by insulin/IGF-1/PI3K/Akt signaling through klotho expression. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 37, n. 3, p. 297–303, 2017.

ZAHID, M. F. *et al.* Cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes: An overview. **International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research**, v. 11, n. 3, p. 232–240, 2017.

ZEIDAN, A. M. *et al.* Epidemiology of myelodysplastic syndromes: Why characterizing the beast is a prerequisite to taming it. **Blood Reviews**, v. 34, p. 1–15, 2019.

ZHOU, X.; WANG, X. Klotho: a novel biomarker for cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 141, n. 6, p. 961–969, 2015.

**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: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES ALFA E BETA *KLOTHO* 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 Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro / João Victor Alves Cordeiro. O abaixo assinado está ciente de que:

**NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO**

O objetivo da pesquisa é estudar o material genético de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica gerando dados que favoreçam a uma melhor compreensão do surgimento, evolução clínica desta doença e à pesquisa de novas moléculas antineoplásicas (nanoencapsuladas ou não) a serem empregadas em modelos *in vitro*.

**PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES**

A amostra biológica utilizada na presente pesquisa corresponde a medula óssea do indivíduo, que corresponde a um tecido líquido-gelatinoso que ocupa o interior dos ossos, sendo conhecida popularmente por 'tutano'. Na medula óssea são produzidos os

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

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

Serão coletadas somente 5mL de amostra de medula óssea com o uso de uma agulha específica para aspiração da medula óssea. Todo o procedimento de coleta da medula óssea é realizado mediante administração de anestésico local com duração máxima de 15 minutos. Após o procedimento, serão coletados dados pessoais de sexo e idade.

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

A recoleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise.

## **RISCOS DO PROCEDIMENTO**

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

Em caso de dores mais fortes, entrar em contato com os responsáveis pela pesquisa pelo telefone (85) 989291827.

## **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA**

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

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo, do não cumprimento das normas estabelecidas, de qualquer outro motivo que, a critério do pesquisador, 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.

## **BENEFÍCIOS DA PESQUISA**

A presente pesquisa traz como benefício o fato de que estudos que avaliem o perfil de expressão gênica, proteica, metilação, cultura de células, análise do efeito do estresse oxidativo com o objetivo principal de desenvolvimento de novos fármacos para essa doença.

## **DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO**

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

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

## **CONTATOS E PERGUNTAS**

Caso surja algum imprevisto ou dúvidas, você deverá entrar em contato solicitar contato direto com o pesquisador responsável pelo estudo: **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (85 – 981881972)** ou com o aluno de Graduação **João Victor Alves Cordeiro (85 – 988239984)**.

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

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

**ASSINATURAS**

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

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

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

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Data**

\_\_\_\_\_

**Assinatura do participante da pesquisa**

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Data**

\_\_\_\_\_

**Assinatura do Pesquisador Responsável**

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Data**

\_\_\_\_\_

**Assinatura do Responsável pela aplicação do TCLE**

## ANEXO: RESUMO SUBMETIDO PARA O AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY (ASH)

### ***Klotho* Expression Predicts Poor Prognosis in Myelodysplastic Syndrome**

Howard Lopes Ribeiro Junior, PhD<sup>1\*</sup>, João Victor Alves Cordeiro, Student<sup>1\*</sup>, Roberta Taiane Germano Oliveira, M.Sc.<sup>1\*</sup>, **Silvia Maria Meira Magalhães, MD, PhD<sup>1</sup>** and Ronald F Pinheiro, MD<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Cancer Cytogenomics Laboratory, Drug Research and Development Center, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil; <sup>2</sup>Department of Medicine, Columbia University Medical Center, New York, NY

**Introduction:** An important explanation for the occurrence of Myelodysplastic syndrome (MDS) in the elderly is related to hematopoietic stem-cell (HSC) senescence. Recent studies have identified aging-related alterations in mesenchymal stromal cells in MDS. During the aging process, the different HSC subtypes lose the ability to differentiate into lymphoid and myeloid precursor cells, causing a breakdown in the immune system balance. This process exposes HSC to important genotoxic factors and may induce genetic or epigenetic alterations because exposure to these factors increases the risk of hematological malignancies. A new biomarker for cancer is *Klotho* ( $\alpha$  and  $\beta$  subtypes), which has been identified as an anti-aging gene that extended the lifespan in murine models when it was overexpressed. Several studies have demonstrated that  $\alpha$ *Klotho* (KL) deficiency causes development of aging features, including increased proliferation, reduction in tumor cell apoptosis, and disruption of HSC development.

Some studies have established an association between low expression of *KL* and risks of cancer (i.e. lymphoma) by inducing cell apoptosis, inhibiting tumor growth, and causing a decrease in insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) activation. In parallel to these studies, a recent study reported that *KL* downregulation was associated with the occurrence of anemia, the main clinical feature of MDS, in cancer patients. However, the expression profile of *KL* and  $\beta$ *Klotho* (*KLB*) genes in the bone marrow (BM) of healthy patients with different ages and the way in which the genes modulate the pathogenesis of MDS in the elderly are unknown.

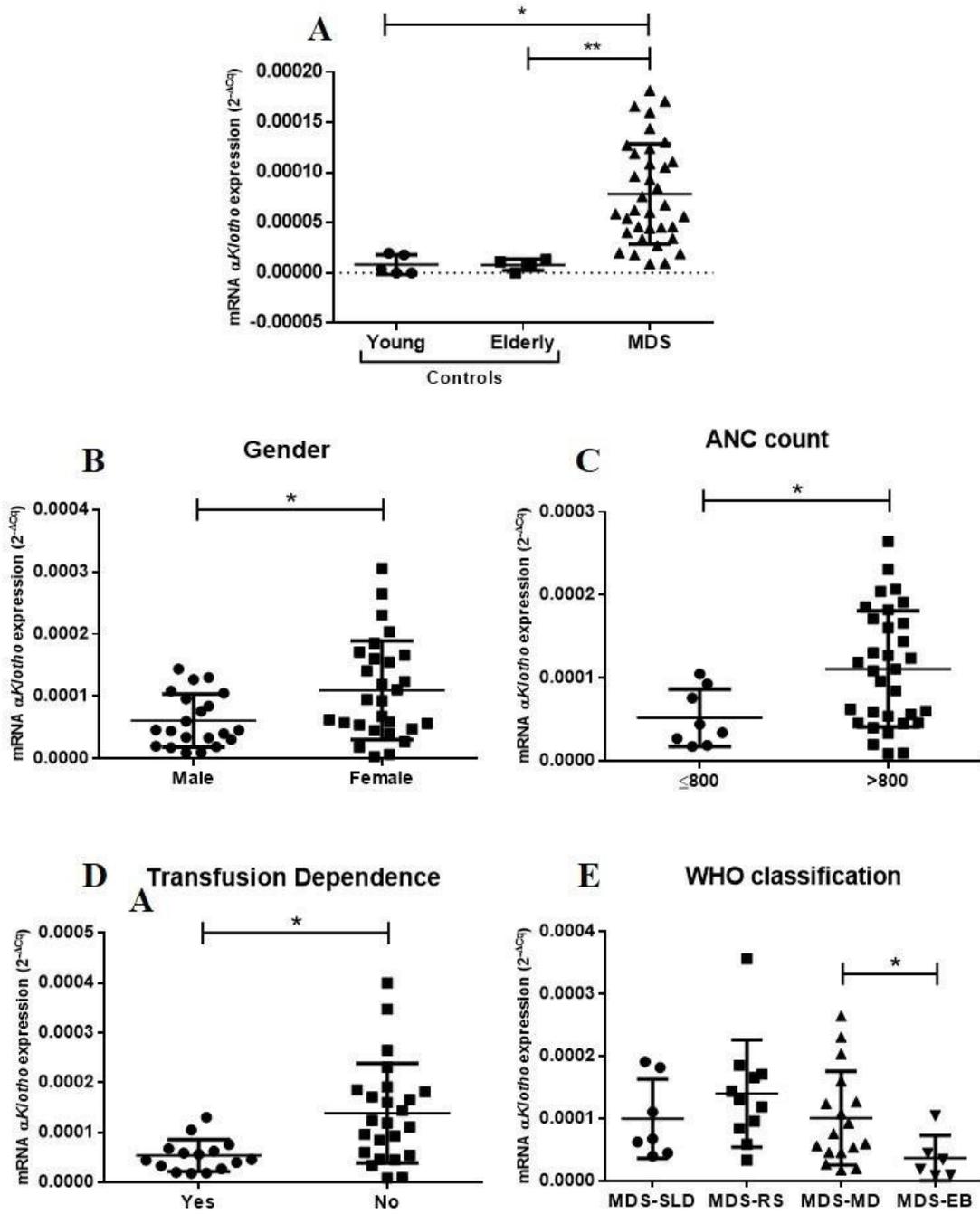
**Methods:** Total BM cell samples from 62 *de novo* MDS patients with a mean age of 66  $\pm$  16 years old (10 MDS with single lineage dysplasia, 14 MDS with ring sideroblasts, 27 MDS with multilineage dysplasia, and 11 MDS with excess blasts based on World Health

Organization's (WHO) 2016 classification) and from eleven healthy volunteer individuals were collected with informed consents. Healthy patients were stratified into young (n=6; mean  $25 \pm 6$  years old) and elderly (n=5; mean  $64 \pm 9$  years old) individuals. Pre-developed TaqMan gene expression assays for *KL* (Hs00934627\_m1) and *KLB* (Hs00545621\_m1) were used to quantify mRNA expression. Each sample was performed in duplicate, and the expression ratios were calculated using the  $2^{-\Delta Cq}$  method.

**Results:** Our results demonstrate that the *KL* gene was expressed in the BM samples from all experimental groups. High *KL* expression was identified in MDS patients when compared to young ( $p < 0.001$ ) and elderly ( $p < 0.001$ ) controls (Figure 1A). In MDS, *KL* was downregulated in male patients ( $p=0.042$ ) (Figure 1B), neutropenic MDS cases ( $p=0.003$ ) (Figure 1C), MDS patients with transfusion dependence ( $p=0.001$ ) (Figure 1D), and MDS with an excess of blasts ( $p=0.038$ ) (Figure 1D), representing more aggressive diseases. A multiple regression was performed in order to predict *KL* expression from gender, absolute neutrophil count (ANC), transfusion dependence, and WHO 2016 classification. These variables significantly predicted *KL* expression ( $F [4, 27] = 3.396$ ;  $p=0.023$ ;  $r^2=0.335$ ). Transfusion dependence ( $p=0.027$ ) and WHO 2016 classification ( $p=0.049$ ) variables significantly added to the prediction. The *KLB* gene was only expressed in a total of 8/62 MDS patients. The feature that stood out in these patients was the presence of dyserythropoiesis (62.5%). No control sample expressed the *KLB* gene.

**Conclusions:** Our results demonstrated an important expression profile of *KL* and *KLB* in BM of healthy young and old individuals and/or in MDS patients for the first time in contrast to a previous study in which it was demonstrated that human BM induces a negligible expression of these genes. Based on absence of differences between controls, our data showed that *KL* expression not was associated with the MDS pathogenesis-related senescence process, but its lower expression contributed to the poor prognostic MDS features, probably due to its high potential for affecting HSC number, function, and erythropoiesis. Additionally, low *KLB* expression in MDS patients with dyserythropoiesis suggests a compensatory response of the bone marrow environment to hematopoietic development block via clonal expansion, especially in the erythroid lineage. These approaches may define *KL* and *KLB* as new pathological markers of poor prognosis in MDS and improve future potential therapies.

**Figure 1:** Expression patterns of *KL* gene in MDS patients.



---

**Abstract ID#:**

124232

**Password:**

822583

**Title:**

*Klotho* Expression Predicts Poor Prognosis in Myelodysplastic Syndrome

**Submitter's E-mail Address:**

howard@ufc.br

**Preferred Presentation Format:**

Poster

**Withdraw if Poster:**

N

**Do you want your abstract published online-only on the Blood Abstracts Web site if it is NOT accepted for presentation:**

Yes