



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VANESSA SILVA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE *PD-L1* EM PACIENTES
PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

FORTALEZA

2021

VANESSA SILVA DE OLIVEIRA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *PD-L1* EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA.

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Cristiana Libardi Miranda Furtado

Co-orientadora: Msc. Roberta Taiane Germano de Oliveira

FORTALEZA

2021

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)

O52a Oliveira, Vanessa Silva de.
Avaliação dos níveis de expressão do gene PD-L1 em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica /
Vanessa Silva de Oliveira. – 2021.
58 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado.

1. Síndrome Mielodisplásica. 2. Checkpoint imunológico. 3. PD-L1. I. Título.

CDD 570

VANESSA SILVA DE OLIVEIRA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *PD-L1* EM PACIENTES PORTADORES DE
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA.

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: _31 / _08 / _2021_.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Msc. Daniela de Paula Borges
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

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)

O52a Oliveira, Vanessa Silva de.
Avaliação dos níveis de expressão do gene PD-L1 em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica /
Vanessa Silva de Oliveira. – 2021.
58 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado.

1. Síndrome Mielodisplásica. 2. Checkpoint imunológico. 3. PD-L1. I. Título.

CDD 570

A Deus.

Às minhas avós, Maria e Raimunda.

Aos meus pais e ao meu irmão.

A todos que fizeram parte da minha trajetória
até este momento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por jamais ter me abandonado e ter sido o meu conforto em todos os momentos.

Aos meus pais e ao meu irmão, por todo apoio, carinho, compreensão e incentivo. Vocês reconheceram meu potencial e me ensinaram a não desistir e a lutar pelos meus sonhos. Eu os amo profundamente e minha gratidão é infinita. Recebam o muito obrigada de uma filha e irmã que sempre foi determinada a deixá-los orgulhosos. Esse é só o primeiro passo.

Ao meu companheiro, Rodrigo, que mesmo nas horas mais difíceis foi o meu porto seguro. Você, com sua doçura e paciência sem dúvidas foi essencial para a conclusão desta etapa, que na verdade é só o início de uma longa trajetória. Obrigada por sempre se fazer presente, trazendo leveza, respeito e amor aos meus dias.

Aos meus queridos integrantes do Bionajas: Ramon, Teresa, Ana Beatriz, Rayane, Mateus, João Paulo, Marcos, Diego e Rivando. Nesses 5 anos o acolhimento de vocês foi necessário e transformador. Vocês foram meu refúgio da rotina exaustiva, e, mesmo sem saber, por muitas vezes me mantiveram de pé. Cada um com sua história e particularidades me traz um exemplo de vida. Sou grata por cada dia ao lado de vocês!

Aos meus queridos amigos Alana, João Victor e Rebeka. Vocês me ensinaram que é importante saber conciliar o acadêmico e o afetivo, e me ensinaram que competência e descontração não são coisas opostas. Obrigada por todos os momentos felizes e por todas as conversas profundas que cada um me proporcionou nesses últimos anos. Vocês trazem calor e alegria para a minha vida e eu sou extremamente grata por isso.

À Mayara e Sharlene, por serem o exemplo profissional que desejo ser um dia. Em vocês encontrei grandes mentoras, mas não só isso, em vocês encontrei um grande carinho. Eu sou grata por todo o aprendizado e amizade.

À Professora Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado e à Msc Roberta Taiane Germano de Oliveira por toda a orientação. Vocês são excelentes biólogas e eu tenho extrema admiração por vocês. Obrigada por aceitar o desafio de me orientar nesses meses, onde vocês foram extremamente queridas durante todo esse período.

Aos professores participantes da banca examinadora Ronald Feitosa Pinheiro e Daniela Paula Borges de pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões. Professor Ronald, em você vejo um exemplo profissional, e sou extremamente grata por me aceitar nessa jornada científica, na qual o senhor compartilha conosco sua paixão pela sabedoria. Dani, em você vejo um exemplo a ser seguido, além de uma grande pesquisadora, é uma mulher incrível e uma grande professora.

Aos meus amigos ICs, Camilla, Thayres, Letícia, Mateus, Ligiane, Leandro, Amanda e João Vitor (que não é IC, mas insiste em ser). Obrigada por todo companheirismo durante esses anos de rotina no laboratório. Sem a amizade e a parceria de vocês este seria um processo muito mais árduo. Cada um tem um lugarzinho no meu coração!

Ao João Victor e à Gabrielle, que tão calorosamente me acolheram nos meus primeiros dias no laboratório. Vocês são inspirações para mim. Muito obrigada!

Ao Breno Kelvin, que foi minha companhia em muitos momentos dessa trajetória e que me ajudou a levar a vida com leveza. Obrigada pelas risadas, conversas e momentos compartilhados, meu amigo!

A todos os membros do laboratório de citogenômica do câncer. Lara, Gustavo, Manu, Cristiane, Izabelle e Marília.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas, por todo o ensinamento para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa iniciação científica.

"A ignorância gera mais confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência."
(Charles Darwin)

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.” (Isaac Newton)

RESUMO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é composta por um grupo de doenças clonais hematopoiéticas que apresenta grande heterogeneidade, sendo caracterizada por defeitos em células progenitoras hematopoiéticas e por desregulação imune e epigenética. Seus portadores possuem manifestações clínicas e patológicas como anemia, citopenias e displasias. O *checkpoint* imunológico atua na regulação de resposta do sistema imunológico impedindo ataques do sistema imune a um tecido próprio. No entanto, alguns cânceres conseguem utilizar este mecanismo para contornar o sistema imunológico, em um processo de evasão imune. O objetivo deste estudo é analisar a expressão gene *PD-L1*, que faz parte do *checkpoint* imunológico e está envolvido no processo de evasão imune, em pacientes portadores de SMD, associando os achados com alterações citogenéticas, variáveis clínicas e laboratoriais de impacto prognóstico. Amostras foram obtidas a partir da medula óssea de 67 pacientes com SMD e quatro controles. Para análise da expressão gênica e citogenética foram realizadas as técnicas de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) e o exame de cariótipo de medula óssea com cultura de curta duração por Banda-G. Os pacientes com SMD com idade superior a 80 anos apresentaram expressão diminuída do gene *PD-L1* em comparação com idade igual ou inferior a 60 anos ($p=0.005$) e aqueles que possuíam idade entre 60 e 70 anos ($p=0.044$). Além disso, na presente coorte, o gene *PD-L1* foi mais expresso em indivíduos com duas alterações citogenéticas, quando comparado com uma alteração citogenética ($p=0,004$), e em pacientes cariótipo normal em relação a uma alteração citogenética ($p=0,003$). Os achados no presente estudo vão contra à tendência encontrada na literatura, no entanto, *PD-L1* se mostra importante para SMD em função de sua atuação no processo de evasão imune.

Palavras-chave: Síndrome Mielodisplásica. *Checkpoint* imunológico. PD-L1.

ABSTRACT

Myelodysplastic Syndrome (MDS) is composed of a group of clonal hematopoietic diseases that present great heterogeneity, being characterized by defects in hematopoietic progenitor cells and by immune and epigenetic dysregulation. Its carriers have clinical and pathological manifestations such as anemia, cytopenias and dysplasia. The immune checkpoint acts in the regulation of the immune system's response, preventing the immune system from attacking its own tissue. However, some cancers are able to use this mechanism to bypass the immune system, in a process of immune evasion. The aim of this study is to analyze the PD-L1 gene expression, which is part of the immunological checkpoint and is involved in the immune evasion process in patients with MDS, associating the findings with cytogenetic alterations, clinical and laboratory variables of prognostic impact. Samples were obtained from the bone marrow of 67 MDS patients and four controls. For analysis of gene expression and cytogenetics, real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) and bone marrow karyotype examination with short-term G-Band culture were performed. Patients with MDS aged over 80 years had decreased expression of the PD-L1 gene compared to those aged 60 years or less ($p=0.005$) and those aged between 60 and 70 years ($p=0.044$). In addition, in this cohort, the PD-L1 gene was more expressed in individuals with two cytogenetic alterations, when compared to a cytogenetic alteration ($p=0.004$), and in normal karyotype patients compared to a cytogenetic alteration ($p=0.003$). The findings in this study go against the trend found in the literature, however, PD-L1 is important for MDS due to its role in the immune evasion process.

Keywords: Myelodysplastic Syndrome. Immune checkpoint. PD-L1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação da estratificação da variável cariótipo no IPSS-R.....	20
Figura 2:	Variáveis estabelecidas pelo IPSS-R.....	21
Figura 3:	Esquematização do Ponto de Checagem imunológico.....	22
Figura 4:	Representação esquemática da análise Citogenética, desde a coleta até a cariotipagem.....	28
Figura 5:	Nível de expressão gênica do PD-L1 na variável idade.....	42
Figura 6:	Nível de expressão gênica do PD-L1 na variável Número de Alterações no Cariótipo.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alterações recorrentes em portadores de Síndrome Mielodisplásica.....	16
Tabela 2: Classificação atualizada de Síndrome Mielodisplásica, proposta pela OMS em 2016.....	19
Tabela 3: Variáveis clínicas dos pacientes determinadas pelas frequências.....	33
Tabela 4: Classificação da população do estudo de acordo com OMS (2016) e Formas de SMD.....	34
Tabela 5: Frequência das variáveis clínicas dos pacientes.....	35
Tabela 6: Tabela 6- Descrição clínica dos pacientes com SMD do presente estudo.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANC:	Contagem Absoluta de Neutrófilos
ATM:	Ataxia Telangiectasia Mutada
AURKA:	Aurora Kinase A
AURKB:	Aurora Kinase B
B2M:	Beta-2-microglobulina
BRCA1:	Breast cancer type 1
BRCA2:	Breast cancer type 1
CDC20:	Cell division cycle protein 20 homolog
CSA:	Cockayne syndrome A
CSB:	Cockayne syndrome B
CTLA-4:	Antígeno 4 de linfócito T citotóxico
ERVs:	Retrovírus endógenos
Hb:	Hemoglobina
IFN γ :	interferon- γ
IL-8:	Interleucina-8
IPSS-R:	Sistema Internacional de Classificação de Prognóstico Revisado
KT:	Cariótipo
LIG4:	DNA Ligase 4
MAD2:	: Mitotic arrest deficient 2
MIQE:	<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i>
NF-kB:	nuclear factor kappa B
PCNA:	Antígeno nuclear de proliferação celular
PD-1:	proteína de morte celular programada 1
POLH:	DNA polymerase eta
POLI:	Sistema Integrado de Bibliotecas
POLK:	DNA polymerase kappa
POLL:	DNA polymerase lambda

POLN:	DNA polymerase nu
POLQ:	DNA polymerase theta
REV1:	DNA directed polymerase
REV3L	DNA directed polymerase zeta catalytic subunit
SDM-EB2:	SMD com Excesso de Blastos
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SMD	Síndrome Mielodisplásica (SMD)
SMD -i:	SMD inclassificável
SMD- DM:	SMD com Displasia em Múltiplas Linhagens
SMD- SA-DM:	SMD com Sideroblastos em anel com Displasia em Múltiplas Linhagens
SMD-DU:	SMD com Displasia em Única Linhagem
SMD-EB1:	SMD com Excesso de Blastos 1
SMD-SA- DU:	SMD com Sideroblastos em anel com Displasia em Única Linhagem
TCLE:	Termos de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF α :	fator de necrose tumoral- α
TPX2:	Targeting protein for Xklp2
UBC:	Ubiquitina
VGLL4	Vestigial Like Family Member 4
XRCC5:	X-Ray Repair Cross Complementing 5
XRCC6:	X-Ray Repair Cross Complementing 6
YAP1	Yes1 associated transcriptional regulator

SUMÁRIO

1	Introdução.....	14
1.1	Síndrome Mielodisplásica.....	14
1.1.1	<i>Aspectos gerais da Síndrome mielodisplásica.....</i>	14
1.1.2	<i>Epidemiologia.....</i>	14
1.1.3	<i>Patogênese.....</i>	15
1.1.4	<i>Citogenética e alterações moleculares da SMD.....</i>	18
1.1.5	<i>Classificação Clínica e Estratificação Prognóstica da SMD.....</i>	19
1.2	<i>Checkpoint imunológico e evasão imune no câncer</i>	21
1.2.1	<i>PD1 e seu Ligantes (PD-L1 e PD-L2).....</i>	23
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo	
	Geral.....	25
2.2	Objetivos Específicos.....	25
3	PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1	Aspectos Éticos da Pesquisa.....	26
3.2	Obtenção das amostras de células da medula óssea.....	26
3.3	Cariótipo por Bandeamento G.....	27
3.4	Análise da Expressão gênica por RT-qPCR.....	28
3.4.1	<i>Extração do RNA total.....</i>	28
3.4.2	<i>Síntese de cDNA.....</i>	29
3.4.3	<i>Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....</i>	29
3.5	Variáveis Analisadas.....	31
4	RESULTADOS.....	33
4.1	Caracterização da População.....	33
4.2	Análise de expressão gênica por RT-qPCR.....	43
4.2.1	<i>Expressão do gene PD-L1 em relação à variável idade.....</i>	43
4.2.2	<i>Expressão do gene PD-L1 em relação ao número de alterações no cariótipo.....</i>	44
5	DISCUSSÃO.....	45
6	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	APÊNDICE.....	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome Mielodisplásica

1.1.1 Aspectos gerais da Síndrome mielodisplásica

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) engloba um grupo heterogêneo de doenças hematológicas, que acarretam diversas manifestações clínicas e patológicas em seus portadores. Esta malignidade pode ser definida como doença clonal de células-tronco na qual a medula óssea não realiza hematopoiese de forma eficaz, causando citopenias e displasias em uma ou mais linhagens de células (SWERDLOW et al., 2017).

A SMD geralmente acomete idosos, com idade entre 65 e 70 anos no momento do diagnóstico (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014). Em razão da baixa nas linhagens sanguíneas, os pacientes de SMD desenvolvem anemia, e, por consequência da baixa responsividade a tratamentos de suporte, ocorre o desenvolvimento de dependência transfusional, o que causa impacto negativo na sobrevida geral, principalmente em portadores de SMD de baixo risco (GATTERMANN, 2018). Além disso, defeitos na linhagem mielóide também causam susceptibilidade a infecções, neutropenia, plaquetopenia e citogenética desfavorável (LEONE; PAGANO, 2018).

Em sua etiologia ela pode ser classificada como SMD primária (*de novo*), quando não há causa conhecida, ou secundária quando seu desenvolvimento acontece em decorrência de terapias (quimioterapia ou radioterapia). Embora a SMD primária não possua causa conhecida, estudos atribuem determinados fatores de risco ao desenvolvimento de SMD, sendo estes: a idade, onde a predominância é em idosos, o sexo, no qual o masculino é mais afetado, estilo de vida, onde obesidade e hábitos como tabagismo são significativos, além das exposições ambientais e ocupacionais (benzeno, solventes, tintas de cabelo, radiação e pesticidas) (MA et al., 2009; BOWEN, 2013).

1.1.2 Classificação Clínica e Estratificação Prognóstica da SMD

A Organização Mundial da Saúde (OMS) apontou a SMD como sendo uma das cinco principais categorias de neoplasias mielóides. Em sua última atualização para cânceres hematológicos (ocorrida em 2016), a OMS promoveu uma reorganização na classificação da Síndrome Mielodisplásica, levando em conta a quantidade de blastos e citopenias em sangue

periférico, além de alterações morfológicas, como displasias e presença de sideroblastos em anel nas células da medula óssea, de forma que esta passou a possuir dez subtipos (ARBER et al., 2016) (Tabela 2).

Tabela 2- Classificação atualizada de Síndrome Mielodisplásica, proposta pela OMS em 2016.

SUBTIPO	SANGUE PERIFÉRICO	MEDULA ÓSSEA
SMD com Displasia em Única Linhagem (SMD-DU)	≤1% de Blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 linhagem; 5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
SMD com Displasia em Múltiplas Linhagens (SMD-DM)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; 5% de Sideroblastos em anel*; ≤5% de blastos
SMD com Sideroblastos em Anel (SMD-SA)		
SMD-SA com Displasia em Única Linhagem (SMD-SA-DU)	≤1% de Blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 linhagem; ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
SMD-SA com Displasia em Múltiplas Linhagens (SMD-SA-DM)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
SMD com Excesso de Blastos (SMD-EB)		
SMD com Excesso de Blastos 1 (SMD-EB1)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 2 a 4% de blastos	Displasia em 0,1, 2 ou 3 linhagens; 5 a 9% de blastos
SMD com Excesso de Blastos 2 (SMD-EB2)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 5 a 19% de blastos	Displasia em 0,1, 2 ou 3 linhagens; 10 a 19% de blastos
SMD inclassificável (SMD-i)		
SMD-i com 1% de blastos	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% ¹ de blastos	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% de blastos
SMD-i com displasia em única linhagem e pancitopenia	Citopenia em 3 linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 1 linhagem; ≤5% de blastos
SMD-i baseada em alterações citogenéticas	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Ausência de displasias; ≤15% de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
SMD com del(5q) isolada	≤1% de Blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% de blastos; del(5q) isolada ou com 1 alteração adicional,

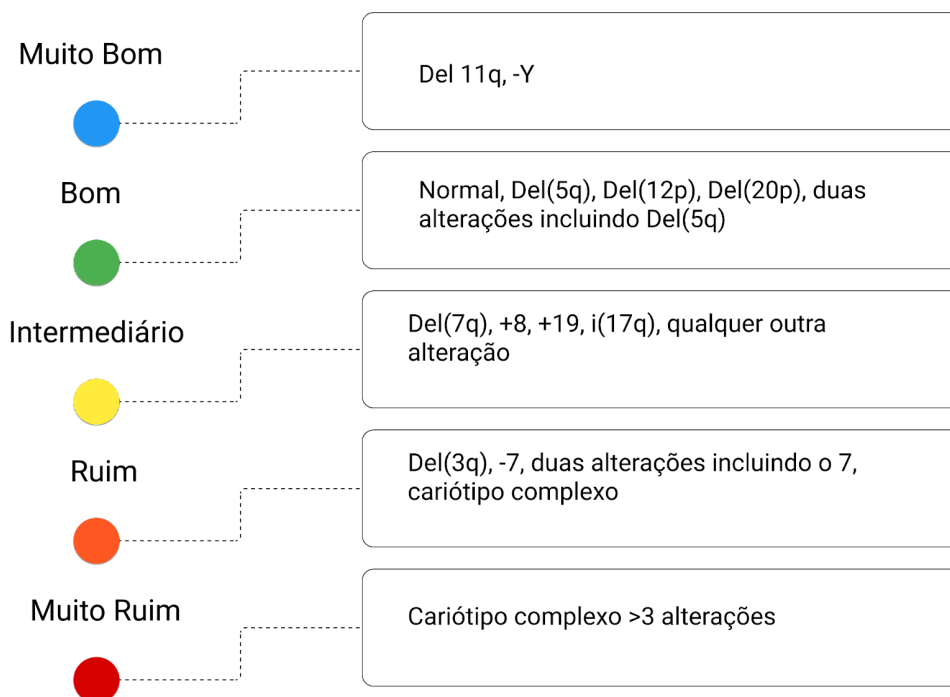
exceto del(7q)/-7

*Quando há presença de mutação do gene SF3B1 ; 1% de blastos deve ser encontrado em pelo menos duas situações isoladas.

Fonte: Adaptado de Arber et al (2016).

Um outro sistema de classificação foi desenvolvido por Greenberg e colaboradores em 1997, o qual foi revisado em 2012. O mais recente (Sistema Internacional de Classificação de Prognóstico Revisado - IPSS-R), baseia-se em escores prognósticos a partir de pacientes com SMD primária e possui o objetivo de determinar a predição de prognóstico desta doença clonal, levando em conta características clínicas -Hemoglobina (Hb), Contagem Absoluta de Neutrófilos (ANC) e Contagem de plaquetas-, além de características morfológicas e citogenéticas para determinar a estratificação do risco e a sobrevida dos portadores de SMD (GREENBERG et al., 2012) (Figuras 1 e 2).

Figura 1- Representação da estratificação da variável cariótipo no IPSS-R



Fonte: Adaptado de GREENBERG et al., (2012)

Figura 2- Variáveis estabelecidas pelo IPSS-R.

Variáveis	Valor dos escores						
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Blastos na MO	≤2%	-	>2%-<5%	-	5-10%	≥10	-
Cariótipo	Muito bom	-	Bom	-	Intermediário	Ruim	Muito Ruim
Hemoglobina	≥10	-	8-10	<8	-	-	-
Plaquetas (mm3)	≥100	50-100	<50	-	-	-	-
Neutrófilos (mm3)	≥0.8	<0.8	-	-	-	-	-

	Valor dos escores				
	Muito Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Muito Alto
	≤1.5	>1.5 - 3	>3 - 4.5	>4.5 - 6	>6
Sobrevida	8.8	5.3	3	1.6	0.5
Média de tempo de Evolução para LMA, 25%, ano	-	10.8	3.2	1.4	0.73

Fonte: Adaptado de GREENBERG et al., (2012)

1.1.3 Epidemiologia

As causas de SMD são conhecidas em apenas 15% dos casos, além disso, tem-se conhecimento de predisposição hereditária em apenas um terço dos casos pediátricos, incluindo em crianças com síndrome de Down, anemia de Fanconi e neurofibromatose. (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014)).

De acordo com o SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results), em um levantamento dos anos de 2007 e 2011 a taxa de incidência global de SMD era de 4,9 casos por 100.000 habitantes (COGLE, 2015). No entanto, dados mais recentes estimam que a incidência de SMD é de cerca de 3,5 a 12,6 novos casos a cada 100.000 indivíduos por ano, com sua prevalência aumentando de acordo com a idade, podendo, portanto, esse número atingir 50 casos após os 70 anos (GADJI; POZZO, 2019). No Japão, dados epidemiológicos mostram que no Japão a média de idade dos portadores de SMD é de 76 anos, no momento do

diagnóstico, onde a taxa de incidência de SMD foi de 3,8 casos por 100.000 para homens e 2,4 casos por 100.000 para mulheres no ano de 2008 (CHIHARA et al., 2014).

No Brasil, um estudo conduzido por Magalhães et al. (2010) utilizando 476 pacientes de SMD das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste, no período de 01 de janeiro de 2003 a 31 de dezembro de 2007, mostrou que a idade mediana no momento do diagnóstico era de 68,3 anos. A maioria dos pacientes do estudo possuía SMD primária e IPSS de baixo risco e o subtipo predominante foi citopenia refratária com displasia multilinhagem (CRDM) (40,6%) pela classificação da OMS (MAGALHÃES et al., 2010).

Um estudo mais recente, atualizou o perfil epidemiológico de SMD na América do Sul, de forma que neste foram avaliados um total de 1.080 pacientes, sendo destes 635 argentinos, 345 brasileiros e 100 chilenos. Na avaliação dos pacientes brasileiros, houve predomínio de indivíduos do sexo masculino (193/345), com média de idade de 65±17 anos e uma prevalência maior de casos de CRDM (105/345) (BELLI, 2015).

1.1.4 Citogenética e alterações moleculares da SMD

A citogenética apresenta uma grande importância na classificação, no diagnóstico e no prognóstico da Síndrome Mielodisplásica. Aproximadamente 40-60% dos casos de SMD primária e mais de 80% dos casos de SMD secundária apresentam alterações cromossômicas, as quais podem ser identificadas por técnicas de citogenética (PERAZZIO; CHAUFFAILLE, 2019).

Em portadores de SMD frequentemente são encontradas alterações não balanceadas. Dentre anormalidades cromossômica encontradas em Síndrome Mielodisplásica estão [-7/7 q-, 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), t (6; 9), além da presença de cariótipo complexo (HOSONO, 2019; PERAZZIO; CHAUFFAILLE, 2019).

As alterações cromossômicas atuam no curso clínico da SMD, de forma a promover perda de homeostase genética, contribuindo para a transformação leucêmica. Nesse contexto, destaca-se o importante papel desta técnica para a definição do prognóstico dos pacientes, além de sua contribuição na descoberta de genes atuantes na patogênese da doença (CAZZOLA et al., 2013; SOUZA et al., 2014; GARCIA-MANERO, 2015; CHAUFFAILLE, 2019).

1.1.3 Patogênese

A Síndrome Mielodisplásica é uma doença onde alterações são induzidas por complexas combinações de mutações genéticas (COREY et al., 2007). Mutações em genes relacionados aos processos de *Splicing*, metilação, modificação de histonas, transcrição de DNA e/ou transdução de sinal estão associadas a fenótipos celulares e subtipos desta doença clonal. Atualmente sabe-se que estas modificações podem ter impacto prognóstico, além de desencadear novas mutações em diferentes genes (SHALLIS; AHMAD; ZEIDAN, 2018). Mutações somáticas recorrentes em Síndrome Mielodisplásica podem ser vistas na Tabela 1.

Um modelo para a teoria de eventos associados à patogênese de SMD foi proposto por Chamseddine et al. (2016), onde ocorrem as seguintes etapas: (1) Danos epigenéticos e ao DNA, desenvolvidos após exposição prolongada a inflamações, a agentes genotóxicos, ou devido a disfunção telomérica; (2) ativação da sinalização imune inata, com posterior secreção desequilibrada de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que interagem com checkpoints celulares; (3) ativação dos checkpoints de dano autônomos com a interrupção do ciclo celular, causando indução de apoptose, na SMD de baixo risco; (4) secreção desequilibrada de citocinas estimuladoras e inibitórias, e o aumento da expressão de TNF- α e Fas na superfície das células-tronco hematopoéticas de longo prazo (LT-HSCs), aumentando sua apoptose; (5) Na SMD de alto risco, ocorre a resistência aos checkpoints de dano ao DNA e apoptose, elevando o risco de adquirir mutações genéticas/epigenéticas adicionais, as quais culminarão em expansão clonal seletiva. Como consequência dessas alterações, ocorre seleção positiva de clones neoplásicos, trazendo consigo chances aumentadas de progressão para LMA (CHAMSEDDINE et al., 2016).

Tabela 1 - Alterações recorrentes em portadores de Síndrome Mielodisplásica

Função/Gene mutado	Incidência	Impacto prognóstico	Fenótipo e outras associações
Splicing de RNA			
<i>SF3B1</i>	20% -28%	↑ SG, ↑ SLL, ↑ SLE	Prediz SMD-SA e SMD-DM, forte associação com a presença de sideroblastos em anel, associado a mutações DNMT3A
<i>SRSF2</i>	12%	↓ SG, ↑ TL	Prediz o fenótipo Leucemia Mielomonocítica Crônica; associado às mutações RUNX1, TET2 e IDH1; associado à superexpressão de RUNX1

<i>U2AF1</i>	7% -8%	↓ SG	Associado com ASXL1 e IDH2 mutações
<i>ZRSR2</i>	3%	Desconhecido	Associado a mutações TET2
Metilação de DNA			
<i>TET2</i>	22%	Desconhecido	Encontrado em 60% do leucemia mielomonocítica crônica, prevê resposta ao DNMTi
<i>DNMT3A</i>	8%	↓ SG, ↑ TL	Associado a mutações IDH2
<i>IDH1 / IDH2</i>	5%	Desconhecido	Associado com DNMT3A , ASXL1, e SRSF2 mutações
Modificações de histona			
<i>ASXL1</i>	11% -14%	↓ SG	Associado à mutação U2AF1
<i>EZH2</i>	6%	↓ SG	
Transcrição de DNA / transdução de sinal			
<i>TP53</i>	8% -13%	↓ SG	Associado a maior porcentagem de mieloblastos da medula, doença de maior risco e cariótipo complexo; raramente associado a mutações em spliceossomos
<i>RUNX1</i>	5% -9%	↓ SG	Associado a maior porcentagem de mieloblasto da medula, fortemente associado a mutações SRSF2
<i>NRAS</i>	4% -6%	↓ SG, ↑ TL	Associado a maior porcentagem de mieloblasto da medula
<i>SETBP1</i>	3% -9%	↓ OS, ↑ LT	Associado a mutações del (7q) e ASXL1
<i>JAK2</i>	3% -5%	Desconhecido	Detectado em 50% dos casos de síndrome mielodisplásica / neoplasia mieloproliferativa com sideroblastos em anel e trombocitose
<i>ETV6</i>	3% -4%	↓ SG	
Coesão da cromátide			
<i>STAG2</i>	7%	↓ SG	Raramente identificado como um clone fundador

SG= Sobrevida Geral; TL= Transformação Leucêmica; SLL= Sobrevivência Livre de Leucemia; SLE= Sobrevivência Livre de Eventos; DNMTi= inibidores da DNA metiltransferase; del (7q)= deleção do braço longo do cromossomo 7; SMD-SA= Síndrome Mielodisplásica com Sideroblastos em Anel; SMD-DM= Síndrome Mielodisplásica com Displasia em Múltiplas Linhagens

Fonte: Adaptado de Shallis, 2018.

Dando destaque a esforços do nosso grupo na elucidação de mecanismos envolvidos na patogênese de Síndrome Mielodisplásica, podemos mencionar tanto genes atuantes no reparo de DNA, quanto genes e proteínas do ciclo celular como sendo importantes

não só para o desenvolvimento, como também para a evolução da doença. Nesse contexto, nosso destaca-se importantes achados de Cavalcante e colaboradores (2020), os quais sugerem que desequilíbrios na metilação de DNA podem influenciar no desenvolvimento de anormalidades cromossômicas, podendo estas, ainda estar associada à baixa expressão de DNA polimerases com atividade translesão, que tratam-se de enzimas capazes de contornar lesões na fita molde de DNA (CAVALCANTE et al., 2020).

Além disso, Oliveira e colaboradores (2020) estudando a polimerase com atividade translesão (REV3L) em SMD, demonstrou a mutação c.9253-6T > C *REV3L*, como uma etapa importante durante a transformação para leucemia mieloide aguda, uma vez que a inativação de REV3L está associada a uma grande instabilidade genômica nesta neoplasia maligna e sua presença pode causar uma alta frequência de quebras cromossômicas (OLIVEIRA et al., 2020).

Outro destaque está no estudo de Genga e colaboradores que, por meio da utilização de imunohistoquímica em biópsias de medula óssea, demonstraram MAD2, CDC20 e AURKB, que são proteínas do fuso e do checkpoint mitótico, como associadas a anormalidades cromossômicas e prognóstico desfavorável em pacientes com SMD (GENGA et al., 2015).

Em SMD, mecanismos imunológicos podem modular o ambiente de forma a favorecer a expansão de células malignas, contribuindo para o desenvolvimento de SMD (GRIGNANO et al., 2018). Um estudo utilizando grande coorte mostrou que a estimulação imune crônica pode funcionar como gatilho para o desenvolvimento de SMD e LMA, onde vasculite, doenças do tecido conjuntivo, artrite inflamatória e doenças neutrofílicas são relatadas como fatores predisponentes (KRISTINSSON et al., 2011).

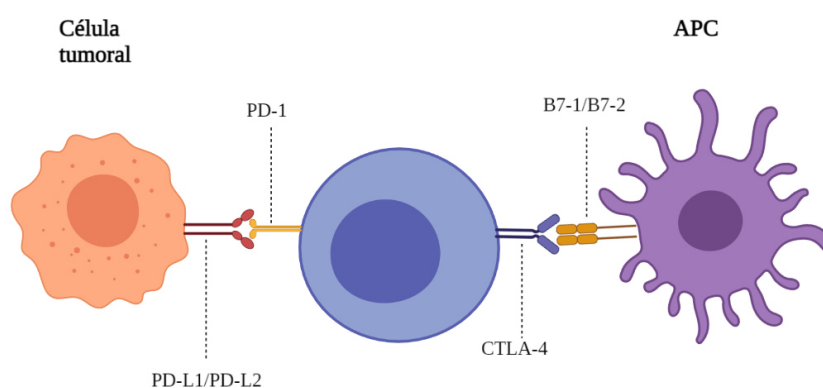
Em recentes estudos do nosso grupo, foi revelado que a ativação de receptores Toll-like 3 (TLR3) por Retrovírus endógenos (ERVs) pode estar ligada à patogênese de SMD, uma vez que esta pode levar à displasia da linhagem eritróide, e, portanto, ao seu bloqueio (OLIVEIRA et al., 2021). Ainda na investigação de mecanismos imunológicos, IL-8 e NF-κB foram evidenciados como partes de uma rede complexa de fatores imunes e inflamatórios envolvidos na SMD (DE MATOS et al., 2017).

1.2 Checkpoint imunológico e evasão imune no câncer

Pontos de verificação imunológicos são reguladores de resposta do sistema imunológico que permitem autotolerância, portanto, eles previnem a autoimunidade e

impedem ataques do sistema imune a um tecido próprio. Neste aspecto, tem destaque o Antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4) e a proteína de morte celular programada 1 (PD-1) (Figura 3), os quais são reguladores negativos da ativação de células T (WEBSTER, 2014; PALMIERI; CARLINO, 2018).

Figura 3- Esquematização do Ponto de Checagem imunológico.



APC= Célula Apresentadora de Antígeno; B7-1/B7-2= Ligantes de CTLA-4; PD-L1/PD-L2= Ligantes da Proteína de morte celular programada.

Fonte: Adaptado de BUCHBINDER; DESAI (2016).

Dentre as principais diferenças entre a ação de CTLA-4 e PD-1, pode-se definir a ação reguladora de CTLA-4 ao início da resposta imune, com esta acontecendo primordialmente em nódulos linfáticos, enquanto PD-1 age de forma mais tardia e principalmente em tecidos periféricos (BUCHBINDER; DESAI, 2016). De forma a destacar o foco principal do presente trabalho, prosseguiremos dando enfoque na atuação do checkpoint imunológico no câncer.

Na iniciação do câncer, o sistema imune é capaz de conter o avanço de células tumorais em função de seu reconhecimento e eliminação, com isto acontecendo por meio de moléculas pró-inflamatórias. Esse processo, no entanto, também seleciona células menos imunogênicas, isto é, aquelas que conseguem contornar o sistema imune, evitando sua reação. Como resultado deste processo, ocorre a evasão imune, onde a formação progressiva de um ambiente imunossupressor irá promover o crescimento do tumor (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004, VINAY et al., 2015).

Com o objetivo de contornar a evasão imune, uma das estratégias de tratamento de cânceres baseia-se no bloqueio da atividade de *checkpoint* imunológico, uma vez que isto

causa interrupção nos processos de sinalização co-inibitória, permitindo o reconhecimento de células cancerosas. Este processo resulta numa forte ativação do sistema imunológico e culmina em respostas imunológicas antitumorais, tanto de células T, quanto de outras células da imunidade inata e adaptativa (SINGH et al., 2020, BAGCHI; YUAN; ENGLEMAN, 2021).

1.2.1 PD1 e seus Ligantes (PD-L1 e PD-L2)

Conforme citado anteriormente, PD1 (*programmed cell death 1*) é um receptor regulador das funções de linfócitos T. O gene codificador deste receptor (*PDCDI*) possui 5 exons e está localizado no braço longo do cromossomo 2. PD-1 é uma proteína transmembrana, pertencente à família B7/CD28 de receptores e co-estimuladores, com 288 aminoácidos, que atua não apenas nas funções de células T, mas também na diferenciação de T CD4+ em células T reguladoras (KEIR et al., 2008).

PD-1 é expresso por células B, células T e células mielóides e possui dois receptores o PD-L1 e PD-L2, ambos localizados na porção 9p24.1, sendo estes expressos por células dendríticas, macrófagos, células B, células endoteliais, epiteliais e células tumorais. A interação de PD-1 com seus ligantes, tem como resultado a inibição da ativação de células T, assim como a regulação positiva de moléculas anti-apoptóticas e negativa da síntese de citocinas pró-inflamatórias (KEIR et al., 2008; SUN; MEZZADRA; SCHUMACHER, 2018).

Vale ressaltar a expressão de PD-1 como uma característica das células T em processo de exaustão, isto é, aquelas cuja proliferação é reduzida e diminui progressivamente até cessar, em razão de estimulação antigênica excessiva ou redução da ajuda de células T CD4+. O processo de exaustão ocorre durante infecções crônicas e câncer, sendo, portanto, caracterizado por perda de função das células T, e tendo como resultado o controle de infecções e tumores. (BRAHMER et al, 2012).

Tanto PD-1 quanto seus ligantes podem ser considerados agentes com papel central na resistência de cânceres à eliminação por células T tumorais endógenas específicas, podendo este processo ocorrer em razão de processos de resistência imune intrínseca ou adaptativa. Neste contexto, o processo de resistência intrínseca, pode ocorrer em função de alterações genéticas ou devido a ativação de vias de sinalização, enquanto a resistência imune adaptativa está ligada à indução da expressão de PD-L1 em células tumorais em resposta a citocinas específicas (TOPALIAN; DRAKE; PARDOLL, 2015).

Tratando-se de câncer de mama, Wu e colaboradores (2019) mostraram PDL1 como um biomarcador, o qual é preditivo de resposta patológica completa (estado em que nenhum resíduo de células tumorais ou apenas carcinoma ductal *in situ* permanece nas peças cirúrgicas após o tratamento pré-operatório), além de ser um fator prognóstico de sobrevida livre da doença. Já em câncer pancreático, utilizando análises multivariadas Birnbaum e colaboradores (2016) apontaram uma associação de PDL-1 com menor sobrevida livre de doença e sobrevida global, o estudo fez uma comparação entre amostras pancreáticas normais com câncer pancreático, e, a expressão de PDL-1 estava aumentada em 19% das amostras de câncer.

Atualmente, tem-se como alternativa para tratamentos de cânceres, como LMA e SMD, o uso de agentes hipometilantes. Estes fármacos têm como mecanismo de ação a inibição de DNA metiltransferase-1 (DNMT1), podendo causar hipometilação de ilhas CpG presentes em promotores de genes envolvidos na resposta anti-tumoral, aumentando, assim, o combate a células malignas. Todavia, um viés observado no uso destes medicamentos se encontra no seu potencial de regular positivamente a expressão de moléculas imunes inibitórias, as quais poderiam justificar o aumento da resistência de tumores (DAVER et al., 2018).

Estudos frequentemente analisam a expressão de PD-L1, a qual parece ser regulada positivamente após o tratamento com agentes hipometilantes. Utilizando linhagens de câncer de pulmão de não pequenas células, WRANGLE et al, (2013) descreveram uma regulação positiva de PDL-1 e este foi correlacionado com uma boa resposta à terapia anti-PD-1. Além disso, a expressão de PDL-1 também está aumentada em pacientes com *TP53* mutado, e, sua presença no microambiente tumoral parece estar associada em mau prognóstico em SMD (YANG et al., 2014, HAROUN et al., 2017). Ainda há, no entanto, necessidade de elucidação do papel destes receptores em SMD, que trata-se de uma doença extremamente heterogênea, onde há forte participação de mecanismos imunes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão do gene *PD-L1* em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica (SMD), associando os achados com alterações citogenéticas, variáveis clínicas, laboratoriais, além do prognóstico dos pacientes.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os níveis de expressão do gene *PD-L1* em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica;
2. Comparar os níveis de expressão do gene *PD-L1* 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 do gene *PD-L1* 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: 47730721.9.0000.5054) através do sistema da Plataforma Brasil, utilizando-se de Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentados na seção 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 da medula óssea

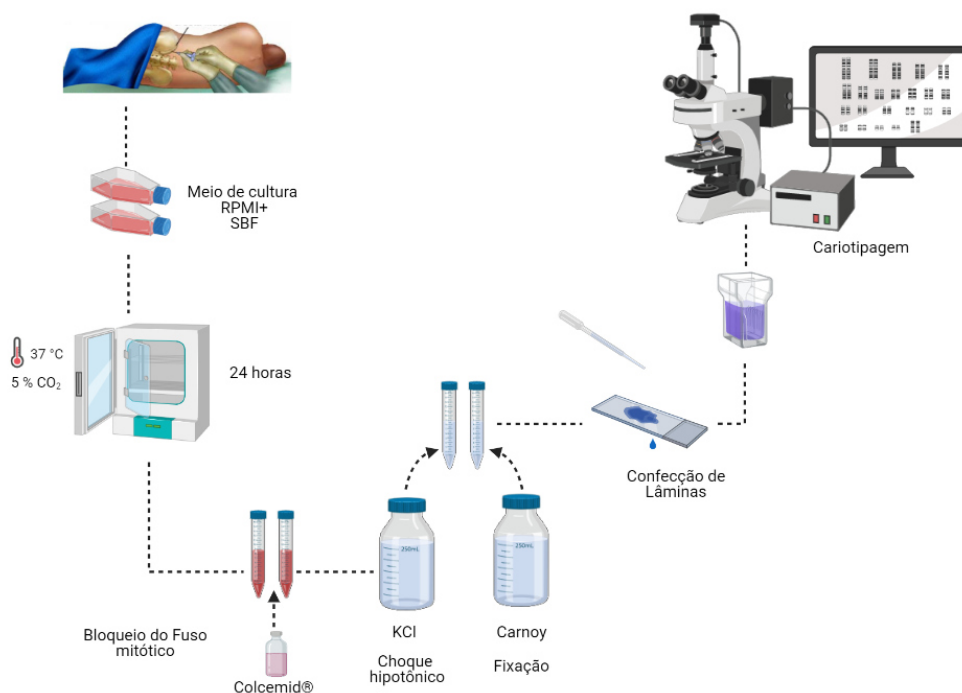
As 67 amostras de pacientes e as 4 dos controles foram coletadas por médico hematologista experiente. Para a avaliação do Cariótipo por banda G, as amostras foram coletadas em seringa heparinizada. As amostras para a obtenção do pool celular foram coletadas em tubos Vacutainer® contendo EDTA. A partir da coleta de 8 ml de medula óssea de pacientes com SMD e indivíduos saudáveis em tubos de vidro Vacutainer® contendo EDTA, foram separados 5 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.

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 eppendorfs para futuras pesquisas proteômicas. O material restante foi lavado com 1mL de solução de lise (25ml 65 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. O conteúdo foi agitado lentamente, deixado em banho de gelo por 15 minutos e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4° C. Em seguida foi desprezada a fase aquosa e acrescentado 250µL de PBS e, posteriormente, 750uL de Trizol LS Reagent® (Invitrogen, EUA). O material foi homogeneizado com pipeta até a dissolução completa. Após este 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 foi 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 estreptomicina e penicilina. O material foi cultivado por 24 horas em estufa a 37°C. Em seguida, adicionou-se 70µL de colchicina (Colcemid®) por 30 minutos. O material foi então centrifugado e ressuspensão em solução hipotônica de KCl 0,075M por 20 minutos. Antes de centrifugar novamente, foi adicionado 0,5mL de Carnoy (solução 3:1 de metanol e ácido acético) e homogeneizado. Após a centrifugação, o material foi lavado por até 3 vezes em solução de Carnoy. Para a confecção das lâminas, o material foi gotejado em lâminas, “envelhecidas” em placa e o bandeamento foi realizado pela técnica de tripsina e as lâminas coradas com corante Wright. Para cada paciente, foram 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) (Figura 4).

Figura 4: Representação esquemática da análise Citogenética, desde a coleta de medula óssea até a cariotipagem.



Fonte: Elaborada pelo Autor.

3.4 Análise da Expressão gênica por RT-qPCR

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®* (ThermoFisher Scientific) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para cada 10^6 células armazenadas em 1mL de *Trizol* foi adicionado a 200 μ L de Clorofórmio para lise da membrana e 10 μ L de glicogênio, foram homogeneizadas em vórtex e, em seguida, centrifugadas a 14.000rpm por 15 minutos a 4°C. Retirou-se o sobrenadante de cada amostra, transferindo para novos tubos, seguidos de precipitação com 400 μ L de isopropanol, e incubado por 60 minutos a -20°C, após esse período, foi realizada outra centrifugação a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O pellet formado foi ressuspensão em etanol 70% (v/v) e novamente centrifugado por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado por inversão e, após seco, o pellet foi diluído em água livre de RNAase. Foram realizadas leituras espectrofotométricas em

Nanodrop 1000 (ThermoFisher Scientific) nos comprimentos de ondas de 230, 260 e 280nm, obtendo-se suas relações para posterior aferição de contaminação das amostras.

3.4.2 Síntese de cDNA

O experimento seguiu as recomendações do fabricante do kit para Transcrição Reversa *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems®). Para cada reação, foram utilizados uma quantidade de RNA total para uma concentração final de 1000 ng. Para cada reação, utilizou-se de 1,0 µL de buffer, 0,4 µL de dNTP, 1,0 µL de *Random Primers*, 0,625 µL de *Multiscribe Reverse Transcriptase*TM 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. 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 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

A quantificação da expressão gênica de *PD-L1* 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*® *Hs00204257_m1*.

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).

Para cada amostra, foi realizada uma duplicata e foram consideradas para análise somente amostras cujas diferenças de amplificação não excederam a 0,4 ciclos (desvio padrão $Cq \leq 0,4$) (VANDESOMPELE et al., 2002). Não foram consideradas as duplicatas das amostras que apresentaram diferenças maiores que 0,5 ciclos, mesmo após repetição do experimento. Foram realizados controles negativos das reações para todos os genes estudados, sendo que para estas reações foram adicionados 1,25 μ L 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 referência, 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 dois genes referência para confirmar a estabilidade dos níveis de expressão gênica: Beta-2-microglobulina (*B2M*) e Ubiquitina C (*UBC*), com sonda *TaqMan assay*® *Hs00187842_m1* para *B2M* e *Hs00824723_m1* para *UBC*. Foi calculado o desvio padrão de cada endógeno com base em valores absolutos (Cq - 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 *B2M*. 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 (Cq). Foi estabelecido um threshold, no qual os valores de Cq foram fornecidos pelo software do aparelho *7500 Real-Time PCR System®* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) para a realização das análises estatísticas. Em seguida, os dados foram exportados para planilhas do software Microsoft Excel (formato .xlsx) para os cálculos de ΔCq e de $2^{-\Delta Cq}$ tanto dos genes endógenos quanto do gene alvo (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 ao 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 distanciaram em seus desvios padrões, a fim de determinar a qualidade, integridade e estabilidade dos níveis de expressão. Diante disso, o estudo se iniciou com 73 amostras de cDNA, mantendo-se no total 67 amostras para prosseguimento das análises estatísticas.

3.5 Variáveis Analisadas

- Grupo: Caso e Controle;
- Sexo: Feminino e Masculino;
- Idade: ≤ 60 anos, $>60 - \leq 70$ anos, >70 anos (Classificação IPSS-R);
- Celularidade: Hipocelular, Normocelular e Hiper celular;
- Cariótipo: Normal e Alterado;
- Classificação dos valores de hemoglobina (Hb) (IPSS-R): ≥ 10 g/dL, $8 - <10$ g/dL e <8 g/dL;
- Classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R): ≥ 100.000 por mm^3 , $50.000 - <100.000$ por mm^3 e ≤ 50.000 por mm^3 (GREENBERG et al., 2012);
- 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-DU (SMD com Displasia de Única Linhagem), SMD-DM (SMD com Displasia de Múltipla Linhagem), SMD-EB (SMD com Excesso de Blastos), SMD-SA (SMD com Sideroblastos em Anel);
- 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 (B2M e UBC) da mesma amostra, gerando assim os valores de ΔCq e, posteriormente, convertidos para $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK et al., 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Todas as variáveis possuíam menos de 50 casos, portanto foi realizado o teste de Shapiro-Wilk com objetivo de avaliar se as amostras apresentavam distribuição normal. 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 da População

Um total 67 pacientes de SMD foram analisados no presente estudo, dentre os quais 36 (53,7%) eram do sexo masculino e 31(46,3%) eram do sexo feminino. Com relação à idade, a média foi de 66,8 anos, com mediana de 71,5 anos, e, ao estratificar essa variável em ≤ 60 e >60 , observou-se que 68,2% dos indivíduos encontravam-se acima dos 60 anos (Tabela 3).

Nas variáveis clínico-laboratoriais, 61 indivíduos foram analisados, sendo que 24 (39,3%) apresentaram hemoglobina inferior a 8g/dL, 20 (32,8%) apresentavam apenas uma citopenia e 27 (44,3%) apresentavam duas ou mais. Nesta caracterização, a baixa celular mais frequente foi a neutropenia, presente em 47(77%) dos indivíduos amostrados e a menos frequente foi plaquetopenia, a qual estava em 14 (23%) destes (Tabela 3).

31 pacientes possuíam resultados de biópsias de medula óssea, destes, 24 (77,4%) possuía característica hipercelular, enquanto 4 (12,9%) e 3 (9,7%) medulas eram normo e hipocelular, respectivamente. Além disso, em 9 (29%) dos pacientes foi encontrada a presença de fibrose e em 6 (19,3%) não havia fibrose na biópsia de medula óssea. Vale ressaltar que não foi possível ter acesso aos dados dos demais pacientes (Tabela 3).

Dentre os resultados de mielograma da presente coorte, foi observado que a maioria apresentava 1 ou 2 displasias (34,6% e 32,7%, respectivamente), destas a foi observada a predominância de diseritropoiese- 42 (80,8%) dos indivíduos-, seguida por dismegacariopoeise- 30 (57,7%) dos indivíduos- e por último disgranulopoeise- presente em 26 (50%) dos indivíduos.

Estratificando o percentual de blastos de 52 indivíduos, 33 (63,5%) apresentaram contagens superiores a 2% de blastos, além disso, 7(13,5%) apresentaram contagens entre 5 e 10% e 6 (11,5%) possuíam contagens superiores a 10% de blastos na medula óssea (Tabela 3).

Quanto ao percentual de sideroblastos em anel, foram contabilizados dados de 51 pacientes. Destes, a maioria- 32 (62,7%) - não apresentava esta característica nas contagens, no entanto, 15 (29,4%) dos pacientes apresentaram contagens superiores a 15% de sideroblastos em anel em suas células da medula óssea (Tabela 3).

Tabela 3- Variáveis clínicas dos pacientes determinadas pelas frequências

Variáveis	Número de pacientes	Porcentagem%
SEXO (n=67)		
Feminino	31	46,3
Masculino	36	53,7
IDADE (n=66)		
≤60	21	31,8
>60-70	11	16,7
>70-80	21	31,8
>80	13	19,7
HEMOGLOBINA (n=61)		
≥10	22	36,1
8-<10	15	24,6
<8	24	39,3
CONTAGEM ABSOLUTA DE NEUTRÓFILOS (ANC) (n=61)		
≥800	14	23,0
<800	47	77,0
PLAQUETAS (n=61)		
≥ 100	32	52,5
50-<100	15	24,6
<50	14	23,0
CELULARIDADE (n=31)		
Hipocelular	3	9,7
Normocelular	4	12,9
Hiper celular	24	77,4
BLASTOS MO (n=52)		
≤ 2%	33	63,5
>2% - <5%	6	11,5
5%-10%	7	13,5
>10% - <20%	6	11,5
SIDEROBLASTOS EM ANEL (n= 51)		
0	32	42,1
>1-<15%	4	5,3
≥ 15%	15	19,7
FIBROSE MEDULAR (n=15)		
Presença	9	60,0
Ausência	6	40,0

Dentre os paciente portadores de SMD, o subtipo mais frequente foi SMD com Displasia em Multilinhagem com 20 (38,5%) pacientes, seguido pelo subtipo SMD com

Sideroblastos em Anel com 11 (21,2%) pacientes, 9 pacientes com subtipo SMD com Excesso de Blastos I (17,3%), 7 pacientes com subtipo SMD com Excesso de Blastos II (13,5%) e 5 (9,6%) pacientes do subtipo SMD com Displasia Unilinhagem.

Tabela 4 - Classificação da população do estudo de acordo com OMS (2016) e Formas de SMD.

Variáveis	Número de pacientes	Porcentagem%
CLASSIFICAÇÃO DA OMS		
SMD-DU	5	9,6
SMD-DM	20	38,5
SMD-SA	11	21,2
SMD-EB1	9	17,3
SMD-EB2	7	13,5
FORMAS DE SMD		
Formas iniciais	36	67,9
Formas avançadas	17	32,1

A citogenética nos permitiu avaliar os cariótipos, de onde foram obtidos os resultados de 64 pacientes. Nas análises, 27(42,2%) não possuíam alterações no cariótipo e 21(32,8%) apresentaram um cariótipo alterado. Dos 48 cariótipos com resultado diferente de ausência de metáfases, 9 (18,8%) tinham apenas uma alteração, 5 (10,4%) tinham duas alterações e 7 (14,6%) tinham um cariótipo complexo com três ou mais alterações (Tabela 5).

Analisando os 21 casos em que alterações cromossômicas se fizeram presentes no cariótipo, em 8 (38,1%) casos observou-se deleção no braço longo do cromossomo 5, já no cromossomo 7, este mesmo tipo de alteração estrutural foi observada em 4 (19%) portadores de SMD. Com relação a alterações numéricas (aneuploidias), em 10 (47,6%) pacientes esta variável se fazia presente (Tabela 5).

Se tratando de prognóstico, dos 48 pacientes avaliados utilizando dados de IPSS-R, 31 (64,58%) apresentaram prognóstico favorável, e, em contrapartida, apenas 1 (2,1%) possuía um prognóstico muito desfavorável. Já na categoria do grupo de risco, dos 46 pacientes em que foi possível avaliar o grupo de risco, 27 apresentavam risco baixo ou muito baixo (32,6% e 26,1%, respectivamente), 7 (15,2%) eram de risco intermediário, 6 (13%) eram de alto risco e 6 (13%) de muito alto risco (Tabela 6).

Tabela 5 - Frequência das variáveis citogenéticas dos pacientes

Variáveis	Número de pacientes	Porcentagem%
Cariótipo (Normal/Alterado)		
Normal	27	56,3
Alterado	21	43,8
Cariótipo (Deleção do 5q)		
Normal	27	56,3
Alterado com 5q	8	16,7
Alterado sem 5q	13	27,1
Cariótipo (Deleção do 7q)		
Normal	27	56,3
Alterado com 7q	4	8,3
Alterado sem 7q	17	35,4
Cariótipo (Alterações)		
Normal	27	56,3
1 alteração	9	18,8
2 alterações	5	10,4
3 ou mais alterações (Complexo)	7	14,6
Prognóstico IPSS-R		
Muito favorável	3	6,3
Favorável	31	64,6
Intermediário	7	14,6
Desfavorável	6	12,5
Muito desfavorável	1	2,1

Dos 47 pacientes avaliados quanto à dependência transfusional, 25 (53,2%) se encaixam nessa categoria. Enquanto a evolução para LMA, dos 36 casos avaliados, apenas 2 (5,5%) tiveram transformação para esta neoplasia hematológica.

Tabela 6- Descrição clínica dos pacientes com SMD do presente estudo

PCT	Sexo	Idade	Celularidade	Cariótipo	OMS	IPSS-R	DT	Ev. LMA	Óbito
1	F	65	Hiper celular	46,XX[20]	SMD-DM	Risco intermediário	Não	Não	Não
2	M	62	Hiper celular	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2]	SMD-EB2	Alto risco	Sim	-	Sim
3	M	73	-	Ausência de Metáfases	SMD-EB2	-	Sim	-	Sim
4	M	66	Hiper celular	Ausência de Metáfases	SMD-EB1	-	Sim	Não	Sim
5	M	49	Hiper celular	47,XY,+mar[6]/ 48,XY,+8,del(16q22),+mar[4]/ 47~50,XY, del(4q35),+8,+10,+11,del(16q22),+21,+mar[8]	SMD-DM	Risco muito alto	Sim	-	Sim
6	F	57	Hiper celular	46,XX[8]	SMD-DM	Baixo risco	Sim	Não	Sim
7	M	58	Hipo celular	46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12]	SMD-SA	Baixo risco	Não	Sim	Sim
8	F	28	-	46,XX[20]	SMD-SA	Baixo risco	Sim	Não	Não
9	M	82	Hiper celular	46,XY,del(5)(?q22q33)[3]/ 45,XY,del(5)(?q22q33),-18[3]/ 46,XY[14]	SMD-SA	Baixo risco	Sim	Não	Sim
10	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

11	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
12	M	64	Hipercelular	37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/ 46,XY,del(5)(q15q33)[5] /46,XY[6]	SMD-EB2	Risco muito alto	Sim	Não	Não
13	F	82	Hipercelular	46,XX[5]	SMD-SA	Baixo risco	Sim	-	Sim
14	M	74	Hipercelular	46,XY[6]	SMD-SA	Baixo risco	Não	Não	Não
15	M	87	Normocelular	46,XY[6]	SMD-DU	Baixo risco	Não	Não	Não
16	F	57	Hipocelular	46,XX del(11)(q23)[11]/46,XX	-	Muito baixo	-	-	-
17	M	82	-	Ausência de Metáfases	SMD-DM	-	Não	Não	Sim
18	F	87	Hipercelular	Ausência de Metáfases	SMD-SA	-	Não	Não	Sim
19	F	84	Hipercelular	Ausência de Metáfases	SMD-SA	-	Não	Não	Sim
20	F	51	Hipercelular	46,XX[11]	SMD-SA	Muito baixo	Não	Não	Não
21	F	72	-	-	SMD-EB2	-	Sim	Não	-
22	F	40	-	Ausência de Metáfases	SMD-DM	-	-	-	Não
23	F	45	Hipocelular	Ausência de Metáfases	-	-	-	-	Sim

24	F	77	-	Ausência de Metáfases	SMD-EB1	-	Sim	Não	Sim
25	F	72	Hiperclular	46,XX[6]	SMD-DU	Muito baixo	Não	Não	Não
26	M	73	-	80~90<3n>XXYY,...[3]/ 46,XY,del(5)(q32),del(11)(q32),del(17)(p11.2)[7]/ 46,XX[11]	SMD-EB1	Alto risco	Não	-	Não
27	M	69	-	49,XY,+13,+14,+mar[9]/46,XY[14]	-	-	-	-	-
28	M	74	Hiperclular	46,XY[3]	SMD-DM	Muito baixo	Não	Não	Sim
29	M	52	-	46,XY[20]	SMD-DM	Baixo risco	Sim	Não	-
30	M	74	-	46,XY,del(11)(q23)[7]/46,XY[13]	SMD-DU	Muito baixo	-	-	-
31	F	-	-	-	-	-	-	-	-
32	M	31	-	46,XY[24]	SMD-DM	Baixo risco	Não	Não	Não
33	F	57	-	46,XX[21]	-	-	-	-	-
34	F	60	-	46,XX[10]	SMD-DM	Muito baixo	-	-	-
35	M	85	Hiperclular	46,XY[15]	SMD-SA	Baixo risco	Sim	Não	Não
36	M	40	-	-	-	-	-	-	-
37	M	85	-	47,XY,+8[12]/46,XY[8]	SMD-EB1	Risco intermediário	Não	-	Sim
38	M	85	Normocelular	46,XY[20]	SMD-EB1	Risco intermediário	Não	Não	Sim

39	M	62	Hipercelular	47,XY,+15[10]/46,XY[10]	SMD-SA	Risco intermediário	Sim	Não	Não
40	M	66	Hipercelular	46,XY[17]	-	Baixo risco	Não	Não	Sim
41	F	77	-	46, XX 20	SMD-DM	Baixo risco	Sim	Sim	Sim
42	F	71	-	Ausência de Metáfases	-	-	-	-	-
43	F	75	-	Ausência de Metáfases	-	-	-	-	-
44	F	44	-	46,XX[20]	SMD-EB2	Alto risco	Sim	-	Sim
45	F	45	Normocelular	46,XX[7]	SMD-DM	Muito baixo	Não	-	Não
46	F	73	-	Ausência de Metáfases	-	-	-	-	-
47	M	79	Hipercelular	46,XY[7]	SMD-DM	Muito baixo	Sim	Não	-
48	M	84	Hipercelular	Ausência de Metáfases	SMD-EB1	-	Não	Não	Sim
49	F	73	-	47,XX,+mar[4]/46,XX[14]	-	Risco intermediário	-	-	-
50	M	55	-	46,XY[15]	SMD-DM	Muito baixo	Não	Não	Não
51	F	47	-	46,XX[15]	SMD-DU	Baixo risco	Sim	Não	Sim
52	F	78	Normocelular	46,XX,del(5)(q12q33)[18]/46,XX[2]	SMD-DM	Muito baixo	Sim	Não	Não
53	M	62	Hipercelular	Ausência de Metáfases	SMD-DM	-	-	Não	Não

54	M	59	-	Ausência de Metáfases	SMD-DM	-	Não	Não	Não
55	F	65	Hipercelular	Ausência de Metáfases	SMD-DM	-	Sim	Não	Não
56	F	77	-	46,XX,del(7)(q32)[2]/46,XX[26]	SMD-DU	Alto risco	Sim	-	Sim
57	F	76	-	46,XX[15]	SMD-SA	Baixo risco	Não	Não	Não
58	M	76	Hipercelular	Ausência de Metáfases	SMD-DM	-	-	-	-
59	M	69	-	46,XY[10]	-	Muito baixo	-	-	Sim
60	F	85	-	46,XX[20]	-	Risco intermediário	Não	Não	Não
61	M	56	Hipercelular	46,XY,del(5)(q32)[3]/ 46,XY,del(5)(q32),del(7)(q36)[3]/ 46,XY,-5,+mar[9]/46,XY[7]	SMD-EB1	Risco muito alto	-	-	Não
62	M	55	-	45,X,-Y[15]/ 45,X,-Y,del(5)(q32)[3]/ 46,XY[2]	SMD-EB2	Risco intermediário	-	-	-
63	M	75	-	92,XXYY[4]/46,XY[8]	SMD-EB1	Alto risco	Sim	-	Sim
64	F	80	-	46,XX[20]	-	Muito baixo	Não	Não	-
65	M	55	Hipercelular	45,XY,-7[15]/46,XY,-7,+mar[5]	-	Risco muito alto	-	-	-
66	M	89	-	46,XY,t(5;19)(q13.2;q13.4)[3]/ 46,XY,t(5;9)(q13.2;q13.4),t(8;21)(q21.3;q22.12)[3]/ 46,Y,del(X)(q21),t(5;19)(q13.2;q13.4),t(8;21)(q21.3;q22.12)[5]/ 46,XY[9]	SMD-EB2	Risco muito alto	-	-	Sim

67	M	84	-	46,XY[20]	SMD-EB1	Alto risco	Sim	-	-
----	---	----	---	-----------	---------	------------	-----	---	---

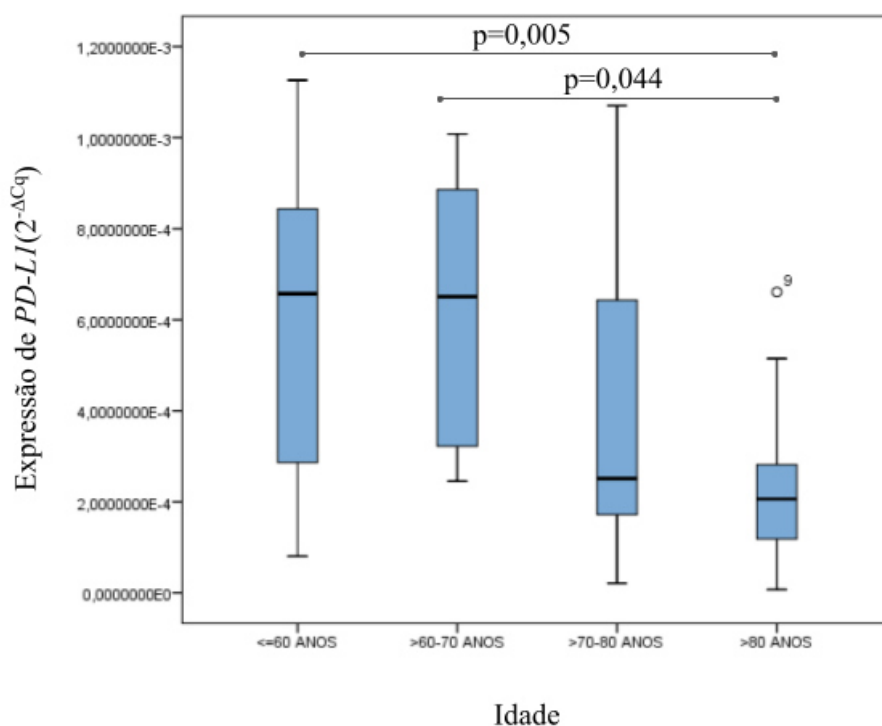
4.2 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

4.2.1 Expressão do gene PD-L1

4.2.1.1 Expressão do gene PD-L1 em relação à variável idade (IPSS-R)

Para a variável idade, estratificada em quatro grupos de acordo com o IPSS-R: ≤ 60 anos, $>60-70$ anos, $>70-80$ e >80 , foi observado que houve um aumento da expressão de PD-L1 em pacientes com idade igual ou inferior a 60 anos e entre 60 e 70 anos ($p=0,005$ e $p=0,044$ respectivamente), em relação àqueles com idade superior a 80 anos (Figura 5).

Figura 5: Nível de expressão gênica do PD-L1 na variável idade.



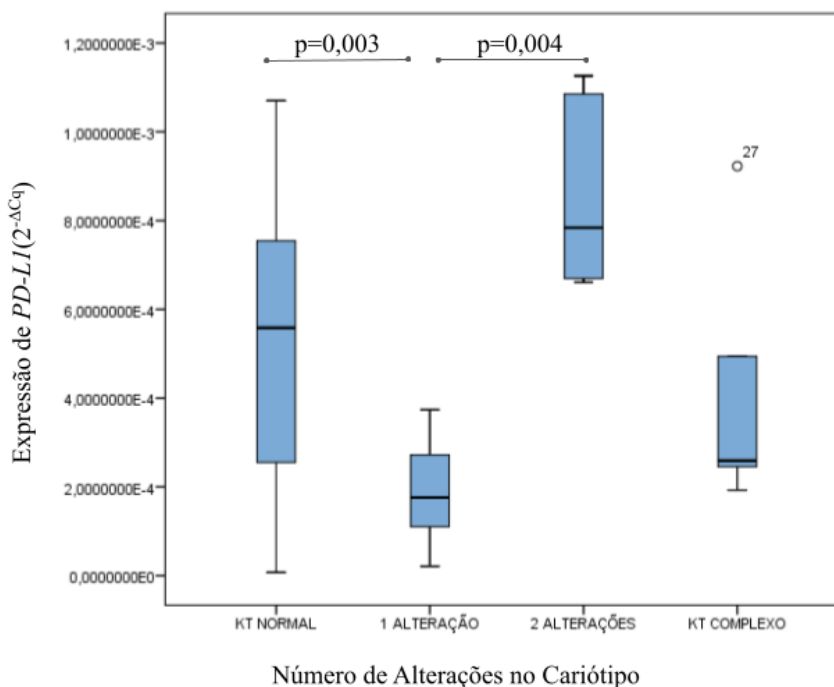
PDL-1	Nível de expressão (Expressão Gênica do PD-L1 $2^{-\Delta Cq}$)								
	Idade	N	Média	Desvio padrão	Limite inferior	Limite superior	Anova	Teste de Levene	Games-Howell
	≤ 60 ANOS	21	0,00057971	0,0003296664	0,000429647	0,000729772	0,016	0,036	0,005
	$>60-70$ ANOS	9	0,000592578	0,0003025482	0,000360019	0,000825137			0,044
	$>70-80$ ANOS	19	0,000415795	0,0003135229	0,000264682	0,000566908			-
	>80 ANOS	11	0,000241218	0,0001958758	0,000109627	0,000372809			-

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

4.2.1.2 Expressão do gene *PD-L1* em relação ao número de alterações no cariótipo

Quanto ao cariótipo, observou-se que os níveis de *PD-L1* estão aumentados nos pacientes com cariótipo normal ($p=0,003$) e com duas alterações no cariótipo em comparação com os que apresentavam apenas uma alteração (Figura 6).

Figura 6: Nível de expressão gênica do *PD-L1* na variável Número de Alterações no Cariótipo



KT= Cariótipo; KT normal= cariótipo sem alterações cromossômicas; KT complexo= cariótipo com 3 ou mais alterações;

PDL-1		Nível de expressão (Expressão Gênica do PD-L1 2 ^{-ΔCq})						
Cariótipo	N	Média	Desvio padrão	Limite inferior	Limite superior	Anova	Teste de Levene	Games-Howell
NORMAL	26	0,00050112 3	0,0003133439	0,000374561	0,000627685	0,002	0,017	0,003
1 ALTERAÇÃO	7	0,00019068 6	0,0001274346	0,000072828	0,000308543			-
2 ALTERAÇÕES	5	0,00086514	0,0002254076	0,000585259	0,001145021			0,004
COMPLEXO	6	0,00039543 3	0,0002788404	0,000102808	0,000688058			-

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

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foram realizadas análises da expressão do gene *PD-L1*, em 67 pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica. *PD-L1* está envolvido no processo de evasão imune em diversas neoplasias malignas, podendo ser, portanto um importante biomarcador em cânceres, além de contribuir tanto para a definição, quanto para a efetividade de terapias (DERMANI et al., 2019).

O câncer é uma doença relacionada a muitos fatores, um deles é o avanço da idade. A idade, por sua vez, é um fator determinante não só da capacidade, mas também da qualidade da resposta imunológica. Com o avançar da idade, ocorre uma redução na resposta imune mediada por linfócitos CD4 e CD8, além disso, há uma redução de células T virgens no pool periférico, o que pode resultar também em redução da responsividade a novos antígenos (LINTON; DORSHKIND, 2004).

Ademais, em doenças relacionadas à idade, o processo de envelhecimento também traz um aumento do estado pró-inflamatório no organismo. Neste contexto, ressalta-se o envelhecimento por inflamação, que é caracterizado por inflamação crônica e por distúrbios imunológicos. Não obstante, danos ao DNA podem, ainda, juntamente com citocinas pró-inflamatórias, induzir este processo, assim como a quantidade de células com resposta de danos ao DNA ativada pode exacerbá-lo (XIA et al., 2016).

Um trabalho conduzido por Kondo e colaboradores, utilizando linhagens celulares (F-36P e SKM-1) de SMD cultivadas em presença de citocinas, demonstrou regulação positiva de PD-L1 induzida por interferon- γ (IFN γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF α), via NF- κ B, nos blastos. Já em células coletadas da medula óssea de pacientes de SMD, ao estratificar entre alto e baixo risco com o intuito de comparar a frequência de expressão de PD-L1, foi observada uma maior expressão nos pacientes de alto risco (KONDO et al., 2010).

Em uma explicação breve de um modelo de progressão da SMD mediado pelo microambiente tumoral, Ishibashi e colaboradores, propõem a superprodução de citocinas como evento primário da patogênese da doença. Ainda de acordo o estudo, a interação entre PD-1 dos linfócitos e PD-L1 dos blastos de SMD gera um sinal bidirecional, que por um lado levaria à apoptose de células T e por outro elevaria o potencial proliferativo intrínseco dos blastos de SMD (ISHIBASHI; TAMURA; OGATA, 2011). Estes achados, em conformidade com pesquisas de nosso grupo conduzida por De Matos e colaboradores, as quais demonstram NF- κ B como aumentado em pacientes com idade superior a 75 anos, além de ressaltar processos inflamatórios como partes envolvidas na própria SMD, apontam para um possível favorecimento da regulação positiva de *PD-L1*, e, portanto, da presença de evasão imune na progressão da doença, com tendência a crescer de acordo com a idade (DE MATOS et al., 2017).

Apesar da resposta imune adaptativa ser reduzida em idosos, a inflamação e outros mecanismos da imunidade inata é aumentada, o que poderia explicar uma tendência de maior expressão de *PD-L1* em idades mais avançadas, visto que a interação PD-1/PD-L1 mantém a hiperativação de células T de defesa para prevenção de doenças autoimunes (YI et al., 2021). Ainda que os resultados das análises da expressão dos genes da população do presente estudo apontem para uma menor expressão de *PD-L1* em pacientes com idade superior a 80 anos quando comparados a pacientes com idade igual ou inferior a 60 e pacientes entre 60 e 70 anos, outras características, como alterações genéticas no microambiente tumoral, podem, em conjunto, estar afetando a expressão desse gene em pacientes mais idosos.

A Hippo é uma via de sinalização que inicialmente foi descoberta em *Drosophila melanogaster* como atuante no crescimento de tecidos. Atualmente sabe-se que esta via também desempenha papel na regeneração de tecidos, renovação celular e tumorigênese, além disso, seus componentes estão envolvidos na proliferação, sobrevivência, mobilidade e diferenciação celular (MA et al., 2019). O YAP é um importante mediador oncogênico atuante

na via Hippo. Estudando câncer colorretal Zhang et al., observaram redução da expressão de *PD-L1* por meio da inibição de *YAP* em linhagens celulares HCT116, as quais foram transplantadas em camundongos BALB/c nude submetidas ao tratamento com metformina. Estes achados destacam o papel do YAP e da via Hippo na regulação de *PD-L1* (ZHANG et al., 2019).

VGLL4 é um cofator transcricional com expressão reduzida em cânceres e sua expressão está positivamente ligada à sobrevivência. Utilizando modelos animais, Wu e colaboradores demonstraram que deficiência de *VGLL4* reduziu a expressão de PD-L1 por meio de uma cascata de reação que tem repressão transcricional como resultado devido a ligação de IRF-2 ao promotor de *PD-L1* (WU et al., 2019).

Tanto tratamento medicamentoso com metformina e sua ação inibitória de PD-L1 por meio da supressão de *YAP*, quanto a redução da expressão de *VGLL4* gerando repressão transcricional de PD-L1, demonstram eventos que levam à uma redução da expressão deste ligante. Portanto, hipotetiza-se que eventos como estes poderiam justificar os achados do presente estudo onde a expressão de *PD-L1* foi diminuída em idosos com idade superior a 80 anos quando comparados a pacientes com idade igual ou inferior a 60 e pacientes entre 60 e 70 anos.

Conforme citado anteriormente, a Síndrome Mielodisplásica é uma doença de múltiplos passos, onde a patogênese é acompanhada por condições inflamatórias, dano ao DNA e epigenético e disfunção telomérica, onde inicialmente as células tumorais são sensíveis ao *checkpoint* imunológico, mas em formas mais avançadas, ocorre a resistência a este mecanismo (CHAMSEDDINE et al., 2016). Na presente coorte, o gene *PD-L1* foi mais expresso em indivíduos com duas alterações citogenéticas, quando comparados àqueles com uma alteração citogenética, e em pacientes com cariótipo normal em relação àqueles que apresentavam uma alteração citogenética. Como a SMD é uma doença complexa e multifatorial, diversos mecanismos podem estar relacionados ao desenvolvimento e progressão da doença. Vale ressaltar que há uma baixa correspondência na literatura acerca da relação da expressão de *PD-L1* com a idade de acordo com o IPSS-R, assim como da expressão de *PD-L1* com as alterações no cariótipo, em razão disto, necessita-se de maiores investigações, com o objetivo de observar melhor este fenômeno.

Por se tratar de um gene com potencial de contribuição para o avanço de cânceres, ressalta-se a necessidade de mais estudos para elucidar sua função e influência em malignidades hematopoiéticas, como SMD. Vale salientar que o Ligante da Proteína de Morte Celular Programada pode ser importante para SMD, mesmo antes do tratamento com

hipometilantes devido à sua contribuição no processo de evasão imune e outras respostas imunológicas.

Sabe-se que a desregulação das células T está diretamente relacionadas à interação entre PD-1 e seu receptor PD-L1 (PD-1/PD-L1), além disso, o bloqueio de PD-1/PD-L1 pode restaurar a função da célula T no combate ao câncer (YI et al., 2021). Uma limitação do presente estudo foi não avaliar a expressão de *PD-1*, pois esta seria uma forma de validar possíveis baixas ou altas na expressão. Outra limitação do estudo advém do tamanho da população amostral, portanto, a inclusão de mais pacientes poderia confirmar esses achados.

De importante discussão, no presente estudo há um caso de SMD-EB-II cuja expressão de *PD-L1* juntamente com características clínicas foi sobressalente. Trata-se de um paciente do sexo masculino, de 89 anos de idade, de origem rural, pertencente ao grupo de risco muito alto e prognóstico desfavorável. Este paciente que apresentava 14% de blastos, 3 displasias na medula óssea e um cariótipo complexo, veio a óbito. A média do Cq deste indivíduo estava abaixo da média da população amostral do trabalho. De acordo com o exposto no presente estudo, especula-se que processos relacionados à idade e à SMD podem ter contribuído para o processo de evasão imune e progressão da doença. Vale ressaltar que, em função das características da população amostral, com o fim de normalização de dados, casos como estes eram frequentemente removidos, pois configuravam-se como *outliers*.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo foi observada uma expressão de *PD-L1* em pacientes com idade superior a 80 anos, quando comparado a idades iguais ou inferiores a 60 anos e entre 60 e 70 anos. Além disso, *PD-L1* foi mais expresso em pacientes com duas alterações, quando comparado com uma alteração, e em pacientes cariótipo normal em relação a uma alteração.

Não houve significância estatística nas demais variáveis analisadas, no entanto, em Ligante da Proteína de Morte Celular Programada pode ser importante para SMD, mesmo antes do tratamento com hipometilantes, em razão da sua atuação no processo de evasão imune. Reafirma-se, portanto, a importância do estudo deste gene em SMD, para a elucidação de sua função nesta neoplasia maligna.

REFERÊNCIAS

- ADÈS, L.; ITZYKSON, R.; FENAU, P. Myelodysplastic syndromes. **Lancet (London, England)**, v. 383, n. 9936, p. 2239–2252, 28 jun. 2014.
- ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 19 maio 2016.
- BAGCHI, S.; YUAN, R.; ENGLEMAN, E. G. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 16, n. 1, p. 223–249, 24 jan. 2021.
- 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, out. 2015.
- BIRNBAUM, D. J. et al. Prognostic value of PDL1 expression in pancreatic cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 44, p. 71198–71210, 1 nov. 2016.
- BOWEN, D. T. Occupational and environmental etiology of MDS. **Best Practice & Research. Clinical Haematology**, v. 26, n. 4, p. 319–326, dez. 2013.
- BRAHMER, Julie R.; TYKODI, Scott S.; CHOW, Laura Q. M.; *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 26, p. 2455–2465, 2012.
- BUCHBINDER, E. I.; DESAI, A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 39, n. 1, p. 98–106, fev. 2016.
- CAVALCANTE, G. M. et al. Tissue methylation and demethylation influence translesion synthesis DNA polymerases (TLS) contributing to the genesis of chromosomal abnormalities in myelodysplastic syndrome. **Journal of Clinical Pathology**, p. jclinpath-2020-207131, 24 nov. 2020.
- 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, 12 dez. 2013.
- CHAMSEDDINE, A. N. et al. Unraveling Myelodysplastic Syndromes: Current Knowledge and Future Directions. **Current Oncology Reports**, v. 18, n. 1, p. 4, 2016.

CHIHARA, D. et al. Incidence of Myelodysplastic Syndrome in Japan. **Journal of Epidemiology**, v. 24, n. 6, p. 469–473, 2014.

COGLE, C. R. Incidence and Burden of the Myelodysplastic Syndromes. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 10, n. 3, p. 272–281, set. 2015.

COREY, S. J. et al. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. **Nature Reviews. Cancer**, v. 7, n. 2, p. 118–129, fev. 2007.

DAVER, N. et al. Hypomethylating agents in combination with immune checkpoint inhibitors in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 32, n. 5, p. 1094–1105, maio 2018.

DE MATOS, A. G. et al. Interleukin-8 and nuclear factor kappa B are increased and positively correlated in myelodysplastic syndrome. **Medical Oncology**, v. 34, n. 10, p. 168, 30 ago. 2017.

DENG, X.; FANG, L. VGLL4 is a transcriptional cofactor acting as a novel tumor suppressor via interacting with TEADs. **American Journal of Cancer Research**, v. 8, n. 6, p. 932–943, 1 jun. 2018.

DERMANI, F. K. et al. PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 2, p. 1313–1325, fev. 2019.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 329–360, 2004.

GADJI, M; POZZO, A R. From cellular morphology to molecular and epigenetic anomalies of myelodysplastic syndromes. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 58, n. 7, p. 474–483, jul. 2019.

GATTERMANN, N. Iron overload in myelodysplastic syndromes (MDS). **International Journal of Hematology**, v. 107, n. 1, p. 55–63, 1 jan. 2018.

GENGA, K. R. et al. Proteins of the mitotic checkpoint and spindle are related to chromosomal instability and unfavourable prognosis in patients with myelodysplastic syndrome. **Journal of Clinical Pathology**, v. 68, n. 5, p. 381–387, maio 2015.

GHOBRIAL, I. M. et al. The bone-marrow niche in MDS and MGUS: implications for AML and MM. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 4, p. 219–233, abr. 2018.

GREENBERG, P. L. et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454–2465, 20 set. 2012.

GRIGNANO, E. et al. Autoimmune manifestations associated with myelodysplastic syndromes. **Annals of Hematology**, v. 97, n. 11, p. 2015–2023, 1 nov. 2018.

HAROUN, F. et al. PD-1 signaling and inhibition in AML and MDS. **Annals of Hematology**, v. 96, n. 9, p. 1441–1448, set. 2017.

ISHIBASHI, M.; TAMURA, H.; OGATA, K. Disease progression mechanism in myelodysplastic syndromes: insight into the role of the microenvironment. **Leukemia Research**, v. 35, n. 11, p. 1449–1452, nov. 2011.

KEIR, M. E. et al. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 26, n. 1, p. 677–704, 2008.

KONDO, A. et al. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor- κ B activation in blasts in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 116, n. 7, p. 1124–1131, 19 ago. 2010.

KRISTINSSON, S. Y. et al. Chronic Immune Stimulation Might Act As a Trigger for the Development of Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndromes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 21, p. 2897–2903, 20 jun. 2011.

LEONE, G.; PAGANO, L. Infections in Myelodysplastic Syndrome in Relation to Stage and Therapy. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. e2018039, 2018.

LINTON, P. J.; DORSHKIND, K. Age-related changes in lymphocyte development and function. **Nature Immunology**, v. 5, n. 2, p. 133–139, fev. 2004.

MA, S. et al. The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 88, p. 577–604, 20 jun. 2019.

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, 15 jun. 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**, v. 116, n. 21, p. 1884–1884, 19 nov. 2010.

DE OLIVEIRA, R.T.G. **ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS DNA POLIMERASES COM ATIVIDADE TRANSLESÃO EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA.**, Universidade Federal do Ceará. Dissertação. p. 113, 2018.

OLIVEIRA, R. T. G. DE et al. c.9253-6T>c REV3L: A novel marker of poor prognosis in Myelodysplastic syndrome. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, p. S2531-1379(20)30078- X, 27 jun. 2020.

OLIVEIRA, R. T. G. DE et al. ERVs-TLR3-IRF axis is linked to myelodysplastic syndrome pathogenesis. **Medical Oncology (Northwood, London, England)**, v. 38, n. 3, p. 27, 17 fev. 2021.

PERAZZIO, A. DOS S. B.; CHAUFFAILLE, M. DE L. L. F. When karyotype is decisive for myelodysplastic syndromes diagnosis. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 41, n. 4, p. 371–373, 1 out. 2019.

RIBEIRO, H. L. R. Jr. et al. Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome: DNA repair genes in myelodysplastic syndrome. **Hematological Oncology**, v. 33, n. 4, p. 220–228, dez. 2015.

RIBEIRO, H. L. R. Jr. et al. Expression of DNA repair genes is important molecular findings in CD34 + stem cells of myelodysplastic syndrome. **European Journal of Haematology**, v. 100, n. 1, p. 108–109, jan. 2018.

RIBEIRO, H. L. R. Jr. et al. Can synthetic lethality approach be used with DNA repair genes for primary and secondary MDS? **Medical Oncology**, v. 36, n. 12, p. 99, dez. 2019.

SANTIAGO, S. P. et al. New polymorphisms of Xeroderma Pigmentosum DNA repair genes in myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**, v. 58, p. 73–82, jul. 2017.

SHALLIS, R. M.; AHMAD, R.; ZEIDAN, A. M. The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. **European Journal of Haematology**, v. 101, n. 3, p. 260–271, set. 2018.

SINGH, S. et al. Immune checkpoint inhibitors: a promising anticancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 1, p. 223–229, jan. 2020a.

SPERLING, A. S.; GIBSON, C. J.; EBERT, B. L. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 1, p. 5–19, jan. 2017.

SWERDLOW, S. H. et al. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4th. ed. France: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2017.

TOPALIAN, S. L.; DRAKE, C. G.; PARDOLL, D. M. Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. **Cancer Cell**, v. 27, n. 4, p. 450–461, 13 abr. 2015.

VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35 Suppl, p. S185–S198, dez. 2015.

WEBSTER, R. M. The immune checkpoint inhibitors: where are we now? **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 13, n. 12, p. 883–884, dez. 2014.

WRANGLE, John; WANG, Wei; KOCH, Alexander; *et al.* Alterations of immune response of Non-Small Cell Lung Cancer with Azacytidine. **Oncotarget**, v. 4, n. 11, p. 2067–2079, 2013.

WU, Ailing; WU, Qingzhe; DENG, Yujie; *et al.* Loss of VGLL4 suppresses tumor PD-L1 expression and immune evasion. *The EMBO journal*, v. 38, n. 1, p. e99506, 2019.

WU, Ziping; ZHANG, Lei; PENG, Jing; *et al.* Predictive and prognostic value of PDL1 protein expression in breast cancer patients in neoadjuvant setting. **Cancer Biology & Therapy**, v. 20, n. 6, p. 941–947, 2019.

XIA, S. et al. An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. e8426874, 14 jul. 2016.

YANG, H. et al. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. **Leukemia**, v. 28, n. 6, p. 1280–1288, jun. 2014.

YI, M. et al. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 14, n. 1, p. 10, 7 jan. 2021.

ZHANG, Jun-Jie; ZHANG, Qiu-Shi; LI, Zi-Qian; *et al.* Metformin attenuates PD-L1 expression through activating Hippo signaling pathway in colorectal cancer cells. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 11, p. 6965–6976, 2019.

ZHANG, Y.; ZHENG, J. Functions of Immune Checkpoint Molecules Beyond Immune Evasion. In: XU, J. (Ed.). . **Regulation of Cancer Immune Checkpoints: Molecular and Cellular Mechanisms and Therapy**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer, 2020b. p. 201–226.

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 DO GENE PD-L1 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. 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 ao sangue periférico do indivíduo, que corresponde a um líquido de cor vermelha que ocupa o interior das veias. Os componentes do sangue: as hemácias (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas.

Serão coletadas somente 4mL de amostra de sangue venoso 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 coleta 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) 981881972.

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 da pesquisadora, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes e, por fim, da suspensão do estudo como um todo.

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

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)**.

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.