



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

**MARÍLIA BRAGA COSTA**

**PERFIL DE METILAÇÃO DOS GENES DE REPARO DE FITA SIMPLES DO  
DNA EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E  
EM AGRICULTORES EXPOSTOS A AGROTÓXICOS**

**FORTALEZA**

**2022**

MARÍLIA BRAGA COSTA

PERFIL DE METILAÇÃO DOS GENES DE REPARO DE FITA SIMPLES DO DNA  
EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E EM  
AGRICULTORES EXPOSTOS A AGROTÓXICOS

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

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA

2022

MARÍLIA BRAGA COSTA

**PERFIL DE METILAÇÃO DOS GENES DE REPARO DE FITA SIMPLES DO  
DNA EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E EM  
AGRICULTORES EXPOSTOS A AGROTÓXICOS**

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

**Defesa em:** 20/04/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

**Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado** (Coorientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

**Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo**  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

**Dr. Lorena Lobo de Figueiredo Pontes**  
Universidade de São Paulo- USP

---

**Dr. Sara Teresinha Olalla Saad**  
Universidade de Campina - UNICAMP

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)

---

C874p Costa, Marília Braga.

Perfil de metilação dos genes de reparo de fita simples do DNA em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica e em agricultores expostos a agrotóxicos / Marília Braga Costa. – 2022.  
117 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

Coorientação: Prof. Dr. Cristiana Libardi Miranda Furtado.

1. Síndrome. 2. Células-Tronco Hematopoéticas. 3. Agroquímicos. 4. Metilação. 5. Reparo do DNA. I. Título.

CDD 610

---

*À Deus.  
Ao meu esposo.  
Aos meus pais e irmão.*

## AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, Senhor da minha vida, que tem me proporcionado viver este momento, me capacitado para concretizar esse trabalho e me dado o prazer, a satisfação de concluir mais essa fase da minha história.

Aos meus queridos pais **Francisco Welligton Caetano Costa** e **Antônia Maria Braga Costa** e ao meu irmão **Emanuel Marcel Braga Costa**, por serem o meu maior apoio, amparo e por todo amor e empenho dedicados a mim. Amo vocês!!!

Ao meu amado esposo, **Matheus Henrique Santos Fernandes**, por toda compreensão, pelo ombro dedicado a enxugar minhas lágrimas, por acreditar tanto que tudo isso seria possível. Que a cada dia eu possa retribuir toda sua ajuda e carinho.

Ao meu orientador **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro**, por ser um homem tão dedicado à sua profissão como médico, pesquisador e professor. Mas sobretudo, por todo direcionamento, orientação, conhecimento e exigência, essenciais para meu crescimento científico. Meus sinceros agradecimentos.

À **Cristiane Libard**, minha coorientadora, que sempre esteve disponível para me ajudar e elucidar minhas dúvidas, que nossa parceria vá além do doutorado.

Aos **Membros da banca**, por todas as contribuições, por todas as dúvidas elucidadas, por todas as sugestões oferecidas ao meu trabalho, meu muito obrigada.

Ao professor **Dr. Luis Pinto**, juntamente, com a querida **Dra. Sheila Coelho** que disponibilizaram o laboratório no Instituto Nacional do Câncer e tornaram possível os resultados deste trabalho, serei sempre grata.

À querida **Paula Vieira**, uma amiga que este trabalho me deu, um presente que cultivarei por longos anos, meu muitíssimo obrigada, nunca serei suficiente grata.

À todos que fazem parte do **Laboratório de Citogenômica do Câncer**, em especial a **Cristiane Monte** e **Izabelle Rocha**, que dividiram algumas emoções deste trabalho; e também a **Daniela Borges**, por toda ajuda e por sempre está disposta a me ouvir, meus sinceros agradecimentos, sobretudo, pela amizade.

*“Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos! Por que quem compreendeu a mente do Senhor? Ou quem foi seu conselheiro? Ou quem lhe deu primeiro a ele, para que lhe seja recompensado? Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém...”*

*(Apostolo Paulo, em Romanos 11:33-36.)*

## RESUMO

A síndrome mielodisplásica (SMD) é definida como um grupo heterogêneo de doenças clonais das células progenitoras hematopoiéticas caracterizada por citopenias e displasia na medula óssea com risco de evolução para a leucemia mieloide aguda. Sua etiologia está principalmente relacionada a idade, mas apresenta como um dos fatores de risco a exposição aos agrotóxicos que podem levar a uma reprogramação aberrante do genoma pela metilacao do DNA. O presente estudo tem como principal objetivo avaliar o perfil de metilação dos genes de reparo do DNA em três grupos de estudo: um grupo com fator de risco para a doença, caracterizado pelos agricultores; um segundo grupo composto de pacientes com SMD; um terceiro grupo composto por pessoas saudáveis e não expostas a agrotóxicos em nenhum momento da vida. Além das análises de metilação, este trabalho associa os resultados de metilação a dados de expressão gênica obtidos em estudos prévios. Foi avaliado o perfil de metilação de genes relacionados ao mecanismo de reparo de fita simples do DNA (*CSA*, *CSB*, *XPA*, *XPC* e *XPG*) com a técnica de pirosequenciamento a partir de amostras de medula óssea dos três grupos e realizamos a análise do cariótipo das células da medula óssea pela Banda-G para pesquisa das alterações citogenéticas. Na análise do perfil de metilação dos grupos de agricultores, observou-se que o grupo da agricultura ecológica apresentou maior porcentagem de metilação do gene *XPA* frente aos grupos expostos. Em relação às variáveis de SMD, pacientes com idade inferior a 60 anos mostraram maior porcentagem de metilação para o gene *XPA* e *CSB* em relação aos pacientes com idade igual ou superior. Pacientes classificados nas formas iniciais da SMD mostraram maior porcentagem de metilação frente as formas avançadas para o gene *XPA*. Ademais, na classificação de risco do R-IPSS pacientes de baixo risco mostraram maior porcentagem de metilação do gene *XPA* em relação aos pacientes classificados no grupo alto risco. No que se refere às análises entre os grupos, observou-se maior porcentagem de metilação do grupo SMD frente aos agricultores expostos e ao grupo controle para o gene *XPA*. O grupo SMD foi subdividido em suas formas iniciais e avançadas e avaliada a metilação em relação aos agricultores expostos e o grupo controle. Observou-se maior porcentagem de metilação do grupo formas iniciais frente ao grupo formas avançadas e o grupo dos agricultores expostos, assim como as formas iniciais também mostraram maior porcentagem de metilação frente ao grupo controle também para o gene *XPA*. As análises de correlação entre a expressão e a metilação tanto dos agricultores quanto dos pacientes com SMD não se mostraram correlacionáveis, sugerindo que a alteração na expressão desses genes não é motivada pelo mecanismo de metilação do DNA.

**Palavras chave:** síndrome mielodisplásica, agricultores, exposição aos agrotóxicos, metilação do DNA.



## ABSTRACT

Myelodysplastic syndrome (MDS) is defined as a heterogeneous group of hematopoietic progenitor cell clonal diseases characterized by cytopenias and bone marrow dysplasia with a risk of progressing to acute myeloid leukemia. Its etiology is mainly related to age, but one of the risk factors is exposure to pesticides that can lead to aberrant reprogramming of the genome by DNA methylation. The present study has as main objective to evaluate the methylation profile of DNA repair genes in three study groups: a group with a risk factor for the disease, characterized by farmers; a second group composed of patients with MDS; a third group composed of healthy people and not exposed to pesticides at any time in life. In addition to methylation analyzes, this work associates methylation results with gene expression data obtained in previous studies. The methylation profile of genes related to the simple DNA strand repair mechanism (CSA, CSB, XPA, XPC and XPG) was evaluated with the pyro-sequencing technique using bone marrow samples from the three groups and we performed the karyotype analysis of bone marrow cells by G-Band to investigate cytogenetic changes. In the analysis of the methylation profile of the groups of farmers, it was observed that the group of ecological agriculture presented a higher percentage of methylation of the XPA gene compared to the exposed groups. Regarding the variables of SMD, patients under the age of 60 years showed a higher percentage of methylation for the XPA and CSB gene compared to patients aged equal or above. Patients classified in the initial forms of SMD showed a higher percentage of methylation compared to the advanced forms for the XPA gene. Furthermore, in the risk classification of the R-IPSS, low-risk patients showed a higher percentage of methylation compared to patients classified in the high-risk group. Regarding the analyzes between the groups, there was a higher percentage of methylation in the SMD group compared to exposed farmers and the control group. The SMD group was subdivided into its initial and advanced forms and methylation was evaluated in relation to exposed farmers and the control group. A higher percentage of methylation was observed in the initial forms group compared to the advanced forms group and the exposed farmers group, as well as the initial forms also showed a higher percentage of methylation compared to the control group. The correlation analyzes between expression and methylation of both farmers and patients with MDS were not correlated, suggesting that the change in the expression of these genes is not motivated by the DNA methylation mechanism.

**Keywords:** myelodysplastic syndrome, farmers, exposure to pesticides, DNA methylation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Classificação prognóstica, categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R (2012)	17
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática sobre a patogênese da Síndrome Mielodisplásica	23
<b>Figura 3.</b> Reação de metilação do DNA	26
<b>Figura 4.</b> Lesões de DNA e suas principais vias de reparo	30
<b>Figura 5.</b> Apresentação esquemática dos tipos de mecanismos de reparo em danos de fita simples de DNA	33
<b>Figura 6.</b> Apresentação esquemática das etapas e das principais proteínas atuantes no mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo (NER)	36
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática completa das vias do reparo por excisão de nucleotídeo (Nucleotide excision repair pathways – NER).	37
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática de todos os grupos incluídos nesta pesquisa	41
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática da Metodologia de Citogenética Clássica por Bandeamento-G	43
<b>Figura 10.</b> DNA tratado com bissulfito de sódio.	46
<b>Figura 11.</b> Gel de agarose revelado no aparelho ChemiDoc (Bio Rad®)	48
<b>Figura 12.</b> Princípio do pirosequenciamento	51
<b>Figura 13.</b> Pirograma obtido durante o pirosequenciamento	52
<b>Figura 14.</b> Fluxograma da metodologia utilizada no estudo	53
<b>Figura 15.</b> Demonstrativo da identificação da região alvo e os pontos CGs do gene <i>XPA</i>	55
<b>Figura 16.</b> Demonstrativo da identificação da região alvo e os pontos CGs do gene <i>CSB</i>	56
<b>Figura 17.</b> Demonstrativo da identificação da região alvo e os pontos CGs do gene <i>CSA</i>	57
<b>Figura 18.</b> Representação do resultado de dois cariótipos de agricultores avaliados no estudo	62
<b>Figura 19.</b> Perfil de metilação dos sítios CpG's avaliados para o gene <i>XPA</i> , <i>CSB</i> e <i>CSA</i> nos agricultores	64

<b>Figura 20.</b> Perfil de metilação do gene <i>XPA</i> entre os grupos dos agricultores	
<b>Figura 21.</b> Perfil de metilação dos genes <i>CSB</i> e <i>CSA</i> entre os grupos dos agricultores	66
<b>Figura 22:</b> Representação dos resultados encontrados na citogenética por banda G dos pacientes com SMD.	74
<b>Figura 23.</b> Perfil de metilação dos sítios CpG's avaliados para o gene <i>XPA</i> , <i>CSB</i> e <i>CSA</i>	76
<b>Figura 24.</b> Perfil de metilação do gene <i>XPA</i> em pacientes com SMD frente a variável idade	77
<b>Figura 25.</b> Perfil de metilação do gene <i>CSB</i> em pacientes com SMD frente a variável idade	78
<b>Figura 26.</b> Perfil de metilação do gene <i>CSA</i> em pacientes com SMD frente a variável idade	79
<b>Figura 27.</b> Perfil de metilação do gene <i>XPA</i> em pacientes com SMD frente a variável formas da doença	80
<b>Figura 28.</b> Perfil de metilação dos genes <i>CSA</i> e <i>CSB</i> em pacientes com SMD frente a variável formas da doença	81
<b>Figura 29.</b> Perfil de metilação do gene <i>XPA</i> em pacientes com SMD frente a variável classificação de risco do IPSS-R	82
<b>Figura 30.</b> Perfil de metilação dos genes <i>CSB</i> e <i>CSA</i> em pacientes com SMD frente à variável classificação de risco do IPSS-R	83
<b>Figura 31.</b> Perfil de metilação do gene <i>XPA</i> entre os grupos SMD, agricultores expostos e controle	86
<b>Figura 32.</b> Perfil de metilação dos genes <i>CSA</i> e <i>CSB</i> entre os grupos SMD, agricultores expostos e controle	87
<b>Figura 33.</b> Perfil de metilação do gene <i>XPA</i> entre os grupos SMD nas suas formas iniciais e avançadas e o grupo de agricultores expostos	88
<b>Figura 34.</b> Perfil de metilação dos genes <i>CSB</i> e <i>CSA</i> entre os grupos SMD nas suas formas iniciais e avançadas e o grupo de agricultores expostos	89
<b>Figura 35.</b> Perfil de metilação do gene <i>XPA</i> entre os grupos SMD nas suas formas iniciais e avançadas e o grupo controle	90
<b>Figura 36.</b> Perfil de metilação dos genes <i>CSB</i> e <i>CSA</i> entre os grupos SMD nas suas formas iniciais e avançadas e o grupo controle.	91

<b>Figura 37.</b> Perfil de metilação do gene <i>XPA</i> entre os grupos SMD nas suas formas iniciais, agricultores não expostos e controle	92
<b>Figura 38.</b> Perfil de metilação dos genes <i>CSB</i> e <i>CSA</i> entre os grupos SMD nas suas formas iniciais, agricultores não expostos e controle	93
<b>Figura 39.</b> Perfil de metilação dos genes <i>XPA</i> , <i>CSB</i> e <i>CSA</i> entre os grupos SMD na sua forma avançada, agricultores expostos e controle	94
<b>Figura 40.</b> Nível de expressão de casos de SMD que apresentaram ou não porcentagens de metilação do gene <i>XPA</i> .	98
<b>Figura 41.</b> Nível de expressão dos agricultores que apresentaram ou não porcentagens de metilação do gene <i>XPA</i> .	99
<b>Figura 42.</b> Figura resumo dos principais resultados apresentados no presente estudo.	108

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação clínica da SMD segundo critérios da OMS 2008	14
<b>Tabela 2:</b> Classificação clínica da SMD segundo os critérios da OMS 2016	15
<b>Tabela 3.</b> Função dos genes avaliados nesse estudo	38
<b>Tabela 4.</b> Sequências dos <i>primers</i> utilizados no estudo	47
<b>Tabela 5.</b> Componentes da reação e condições para amplificação de cada gene alvo	49
<b>Tabela 6.</b> Caracterização dos grupos de agricultores avaliados no estudo	59
<b>Tabela 7.</b> Perfil citogenéticos dos grupos de agricultores	60
<b>Tabela 8.</b> Caracterização dos resultados de citogenética clássica dos agricultores	61
<b>Tabela 9.</b> Descrição dos resultados de perfil de metilação das variáveis de caracterização dos agricultores analisadas no estudo	67
<b>Tabela 10:</b> Caracterização descritiva das variáveis sociodemográficas dos pacientes com SMD	68
<b>Tabela 11:</b> Estratificação clínica dos pacientes pela classificação da OMS (2008)	69
<b>Tabela 12:</b> Frequência das variáveis clínicas relacionadas aos achados da medula óssea em pacientes com SMD	70
<b>Tabela 13.</b> Frequência das variáveis clínico-laboratoriais relacionados aos achados do sangue periférico e evolução pra LMA em pacientes com SMD	71
<b>Tabela 14:</b> Frequência dos resultados citogenéticos e frequência das variáveis associadas aos grupos de risco dos pacientes com SMD ao diagnóstico	71
<b>Tabela 15 -</b> Descrição detalhada do cariótipo de medula óssea dos pacientes de SMD que apresentaram resultado de citogenética	72
<b>Tabela 16.</b> Descrição dos resultados de perfil de metilação das variáveis de SMD analisadas no estudo	84
<b>Tabela 17.</b> Descrição dos resultados de perfil de metilação entre os grupos avaliados no estudo	95

<b>Tabela 18:</b> Análise de correlação entre os níveis de expressão e metilação dos genes <i>XPA</i> , <i>CSB</i> e <i>CSA</i> em amostras de agricultores expostos a pesticidas	96
<b>Tabela 19:</b> Análise de correlação entre os níveis de expressão e metilação dos genes <i>XPA</i> , <i>CSB</i> e <i>CSA</i> em amostras de pacientes com SMD	97

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
1.1 Aspectos gerais da Síndrome Mielodisplásica	12
1.2 Epidemiologia da Síndrome Mielodisplásica	13
1.3 Classificação clínica da Síndrome Mielodisplásica	14
1.4 Classificação prognóstica da Síndrome Mielodisplásica	16
1.5 Etiologia da SMD	18
1.5.1 Genotoxicidade dos Pesticidas como fator de risco para SMD	19
1.6 Patogênese da SMD	21
1.7 Reprogramação Epigenética	24
1.7.1 Metilação do DNA	25
1.7.2 Metilação do DNA em SMD	27
1.8 Mecanismo de reparo do DNA	29
1.8.1. Mecanismos de Reparo de Fita Simples de DNA	31
1.8.1.1. Reparo por excisão de base	31
1.8.1.2 Reparo de erros de emparelhamento de bases	31
1.8.1.3 Reparo por excisão de nucleotídeo	32
1.8.1.3.1. Proteínas da via NER	33
<b>2. OBJETIVOS</b>	39
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos	39
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	40
3.1 Aspectos éticos da Pesquisa	40
3.2 Seleção das amostras para os grupos de estudo	40
3.3 Obtenção das amostras do pool medular	42
3.4 Cariótipo por bandeamento-G	42

3.5 Pirosequenciamento pós-modificação do DNA com bissulfito de sódio	44
3.5.1 Extração de DNA	44
3.5.2 Modificação do DNA por Bissulfito de Sódio	44
3.5.3 Determinação das sequencias e desenho dos primers	46
3.5.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese	47
3.5.5 Sequenciamento	49
3.6 Análises Estatísticas	52
<b>4 RESULTADOS</b>	54
4.1 Caracterização geral dos grupos avaliados no estudo	54
4.2 Demonstrativo das regiões alvos dos genes avaliados no estudo	55
4.3 Agricultores	58
4.3.1 Caracterização dos grupos de agricultores	58
4.3.2 Citogenética Clássica dos agricultores	60
4.3.3 Perfil de metilação dos genes de reparo de fita simples do DNA nos grupos de agricultores	63
4.3.3.1 Determinação dos sítios CpG's para os genes <i>XPA</i> , <i>CSB</i> e <i>CSA</i>	63
4.3.3.2 Perfil de metilação das variáveis de caracterização dos agricultores para os genes <i>XPA</i> , <i>CSB</i> e <i>CSA</i> .	65
4.4. Síndrome Mielodisplásica	68
4.4.1 Caracterização sociodemográfica e clínica dos pacientes com síndrome mielodisplásica	68
4.4.2 Perfil de metilação dos genes de reparo de fita simples do DNA em pacientes com síndrome mileodisplásica	75
4.4.2.1 Determinação dos sítios CpG's para o gene <i>XPA</i> , <i>CSB</i> e <i>CSA</i>	75
4.4.2.2 Perfil de metilação das variáveis avaliadas para os pacientes com síndrome mielodisplásica para os genes <i>XPA</i> , <i>CSB</i> e <i>CSA</i>	77
4.5. Perfil de metilação entre os grupos avaliados no estudo dos genes <i>XPA</i> , <i>CSB</i> e <i>CSA</i>	86
4.6 Análises de correlação entre os níveis de expressão e metilação dos genes <i>XPA</i> , <i>CBS</i> e <i>CSA</i> para os grupos de estudo	96



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais da Síndrome Mielodisplásica

A síndrome mielodisplásica (SMD) é definida como um grupo heterogêneo de doenças clonais das células progenitoras hematopoiéticas (CPH) caracterizada por uma hematopoiese ineficaz que acarretam citopenia(s) no sangue periférico, displasias em uma ou mais linhagens celulares, medula óssea (MO) hiperclular e risco de evolução para Leucemia Mieloide Aguda (LMA) em 30% a 40% dos casos (TOBIASSON; KITTANG, 2019).

As disfunções hematopoiéticas na SMD são bastante variáveis e compreende múltiplas etapas, caracterizando uma fisiopatologia bastante complexa que pode acometer diversas vias de sinalização. Seu curso clínico pode ser dividido em duas fases distintas, baixo risco e alto risco de progressão para LMA, no qual o número de linhagens celulares displásicas e a porcentagem de blastos na medula óssea são critérios primordiais para definir o estágio e a progressão da SMD (BEJAR, 2014; LINDSLEY, 2017).

Estudos têm mostrado que um conjunto central de genes são afetados por processos genéticos somáticos que ocorrem em várias etapas durante o processo da SMD. Avanços nas pesquisas de sequenciamento gênico já descobriram um grande número de genes mutados em pacientes com SMD e mostram que mais de 80% destes pacientes terão pelo menos uma dessas alterações genéticas. Vale ressaltar que estas mutações podem estar presentes em genes envolvidos com vias oncogênicas biologicamente importantes, como regulação epigenética, splicing do RNA e demais processos (BEJAR, 2014; LINDSLEY, 2017).

Avanços na área molecular tem se expandido devido ao influxo de informações que afirmam a importância das mutações para diagnóstico e prognóstico da SMD. Recentemente foi incorporado a sua classificação a mutação no gene *Splicing factor 3b subunit 1 (SF3B1)* no algoritmo de diagnóstico do subtipo Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA), posteriormente denominado SMD com sideroblastos em anel (SMD-AS). No entanto, ainda há vários desafios para o diagnóstico a partir de dados de mutação, visto que o fenótipo clínico dos indivíduos afetados tende a ter grande variação, dependendo ainda o diagnóstico da doença de critérios clínicos e morfológicos (BEJAR, 2014; HASSERJIAN, 2019) Portanto, os avanços na área molecular tendem a

progredir na busca de padrões de mutação específicos que venham ajudar a estabelecer o diagnóstico de SMD.

## 1.2 Epidemiologia da Síndrome Mielodisplásica

A SMD é uma neoplasia que acomete principalmente indivíduos idosos, com a maior parte dos pacientes possuindo mais de 65 anos ao diagnóstico (EUN-JU LEE, NIKOLAI PODOLTSEV, STEVEN D GORE, 2016). Na infância, a SMD é considerada rara, compreendendo 1 a 4 casos por milhão, caracterizando menos de 5% das neoplasias hematológicas infantis (FRANCO LOCATELLI, 2018). Quanto ao sexo, os homens possuem uma incidência maior do que mulheres, 4,5 vs 2,7 por 100.000 habitantes por ano (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014; PFEILSTÖCKER, M.; TUECHLER, H.; SANZ, 2016).

A SMD nos Estados Unidos é estimada em 3,4 por 100.000 pessoas, mas esse valor provavelmente seja subestimado devido a subdetecção e subnotificação da doença (STROM, S. S.; VELEZ-BRAVO, V.; ESTEY, 2008). Dados alemães revelam uma taxa de prevalência de SMD de 7 casos por 100.000 habitantes (NEUKIRCHEN, 2011).

O Brasil teve o primeiro levantamento de casos de SMD realizado em 2010, no qual foi elaborado com base em um estudo com 476 pacientes advindos de 12 centros das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil, diagnosticados com SMD entre janeiro de 2003 a 31 de dezembro de 2007 (MAGALHÃES, S. M. M. et al, 2010). Foi mostrado no estudo que no Brasil a idade mediana de diagnóstico dos pacientes com SMD é de 68,3 anos, o que se assemelha com o observado no Japão e Coréia, mas que apresenta-se menor do que o observado nos EUA e Europa. Ademais, houve uma prevalência do sexo feminino, 50,8% e de residentes da zona urbana, com 86,6% (MAGALHÃES, S. M. M. et al., 2010).

Em um estudo sul-americano, com a participação de 1080 pacientes diagnosticados com SMD *de novo*, oriundos do Brasil (345), no qual fizeram parte pesquisadores do nosso grupo compostos pelos professores Ronald Feitosa Pinheiro e Silvia Maria Meira Magalhaes, Chile (100) e Argentina (635), foi observado média de idade dos pacientes brasileiros de 68 anos, da Argentina 69 e do Chile 64 anos, com predomínio de pacientes do sexo masculino, do subgrupo CRDM (OMS 2008) e de baixo risco, segundo o IPSS-R (BELLI et al., 2015).

Mesmo com todo avanço na caracterização da SMD, o diagnóstico ainda enfrenta dificuldades. Condições clínicas podem se assemelhar com outras doenças e acabam gerando um diagnóstico diferencial bastante complexo. Portanto, a dificuldade de diagnóstico junto com o baixo número de registros de casos acabam levando a uma subnotificação da SMD (COGLE et al., 2011).

### **1.3 Classificação clínica da Síndrome Mielodisplásica**

Com o objetivo de auxiliar no diagnóstico, o grupo Franco-Americano Britânico (FAB), em 1982, criou um sistema de classificação da SMD baseada em aspectos morfológicos do sangue periférico e da medula óssea, que foi dominante até os anos 2000 (BENNETT, 1982); MATOS et al., 2016). Criado em 2001 e revisado em 2008, a OMS decidiu aperfeiçoar e estender a classificação da FAB realizando algumas reformulações (SWERDLOW, 2008). Após oito anos a OMS faz uma nova revisão e inclui características biológicas e genéticas para aprimorar o significado clínico de cada subtipo da SMD (SWERDLOW et al., 2016).

A mais atual revisão da OMS, 2016, passa a contar com característica molecular da doença, na qual conta com a inclusão da mutação no gene *SF3B1* na definição de porcentagem de sideroblastos em anel na MO no grupo ARSA, agora caracterizada como SMD com sideroblastos em anel. Além disso, a nova classificação determina a substituição dos termos “anemia refratária” e “citopenia refratária” por “Síndrome Mielodisplásica com displasia unilinhagem” e “Síndrome Mielodisplásica com displasia multilinhagem” (Tabela 1)(ARBER; HASSERJIAN, 2015).

**Tabela 1:** Classificação clínica da SMD segundo os critérios da OMS 2016

<b>SUBTIPOS DE SMD</b>	<b>SANGUE PERIFÉRICO</b>	<b>MEDULA ÓSSEA</b>
(SMD-DU)	≤1% de Blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 linhagem; 5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
(SMD-DM)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; 5% de Sideroblastos em anel*; ≤5% de blastos
<b>SMD com sideroblastos em anel</b>		
(SMD-SA-DU)	≤1% de Blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 linhagem; ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
(SMD-SA-DM)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
<b>SMD com Excesso de Blastos (SMD-EB)</b>		
(SMD-EB1)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 2 a 4% de blastos	Displasia em 0,1, 2 ou 3 linhagens; 5 a 9% de blastos
(SMD-EB2)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 5 a 19% de blastos	Displasia em 0,1, 2 ou 3 linhagens; 10 a 19% de blastos
<b>SMD inclassificável (SMD-i)</b>		
SMD-i com 1% de blastos	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% <sup>†</sup> de blastos	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% de blastos
SMD-i com displasia em única linhagem e pancitopenia	Citopenia em 3 linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 1 linhagem; ≤5% de blastos
SMD-i baseada em alterações citogenéticas	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Ausência de displasias; ≤15% de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
SMD com del(5q) isolada	≤1% de Blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% de blastos; del(5q) isolada ou com 1 alteração adicional, exceto del(7q)/-7

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

#### 1.4 Classificação prognóstica da Síndrome Mielodisplásica

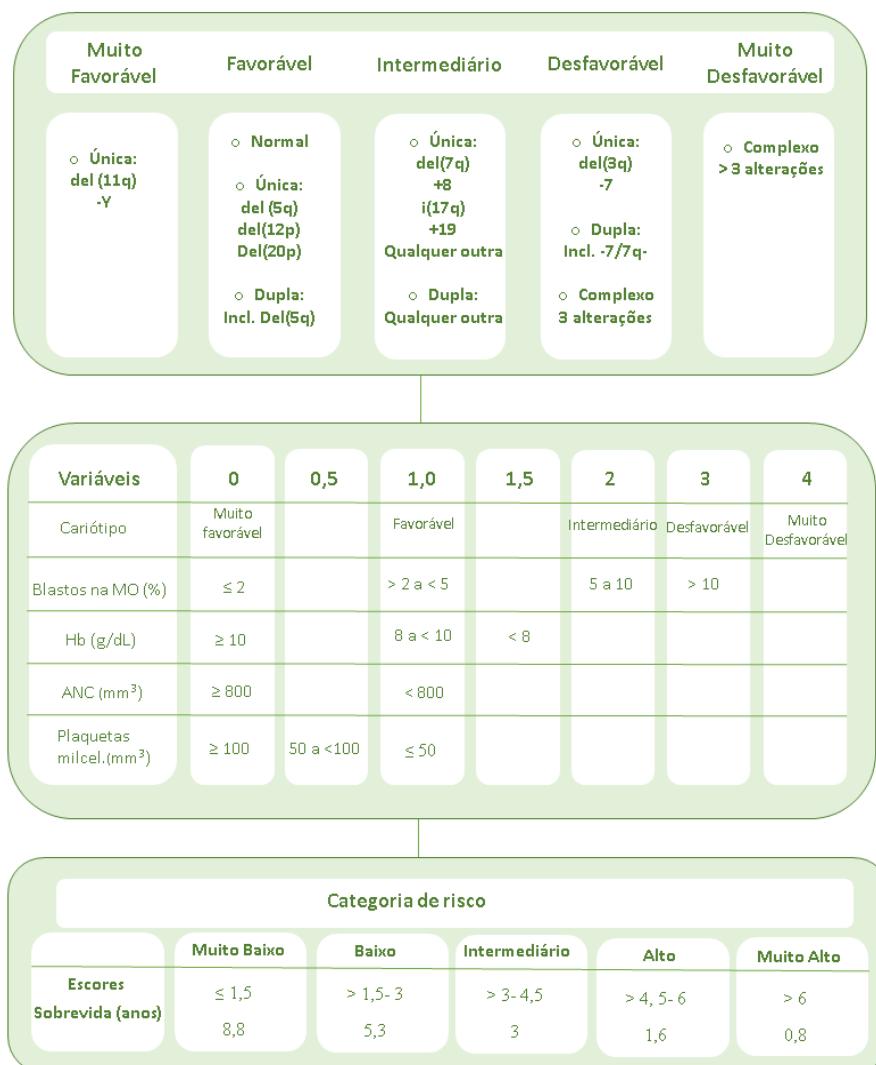
GREENBERG e colaboradores criaram, em 1997, o Índice Internacional de Escore Prognóstico (IPSS), no qual foi baseado em informações provenientes de sete estudos que contavam com dados de 816 pacientes diagnosticados com SMD *de novo*. Esse sistema

conta com uma estratificação de escores para prever o risco de transformação leucêmica e média de sobrevida do paciente, levando em consideração a porcentagem de blastos da MO, o número de citopenias periféricas e o cariótipo dividido em três categorias. As três variáveis geram valores que são somados e é determinado o valor do IPSS. Assim, o paciente pode ser enquadrado em um dos quatro grupos de risco: baixo (pontuação 0), intermediário-I (pontuação de 0,5-1), intermediário-II (pontuação de 1,5 a 2,0) e elevado (pontuação > 2,5) (GREENBERG P, C COX, et al, 1997).

Em 2010, o IPSS passa por uma revisão que conta com uma base de dados de 7012 pacientes com SMD dando origem ao IPSS-R (revisado). Nessa revisão, o número de citopenias foi substituído pelo grau de citopenias, a porcentagem de blastos foi melhor estratificada, houve a incorporação de mais duas categorias citogenéticas e foi considerada a idade do paciente ao diagnóstico, a quantificação de ferritina sérica, a lactato desidrogenase, a B2-microglobulina e a performance como importantes características para a sobrevida, mas não para a transformação leucêmica. Além disso, após uma análise multivariada com tempo de sobrevida de e transformação para LMA, foram criadas 5 categorias de risco: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto risco (Figura 1) (GREENBERG et al., 2012).

Conforme aumenta o conhecimento da doença acerca de sua heterogeneidade e complexidade, torna-se claro a necessidade de refinamento dos sistemas prognósticos, visto que são importantes para decisão terapêutica do paciente. Espera-se que análises avançadas de variáveis clínicas, citogenéticas e moleculares sejam essenciais para uma progressão em futuros modelos que melhorem o prognóstico e a conduta terapêutica da SMD (JONAS, B. A.; GREENBERG, 2015).

**Figura 1:** Classificação prognóstica, categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R (2012).



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

## 1.5 Etiologia da SMD

A SMD pode ser classificada em primária ou *de novo*, onde se enquadram a maioria dos pacientes, 85-90% dos casos, e secundária ao tratamento com quimioterápicos e radioterapia, em uma porcentagem menor de pacientes, 10-15% dos casos, mas que apresentam complicações mais graves e um pior prognóstico (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014; CHAMSEDDINE et al., 2016). A SMD primária pode não ter causa aparente, embora apresente como maior fator de risco a idade (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014; CHAMSEDDINE et al., 2016). Além disso, há vários estudos que demonstram diversos outros fatores de risco associados ao desenvolvimento da SMD, como uso de álcool, tabaco, bem como a exposição prolongada ao benzeno e seus derivados, exposição à radiação ionizante e a exposição a agentes químicos agrícolas, os pesticidas (AVGERINOUS et al., 2017). Quanto aos casos relacionados a condições hereditárias ou congênitas não há muito descrito na literatura que faça esta associação, no entanto, há raros casos de doenças congênitas, como a anemia de Fanconi, que podem, eventualmente, levar ao desenvolvimento da SMD (ALTER, 2014).

Durante a investigação para confirmação de diagnóstico da SMD é de suma importância avaliar a história clínica do paciente, visto que além da idade existem vários fatores de risco contribuintes para o desenvolvimento da doença, como citado anteriormente. E Embora a etiologia da SMD primária englobe um arcabouço de possibilidades, existem alguns hábitos que podem ser mais preponderantes quanto ao risco associado à doença, levando ao desenvolvimento de alterações celulares e moleculares, contribuindo para um processo carcinogênico. A exposição aos agrotóxicos, por exemplo, já tem sido bastante relatado em estudos que associam a exposição ao desenvolvimento de diversos tipos de cânceres e doenças degenerativas, como o parkson (ALOIZOUA A. M. ET AL., 2020).

É importante ressaltar que embora haja estudos demonstrado que a exposição aos agrotóxicos são fatores de risco para o desenvolvimento da SMD e podem estar relacionados a etiologia da doença, ainda há resultados conflitantes e é necessário demais pesquisas para se obter respostas mais bem elucidadas sobre essa questão (JIN et al., 2014).

### **1.5.1 Genotoxicidade dos Pesticidas como fator de risco para SMD**

Os pesticidas são produtos químicos caracterizados pela capacidade de controlar pragas e / ou ervas daninhas, mas também podem ser usados com o objetivo de controlar vetores de doenças (BARRÓN CUENCA et al., 2019). Além disso, permitem a produção em larga escala, aumentando a produtividade da lavoura, e promovem, com isso, o aumento de vendas e os lucros. No entanto, vale ressaltar, que esses produtos possuem níveis de toxicidade e podem ser prejudiciais aos organismos vivos, visto que também podem constituir uma ameaça à saúde humana (BARRÓN CUENCA et al., 2019).

A utilização de pesticidas na agricultura com objetivo de atingir uma produção em larga escala tem aumentado mundialmente desde a década de 50, e pesquisas que associam a exposição a esses produtos com risco de desenvolvimento de neoplasias também têm sido frequentes nas últimas anos. Sabe-se que a maioria das células, quando regularmente danificadas por agentes carcinogênicos, principalmente de origem ambiental, buscam reconhecer e corrigir as lesões de DNA a fim de manter a integridade genômica. Porém, devido à grande exposição e/ou manuseio de maneira não adequada de fatores carcinogênicos externos, os danos ao DNA podem não ser reparados, devido às alterações nos mecanismos de regulação e replicação celular, ocasionando crescimento celular desregulado e câncer (DIZDAROGLU, 2015).

Os processos carcinogênicos originados por meio do uso de agrotóxicos possuem os mais variados mecanismos de genotoxicidade e desenvolvimento de tumores envolvendo mediadores hormonais, imunológicos e a produção de moléculas oxidantes (peróxidos), que são moléculas altamente instáveis com capacidade de alterar a estrutura de lipídeos e proteínas na membrana celular, modificando a permeabilidade celular (RODVALL; DICH; WIKLUND, 2003).

A relação entre a exposição aos agrotóxicos e sua propriedade de desenvolvimento do câncer está relacionado com a capacidade de agentes genotóxicos interagirem quimicamente com o DNA, formando adutos, gerando alterações oxidativas e ocasionando danos na molécula de DNA, prejudicando genes cruciais para manutenção da estabilidade genômica (DE ADAD et al., 2015; KOIFMAN; HATAGIMA, 2003).

Portanto, os danos gerados por estas lesões podem levar a várias modificações biológicas, nas quais podem ser alterações cromossômicas, mutações, herdáveis ou não, epimutações, as quais levam a perda da estabilidade genômica e conseqüentemente a senescência



célular e/ou apoptose, características essas de doenças relacionadas a idade (JIN et al., 2014; LANGIE et al., 2015).

Quanto a relação da exposição a tais produtos químicos e a SMD, alguns estudos de metanálise tem demonstrado associação do uso de agrotóxicos com o desenvolvimento da doença e tal relação têm chamado a atenção nos últimos anos (JIE, JEN et al., 2014; MOSTAFALOUAND ABDOLLAHI, 2017). Tanto a exposição a curto quanto a longo prazo, assim como a exposição direta, relacionada ao contato direto que os trabalhadores possuem, e a indireta, como as que as pessoas que moram nas proximidades de áreas em que os agrotóxicos são aplicados, são preocupantes (BARRÓN CUENCA et al., 2019).

Em um estudo de metanálise pesquisadores avaliaram 11 trabalhos publicados sobre a relação da exposição aos agrotóxicos com o desenvolvimento da SMD em um período de 21 anos e identificaram informações de 1.942 casos de SMD com 5.359 controles. Entre os 5.359 controles, 3.853 pessoas eram pacientes hospitalizados sem condições relacionadas a doenças hematológicas e os 1506 restantes eram controles saudáveis. Por meio de questionário e/ou entrevista obtiveram informações de que um total de 1456 participantes foram expostos a pesticidas, e destes 323 desenvolveram SMD. Após uma análise minuciosa da heterogeneidade entre os estudos, os pesquisadores encontraram uma razão de chances de 2,04 para o desenvolvimento de SMD. Ao avaliar a estratificação da razão de chances em relação ao subtipo de SMD os pesquisadores encontraram um valor de 1,63 para os casos de baixo risco (tradicionalmente AR e ARSA). O aumento da razão de chances parece ser bem maior para as formas iniciais da SMD, com 63% de maior risco para anemia Refratária (AR) e anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA) e 49% para as anemias refratárias com excesso de blastos (AREB/AREBt). Além disso, o efeito dos agrotóxicos parecia ser mais evidente quando os pacientes analisados eram da Europa ou da Ásia (JIN et al., 2014).

Os possíveis mecanismos biológicos ligados ao desenvolvimento da SMD em relação aos pesticidas não são claros e necessitam de mais estudos. Acredita-se que os pesticidas possam levar a superexpressão de espécies reativas de oxigênio levando a extensas lesões do DNA, o que poderia, em segundo momento, levar a quebras cromossômicas, achado presente em 50% dos casos de SMD (JIN et al., 2014). Além disso, a reprogramação alterada do DNA devido a estímulos externos e estilo de vida podem estar intimamente associadas a falhas no processo de diferenciação celular, o que podem gerar uma reprogramação aberrante das células tronco hematopoiéticas,

principalmente, durante o processo de diferenciação mielóide e linfóide e, conseqüentemente, levar a doenças hematológicas, como a SMD e leucemias (AVGERINOU et al., 2017; PICCOLI et al., 2019).

## 1.6 Patogênese da SMD

A patogênese da SMD ainda é pouco compreendida e precisa ser melhor elucidada. O clone anômalo e geneticamente instável precursor de células hematopoiéticas se desenvolve após sofrer alterações genéticas, citogenéticas e epigenéticas, gerando mudanças funcionais nas células, o que pode progredir e levar a evolução da doença (NAEIM, F.; RAO, P. N.; GRODY, 2008); (VASSALLO, J.; MAGALHÃES, 2009); TORSTEN HAFERLACH, 2018).

O melhor modelo que descreve a patogênese da SMD é o de múltiplos passos que engloba alterações nas células tronco hematopoiéticas, nas quais podem ser causadas pela idade, devido ao encurtamento dos telômeros, pela exposição a agentes genotóxicos ou por alguma condição inflamatória medular (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014; CHAMSEDDINE et al., 2016; GARCIA-MANERO, 2015).

Acredita-se que mutações somáticas nas células-tronco pluripotentes contribuem para a patogênese dessa doença. Aproximadamente 80% dos pacientes com SMD apresentam mutação em mais de um gene, dos quais a maioria apresenta mutações que alteram a sequência e a função de oncogenes e genes supressores tumorais (BEJAR, 2014; CHAMSEDDINE et al., 2016; PAPAEMMANUIL et al., 2013).

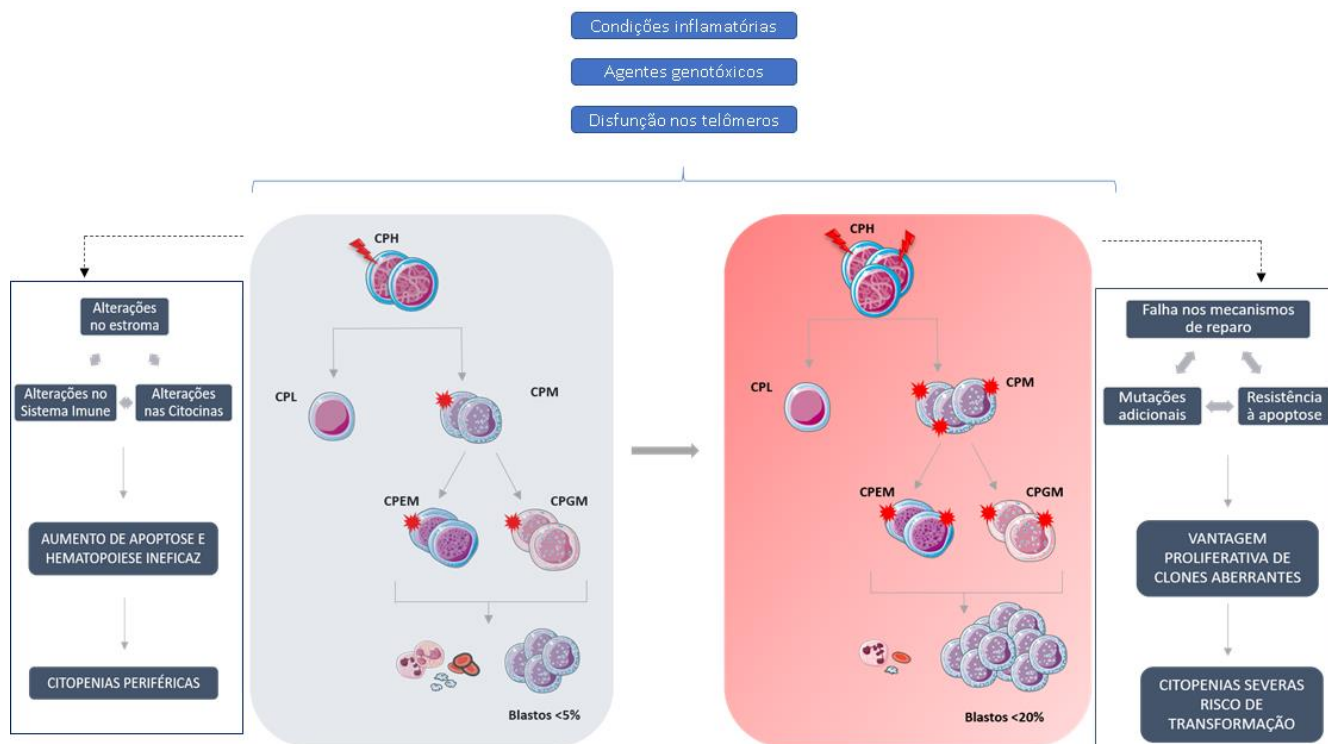
As transformações malignas ocorrem em várias etapas, devido a um acúmulo de defeitos de maturação e alterações cromossômicas, que dá origem a alterações moleculares e na função das células (BEJAR et al., 2011; ELIAS et al., 2013; UYANIK et al., 2016). Segundo Bejar e colaboradores (2011) as etapas associadas à patogênese da SMD incluem: auto-renovação de uma célula-tronco hematopoiética, aumento da capacidade proliferativa do clone, defeitos ou bloqueio de diferenciação, instabilidade genética e epigenética e supressão da hematopoiese normal (Figura 2).

Cerca de 80% dos pacientes diagnosticados com SMD apresentam pelo menos uma mutação somática e metade dos pacientes podem apresentar alterações cromossômicas (HOSONO, 2019; PAPAEMMANUIL et al., 2013). Apesar da maioria das alterações somáticas serem passageiras e não terem conseqüências direta para a

hematopoese, algumas mutações podem conferir diferenciação anormal, vantagem de sobrevivência à célula mutada e permitem a expansão clonal. Logo, a aquisição de mais de uma mutação em um clone expandido pode levar ao fenótipo característico da SMD, ou até da evolução para LMA. Vale ressaltar que as mutações somáticas geralmente identificadas na SMD estão agrupadas em genes que regulam oncogenes e genes supressores de tumor os quais geralmente participam da maquinaria de splicing, regulação epigenética e reparo do DNA (BEJAR et al., 2011; CHAMSEDDINE et al., 2016; PAPAEMMANUIL et al., 2013).

É de suma importância a atuação de um mecanismo de reparo totalmente eficaz e que responda aos danos de DNA, assim, as chances de que os dois tipos de mutações, em genes supressores de tumor ou em oncogenes, que levam a diferenciação anormal e aumento da proliferação ocorram dentro de uma mesma célula. Portanto, o risco de desenvolvimento de uma SMD ou LMA pode aumentar bastante quando esta maquinaria de reparo é deficiente. Assim como a funcionalidade inadequada deste mecanismo também pode aumentar o risco de acumular múltiplas mutações no DNA na mesma célula (T et al., 2015).

**Figura 2.** Representação esquemática sobre a patogênese da Síndrome Mielodisplásica



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

## 1.7 Reprogramação Epigenética

A Epigenética pode ser definida como alterações estáveis na função gênica, no qual são herdáveis durante a divisão celular, e que não apresentam alteração na sequência do DNA (YANG et al., 2018). Os mecanismos envolvidos na epigenética podem, em geral, atuar modificando a estrutura da cromatina e/ou de um determinado domínio cromossômico permitindo a expressão de alguns genes e o silenciamento de outros (RESZKA et al., 2018; YANG et al., 2018).

Dentre os mecanismos que envolvem a epigenética estão aqueles que consistem na adição de grupos químicos às caudas das proteínas que formam o nucleossomo, como as modificações das histonas (ubiquitinação, metilação e acetilação). Outro regulador epigenético são os RNAs não codificadores (*ncRNAs*), que ativam ou silenciam genes em um determinado domínio cromossômico ou atuam na regulação pós-transcricional a nível de RNA mensageiro (mRNAs), como os microRNAs (MOHAMMAD; MONDAL; KANDURI, 2009).

A metilação do DNA está entre os mecanismos mais estudados e consiste na adição de radical metil no carbono 5 da citosina, que pode, com isso, conferir o silenciamento gênico ou redução da atividade da região metilada (HORVATH; RAJ, 2018a). Nos mamíferos, este mecanismo é amplamente verificado no contexto CpG, visto que 80% dos eventos de metilação ocorrem em áreas ricas de citosina e guanina, as chamadas ilhas CpGs (HORVATH S., RAJ K., 2018). Apesar do silenciamento gênico ser um fator bastante considerável nos estudos do efeito da metilação, tem se mostrado apenas como uma das suas consequências, pois cada vez mais evidências sugerem que a metilação do DNA pode atuar em outros mecanismos (HORVATH; RAJ, 2018b).

Alterações neoplásicas podem decorrer de eventos genéticos e epigenéticos, no quais estes têm sido apresentados como importantes biomarcadores de câncer, estando associado principalmente a hipermetilação de genes supressores tumorais ou ainda a inativação de oncogenes (MACEDO, LUCIANA CONCI; MATTOS, JAQUELYNNE RODRIGUES; SILVA, 2016; UROSHLEV et al., 2020). Além disso, mecanismos epigenéticos podem estar associados a processos de apoptose, diferenciação, ciclo celular, dentre outros, o que torna a compreensão profunda destes mecanismos essencial na busca de biomarcadores de detecção precoce, prognóstico e diagnóstico de vários tipos de

câncer (MACEDO, LUCIANA CONCI; MATTOS, JAQUELYNNE RODRIGUES; SILVA, 2016; MARTAKULIS; MANELESTELLER, 2010)

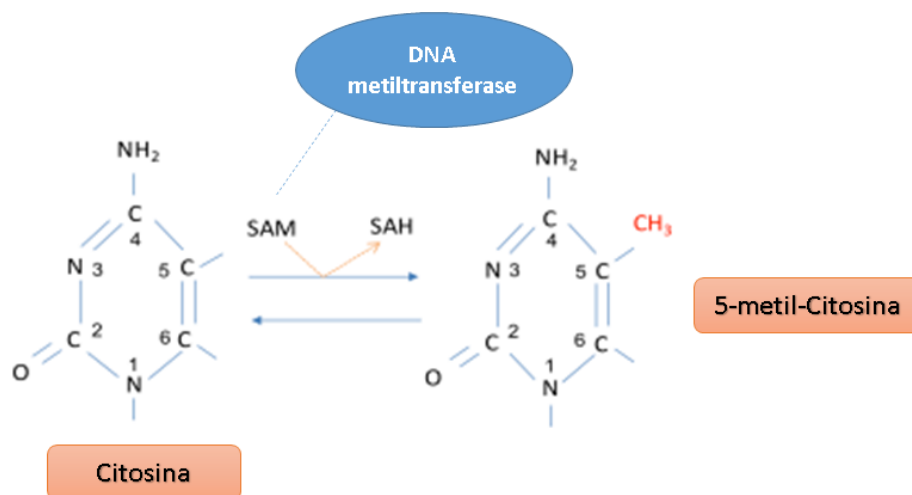
### 1.7.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais comum que, em conjunto com os demais mecanismos epigenéticos, é fundamental para o desenvolvimento normal de um indivíduo. Mas processos comuns, como o próprio envelhecimento, dieta e fatores ambientais, podem estar relacionados com alterações neste mecanismo (HOAD; HARRISON, 2017; HORVATH; RAJ, 2018a; SOUBRY et al., 2016; YANG et al., 2018).

A metilação do DNA é processo químico, reversível, caracterizado pela ligação covalente do grupo metil (CH<sub>3</sub>) ao carbono 5 da citosina, que é seguida por uma guaninano (CpG), resultando na conversão de citosina para 5-metilcitosina na sequência do DNA. Esse processo, na maior parte das vezes, leva a diminuição da atividade ou silenciamento gênico e tem seu processo catalisado por enzimas demetilases, as DNA citosina-5-metiltransferases (DNMTs) (Figura 3) (KATHIRVEL MARUTHAI, ELLAPPAN KALAIARASAN, NOYAL MARIYA JOSEPH, SUBHASH CHANDRA PARIJA, 2018).

As DNMTs são enzimas que atuam na catalização da inserção do grupo metil no carbono 5 da citosina no ponto CpG. São formadas por DNMT1, DNMT3A e DNMT3B, a primeira atua na manutenção dos padrões de metilação, enquanto as demais reestabelecem a metilação do DNA (Viviane Lamim Lovatel, 2020). A metilação é um processo reversível, portanto o processo de desmetilação pode ocorrer, seja de forma ativa ou passiva. Na forma ativa pode ser iniciada de duas maneiras, a primeira envolve a oxidação da 5-metilcitosina (5mC) e é catalisada por outras enzimas da família TET, e também conduzida pela enzima de edição de mRNA de apolipoproteínas B (APOBECs), que atuam na desaminação da 5mC e 5-hidroximetil (5hmC). Quando ocorre de forma passiva, a desmetilação ocorre durante a replicação por meio do processo de manutenção da metilação (LOVATEL et al., 2020). O equilíbrio entre estas enzimas que atuam na metilação e desmetilação do DNA são essenciais para manutenção da estabilidade genômica (LOVATEL et al., 2020).

**Figura 3.** Reação de metilação do DNA.



**Legenda:** O radical metil é adicionado ao carbono 5 da citosina sob a ação da enzima DNA metiltransferase que utiliza como co-fator a S-Adenosil Metionina (SAM) como doadora do grupamento metil, sendo liberado o composto S-Adenosil Homocisteína (SAH).

Adaptado de Futado, M., 2012.

Em câncer, estudos que avaliam o perfil de metilação, observam um padrão de hipometilação global dentro de regiões intergênicas, ou ainda, um perfil de hipermetilação em regiões promotoras do gene ricas em CG's. Este último tem sido associadas à inibição de diferentes vias de sinalização celular por meio do silenciamento de genes supressores de tumor, genes que atuam no reparo do DNA, controle do ciclo celular e diferenciação incompleta, relacionando a metilação do DNA diretamente com o processo de tumorigênese (DEXHEIMER et al., 2017; SAGHAFINIA et al., 2018). Ademais, análises dos níveis de metilação em genes reguladores podem fornecer informações sobre o seu envolvimento não apenas no câncer, mas também em outras doenças (UROSHLEV et al., 2020).

Embora o principal foco da metilação seja sua atuação na diminuição dos níveis de expressão gênica pelo silenciamento de regiões promotoras do gene, estudos que avaliam a metilação global do DNA tem demonstrado que este é apenas um dos desdobramentos do processo da metilação. Mecanismos como regulação de splicing, posicionamento do nucleossomo, recrutamento de fatores de transcrição e ativação de genes são alguns dos

processos que também estão envolvidos e são relacionáveis com o mecanismos de metilação do DNA (ROBERTO TIRADO-MAGALLANES, 2017). Desta forma, estudos que elucidem os processos moleculares que estão envolvidos com a metilação são de suma importância para melhor entendimento dos fatores naturais e patológicos em que a metilação está envolvida.

### **1.7.2 Metilação do DNA em SMD**

O mecanismo de metilação do DNA apresenta um papel essencial na autorrenovação e diferenciação das células tronco hematopoéticas (HSCs). Em células totalmente diferenciadas, assim como durante a diferenciação, envelhecimento celular e progressão da doença, a metilação do DNA é relativamente estável, e atua no controle do destino de células linfóides e mielóides por meio de silenciamento gênico (BENETATOS; VARTHOLOMATOS, 2018). A hipometilação global leva a instabilidade genômica, e a hipermetilação está mais associada ao silenciamento de genes supressores de tumor, dentre outros fatores que podem contribuir para o desenvolvimento de neoplasias (BENETATOS; VARTHOLOMATOS, 2018).

Alterações na maquinaria que atua nos processos de metilação envolvem principalmente a região R882 da enzima DNMT3A e são observadas em leucemias mielóide aguda (LMA), neoplasias mieloproliferativas (MPNs), leucemia mielomonocítica crônica (CMML) e também na síndrome mielodisplásica (Leonidas Benetatos, 2018). A progressão de SMD para LMA foi associada a hipermetilação, sugerindo que a hipermetilação pode estar relacionada a evolução clonal do tumor (LEONIDAS BENETATOS, 2018).

Mutações na enzima DNMT1, responsável por manter o padrão de metilação, são regularmente descritas na LMA e em SMD, correlacionando-se com um mau prognóstico (LEY T, 2010; CANCER GENOME, 2013; GEÓRGIA MUCCILLO DEXHEIMER, 2017). Spencer e colaboradores mostraram que a hipometilação é um evento inicial em paciente com LMA que possuem a mutação em DNMT3AR882H, mas a progressão da doença está relacionada com a hipermetilação da ilha CpG dependente de DNMT3A (DEXHEIMER et al., 2017; SPENCER et al., 2017).

Em estudo do nosso grupo que avaliou a metilação global em biópsias de pacientes com SMD e correlacionou com a expressão de genes atuantes no sistema de reparo do DNA mostrou haver um desequilíbrio na metilação do DNA em pacientes com SMD,



levando ao desenvolvimento de anormalidades cromossômicas associadas à baixa expressão de genes atuantes no reparo do DNA, como as DNA polimerases com atividade de translesão (TLS) (CAVALCANTE et al., 2020).

Vale ressaltar que na SMD, a hipermetilação é mais frequente em fases avançadas da doença, como já dito anteriormente, estando associado à regulação de vários genes que atuam em processos essenciais para manutenção da estabilidade genômica, como reparo do DNA, apoptose, angiogênese e ciclo celular (ISSA, 2010; TSAI et al, 2012).

Na SMD, fármacos inibidores da DNA metiltransferase, como a azacitidina (AZA) e decitabina são utilizados em estágios mais avançados da doença. Embora tenham sido inicialmente descritos como drogas citotóxicas, é sabido que tais medicações atuam na reversão da metilação anormal do DNA promotor, re-expressão de genes silenciados, como supressores tumorais (BAYLIN, JONES, 2011).

Compreender a reprogramação epigenética das CTHs durante processo de proliferação e diferenciação celular é um passo crucial na caracterização dos mecanismos envolvidos na epigenética e podem levar ao desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, assim como promover alternativas para o diagnóstico e tratamento não apenas da SMD, mas de outras doenças relacionadas com estes mecanismos, caracterizando a descoberta de novos biomarcadores.

## 1.8 Mecanismo de reparo do DNA

O sistema de reparo do DNA é um dos processos de suma importância para a maioria dos organismos vivos e está constantemente ativo, respondendo aos danos na estrutura do DNA por meio de vários mecanismos. Sua atividade é relevante tanto para células diferenciadas quanto para células precursoras que estão em proliferação, no qual objetiva manter a integridade e garantir estabilidade genômica, que conseqüentemente é essencial para manter a viabilidade e longevidade de um organismo. Estudos envolvendo tais mecanismos têm sido bastante incentivado, visto terem papel na iniciação e progressão de neoplasias (IYAMA; WILSON, 2013; KLINAKIS; KARAGIANNIS; RAMPIAS, 2020; TORGASHEVA et al., 2016).

Estão envolvidos no sistema de reparo uma rede de proteínas sensores, transdutores e efetores, permitindo um coordenado reparo de danos e garantindo a fidelidade na replicação do DNA. As proteínas podem atuar como sensores de danos, detectam todos os tipos de lesões estruturais na fita de DNA, como cortes, quebras de fita, lesões de replicações, dentre outras. Já proteínas que atuam como transdutores de sinal controlam as atividades em pontos de checagem e inicializando cascatas de sinalização de nucleoproteínas. E as proteínas efetoras atuam diretamente no dano de DNA e bloqueiam a progressão. Defeitos nesse mecanismo levam ao acúmulo de alterações genéticas que são responsáveis pela proliferação e sobrevivências de células cancerosas (KLINAKIS; KARAGIANNIS; RAMPIAS, 2020).

O mecanismo de reparo do DNA está dividido em duas grandes vias, a depender se a lesão é de fita simples ou de dupla fita do DNA. Para lesões na dupla fita do DNA (*Double Strand-Break* - DSB), os mecanismos atuantes poderão ser a Recombinação Homóloga (HR) e a Junção de Extremidades Não Homólogas (NHEJ) (BRENERMAN; ILLUZZI; WILSON, 2014; RIBEIRO et al., 2015).

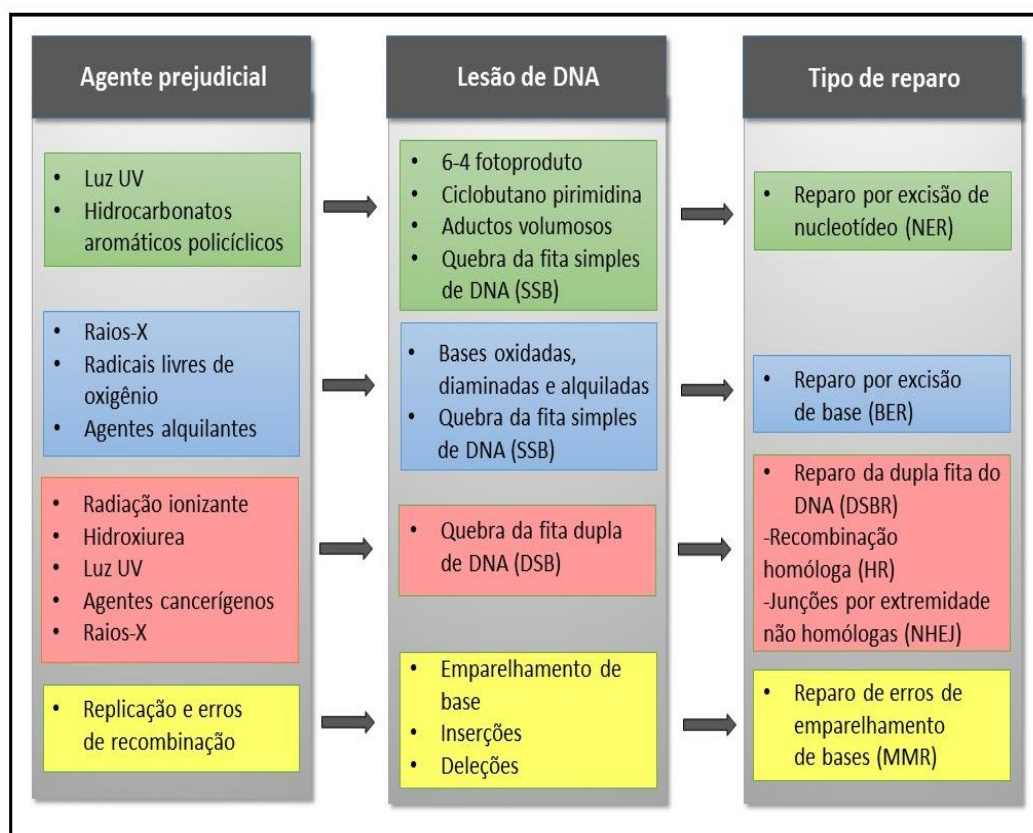
Nosso grupo tem desenvolvido importantes estudos para avaliar as lesões de fita de dupla na SMD, no estudo de Ribeiro e colaboradores (2013) foi identificado variações polimórficas do gene *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutada* – gene que atua na sinalização de lesão no DNA) associadas ao desenvolvimento de SMD de baixo risco e que polimorfismos dos genes de reparo do DNA são associados à patogênese da SMD (RIBEIRO, 2013).

Em um outro estudo do nosso grupo, Ribeiro (2016) demonstrou que pacientes diagnosticados com SMD que apresentavam cariótipo alterado mostravam diminuição da expressão do gene *XRCC6*. O gene *XRCC6*, que codifica a proteína Ku70, participa do dímero Ku70/Ku80 e é responsável por um papel crucial na via de NHEJ. Além disso, também foi demonstrado que genes relacionados aos mecanismos de reparo de dupla fita e de fita simples, *LIG4*, *BRCA2* e *ERCC6* também se apresentam com diminuição de expressão em pacientes com Hb < 8g/Dl (dependentes de suporte transfusional) (RIBEIRO, 2016).

Já em relação aos mecanismos atuantes em lesões de fita simples, esses podem ser divididos em: Reparação por Erros de Emparelhamento de Bases do DNA (MMR), Reparação por Excisão de Bases (BER) e Reparação por Excisão de Nucleotídeos (NER) (BRENERMAN; ILLUZZI; WILSON, 2014; RIBEIRO et al., 2015). Portanto, todas as vias de reparo são fundamentais para manutenção da estabilidade genômica e viabilidade dos organismos, pois as células estão constantemente sofrendo danos. Essas lesões podem ter origem em fonte endógenas, como espécies reativas de oxigênio e fontes exógenas, produtos mutagênicos, como agrotóxicos, e radiação (SAILAJA et al, 2006; JEPPESEN et al., 2011). A figura 4 sintetiza os principais agentes danificadores do DNA, lesões e as vias de reparo responsáveis pela remoção e reparação das correspondentes lesões de DNA.

É importante ressaltar que estudos recentes em epigenética têm demonstrado modificações da cromatina após danos de DNA, sugerindo que fatores específicos de remodelação da cromatina são fundamentais no sistema de reparo, isto é, fatores epigenéticos e de remodelação da cromatina podem cooperar com o sistema de reparo do DNA em resposta a danos (KLINAKIS; KARAGIANNIS; RAMPIAS, 2020).

**Figura 4.** Lesões de DNA e suas principais vias de reparo



Fonte: Adaptado de Jeppensen et al. (2011).

## **1.8.1. Mecanismos de Reparo de Fita Simples de DNA**

### **1.8.1.1. Reparo por excisão de base**

O reparo por excisão de base (Base Excision Repair – BER) atua nas classes mais abundantes de lesões espontâneas e induzidas que ocorrem no DNA e está destinado à maioria das lesões devidas à processos endógenos ou àqueles ocasionados por exposição a agentes químicos exógenos ou radiação (TORGASHEVA et al., 2016); DIANOV e HUBSCHER, 2013). O termo BER, originalmente, caracterizava um conjunto de processos enzimáticos que realizam o reparo de bases de DNA modificados quimicamente, como danos de hidrólise, danos oxidativos e danos alquilantes. Esses danos são inevitáveis, pois são produtos naturais da instabilidade do genoma ou são produtos de reações com agentes intracelulares produzidos naturalmente (BRENERMAN; ILLUZZI; WILSON, 2014).

O mecanismo de reparo por excisão de base reconhece bases danificadas que, na maior parte das vezes, não causam distorção significativa a hélice do DNA. Ademais, tem como característica ser eventualmente iniciado por uma das várias glicosilases existentes, que reconhecem e dão início ao processo de BER com o objetivo de remover a base danificada (SPRY et al. 2007; (WILSON et al., 2011). BER pode ser descrito em três etapas, primeiramente, há o reconhecimento de bases alteradas ou inadequadas por meio das glicosilases que clivam nucleotídeos anormais por hidrólise da ligação N-glicosilica entre a base e a desoxirribose, formando um sítio abásico. Em seguida, sítios apurínicos (perda de Adenina ou Guanina) ou apirimidínicos (perda de Timina ou Citosina) – (AP) são removidos por um AP-endonuclease ou AP-liase, que cliva o DNA na porção 5' ou 3' para o local AP, respectivamente. E então ocorre a excisão da base danificada. Neste momento o duplex de DNA está intacto, isto é, não há quebras na estrutura de fosfodiéster, mas há a ausência da base danificada, e por fim, dar-se a correção da região por meio de uma DNA polimerase e ligação da cadeia por uma DNA ligase (SPRY et al., 2007; TORGASHEVA et al., 2016).

### **1.8.1.2 Reparo de erros de emparelhamento de bases**

O reparo de emparelhamento de bases (Mismatch repairs – MMR), da mesma forma que os demais mecanismos de reparo, é essencial para a manutenção da estabilidade genômica (HERMANS et al., 2016). A funcionalidade do MMR está na remoção de bases

mal pareadas formadas por agentes exógenos e endógenos que causam deaminação, oxidação e metilação de bases, além de erros de pareamento decorrentes de inserções, deleções e erros de replicação (OZTURK; DEMIR, 2011).

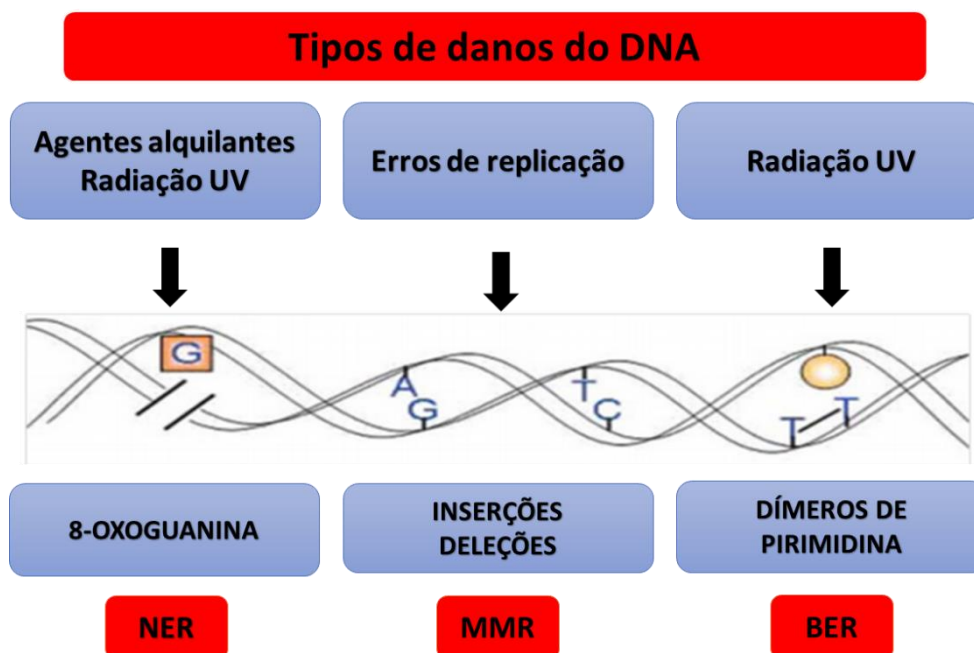
Os erros no processo de replicação do DNA podem incorporar um nucleotídeo errado a cada 10<sup>7</sup> adições e cerca de 0,1% desses erros gerados não são reparados pelo sistema MMR e podem levar a mutações (FISHEL, 2015). Além disso, o mau funcionamento do mecanismo MMR pode resultar em um aumento de 100 a 1000 vezes nas taxas de mutações espontâneas (HERMANS et al., 2016).

O mecanismo MMR inclui passos significativos para remoção do dano no DNA, como o reconhecimento da lesão, discriminação de fita, excisão e reparo (RICHMAN, 2015). Há três proteínas atuantes neste reparo, MutS, MutL e MutH, que estão envolvidas no processo de reconhecimento da incompatibilidade das bases e na incisão endonucleotídeo da cadeia de DNA recém-sintetizada (HERMANS et al., 2016). Em mamíferos, as proteínas homólogas MutS (MSH1-6, MLH1 e MLH3) e MutL (PMS1 e PMS2) são responsáveis pelo reconhecimento dos locais com erros de pareamento. Em seguida, as bases mal pareadas são excisadas pela enzima exonuclease I e então os nucleotídeos que faltam são sintetizados corretamente pela enzima polimerase  $\delta$  (OZTURK; DEMIR, 2011).

### **1.8.1.3 Reparo por excisão de nucleotídeo**

O reparo por excisão de nucleotídeo (Nucleotide Excision Repair – NER) é um mecanismo de reparo multiproteico que tem a capacidade de corrigir lesões no DNA que causam distorção em sua hélice, compreende danos que abrangem segmentos de 24 a 30 nucleotídeos na fita simples do DNA (DIZDAROGLU, 2015; ROUILLON; WHITE, 2011). O sistema NER é consideravelmente conservado e conta com a participação de 30 proteínas. Atua sobretudo em danos induzidos por radiação UV, como dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPDs) e fotoprodutos pirimidina 6-4 pirimidona (6-4 PPs), mas também por um grande número de agentes químicos exógenos, incluindo agentes ambientais como benzopirenos e quimioterápicos como a cisplatina (MARTEIJN et al., 2014; SCHÄRER, 2013a). Na figura 5 se encontra a síntese dos tipos de mecanismos atuantes nos três tipos de reparo de fita simples do DNA.

**Figura 5.** Apresentação esquemática dos tipos de mecanismos de reparo em danos de fita simples de DNA.



**Legenda:** NER Nucleotide Excision Repair; MMR DNA Mismatch Repair; BER Base Excision Repair.

#### 1.8.1.3.1. Proteínas da via NER

A verificação dos mecanismos de reparo do DNA se tornou possível graças a descrição de doenças precoces, como síndromes de doenças familiar, mas também pela investigação de bases genéticas e moleculares. Um desses mecanismos, o NER, é responsável por uma gama de lesões de DNA, incluindo aquelas desestabilizadoras da hélice do DNA induzidas por radiações UV, dentre outras (GRACIELA SPIVAK, 2015; (APOSTOLOU et al., 2019; ARAÚJO; KURAOKA, 2019).

Esta via contém uma variedade de proteínas atuantes em seu mecanismo e apresenta como principais participantes sete proteínas que compõem o Xeroderma Pigmentosum complementation group, de *XPA* a *XPG*, a proteína Excision Repair Complementing group 1 (*ERCC1*), a proteína homóloga humana da levedura *RAD23* (hHR23B), a Replication Protein A (*RPA*), as subunidades do *Transcription Factor* que possui atividade helicase (*TFIIH*) e as proteínas Cockayne Syndrome A and B (*CSA* e *CSB*) (BARAKAT; GAJEWSKI; A. TUSZYNSKI, 2012; BUDDEN; BOWDEN, 2013).

O mecanismo NER envolve três etapas (Figura 6), o reconhecimento de danos e consequente recrutamento de um complexo proteico de reparo para o local danificado, seguido da incisão na porção danificada dos nucleotídeos com posterior excisão da lesão no DNA. Por fim, a DNA polimerase promove a síntese da região excisada, utilizando a fita não danificada como molde, seguida da ligação da fita por meio de uma DNA ligase (SPRY et al., 2007; BUDDEN; BOWDEN, 2013).

O mecanismo NER em eucariotos pode ser descrito em duas formas que diferem entre si. Existe o reparo acoplado a transcrição (Transcription-Coupled Repair - TCR), que se refere à remoção mais rápida de danos das fitas transcritas de genes ativos; e há o reparo global do genoma (Global Genome Repair - GGR), que remove lesões em qualquer parte do genoma, independentemente de qualquer sequência específica ser transcrita ou não (MARTEIJN et al., 2014; ALEKSEEV; COIN, 2015; SOFIA J. ARAÚJO, 2019; ZIVKOS APOSTOLOU, 2019).

O GGR tem seu mecanismo ativado quando ocorre a detecção de lesões que causam distorção da hélice do DNA, o que leva a ligação dos complexos UVRAD23, CETN2 e o sensor de dano *XPC*, que com ajuda do complexo UVSSA reconhecem o dano e se ligam aos pares de base alterados. Já no processo de TCR, as lesões são detectadas quando a lesão altera a fita de DNA e isto promove o bloqueio da RNA polimerase II. Tal polimerase é afastada permitindo com que a lesão seja acessível ao mecanismo de reparo. Para isto estão envolvidas as proteínas *CSA* e *CSB*, que atuam junto com UV-stimulated scaffold protein A (UVSSA) e Ubiquitin-specific-processing protease 7 (USP7) (ALEKSEEV; COIN, 2015; MARTEIJN et al., 2014).

Os processos GGR e TCR continuam numa mesma via comum, após os passos descritos anteriormente, no qual um complexo multiprotéico, que inclui o TFIIF, é recrutado para ambos os processos. *XPB* e *XPD* que atuam nesse momento do mecanismo agem gerando relaxamento do DNA ao redor da lesão, o que permite que o subcomplexo *XPA-RPA* confirme a presença do dano e estabilize-o para a excisão das bases.

Neste momento, *XPA* age como proteína central da via NER, interagindo com as proteínas TFIIF, *RPA*, *XPC-RAD23B*, *DDB2*, *ERCC1-XPF* e *PCNA*, assim como com o DNA. Portanto, através dessas interações, *XPA* ocupa um papel central como um fator da via e possivelmente trabalha para garantir que todos os demais fatores estejam no local correto para que a incisão da lesão ocorra. Assim, *XPA* interage fortemente com a

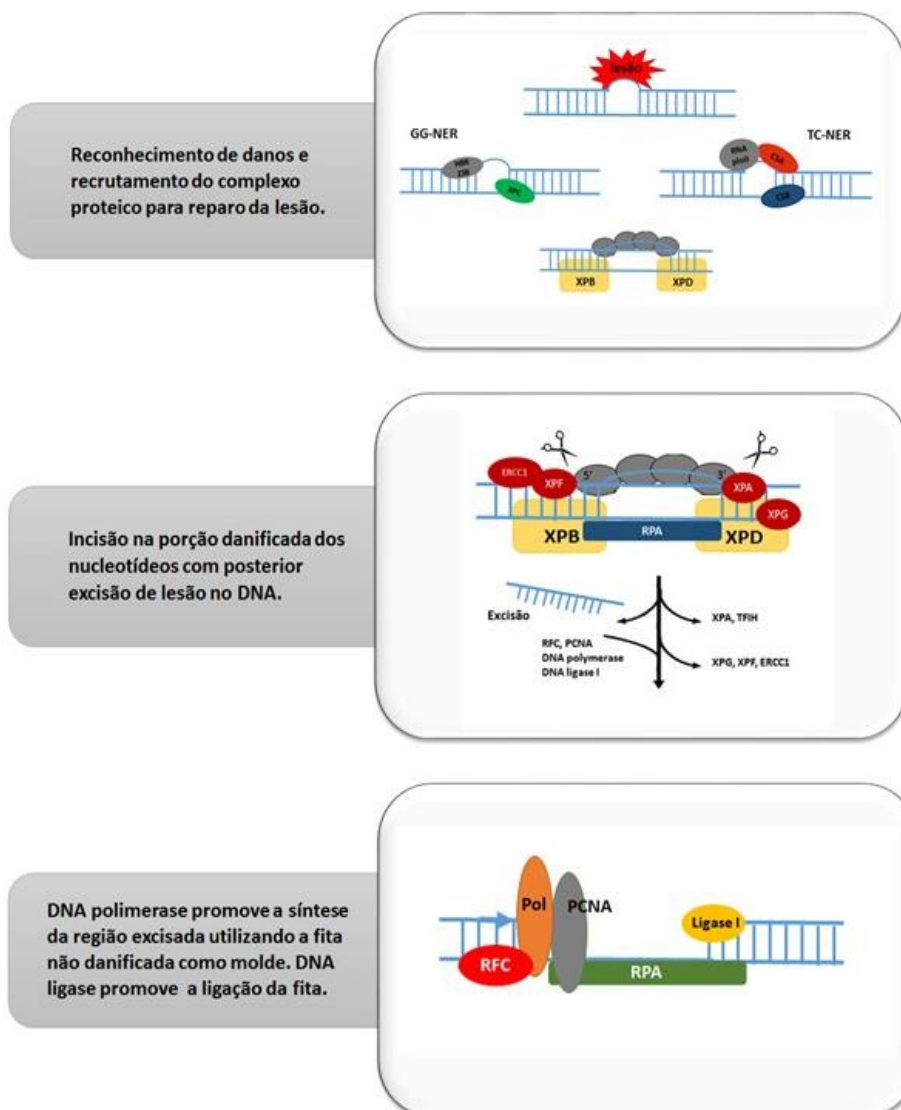


proteína de ligação de ssDNA RPA no complexo NER e acredita-se que os dois cooperem em sua ligação com o DNA (SOFIA J. ARAÚJO, 2019).

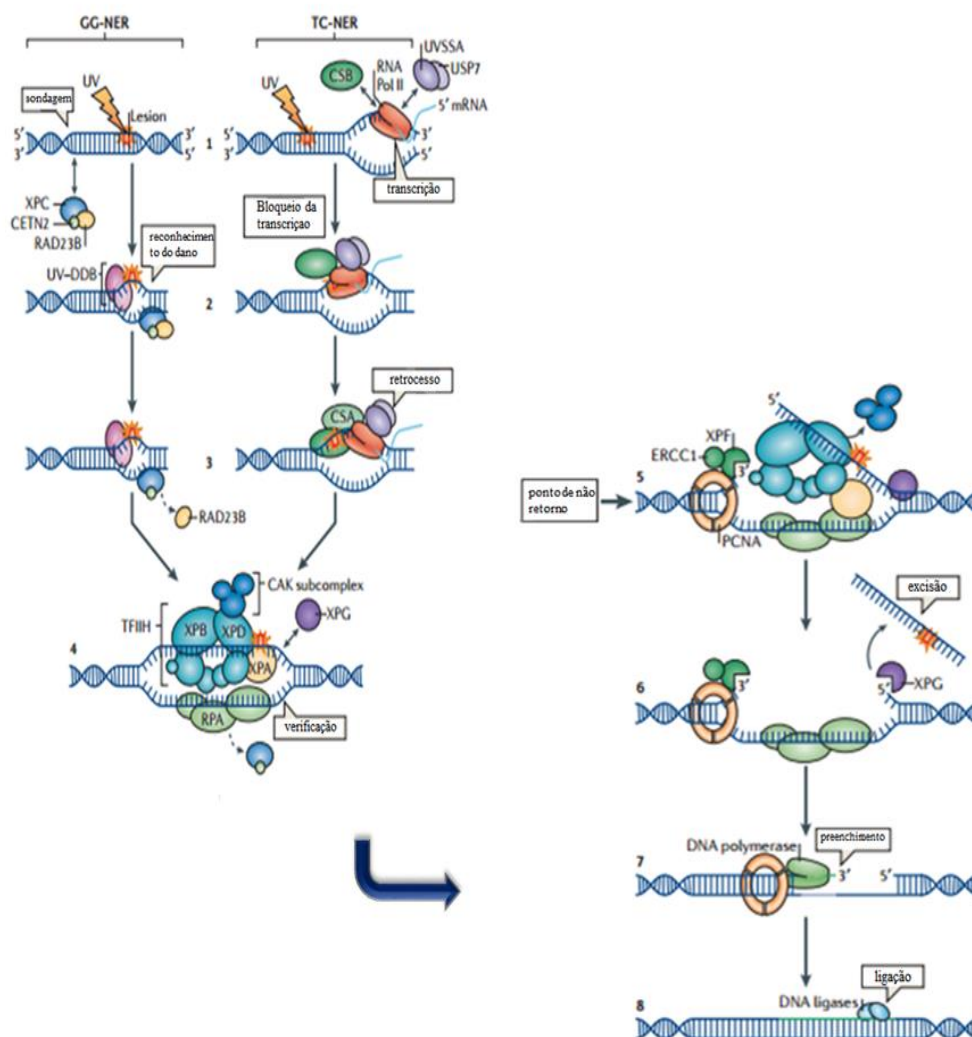
Em seguida, o complexo *ERCC1-XPF* endonuclease é direcionado para agir no processo de excisão de cerca de 24 a 30 bases que contém a lesão, neste momento *XPG* é ativado para cortar e permitir a excisão do dano. Segue-se com o recrutamento das proteínas *RFC*, *RPA*, *PNCA* e das polimerases  $\beta$  e  $\epsilon$  para realizar a síntese do novo DNA. Por fim, a fita é selada pela *XRCC1*-DNA ligase III (*LIG3*) ou pela *FEN1*-DNA ligase I (*LIG1*) (FOUSTERI e MULLENDERS, 2008; MARTEIJN et al., 2014). O mecanismo completo da via NER encontra-se ilustrado na figura 7.

Defeitos funcionais nos genes das proteínas associadas ao NER são relacionados a autossômicas recessivas, como o Xeroderma Pigmentoso e síndrome de Cockayne's, cujos sintomas relacionados envolvem câncer de pele e problemas neurológico. Além de vários tipos de cânceres também estarem associados a alterações na via NER, outras doenças síndromes humanas também estão associadas a mutações envolvidas nessa via, como a síndrome cerebro-óculo-facioesquelética (COFS), a síndrome UV-sensível (UVSS) e a rara combinação XP / CS (IYAMA e WILSON, 2013; PERERA et al., 2016; SOFIA J. ARAÚJO, 2019; ZIVKOS APOSTOLOU, 2019).

**Figura 6.** Apresentação esquemática das etapas e das principais proteínas atuantes no mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo (NER).



**Figura 7.** Representação esquemática completa das vias do reparo por excisão de nucleotídeo (Nucleotide excision repair pathways – NER).



**Legenda:** Via NER em mamíferos: GG-NER (Genome Global Repair) e TC-NER (Transcription-Coupled Repair). (1-3) O complexo XPC-RAD23B reconhece a mudança estrutural induzida pelo dano ao DNA como primeiro passo do GG-NER. TC-NER é iniciado por bloqueio da RNA polimerase II (RNAP) pela lesão, a qual bloqueia a transcrição de um gene ativo. Após esses passos de reconhecimento inicial, as duas vias envolvem os mesmos componentes proteicos. (4) Seguindo o reconhecimento, o complexo TFIIH é recrutado. Através da atividade das helicases XPB e XPD, TFIIH promove a abertura da fita dupla de DNA ao redor da lesão, facilitando o recrutamento de XPA e RPA. (5) O complexo XPF-ERCC1 é recrutado para a lesão através de interação direta com XPA, enquanto XPG é especificamente engajada através de interação com TFIIH. (6-7) As duas endonucleases, XPF-ERCC1 e XPG removem o fragmento oligonucleotídico que contém o dano e a DNA polimerase se encarrega de realizar a síntese de reparo em cooperação com RFC e PCNA. (8) Finalmente a abertura é selada tanto pelo complexo XRCC1-LIG3 como pelo FEN1-LIG1. (FONTE: Adaptado de MARTEIJN et al., 2014)

A pesquisa e elucidação de genes de reparo do DNA são bastante significativos para a Medicina, visto a importância para a saúde humana da manutenção de tais mecanismos de reparo do DNA, que são cruciais para integridade do genoma. Na tabela 2 se encontra, de forma resumida, as principais funções dos genes de reparo relacionado aos danos de fita simples avaliados neste estudo.

Ademais, lesões causadas por agentes externos e que são contribuintes para o desenvolvimento de neoplasias requerem um maquinário efetivo de reparo do DNA, pois podem ser fatores contribuintes para o surgimento de alterações genéticas e epigenéticas. Portanto, compreender o possível mecanismo atuante em alterações nos genes de reparo do DNA é de suma importância para melhor entendimento de processos patológicos na síndrome mielodisplásica.

**Tabela 2.** Função dos genes avaliados nesse estudo.

<i>GENES</i>	<i>FUNÇÕES</i>
<i>XPC</i>	Proteína de ligação ao DNA que reconhece lesões UV no GGR e recruta proteínas de reparo. Pode detectar facilmente danos 6-4 PPs com o auxílio de <i>XPE</i> .
<i>XPA</i>	Verificação de dano que foi reconhecido e marcado por <i>XPC</i> e <i>XPE</i> e complexo <i>TFIIH</i> . Permite ligação do complexo <i>XPF-ERCC1</i> .
<i>XPG (ERCC5)</i>	Endonuclease que faz a primeira incisão 3' a lesão UV.
<i>CSA (ERCC8)</i>	Junto com <i>CSB</i> , desloca RNA polimerase e age para recrutar proteínas de reparo.
<i>CSB (ERCC6)</i>	Junto com <i>CSA</i> , desloca RNA polimerase e age para recrutar proteínas de reparo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil de metilação dos genes de reparo de fita simples do DNA em agricultores expostos a agrotóxicos e em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o perfil de metilação dos genes *XPA*, *XPC*, *XPG*, *CSA* e *CSB* em amostras de DNA de agricultores expostos e não expostos a agrotóxicos;
2. Associar o perfil de metilação dos genes de reparo de fita simples com as variáveis de caracterização dos agricultores expostos a agrotóxicos;
3. Avaliar o perfil de metilação dos genes *XPA*, *XPC*, *XPG*, *CSA* e *CSB* em amostras de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica;
4. Associar o perfil de metilação dos genes de reparo de fita simples com as variáveis sociodemográficas e clínicas dos pacientes com síndrome mielodisplásica;
5. Avaliar o perfil de metilação dos genes *XPA*, *XPC*, *XPG*, *CSA* e *CSB* em amostras de DNA de pessoas saudáveis e que não trabalham com agricultura;
6. Associar o perfil de metilação entre os grupos do estudo, pacientes portadores de SMD com os grupos de agricultores expostos e não expostos a agrotóxicos, assim como com os controles saudáveis;
7. Correlacionar o perfil de metilação com a expressão gênica previamente estabelecida dos genes de reparo de fita simples do DNA dos pacientes com SMD;
8. Correlacionar o perfil de metilação com a expressão gênica previamente estabelecida dos genes de reparo de fita simples do DNA dos agricultores exposto à agrotóxicos;

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Nesse estudo foi avaliado o perfil de metilacao de 135 indivíduos assim distribuídos: Um grupo com forte fator de risco para a doença (90), caracterizado pelos agricultores; um segundo grupo, grupo doença, de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (56); e um terceiro grupo composto por pessoas saudáveis e não expostas a agrotóxicos em nenhum momento da vida (10 casos). Além das análises de metilação, este estudo associa os resultados de metilação a dados de expressão gênica obtidos em estudos e experimentos prévios.

#### **3.1 Aspectos éticos da Pesquisa**

A pesquisa foi submetida a dois processos e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará/PROPESQ-UFC (número dos processos: 69177217.0.0000.5054/45116415.6.0000.5054) através do sistema da Plataforma Brasil, utilizando-se de Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e questionário livremente respondido pelos agricultores, os mesmos se encontram na sessão apêndice. A equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. A representação esquemática das metodologias utilizadas neste estudo encontra-se apresentadas na figura 14.

#### **3.2 Seleção das amostras para os grupos de estudo**

Foram incluídas neste estudo 69 amostras de *pool* celular de medula óssea de agricultores que trabalhavam no município de Limoeiro do Norte – CE. O município encontra-se localizado no Nordeste do Brasil, no semi-árido do Estado do Ceará, exatamente na microrregião do Baixo Jaguaribe. Foram obtidas informações por meio de um questionário semiestruturado adaptado de Rigotto 2010 (Apêndice A) destinado à avaliação do modelo de vida e trabalho dos agricultores rurais.

Os agricultores doadores de medula óssea foram estratificados em dois grupos – agricultores expostos e agricultores não expostos a agrotóxicos. No entanto, vale ressaltar que dentro dessa divisão há uma subdivisão em três grupos, conforme o modo de

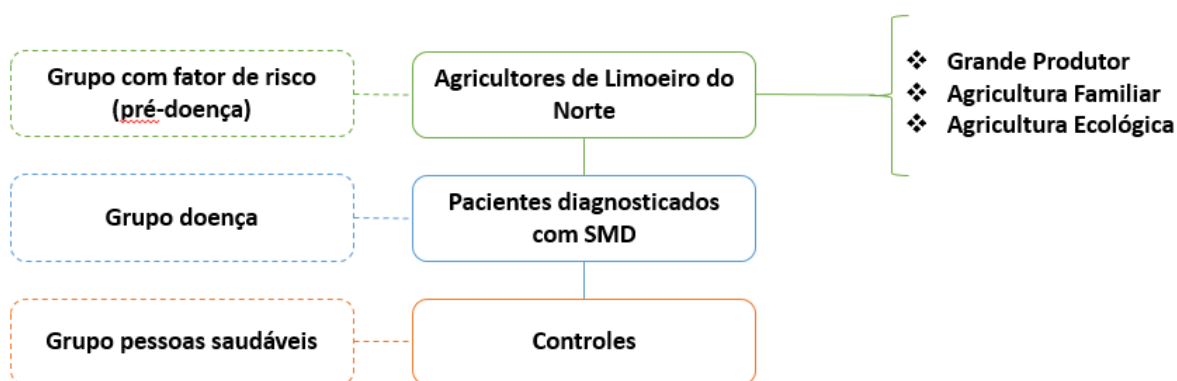
produção dos agricultores (RIGOTTO, 2010), e considerando os setores agrícolas da cidade de Limoeiro do Norte:

- ❖ Grupo 1. Grande Produtor (trabalhadores do agronegócio);
- ❖ Grupo 2. Agricultura Familiar (trabalhadores do segmento pequeno produtor);
- ❖ Grupo 3. Agricultura ecológica (trabalhadores do segmento agroecológica).

Foram adicionados também a esse estudo 56 amostras de *pool* medular de pacientes diagnosticados com SMD de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (SWERDLOW et al, 2008), atendidos em um hospital terciário de referência da Universidade Federal do Ceará no período de 2008 a 2017. Os dados clínico-laboratoriais foram obtidos a partir de revisão de prontuário.

Além disso, um terceiro grupo, pessoas saudáveis, foi incluído no estudo. Caracterizado pela obtenção de *pool* medular de 10 controles saudáveis e não expostos a agrotóxicos. A medula óssea dos doadores saudáveis foi coletada após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Na figura 8 encontra-se uma síntese dos grupos definidos neste estudo.

**Figura 8:** Representação esquemática de todos os grupos incluídos nesta pesquisa.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### **3.3 Obtenção das amostras do pool medular**

Foram coletadas amostras de medula óssea em tubos de vidro Vacutainer® contendo EDTA, 3ml de medula óssea destinado a realização da Citogenética Clássica e 5mL para os procedimentos de extração de RNA e DNA a fim de realizar os experimentos designados posteriormente. As coletas de MO foram realizadas em todos os participantes deste estudo e todas as amostras de medula óssea foram coletadas por um médico hematologista experiente.

Para a separação das células do pool celular da medula óssea realizou-se a transferência da amostra para um tubo do tipo Falcon de 50mL onde foi lavada com solução de lise (25mL de solução de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato de amônio 0,01M). O conteúdo foi agitado lentamente por 3 minutos e centrifugado a 13200 rpm por 10 minutos a 4° C. Em seguida foi desprezada a fase aquosa e acrescentado 250µL de PBS, dependendo do volume do material obtido. Posteriormente foi acrescentado 750uL de Trizol LS Reagent® (Invitrogen, EUA) para cada 250uL de volume de PBS aplicado no pool medular. O material foi homogeneizando com pipeta até dissolução completa. Após este procedimento, o material foi armazenado no freezer a -80°C para posterior extração de RNA e DNA (ver sessão 3.5.1 e 3.6.1, respectivamente).

### **3.4 Cariótipo por bandeamento-G**

A Citogenética Clássica foi realizada de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceará, segundo a técnica descrita por Chauffaille e adaptada por Pinheiro (PINHEIRO et al, 2009). A medula óssea foi colhida em heparina e de forma estéril foi dividida em dois frascos contendo 7mL de meio RPMI 1640 (pH 7,0), 3mL de soro fetal bovino e 100µl de L-glutamina. Este material foi cultivado por 24 horas em estufa a 37°C. Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 50uL de colchicina (Colcemid®) por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspensão em solução hipotônica de KCl 0,075M e fixado em solução de ácido acético e metanol (proporção 3:1), por 4 vezes. Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia óptica e em seguida foram aquecidas por 3 minutos em micro-ondas em alta potência. O bandeamento foi realizado pela técnica de tripsina e as bandas coradas com o Kit



Panótico®. Foram analisadas pelo menos 20 metáfases de cada paciente, sendo capturadas e analisadas em sistema computadorizado com software para cariotipagem: CytoVision® (Figura 9). Os resultados das análises citogenéticas de medula óssea foram estabelecidos de acordo com os critérios do Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (SHAFFER E TOMMERUP, 2014).

**Figura 9:** Representação esquemática da Metodologia de Citogenética Clássica por Bandeamento-G.

### **3.5 Pirosequenciamento pós-modificação do DNA com bissulfito de sódio**

#### **3.5.1 Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada a partir da utilização do Trizol Reagente® de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para cada  $10^6$  células armazenadas em 1mL de Trizol Reagente® foram adicionados 200 $\mu$ L de Clorofórmio para desproteinização. Posteriormente, o material foi centrifugado a 11.000 rpm por 15 minutos a 2° C. O RNA presente na fase aquosa foi transferido para um microtubo estéril de 1,5mL para posterior procedimento de extração de RNA total e realização de estudos de expressão gênica. Após a completa remoção da fase aquosa (RNA), foi isolada a interfase (DNA) da fase orgânica (Proteínas e compostos fenólicos) e posteriormente precipitação do DNA com 300 $\mu$ L de etanol absoluto por mL de Trizol Reagente® e misturado por inversão por 3 minutos.

Posteriormente, as amostras foram incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente e em seguida a sedimentação por centrifugação por 2000 rpm, por 5 minutos a 4°C. Após a remoção do sobrenadante (Proteínas), o pellet de DNA foi lavado com um 1mL de solução 0,1 M de Citrato de Sódio em Etanol 10%. O pellet de DNA com a solução de lavagem foi incubado por 30 minutos em temperatura ambiente, com inversão periódica, e posterior centrifugação em 2000 rpm, por 5 minutos a 4°C. Após a lavagem, o pellet de DNA foi ressuspenso em 2mL de etanol 75%, armazenado por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugado por 2000 rpm, por 5 minutos a 4°C. O pellet de DNA, em tudo aberto, ficou exposto por 15 minutos para secar, em seguida foi ressuspenso em 350 $\mu$ L de NaOH 8mM pH~8,4 e, por fim, armazenado a -20°C para realização de posteriores experimentos.

Foram realizadas leituras espectrofotométricas nos comprimentos de ondas de 220, 260 e 280 nm para aferição de pureza, concentração e contaminação das amostras. Foram analisadas amostras com relação  $A_{260}/A_{280} > 1,8$ .

#### **3.5.2 Modificação do DNA por Bissulfito de Sódio**

O DNA extraído foi modificado pelo tratamento com bissulfito de sódio, o qual consiste na desaminação das citocinas não metiladas em uracilas. Assim, na realização da PCR, a *Taq DNA polimerase* reconhece essa uracila como timina. Já as citocinas

metiladas não sofrem desaminação e permanecem inalteradas (Figura 10) (PATTERSON et al.,2011 procurar).

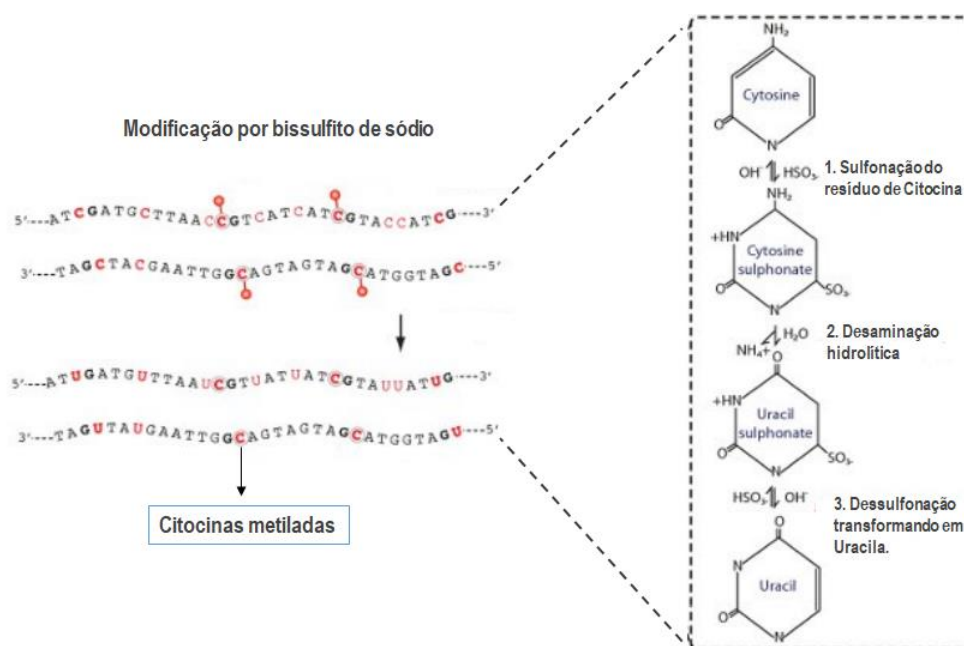
A modificação foi realizada utilizando o EZ DNA Methylation Kit (ZymoResearch) de acordo com as recomendações do fabricante. Um total de 500 ng de DNA genômico foi utilizado para realizar a modificação por bissulfito. Primeiramente, foi preparado o reagente de conversão (CT), no qual foi adicionado 750  $\mu$ L de água ultrapura e 210  $\mu$ L do tampão M-Dilution ao tubo CT, em seguida foi para o vortex por 10 a 30 minutos para total dissolução. Também foi necessário preparar o tampão de lavagem (M-Wash) pela adição de 24 mL de etanol 100% aos 6 mL do tampão M-Wash.

Foram adicionados 5  $\mu$ L de M-Dilution à amostra de DNA e seu volume ajustado para 50 $\mu$ L com água ultrapura e incubado a 37°C durante 15 minutos. Em seguida foram adicionados 100  $\mu$ L do reagente de conversão preparado a cada amostra. Logo após foi realizado uma condição alternativa de incubação (Illumina Infinium Methylation Assay) do protocolo que consistiu em incubar as amostras no termociclador Veriti (Applied Biosystems) a 95°C por 30 segundos, 50°C por 60 minutos, repentinando 16 vezes (16 ciclos). Após a ciclagem as amostras foram mantidas a 4°C por 10 minutos.

Finalizada a incubação, foram adicionados 400  $\mu$ L de tampão de ligação M-Binding à coluna fornecida pelo kit, esta foi inserida em um tubo coletor de 2 mL. Em seguida a amostra foi transferida para a coluna e foram centrifugadas por 30 segundos a  $>10.000$  xg e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 100  $\mu$ L de tampão de lavagem M-wash à coluna e centrifugado por 30 segundos a  $>10.000$  xg. Foram adicionados 200  $\mu$ L do tampão de dessulfonação M-Desulphonation e incubado a temperatura ambiente (20-30°C) durante 15-20 minutos.

Ao terminar a incubação, as amostras foram centrifugadas por 30 segundos a  $>10.000$  xg, lavadas com 200  $\mu$ L de M-Wash, centrifugadas por 30 segundos a  $>10.000$  xg, esse processo foi repetido por mais duas vezes. Por fim, a coluna foi colocada em um tubo de 1,5 mL e foram adicionados 10  $\mu$ L do tampão de eluição (M-Elution) diretamente na matriz da coluna. Em seguida a coluna foi centrifugada por 30 segundos a  $>10.000$  xg para eluir o DNA, estando pronto para análise imediata ou armazenado a -20°C para realização de experimentos posteriores.

**Figura 10.** DNA tratado com bissulfito de sódio.



**Legenda:** A figura mostra o tratamento com bissulfito de sódio promovendo a conversão do DNA não metilado em uracila e posteriormente em timina, já a citosina metilada continua sendo citosina.

### 3.5.3 Determinação das sequencias e desenho dos primers

O DNA modificado por bissulfito foi amplificado utilizando primers específicos para os genes alvos do estudo (Tabela 3). A análise de metilação dos genes de interesse foi realizada em colaboração com o Instituto Nacional do Câncer (INCA). Para o desenho dos primers e das sondas de pirosequenciamento, os pontos CGs com maior grau de correlação com a expressão dos genes selecionados foram determinados de acordo com a base de dados UCSC Genome Browser, levando em consideração as doenças mielodisplásicas e mieloproliferativas, como a leucemia mieloide aguda – LMA (<http://genome.ucsc.edu/>). Para confirmação das ilhas CpGs dentro de cada região foi utilizado o programa *Methprimer* (LC Li et al, 2002).

**Tabela 3.** Sequências dos *primers* utilizados no estudo.

GENES DE REPARO	PRIMERS	AMPLICON (PB)	SEQUÊNCIA ANALISADA
<i>CSA</i>	Foward (5'-3'): GGAAAGTGTGGGGTAAAGTT Reverse biotina (5'-3'): ACTCCTTCACTTCCCTAAC Sequência: GAAGAGGGTTTTTTAA	467	aTTYGtttgYGtgYGgaTaaaaTTTTagTatat
<i>CSB</i>	Foward (5'-3'): ATGTTGGAGTTGTTATTTTAAAGAGA Reverse biotina (5'-3'): ACATAAATTCCACTCCCAATACA Sequência: GTTTGTAAATGTTGTTG	343	ttaYgTgaTtTTaYGTaGtYGTttaaTgtTgtTat TtTgtgaTa
<i>XPA</i>	Foward biotina (5'-3'): GGAGAGGGAAGGGGAAAG Reverse (5'-3'): CCAAAATCACACAACTTTAACTATCA A Sequência: GTGTTGAGATTATATTTTA	578	YGaTTtggtTaTTtttaaaataggTtYGTtgggtgatt TagagtataggTttt
<i>XPC</i>	Foward (5'-3'): TATGAGGGGAAGTTAGGTGG Reverse biotina (5'-3'): AATTACCCAAACAACAATAACTC Sequência: AAAACCTAATAAAAATTACT	552	ACRCRCRTTCCRCRCRRTAAAAACAA CCC
<i>XPG</i>	Foward (5'-3'): AAGATAGGTTTAGAGAATGGT Reverse biotina (5'-3'): AAAACAAATAACCACCAAAACA Sequência: AAATACTACAAAC	330	RcaAaaaatataCRtcatAtACRAaAACRAaAct tcCRcct

Y, símbolo para base degenerada C ou T.

### 3.5.4. Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e eletroforese

Após tratamento com bissulfito de sódio foi utilizado 25ng de DNA modificado para realização da amplificação, que foi realizada a partir da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). As reações de amplificação foram preparadas utilizando 0,25 µL enzima *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 5 µL de Buffer, 1 µL de dNTP, 2 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de primer e 0,26 µL de sonda, 39,25 µL de água ultra pura e 1 µL de DNA (~25 ng) completando o volume final de 50 µL para a reação. As condições para ciclagem de temperatura foram as seguintes: desnaturação inicial a 95° C por 15 minutos, seguidos de 50 ciclos de desnaturação a 95° C por 40 segundos; anelamento (temperatura variável, a depender da padronização de cada gene) por 40 segundos; extensão a 72° C por 40 segundos, finalizando com uma extensão final a 72° C por 10 minutos. As condições para cada gene foram previamente estabelecidas e estão apresentadas na tabela 4.

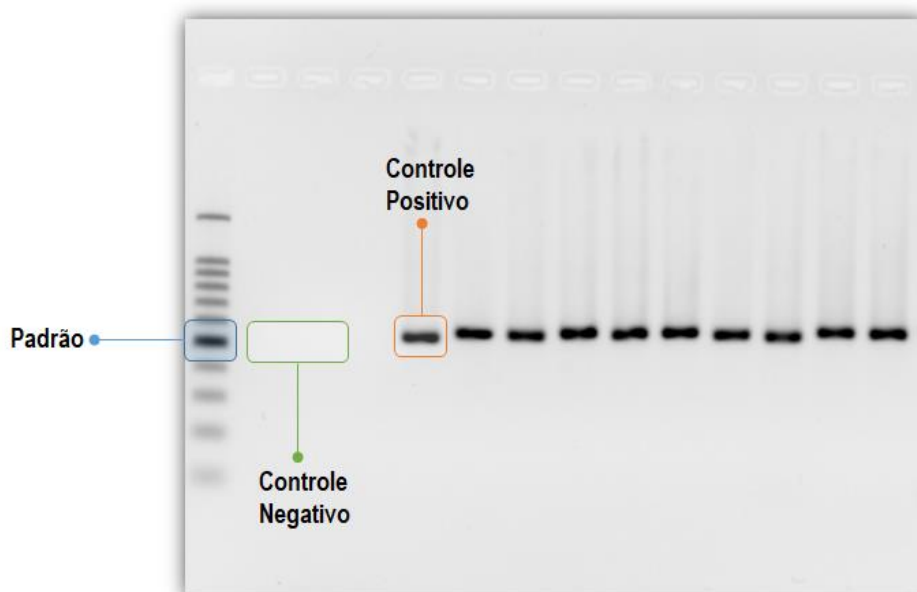
Para cada vez que as amostras eram colocadas para amplificar por meio da PCR, um controle negativo, ausente de DNA genômico, e um controle positivo, amostra de

linhagens (TE1/TE13) também eram acrescentadas para posteriormente correrem na eletroforese e assim avaliar se houve ou não possível contaminação.

Após a reação de PCR, os fragmentos resultantes foram analisados em um gel de agarose 2,0%, utilizando o padrão de peso molecular de 100 pares de base. Após a corrida, o gel foi revelado no aparelho de detecção de quimioluminescência de luz visível, ChemiDoc (Bio Rad®), para visualização das bandas (Figura 11).

Os produtos da PCR, com volume de 40µL por poço, foram colocados em placas Axygen de 96 poços e seladas com filme adesivo Axygen para posteriormente seguirem para o passo de sequenciamento. Foram adicionadas em cada placa um controle positivo (linhagem TE1/TE13).

**Figura 11.** Gel de agarose revelado no aparelho ChemiDoc (Bio Rad®).



**Legenda:** A figura mostra o gel de agarose contendo produtos de amplificação. No primeiro poço à esquerda do gel temos o padrão de peso molecular de 500 pb. No segundo e terceiro poços podemos observar os controles negativos das reações, no quarto poço o controle positivo, enquanto nos demais poços são visualizadas amostras.

**Fonte:** Dados do autor

**Tabela 4.** Componentes da reação e condições para amplificação de cada gene alvo.

GENES DE REPARO	T(°C) DE ANELAMENTO	CONDIÇÕES DA PCR	MIX (POR REAÇÃO)
CSA	60	95°C por 15 minutos 95°C por 40 segundos 60°C por 40 segundos (50 ciclos) 72°C por 40 segundos 72°C por 10 minutos 18° ∞	H2O: Buffer: 5 dNTP: 1 MgCl2: 2 Primers: 1 Taq Platinum: 0,26 Amostra: 1
CSB	58	95°C por 15 minutos 95°C por 40 segundos 58°C por 40 segundos (50 ciclos) 72°C por 1 minuto 72°C por 10 minutos 18° ∞	H2O: Buffer: 5 dNTP: 1 MgCl2: 2 Primers: 1 Taq Platinum: 0,26 Amostra: 1
XPA	58	95°C por 15 minutos 95°C por 40 segundos 58°C por 40 segundos (50 ciclos) 72°C por 40 segundos 72°C por 10 minutos 18° ∞	H2O: Buffer: 5 dNTP: 1 MgCl2: 2 Primers: 1 Taq Platinum: 0,26 Amostra: 1
XPC	58	95°C por 15 minutos 95°C por 40 segundos 58°C por 40 segundos (50 ciclos) 72°C por 40 segundos 72°C por 10 minutos 18° ∞	H2O: Buffer: 5 dNTP: 1 MgCl2: 2 Primers: 1 Taq Platinum: 0,26 Amostra: 1
XPG	58	95°C por 15 minutos 95°C por 40 segundos 58°C por 40 segundos (50 ciclos) 72°C por 40 segundos 72°C por 10 minutos 18° ∞	H2O: Buffer: 5 dNTP: 1 MgCl2: 2 Primers: 1 Taq Platinum: 0,26 Amostra: 1

### 3.5.5. Sequenciamento

Após a etapa de amplificação, o produto da PCR foi sequenciado pela técnica de pirosequenciamento utilizando o sistema *PyroMark Q96* (Qiagen), que depende da atuação de quatro enzimas: DNA polimerase I, ATP sulfúrilase, luciferase e apirase; além de seus substratos: adenosina fosfossulfato (APS), luciferina e o DNA molde.

Os produtos de PCR contidos na placa de 96 poços foram transferidos para uma nova placa do pirosequenciamento e coletados utilizando “beads” revestidas com estreptavidina diluídas em tampão de ligação (10 mM Tris-HCl; 2 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% Tween 20 – pH 7,6) para promover a ligação apenas das fitas biotinizadas. Em seguida, foram submetidas à agitação por 10 minutos. Após esse período, as “beads” foram aspiradas utilizando a “Vacuum Prep Workstation”, lavadas com etanol 70%, desnaturadas com NaOH 0,2 M e lavadas com o tampão de lavagem (10 mM Tris-Acetato – pH 7,6). Depois, foram adicionados 40 µL da solução de *primer* de sequenciamento 0,4 mM diluído em tampão de anelamento (20 mM Tris-Acetato; 2 mM MgAc<sub>2</sub> – pH 7,6). A mistura (“beads” ligadas a uma das fitas do produto de PCR e *primers*) foi desnaturada

por dois minutos a 80°C em termobloco e então resfriada por 20 minutos à temperatura ambiente para atingir a temperatura de anelamento dos *primers*.

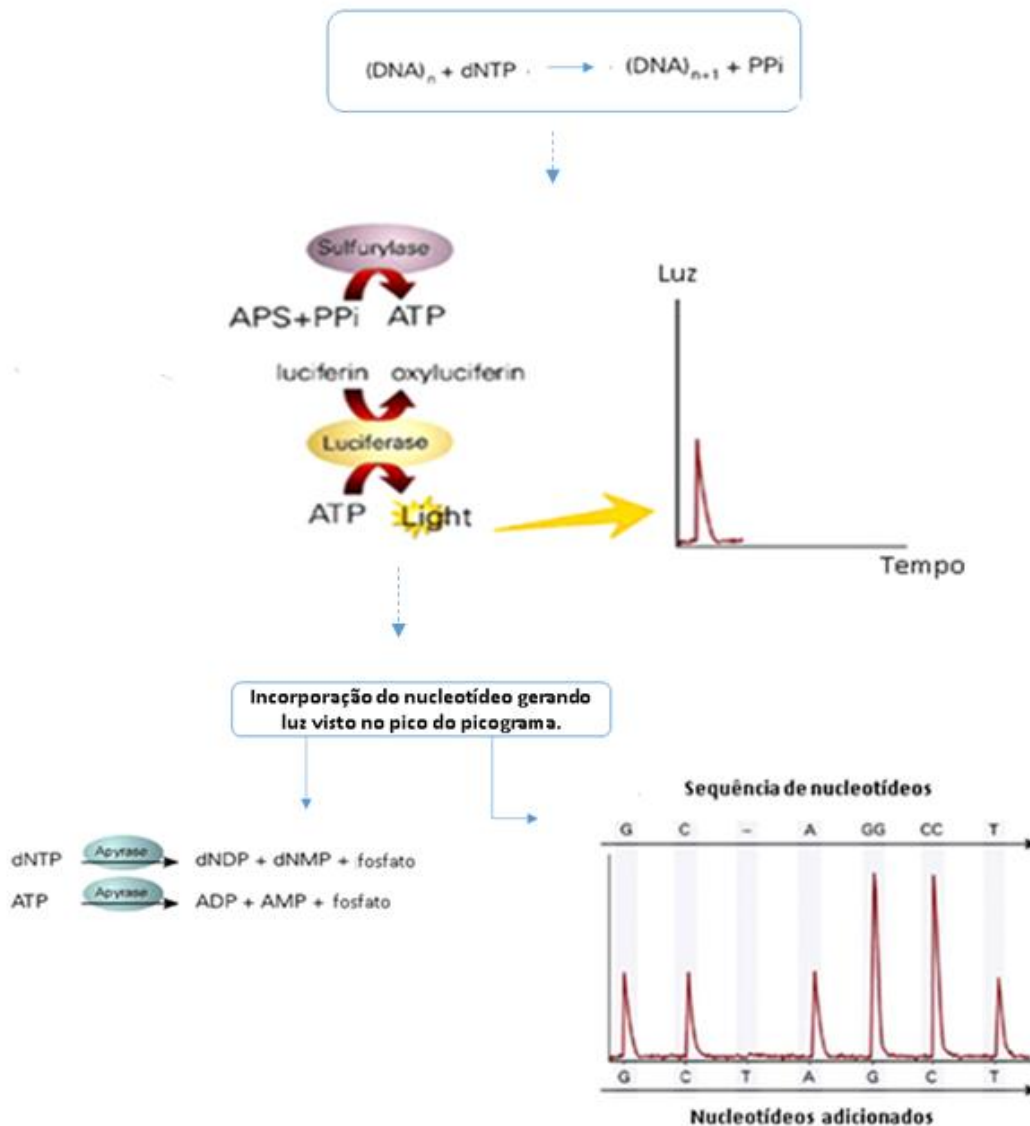
Por último, foram adicionados dNTPs, enzimas e substratos, definidos de acordo com a sequência a ser injetada na placa. O *primer* desenhado especialmente para o sequenciamento se anela à fita simples do produto gerado na reação de PCR, que servirá de molde para a síntese. Então, as enzimas são adicionadas e o primeiro desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) injetado é pareado de acordo com a complementaridade de bases, o qual será incorporado à fita nascente pela DNA polimerase I.

Essa incorporação libera o pirofosfato (PPi), utilizado pela enzima ATP sulfúrilase para converter o PPi em ATP na presença de APS. O ATP produzido é utilizado pela enzima luciferase na conversão de luciferina em oxiluciferina e luz em uma intensidade proporcional à quantidade de ATP. A luz produzida é captada pelo sistema e visualizada como um pico no gráfico Luz versus Tempo, sendo que a altura de cada pico é proporcional à quantidade de nucleotídeos adicionados. Ao mesmo tempo, a enzima apirase está degradando os nucleotídeos não incorporados e o ATP. E assim, a etapa é finalizada e um novo nucleotídeo é adicionado dando continuidade a todo o processo de sequenciamento (Figura 12).

Por fim, a fita biotinizada (molde) sequenciada trata cada sítio CpG como um polimorfismo C/T gerando um dado quantitativo da proporção relativa do alelo metilado versus o alelo não metilado. Os níveis de metilação dos sítios CpG de interesse foram avaliados convertendo os pirogramas (Figura 13) em valores numéricos correspondentes às alturas dos picos obtidos e calculando a média de todos os sítios CpG analisados para cada gene ou região de interesse.

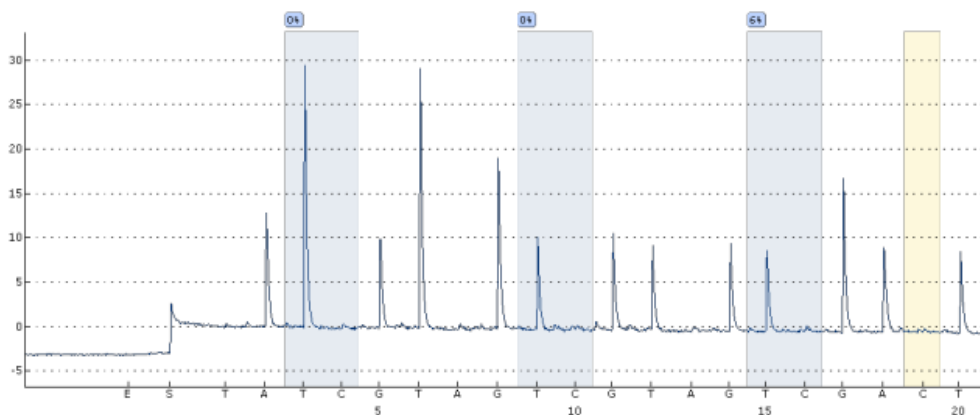


**Figura 12.** Princípio do pirosequenciamento.



**Legenda.** Durante o sequenciamento da fita simples do produto gerado na reação de PCR, há incorporação do desoxiribonucleotídeo trifosfato (dNTP) à fita que está sendo sintetizada, a partir disso há liberação de pirofosfato (PPi). A enzima ATP sulfurylase converte então adenosina 5' fosfosulfato (APS) e PPi em ATP, que em seguida é utilizado na conversão de luciferina em oxiluciferina, emitindo luz. Essa luz é captada e representada como um pico no gráfico luz versus tempo. Caso não haja a incorporação do desoxiribonucleotídeo a enzima apirase promove sua degradação, assim como do ATP não é utilizada. Fonte: Adaptado de: <http://thepix.info/pyrosequencing>

**Figura 13.** Pirograma obtido durante o pirosequenciamento



**Legenda:** A figura mostra o resultado do sequenciamento por síntese (pirosequenciamento), em que o eixo X representa a sequência de nucleotídeos injetados pelo aparelho e o eixo Y representa a intensidade da luz captada.

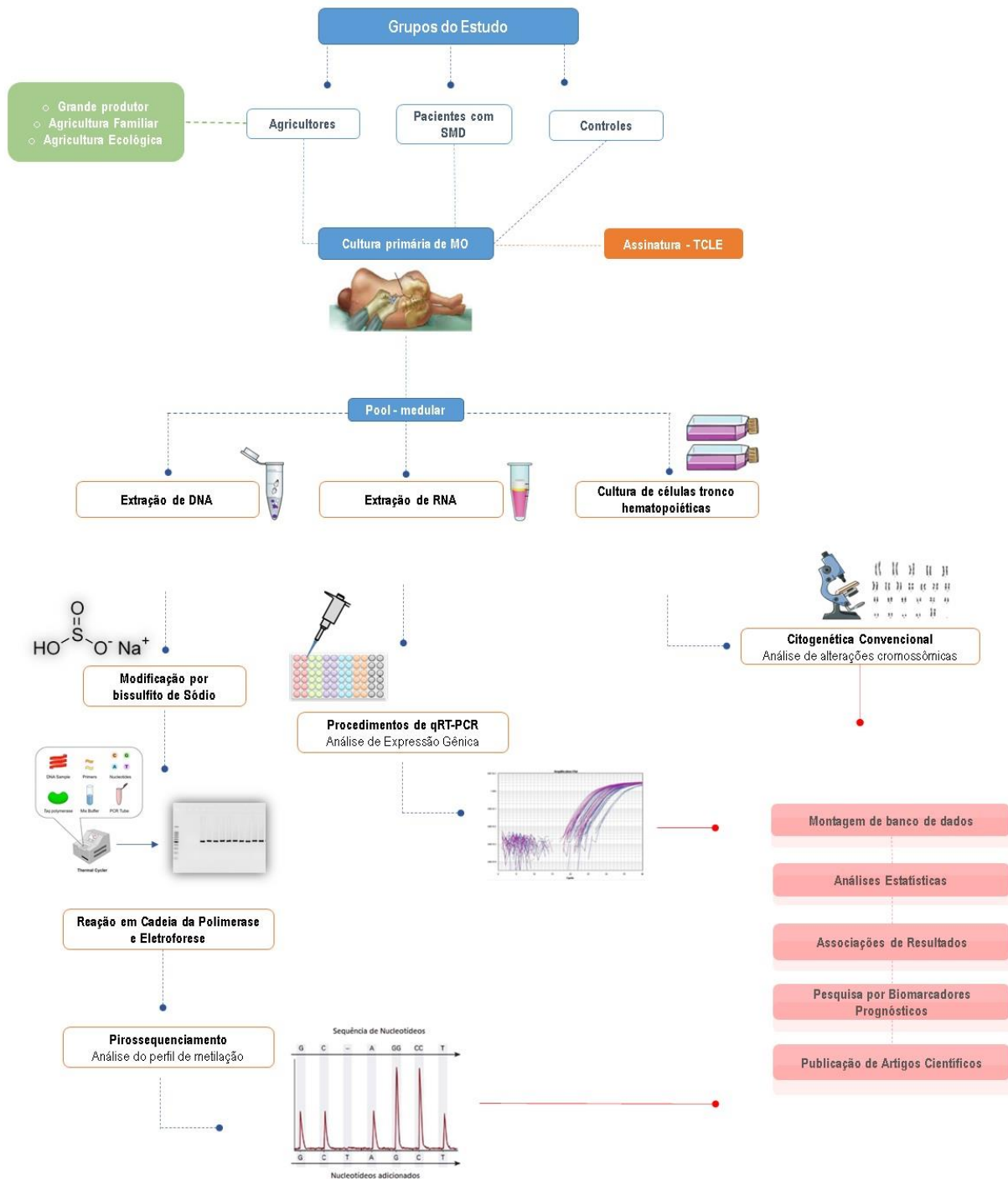
**Fonte:** Dados do autor.

### 3.6 Análises Estatísticas

As análises estatísticas deste trabalho foram realizadas com o auxílio do programa SPSS, na versão 20.0. Primeiramente, os grupos analisados foram testados quanto à normalidade, não apresentando, realizou-se testes não paramétricos. Para análise de dois grupos utilizou-se o teste de Mann-Whitney e no caso de mais de dois grupos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Para os testes de correlação realizou-se testes de *Sperman*. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

Na figura 14 se encontra um fluxograma da metodologia utilizada no estudo.

**Figura 14.** Fluxograma da metodologia utilizada no estudo



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização geral dos grupos avaliados no estudo

Este estudo apresenta três grupos de indivíduos avaliados: um grupo caracterizado por apresentar fatores de risco que podem ser contribuintes para o desenvolvimento da SMD, o grupo de agricultores expostos aos agrotóxicos; um grupo com uma doença caracterizada por aumento da metilação global no DNA (a Síndrome Mielodisplásica); e um terceiro grupo, de pessoas saudáveis e não expostas ao fator de risco exposição aos agroquímicos.

Os resultados serão explanados em cinco sessões: primeiramente, serão demonstradas as sequências alvo escolhidas para os genes avaliados no estudo. Em seguida, serão apresentados os resultados referentes ao grupo dos agricultores com sua caracterização, citogenética e análises do perfil de metilação frente a variáveis de caracterização dos agricultores. A terceira sessão será a apresentação dos resultados do grupo SMD, com sua caracterização, citogenética e análises do perfil de metilação frente as variáveis sócio demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes. Uma quarta sessão será destinada a análise do perfil de metilação entre os grupos avaliados neste estudo, se enquadrando grupo dos agricultores, SMD e grupo controle. Ademais, será apresentada uma quinta sessão de análise de correlação entre expressão e metilação dos grupos presentes neste estudo.

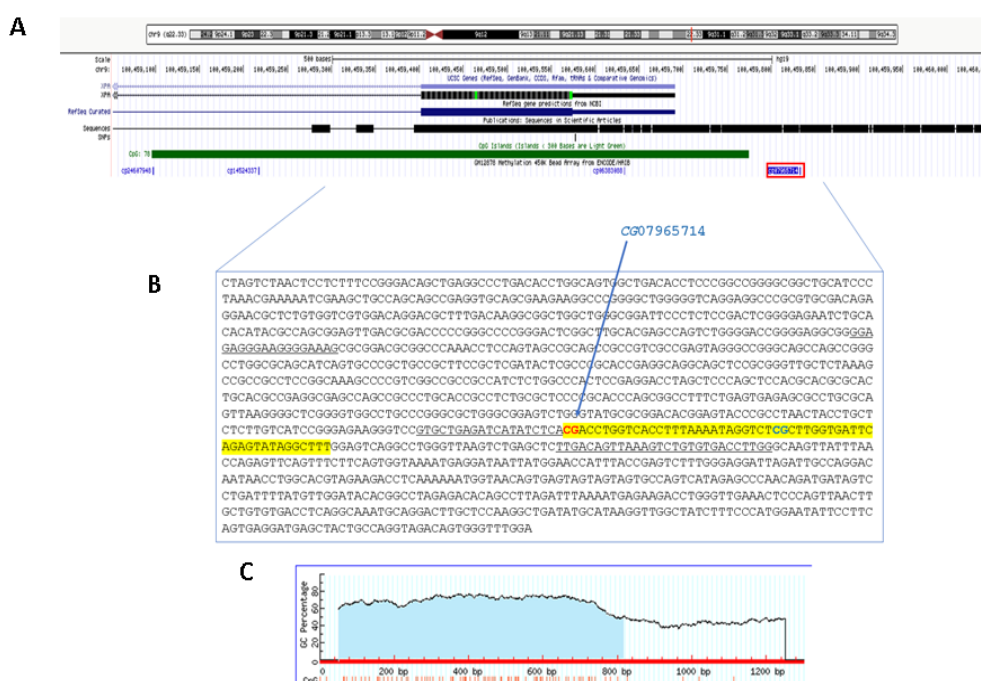
Antes de adentrar na explanação dos demais resultados deste estudo, é preciso ressaltar que para as análises de metilação para os genes *XPG* e *XPC* não foram obtidos resultados de metilação, pois não foi possível obter padrão de bandas na PCR para que fosse realizada a leitura do pirosequenciamento. Por conseguinte, foram seguidas as análises para os demais genes.

## 4.2 Demonstrativo das regiões alvos dos genes avaliados no estudo

Como descrito na metodologia deste estudo, foram escolhidos para avaliar o perfil de metilação dos genes de reparo do DNA os pontos CGs com maior grau de correlação com a expressão dos genes selecionados, levando em consideração as doenças da medula mieloproliferativas como a leucemia mieloide aguda – LMA e a SMD. Foi selecionado sítio de interesse para cada gene, no entanto demais pontos CGs dentro da sequência genômica escolhida foram avaliados. Na figura 15 está demonstrado a localização cromossômica do sítio CG, a sequência genômica analisada e os sítios avaliados para o gene *XPA*. O ponto CG de interesse para o gene *XPA* foi o cg07965714, sítio que mostrou maior correlação negativa com a expressão de LMA ( $r=-0,33$ ).

**Figura 15.** Demonstrativo da identificação da região alvo e os pontos CGs do gene *XPA*.

*XPA CpG Island* (GRCh37/hg19 cg07965714=chr9:100458334-100460333)

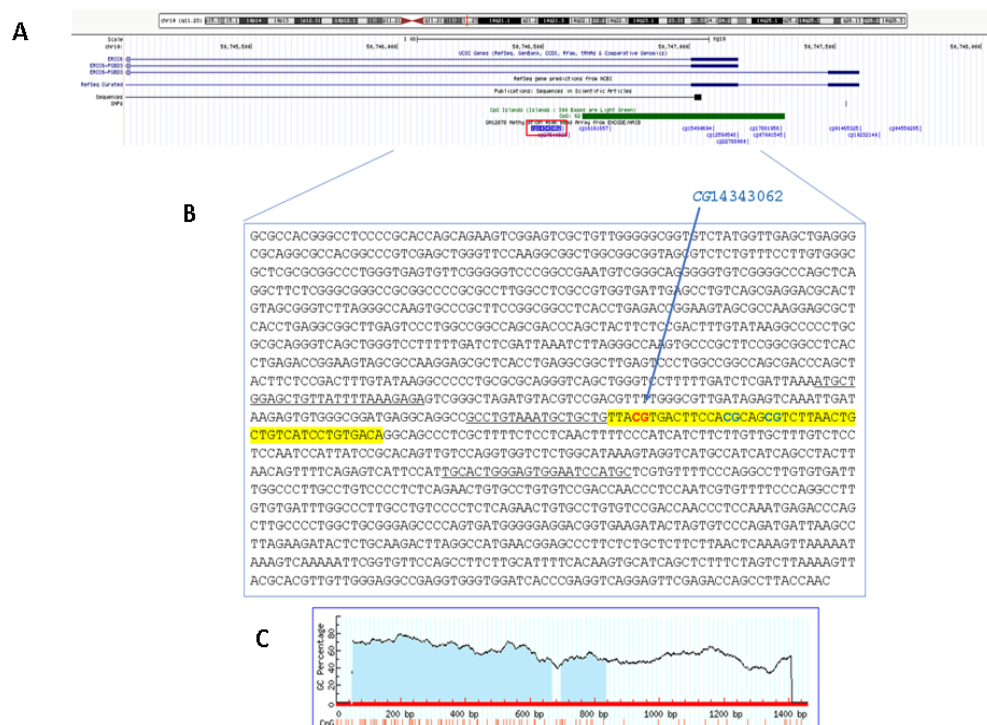


**Legenda.** Região genômica analisada para o gene *XPA* localizado na região cromossômica: GRCh37/hg19 cg07965714=chr9:100458334-100460333. (A) Identificação da ilha CpG de acordo com a plataforma UCSC Genome Browser. No quadrado vermelho está apresentado o sítio CG selecionado. (B) sequência genômica analisada identificando os sítios CGs (azul) e o sítio CG07965714 relacionado com a expressão (vermelho). Em amarelo a região sequenciada, sublinhado as sequências dos primers e sondas. (C) Confirmação da ilha CpG utilizando o programa *Methprimer*.

Na figura 16 está demonstrado a região alvo escolhida para o gene *CSB*, em que foi escolhido o ponto CG 14343062 com maior correlação negativa com a expressão em LMA ( $r = -0,242$ ). Além disso se encontra na imagem região cromossômica do sítio CG e sequencia genômica utilizado no estudo para o gene *CSB*.

**Figura 16.** Demonstrativo da identificação da região alvo e os pontos CGs do gene *CSB*.

*CSB/ERCC6 CpG Island* (GRCh37/hg19 cg14343062=chr10:50746270-50746869)

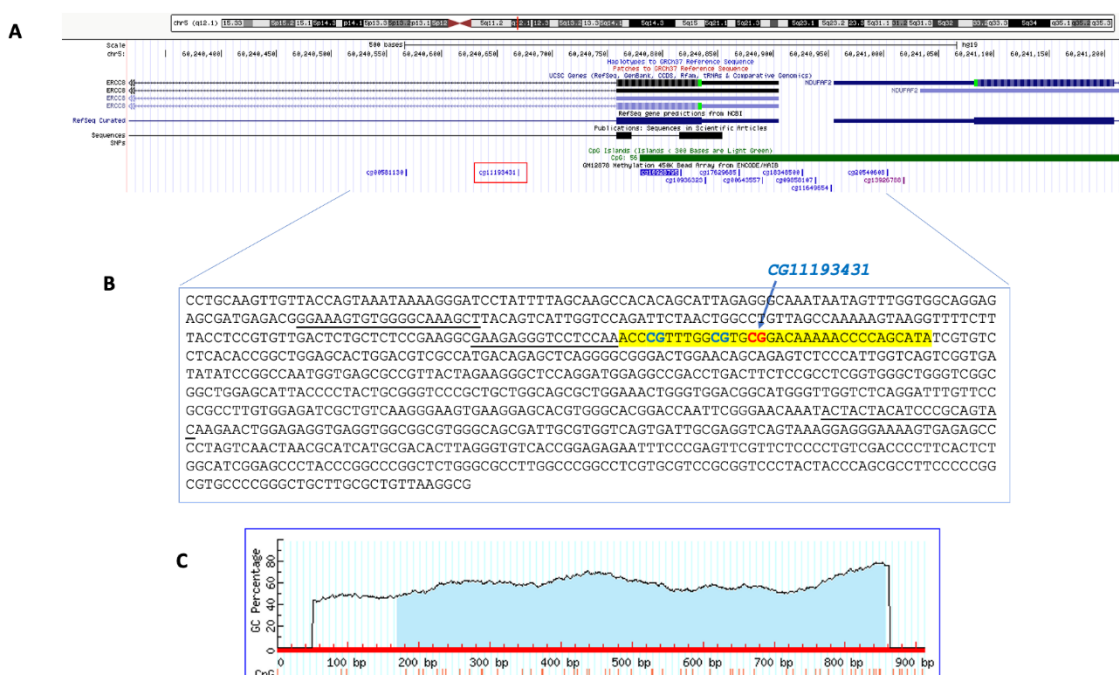


**Legenda.** Região genômica analisada para o gene *CSB* localizado na região cromossômica: GRCh37/hg19 cg14343062=chr10:50746270-50746869. (A) Identificação da ilha CpG de acordo com a plataforma UCSC Genome Browser. No quadrado vermelho está apresentado o sítio CG selecionado. (B) sequência genômica analisada identificando os sítios CGs (azul) e o sítio CG14343062 relacionado com a expressão (vermelho). Em amarelo a região sequenciada, sublinhado as sequências dos primers e sondas. (C) Confirmação da ilha CpG utilizando o programa *Methprimer*.

Para o gene *CSA* foi escolhido o ponto CG11193341. No entanto, não foi encontrada correlação com a expressão em doenças mieloproliferativas. Na figura 17 está demonstrada a região alvo escolhida, assim como a região cromossômica em que se encontra o sítio CG e a sequência genômica analisada para o gene *CSA*.

**Figura 17.** Demonstrativo da identificação da região alvo e os pontos CGs do gene *CSA*.

*CSA/ERCC8 CpG Island* (GRCh37/hg19 cg11193431=Chr9:60240817-60240817)



**Legenda.** Região genômica analisada para o gene *CSA* localizado na região cromossômica: GRCh37/hg19 chr5:60944953-60945663. (A) Identificação da ilha CpG de acordo com a plataforma UCSC Genome Browser. No quadrado vermelho está apresentado o sítio CG selecionado. (B) sequência genômica analisada identificando os sítios CGs (azul) e o sítio CG11193431 relacionado com a expressão (vermelho). Em amarelo a região sequenciada, sublinhado as sequências dos primers e sondas. (C) Confirmação da ilha CpG utilizando o programa *Methprimer*.

### 4.3 Agricultores

#### 4.3.1 Caracterização dos grupos de agricultores

Foram inclusos neste estudo 69 agricultores da região de Limoeiro do Norte/CE. Os agricultores foram estratificados em três grupos segundo o modo de produção. O grupo grande produtor (trabalhadores do agronegócio) representa 31/69 (44,9%) do número geral de trabalhadores, 28/69 (40,6%) representam o grupo agricultura familiar (trabalhadores do segmento pequeno produtor) e 10/69 (14,5%) o grupo agricultura ecológica (trabalhadores do segmento agroecológico).

Faz-se importante ressaltar que as porcentagens de cada variável foram calculadas tendo como base a quantidade de casos em que foi possível obter a informação referente àquela variável. Diante das variáveis de caracterização dos agricultores, foi incluído 1 indivíduo (1,4%) do sexo feminino e 68 (98,6%) do sexo masculino. O grupo do agronegócio apresenta 30 (96,8%) indivíduos do sexo masculinos e 1 (3,2%) do sexo feminino. Enquanto o grupo do pequeno produtor e agroecológico estão representados 100% (30 e 10, respectivamente) por indivíduos do sexo masculino (Tabela 5).

Os agricultores apresentaram média de idade de 46 anos, com idade mínima de 22 anos e máxima de 69 anos. Considerando grupos individualizados, a média de idade dos agricultores do agronegócio (grande produtor) foi de 39,5 anos, do pequeno produtor (agricultura familiar) de 45,5 anos e da agroecologia (agricultura ecológica) de 42 anos (Tabela 5).

A maioria dos trabalhadores foram expostos a agrotóxicos por mais de 12 anos, seja trabalhando no preparo, na mistura ou na pulverização de pesticidas. No grupo grande produtor, 24 (77,4%) agricultores foram expostos por mais de 12 anos e 3 (9,6%) agricultores foram expostos por 12 anos ou menos (Tabela 5). No grupo do pequeno produtor, 20 (71,4%) trabalhadores foram expostos por mais de 12 anos e 2 (7,1%) por menos de 12 anos (Tabela 5).

Dentre os agricultores dos grupos do agronegócio e do pequeno produtor, afirmaram ter contato com agrotóxico 41 (59,4%) deles (Tabela 5). Dentre os agricultores do agronegócio, 11 (35,4%) demonstraram ter contato direto com o agrotóxico, isto é, tinham contato durante a atividade de trabalho; e 27 (41,5%) revelaram ter contato indireto, que se daria após aplicação, durante a colheita, muda e outros (Tabela 5). Quanto ao grupo do pequeno produtor, 14 (50%) afirmaram ter tido contato direto e 3 (10,7%) contato indireto (Tabela 5).



Em relação aos hábitos de vida, o tabagismo e o consumo de álcool foram avaliados. Observou-se que 11 (35,4%) dos trabalhadores do agronegócio tinham o hábito de beber e no grupo do pequeno produtor, 9 (32,1%) faziam uso de álcool, enquanto os agricultores da agricultura ecológica, 6 (60%) faziam uso de álcool (Tabela 3). Quanto ao hábito de fumar, o grupo do agronegócio está representado por 6 (19,3%) agricultores fumantes, o grupo pequeno produtor por 1 (3,5%) e o grupo da agricultura ecológica apenas 1 (10%) fumante (Tabela 5).

O histórico de câncer na família dos trabalhadores é algo presente em 5 (16,1%) agricultores do grupo grande produtor e 8 (28,5%) da agricultura familiar (Tabela 5).

**Tabela 5.** Caracterização dos grupos de agricultores avaliados no estudo

<b>Parâmetros</b>	<b>Grande produtor</b>	<b>Agricultura familiar</b>	<b>Agricultura ecológica</b>
<b>Número de casos (%)</b>	31/69 (44.9)	28/69 (40.6)	10/69 (14.5)
<b>Idade média (anos)</b>	39.5 (23-64)	45.5 (28-65)	42 (28-56)
<b>Gênero (n/%)</b>			
Masculino	30 (96.0)	28 (100.0)	10 (100.0)
Feminino	1 (3.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
<b>Fumante (n/%)</b>			
Sim	6 (19.3)	1 (3.5)	1 (10.0)
Não	14 (45.1)	16 (57.1)	8 (80.0)
<b>Álcool (n/%)</b>			
Sim	11 (35.4)	9 (32.1)	1 (10.0)
Não	10 (32.2)	9 (32.1)	9 (90.0)
<b>Histórico familiar de câncer</b>			
Sim	5 (16.1)	8 (28.5)	-
Não	14 (45.1)	7 (25.0)	-
<b>Tempo de exposição (n/%)</b>			
≤ 12 anos	3 (9.6)	2 (7.1)	-
> 12 anos	24 (77.4)	20 (71.4)	-
<b>Tipo de contato (n/%)</b>			

Direta	11 (35.4)	14 (50.0)	-
Indireta	13 (41.9)	3 (10.7)	-

### 4.3.2 Citogenética Clássica dos agricultores

Também foi avaliada a análise citogenética, na qual obteve-se resultado de cariótipo para 42 (60%) dos agricultores. No grupo do grande produtor, 8 (25,8) agricultores apresentaram cariótipo normal e 6 (19,3%) cariótipo alterado. Quanto ao grupo de agricultores da agricultura familiar, 6 (21,4%) apresentaram resultado com cariótipo normal e 2 (7,1%) cariótipo alterado. Já para o grupo de agricultores da agricultura ecológica, 6 (60%) apresentaram cariótipo normal e 1 (10%) agricultor com cariótipo alterado (Tabela 6). Os resultados da citogenéticas de todos os agricultores estão representados na tabela 7. Na imagem 18 está representado dois cariótipos alterados de agricultores do estudo.

**Tabela 6.** Perfil citogenéticos dos grupos de agricultores

Perfil citogenético	Grupos agricultores		
	Grande produtor (N/%)	Agricultura Familiar (N/%)	Agricultura ecológica (N/%)
<b>Cariótipo normal</b>	8 (25.8)	6 (21.4)	6 (60.0)
<b>Cariótipo alterado</b>	6 (19.3)	2 (7.1)	1 (10)
<b>Ausência de metáfase</b>	6 (19.3)	6 (21.4)	2 (20.0)
<b>Não informado</b>	12 (38.7)	14 (50.0)	1 (10.0)

**Tabela 7.** Caracterização dos resultados de citogenética clássica dos agricultores

Caso	Idade/Sexo	Cariótipo – International System for Human Cytogenetic (ISCN) 2014	Grupo de Trabalhadores
1	34/M	46,XY[15]	GP
2	29/M	46,XY[20]	GP
3	33/M	46,XY[11]	GP
4	48/M	46,XY[7]	GP
5	49/M	44,XY,-20,-21[8]/46,XY[2]	GP
6	43/M	46,XY,del(11)[20]	GP
7	43/M	46,XY,del(11)(q23)[4]/46,XY[16]	GP
8	34/M	46,XY,add(4)(?q35)[3]/46,XY[16]	GP
9	28/M	46,XY [10]	GP
10	62/M	32~45,XY,-1,-18,-7,-14,-16[cp9]	GP
11	36/M	46,XY[10]	GP
12	64/M	46,XY[5]	GP
13	60/M	46,XYdel(11)(q23)[3]/46,XY[17]	GP
14	27/M	46,XY[20]	GP
15	50/M	46,XY[10]	AF
16	49/M	46,XY[20]	AF
17	45/M	46,XY[10]	AF
18	61/M	20~30.+1,+14,+16,+18,+21,+22[5]/45,XY[5]	AF
19	54/M	46,XY[7]	AF
20	42/M	46,XY[20]	AF
21	46/M	18~35,XY,-4,-5,-8,-9,-11,-16,-17,-19,-20,-21,-22[8]/46,XY[2]	AF
22	57/M	46,XY[20]	AF
23	60/M	46,XY[25]	AE
24	43/M	46,XY(del5)[15] del (5q)	AE
25	32/M	46,XY[15]	AE
26	59/M	46,XY [4]	AE
27	53/M	46,XY[20]	AE
28	56/M	46,XY[17]	AE
29	40/M	46,XY[7]	AE

**Legenda:** GP - Grande produtor (trabalhador do agronegócio), AF - (agricultura familiar (pequeno produtor), AE - (agricultura ecológica).

### **4.3.3 Perfil de metilação dos genes de reparo de fita simples do DNA nos grupos de agricultores.**

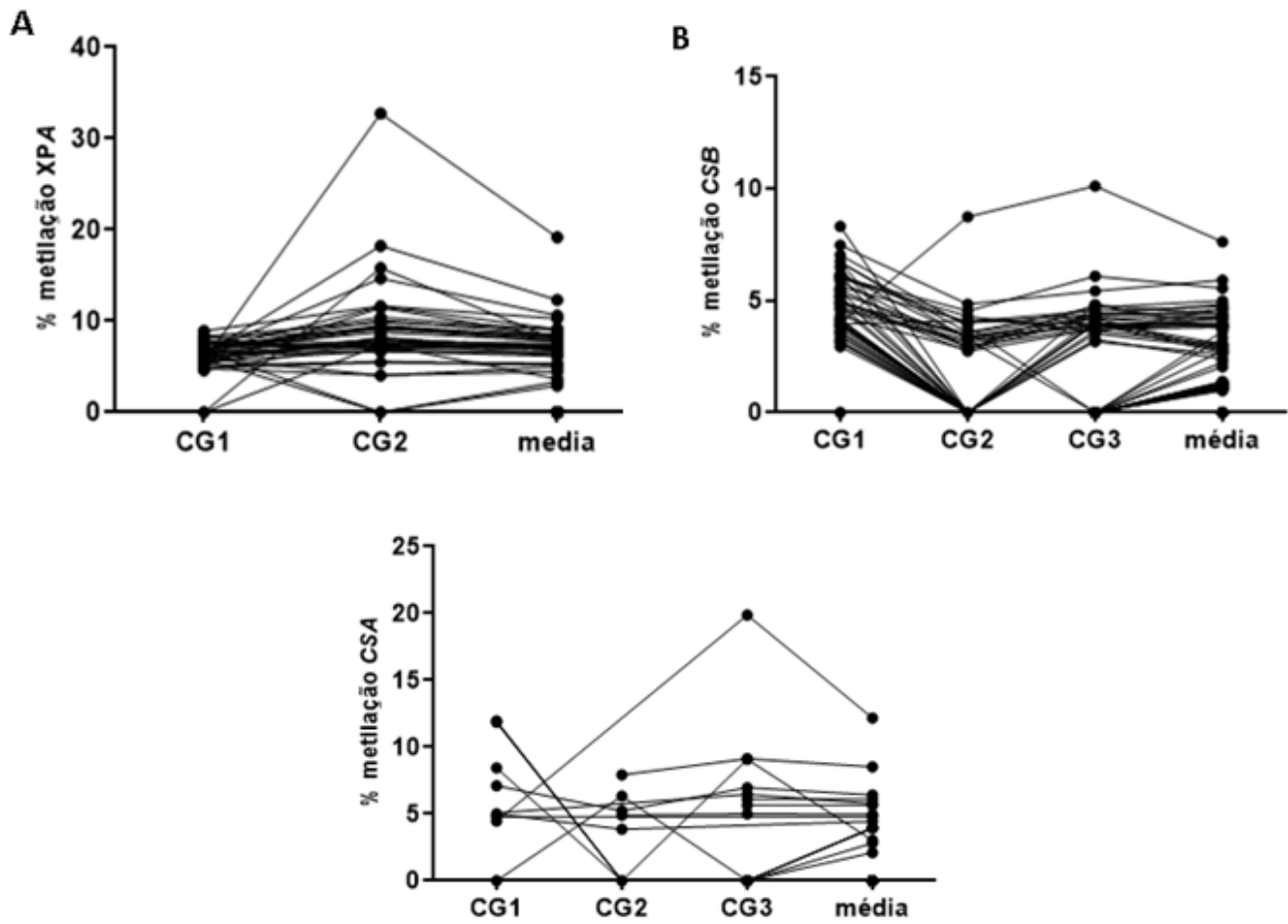
#### **4.3.3.1 Determinação dos sítios CpG's para os genes *XPA*, *CSB* e *CSA***

Para escolha das regiões de interesse de cada gene a ser estudado para a análise do perfil de metilação, foi selecionado pontos CG com maior grau de correlação negativa com a expressão dos genes. A ilha CpG selecionada encontrava-se dentro da região promotora dos genes analisados.

Para o gene *XPA* foram analisados dois sítios CpG's (Figura 18A), nos quais o perfil de metilação de cada ponto CG dentro do gene analisado variou entre os indivíduos investigados e é possível observar um maior perfil de metilação no sítio 2 frente ao primeiro sítio. Vale ressaltar que o ponto CG 2 foi a região que apresentou maior correlação com LMA., sendo considerado o sítio de interesse. Para as comparações das porcentagens de metilação foi utilizada a média destes dois sítios.

Para o gene *CSB*, na metilação dos agricultores, foram analisados três sítios CpG's (Figura 18B), no qual o ponto CG1 apresentou maior perfil de metilação frente aos outros sítios, e este é ponto CG de interesse. Para as análises de metilação foi utilizada a média destes três sítios. Para o gene *CSA* também foram analisados três sítios CpG's (Figura 18C), nos quais o perfil de metilação de cada ponto CG dentro do gene analisado variou entre os indivíduos investigados, mostrando maior variação de metilação entre os pontos CG's e tinha como ponto CG de interesse o terceiro sítio. Para as análises de metilação foi realizada e utilizada a média desses três sítios.

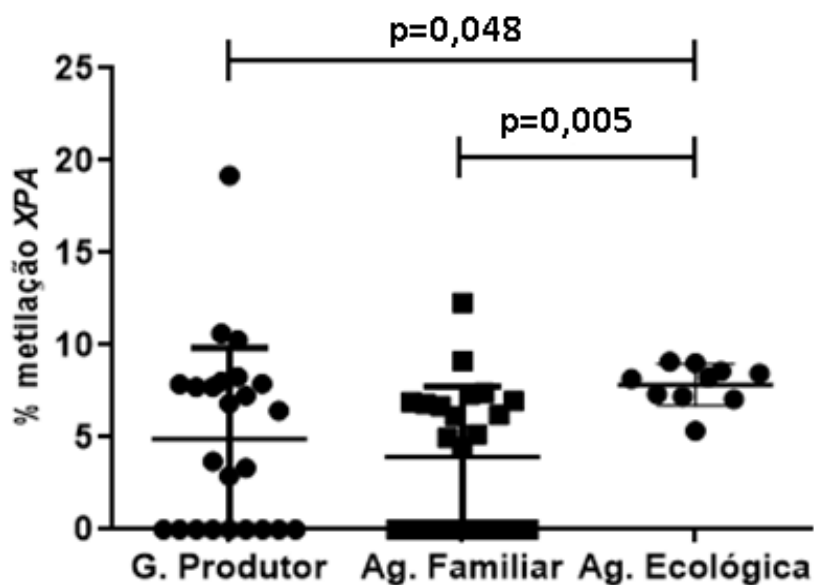
**Figura 18.** Perfil de metilação dos sítios CpG's avaliados para o gene *XPA*, *CSB* e *CSA* nos agricultores.



#### 4.3.3.2 Perfil de metilação das variáveis de caracterização dos agricultores para os genes *XPA*, *CSB* e *CSA*.

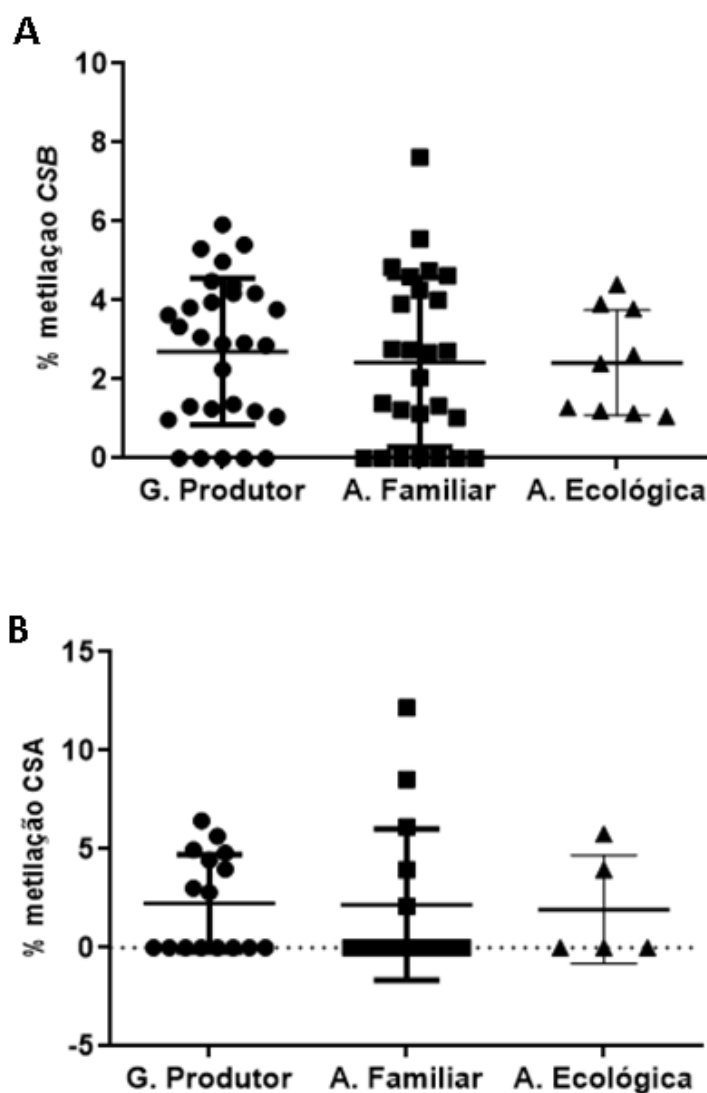
Foi avaliado o perfil de metilação entre os grupos de agricultores e observou-se que a porcentagem metilação do gene *XPA* no grupo grande produtor (mediana = 5,07) apresentava-se menor quando comparado a agricultura ecológica (mediana = 8,21) ( $p = 0,048$ ). Da mesma forma o grupo da agricultura familiar (mediana = 4,98), que também demonstrou menor porcentagem de metilação frente ao grupo da agricultura ecológica (mediana=8,21) ( $p=0,005$ ) (Figura 19). Para o gene *CSB* (Figura 20A) e *CSA* (Figura 20B) não houve diferença entre os grupos analisados ( $p > 0,05$ ) (Tabela 8).

**Figura 19.** Perfil de metilação do gene *XPA* entre os grupos dos agricultores.



GENE <i>XPA</i>		Metilação					Teste de Kruskal- Wallis†
		Contagem (n)	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
GRUPOS AGRICULTORES	GP	31	5,07	4,92	0,00	19,20	<b>p= 0,006</b>
	AF	27	4,98	3,83	0,00	12,31	
	AE	10	8,21	1,14	5,36	9,11	

**Figura 20.** Perfil de metilação dos genes *CSB* e *CSA* entre os grupos dos agricultores.



Foi realizada a associação do perfil de metilação dos genes *XPA*, *CSB* e *CSA* para as variáveis de caracterização dos agricultores (gênero, tempo de exposição, tipo de contato com o agrotóxico, cariótipo, hábitos de vida, predisposição a câncer). Todavia, não foram encontradas diferenças no perfil de metilação para estas variáveis ( $p > 0,05$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Descrição dos resultados de perfil de metilação das variáveis de caracterização dos agricultores analisadas no estudo.

		Metilação XPA		Metilação CSB		Metilação CSA	
		Mediana (mínimo - máximo)	sig.	Mediana (mínimo – máximo)	sig.	Mediana (mínimo – máximo)	sig.
<b>Grupo</b>	GP	5,07 (0,00 - 19,20)		2,92 (0,00 - 5,92)		1,41 (0,00 - 6,44)	
	AF	4,98 (0,00 - 12,31)	<b>0,006</b>	2,36 (0,00 - 7,63)	0,795	0,00 (0,00 - 12,17)	0,810
	AE	8,21 (5,36 - 9,11)		2,40 (1,07 - 4,40)		0,00 (0,00 - 5,78)	
<b>Gênero</b>	Feminino	3,35 (3,35 - 3,35)		3,95 (3,95 - 3,95)		6,44 (6,43 - 6,43)	
	Masculino	6,57 (0,00 - 19,20)	0,737	2,40 (0,00 - 7,63)	0,517	0,00 (0,00 - 12,17)	0,171
<b>Cariótipo</b>	Normal	7,14 (0,00 - 8,29)		1,39 (0,00 - 4,84)		0,00 (0,00 - 6,12)	
	Alterado	6,97 (0,00 - 7,89)	0,711	4,18 (1,25 - 7,63)	0,067	0,00 (0,00 - 12,17)	0,730
<b>Tempo de trabalho</b>	< 12 anos	4,98 (0,00 - 7,91)		1,73 (0,00 - 4,63)		0,00 (0,00 - 5,66)	
	≥ 12 anos	4,46 (0,00 - 19,20)	0,495	2,73 (0,00 - 7,63)	0,218	0,00 (0,00 - 12,17)	0,949
<b>Tipo de contato</b>	Direto	5,37 (0,00 - 12,31)		1,71 (0,00 - 7,63)		0,00 (0,00 - 12,17)	
	Indireto	2,90 (0,00 - 19,20)	0,499	2,12 (0,00 - 5,92)	0,218	3,40 (0,00 - 5,66)	0,949
<b>Uso álcool agricultores expostos</b>	Não	5,31 (0,00 - 8,03)		3,07 (0,00 - 5,92)		1,06 (0,00 - 6,44)	
	Sim	3,29 (0,00 - 19,20)	0,990	2,25 (0,00 - 7,63)	0,639	2,92 (0,00 - 12,17)	0,521
<b>Uso fumo agricultores expostos</b>	Não	5,18 (0,00 - 19,20)		2,84 (0,00 - 7,63)		0,00 (0,00 - 12,17)	
	Sim	0,00 (0,00 - 7,26)	0,109	3,63 (0,98 - 4,99)	0,762	4,88 (3,99 - 5,66)	0,148

Legenda: sig. significância, valor de “p”. Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .



#### 4.4. Síndrome Mielodisplásica

##### 4.4.1 Caracterização sociodemográfica e clínica dos pacientes com síndrome mielodisplásica

O número amostral (n) de pacientes foi de 56 casos diagnosticados com a doença. Em relação as variáveis sociodemográficas dos pacientes, frente à variável gênero, foram incluídos 30 indivíduos do sexo feminino (53.5%) e 26 do sexo masculino (46.4%). A variável idade para os pacientes com SMD foi categorizada em  $\leq 60$  anos e  $>60$  anos. A média de idade para este grupo foi de 66,1 anos (mínimo de 24 anos e máximo de 91 anos) (Tabela 9).

**Tabela 9:** Caracterização descritiva das variáveis sociodemográficas dos pacientes com SMD.

Variáveis		Nº	%
<b>Gênero</b>	Feminino	30	53,5%
	Masculino	26	46,4%
<b>Idade</b>	$\leq 60$ anos	15	28,8%
	$>60 - \leq 70$ anos	11	21,1%
	$>70 - \leq 80$ anos	16	30,7%
	$>80$ anos	10	19,2%
<b>Idade (categorizada)</b>	$\leq 60$ anos	15	28,8%
	$> 60$ anos	37	71,1%

Faz-se importante ressaltar que as percentagens de cada variável foram calculadas tendo como base a quantidade de casos em que foi possível obter a informação referente àquela variável. Os casos omissos foram retirados deste cálculo.

Em relação às variáveis clínicas dos pacientes com SMD, no que se refere à classificação OMS (2016) (Swerdlow, 2016), os pacientes foram categorizados da seguinte forma: 3 pacientes (5,3%) como SMD-SA-DU, 9 (16,0%) pacientes como SMD-DU, 25 (44,6%) pacientes como SMD-DM, 9 (16,0%) pacientes classificados como SMD-SA-DM, 4 (7,1%) pacientes como SMD-EB I, 6 (10,7,3%) pacientes como SMD-EB II (Tabela 10).

Categorizamos, também, a doença nas suas formas iniciais (SMD-SA-DU, SMD-DU, SMD-DM, SMD-SA-DM) e avançadas (SMD-EB I e SMD-EB II). Observou-se que 46 (82,1%) dos casos foram inseridos nas formas iniciais e 10 (17,8%) foram inseridos nas formas avançadas (Tabela 10).

**Tabela 10:** Estratificação clínica dos pacientes pela classificação da OMS (2008).

<b>Variáveis</b>		<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>Classificação da OMS</b>	SMD-SA-DU	03	5,3%
	SMD-DU	09	16,0%
	SMD-DM	25	44,6%
	SMD-SA-DM	09	16,0%
	SMD-EBI	04	7,1%
	SMD-EBII	06	10,7%
<b>Formas da SMD</b>	Iniciais	46	82,1%
	Avançadas	10	17,8%

Quanto à variável celularidade da medula óssea, avaliada por meio da biópsia de medula óssea, 33 pacientes realizaram o exame de biópsia e observamos que 02 pacientes (6,0%) apresentaram medula óssea hipocelular, seguidos de 03 pacientes com medula óssea normocelular (9,%) e 28 pacientes com medula hipercelular (84,8%) (Tabela 11).

Quanto à presença de displasias na medula óssea, avaliada através do exame de mielograma, observou-se que houve um predomínio de displasias na linhagem eritroide (diseritropoiese) em 44 (89,7%) casos, seguidos de displasias na linhagem megacariocítica (dismegacariopoiese) (34/69,3%), e, por último, displasias na linhagem granulocítica (disgranulopoiese) (23/46,9%) (Tabela 11).

Quanto à porcentagem de blastos na medula óssea, foram obtidos resultados de 44 dos 56 pacientes. Identificou-se que 35 (79,5%) dos pacientes estavam inclusos na faixa de  $\leq 2\%$ , 3(6,8%) na faixa de  $>2$  a  $<5\%$ , 2 (4,5%) pacientes na faixa de 5%-10%, e, por fim, 4 (9,0%) pacientes incluídos na faixa  $>10\%$  (Tabela 11).

**Tabela 11:** Frequência das variáveis clínicas relacionadas aos achados da medula óssea em pacientes com SMD.

<b>Variáveis</b>		<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>Celularidade da medula óssea</b>	Hipocelular	02	6,0%
	Normocelular	03	9,0%
	Hipercelular	28	84,8%
<b>Fibrose na medula óssea</b>	Ausência	22	70,9%
	Presença	09	29,1%
<b>Displasias na medula óssea</b>	1	12	26,0%
	2	19	41,3%
	3	15	32,6%
<b>Diseritropoese</b>	Presença	44	89,7%
	Ausência	05	10,2%
<b>Dismegacariopose</b>	Presença	34	69,3%
	Ausência	15	30,6%
<b>Disgranulopose</b>	Presença	23	46,9%
	Ausência	26	53,0%
<b>Faixas das percentagens de blastos</b>	≤2%	35	79,5%
	>2 a <5%	03	6,8%
	>5% - ≤10%	02	4,5%
	>10%	04	9,0%

Quanto aos achados clínico-laboratoriais no sangue periférico dos pacientes, foi observado, ao hemograma, que 43 (30,5%) pacientes apresentaram Hb inferior a 8g/dL, que 25 (24,7%) pacientes apresentaram contagem de neutrófilos (ANC) inferior a 800 por mm<sup>3</sup> e, por fim, 28 (42,7%) pacientes apresentaram contagem de plaquetas inferior a 100.000/mm<sup>3</sup>. No que se refere à progressão da doença e evolução, constatamos que 5 (14,2%) dos pacientes evoluíram para LMA (Tabela 12).

**Tabela 12.** Frequência das variáveis clínico-laboratoriais relacionados aos achados do sangue periférico e evolução pra LMA em pacientes com SMD.

Variáveis		Nº	%
<b>Classificação dos valores de hemoglobina (Hb)</b>	≥ 10g/dL	08	39,0%
	<10g/dL	43	30,5%
<b>Classificação dos valores de neutrófilos (ANC)</b>	≥800/mm <sup>3</sup>	27	75,3%
	<800/mm <sup>3</sup>	25	24,7%
<b>Classificação dos valores de plaquetas</b>	≥100.000/mm <sup>3</sup>	24	57,3%
	≥50.000 - <100.000/mm <sup>3</sup>	15	22,0%
	<50.000/mm <sup>3</sup>	12	20,7%
<b>Classificação dos valores de plaquetas (categorizada)</b>	≥100.000	24	57,3%
	<100.000	28	42,7%
<b>Evolução pra LMA</b>		05	14,2%

Com relação à análise citogenética dos pacientes, observou-se que 40 deles (86,9%) apresentaram resultados e 9 (16,0%) apresentaram ausência de metáfase ao diagnóstico (Tabela 13). Dentre os 40 pacientes com resultado citogenético identificou-se que 24 (42,8,1%) pacientes possuíam cariótipo normal e 16 (28,6%) pacientes apresentaram cariótipo alterado (Tabela 14) (Figura 21).

Frente aos grupos de risco estabelecidos pelo IPSS-R (GREENBERG et al., 2012), verificou-se que 13 (23,2%) pacientes foram classificados como muito baixo risco; 15 (26,7%) pacientes foram definidos como baixo risco; 6 (10,7%) pacientes definidos como risco intermediário; 6 (10,7%) pacientes foram estratificados como alto risco (Tabela 13).

**Tabela 13:** Frequência dos resultados citogenéticos e frequência das variáveis associadas aos grupos de risco dos pacientes com SMD ao diagnóstico.

Variáveis		Nº	%
<b>Cariótipo</b>	Normal	24	42,8%
	Alterado	16	28,6%
	Ausência de metáfases	9	16,1 %
<b>Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R</b>	Muito baixo (≤1.5)	13	23,2%
	Baixo (>1.5-3)	15	26,7%
	Intermediário (>3-4.5)	06	10,7%
	Alto (>4.5-6)	06	10,7%
	Muito alto (>6)	00	0,0%

**Tabela 14** - Descrição detalhada do cariótipo de medula óssea dos pacientes de SMD que apresentaram resultado de citogenética.

<i>Paciente</i>	<i>Idade/Sexo</i>	<i>Cariótipo - ISCN 2016</i>	<i>OMS</i>
1	F/28	46 XX [20]	SMD-SA-DU
2	M/24	46 XY [9]	SMD-DM
3	F/81	46,X,i(X)(q10),del(17)(q22q23.3)[7]/46,XX[13]	SMD-DU
4	F/78	46,XX,del(5)(q12q33)[18]/46,XX[2]	SMD-DU
5	F/45	46,XX[7]	SMD-DU
6	M/85	46,XY[15]	SMD-SA-DM
7	M/47	47,XY,+mar[5]/46,XY,del(5)(q31)[5]/46,XY[15]	SMD-DM
8	M/31	46,XY[24]	SMD-DM
9	M/55	46,XY[15]	SMD-DM
10	M/52	46,XY[20]	SMD-DM
11	F/65	46,XX[20]	SMD-DM
12	M/91	46,X-Y[4]/46,XY[16]	SMD-SA-DU
13	F/77	46, XX [15]	SMD-DU
14	F/56	46, XX [11]	SMD-SA-DM
15	M/60	47,XY,+15[10]/46,XY[10]	SMD-DM
16	M/45	47,XY,+mar[3]/46,XY[17]	SMD-DM
17	M/67	46,XY[20]	SMD-EB1
18	M/89	46,XY[17]	SMD-EB2
19	M/82	46,XY[20]	SMD-SA-DM
20	M/89	46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17]	SMD-DM
21	F/73	46,XX [25]	SMD-DM
22	M/69	46,XY,del(5)(q15q33)[7]/46,XY[11]	SMD-DU
23	M/66	47,XY,+mar[5],46,XY[11]	SMD-DM
24	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
25	M/46	46, XY[8]	SMD-DM

26	M/71	del 5, tris 20	SMD-EB1
27	F/64	46 XX [20]	SMD-DU
28	F/72	46,XX[25]	SMD-SA-DM
29	F/88	46, XX[20]	SMD-SA-DM
30	F/41	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(?q25)[7]/46,XX[4]	SMD-DM
31	F/73	46 XX [10]	SMD-DM
32	F/56	46,XX[10]	SMD-DU
33	F/88	47,XX,+22[4]/46,XX[16]	SMD-DM
34	F/81	46,XX[5]	SMD-SA-DM
35	F/46	46,XX[8]	SMD-DU
36	F/87	47,XX,t(4;11)(q27;q32),+mar[4]/46,XX[16]	SMD-DM
37	F/77	46,XX[3]	SMD-DM
38	F/80	46,XX[20]	SMD-SA-DM
39	F/62	92~105<4n>..XX[3]/46,XX,del(5)(q32q33)[5]/46,XX[12]	SMD-DU
40	M/80	45,X,-Y[18]/46,XY[7]	SMD-SA-DM

**Figura 21.** Representação dos resultados encontrados na citogenética por banda G de pacientes com SMD.



**Legenda.**A. Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo alterado com del(5q). B. Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo normal 46,XX [20].

#### **4.4.2 Perfil de metilação dos genes de reparo de fita simples do DNA em pacientes com síndrome mileodisplásica.**

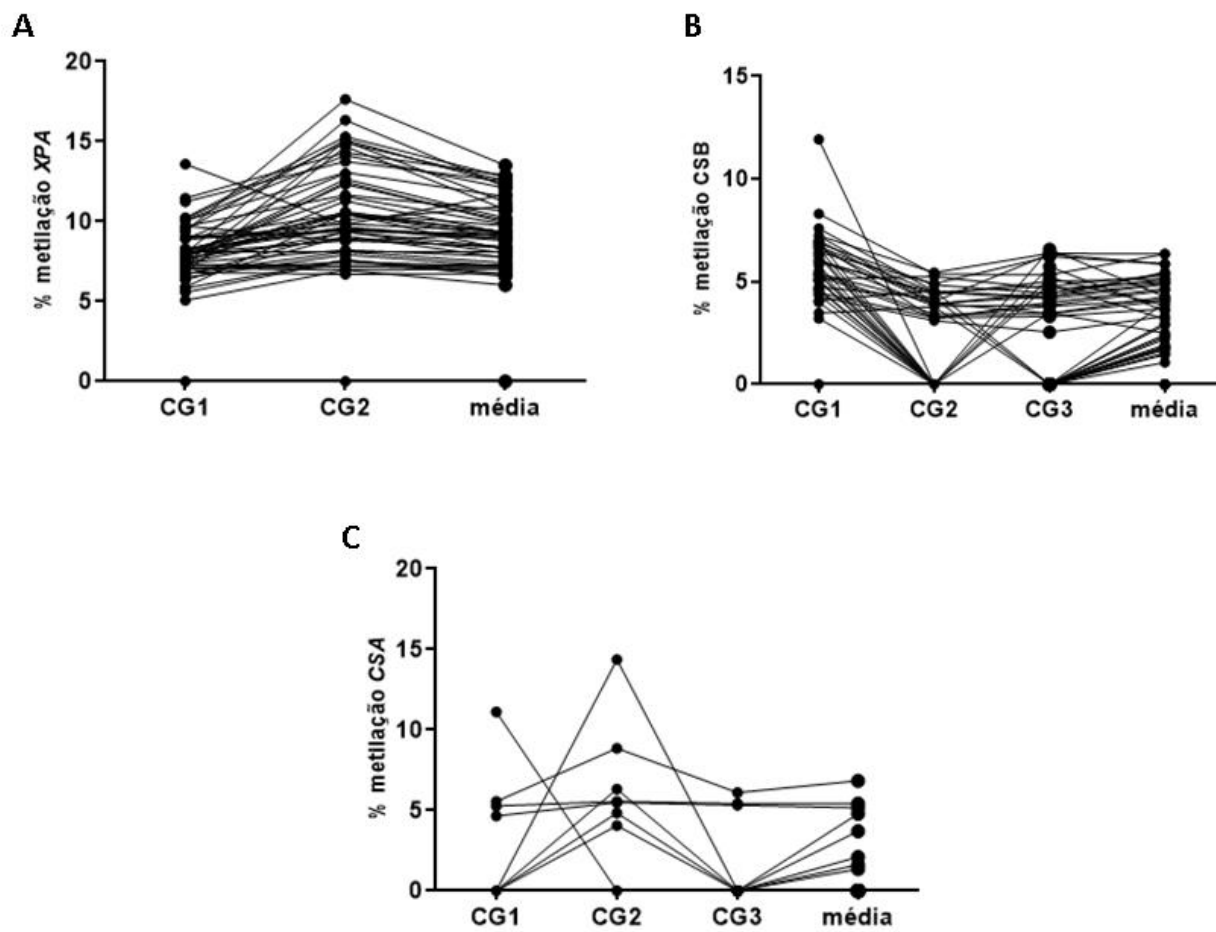
##### **4.4.2.1 Determinação dos sítios CpG's para o gene *XPA*, *CSB* e *CSA***

Para o gene *XPA*, na metilação dos pacientes com SMD, foram escolhidos dois sítios CpG's (Figura 22A) em que o perfil de metilação de cada ponto CG dentro do gene analisados variou entre os indivíduos investigados. Ademais, é possível observar um maior porcentagem de metilação no sítio 2 frente ao primeiro sítio. Para as análises do perfil de metilação foi utilizado a média destes dois sítios.

Para o gene *CSB* foram escolhidos três sítios CpG's, em que o perfil de metilação de cada ponto CG dentro do gene analisado variou entre os indivíduos. Para as análises foi utilizada a média destes três sítios (Figura 22B). Para o gene *CSA* também foram escolhidos três sítios CpG's em que cada ponto CG dentro do gene analisado também variou entre os indivíduos. Para as análises de metilação foi realizada e utilizada a média destes três sítios (Figura 22C).



**Figura 22.** Perfil de metilação dos sítios CpG's avaliados para o gene *XPA*, *CSB* e *CSA*.

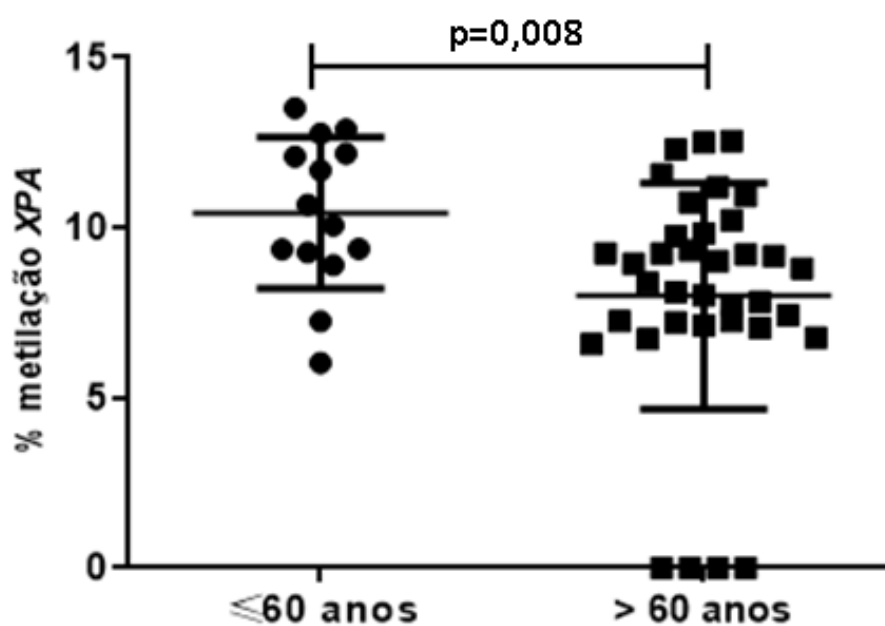


#### 4.4.2.2 Perfil de metilação das variáveis avaliadas para os pacientes com síndrome mielodisplásica para os genes XPA, CSB e CSA

As associações entre o perfil de metilação dos genes estudados e as variáveis clínico laboratoriais dos pacientes com SMD serão apresentados a seguir, dados não significantes estão apenas tabelados.

Para o gene XPA, foi observado que os pacientes com idade superior a 60 anos apresentavam menor porcentagem de metilação dos sítios CGs analisados (mediana=8,60) quando comparados a pacientes com idade igual ou inferior a 60 anos (mediana=10,38) ( $p=0,008$ ) (Figura 23).

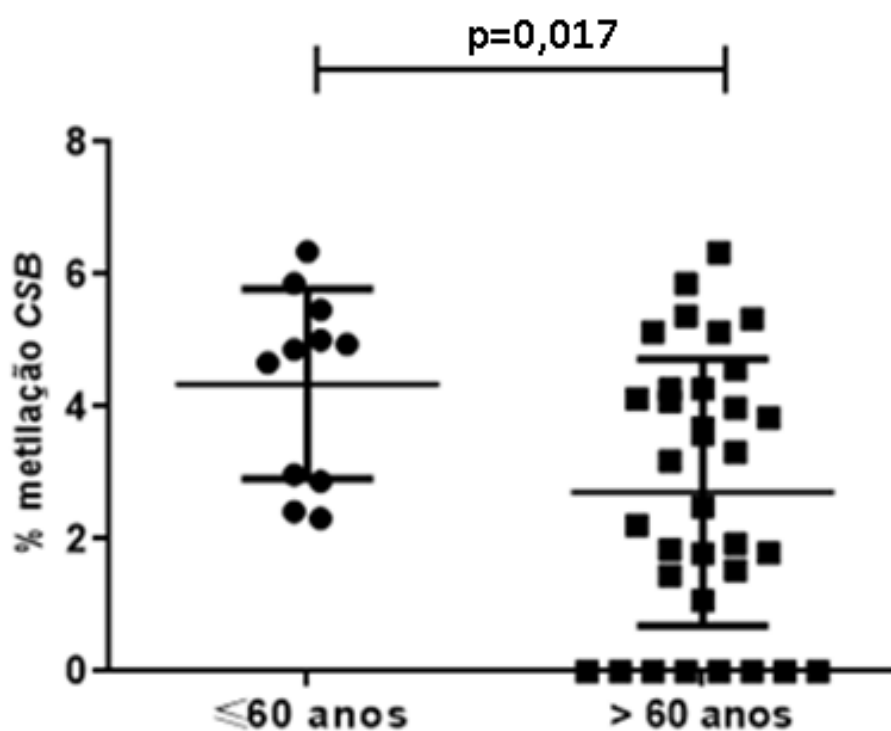
**Figura 23.** Perfil de metilação do gene XPA em pacientes com SMD frente a variável idade.



GENE XPA	Metilação					Teste de MannWhitney†
	Contagem (n)	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
Idade ≤ 60	14	10,38	2,22	6,03	13,52	p=0,008
> 60	36	8,60	3,32	0,00	12,55	

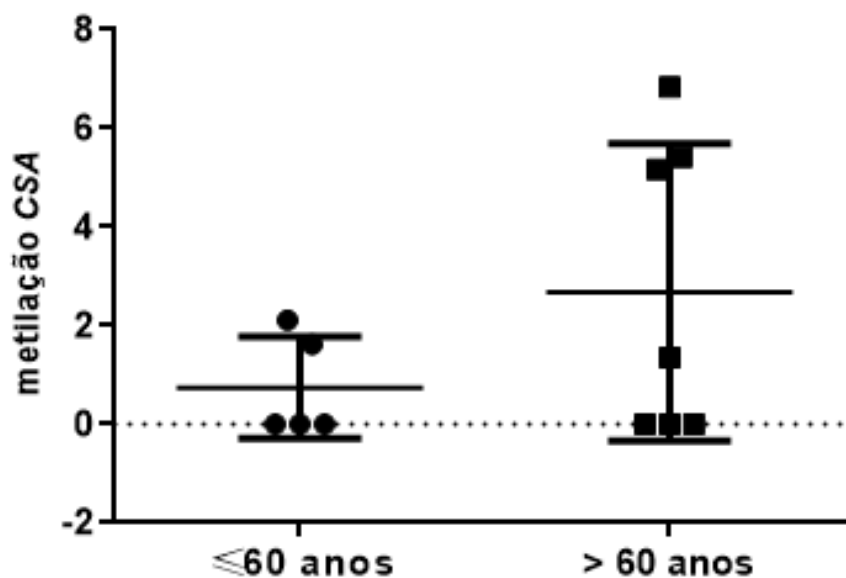
Da mesma forma, para o gene *CSB* também foi observada uma diferença na porcentagem de metilação dos sítios CGs para os pacientes com idade menor ou igual a  $\leq 60$  anos (mediana = 4,87) quando comparados a pacientes com idade superior (mediana = 2,83) ( $p = 0,017$ ) (Figura 24). Para o gene *CSA* não foi observada diferença na porcentagem de metilação para variável idade ( $p > 0,05$ ) (Figura 25; Tabela 15).

**Figura 24.** Perfil de metilação do gene *CSB* em pacientes com SMD frente a variável idade.



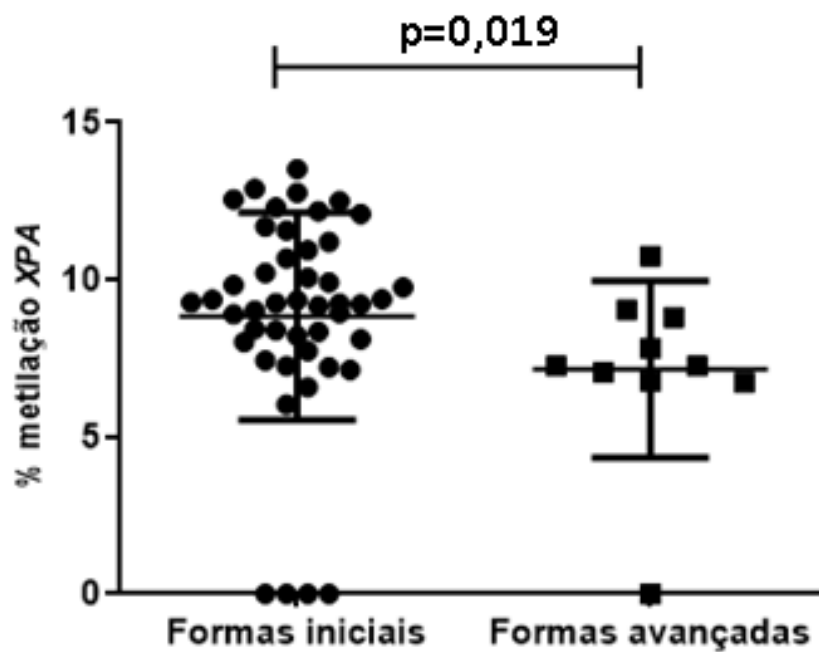
GENE <i>CSB</i>	Metilação					Teste de MannWhitney†
	Contagem (n)	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
Idade						
$\leq 60$	14	4,87	1,44	6,03	13,52	$p=0,017$
$> 60$	36	2,83	2,02	0,00	12,55	

**Figura 25.** Perfil de metilação do gene *CSA* em pacientes com SMD frente a variável idade.



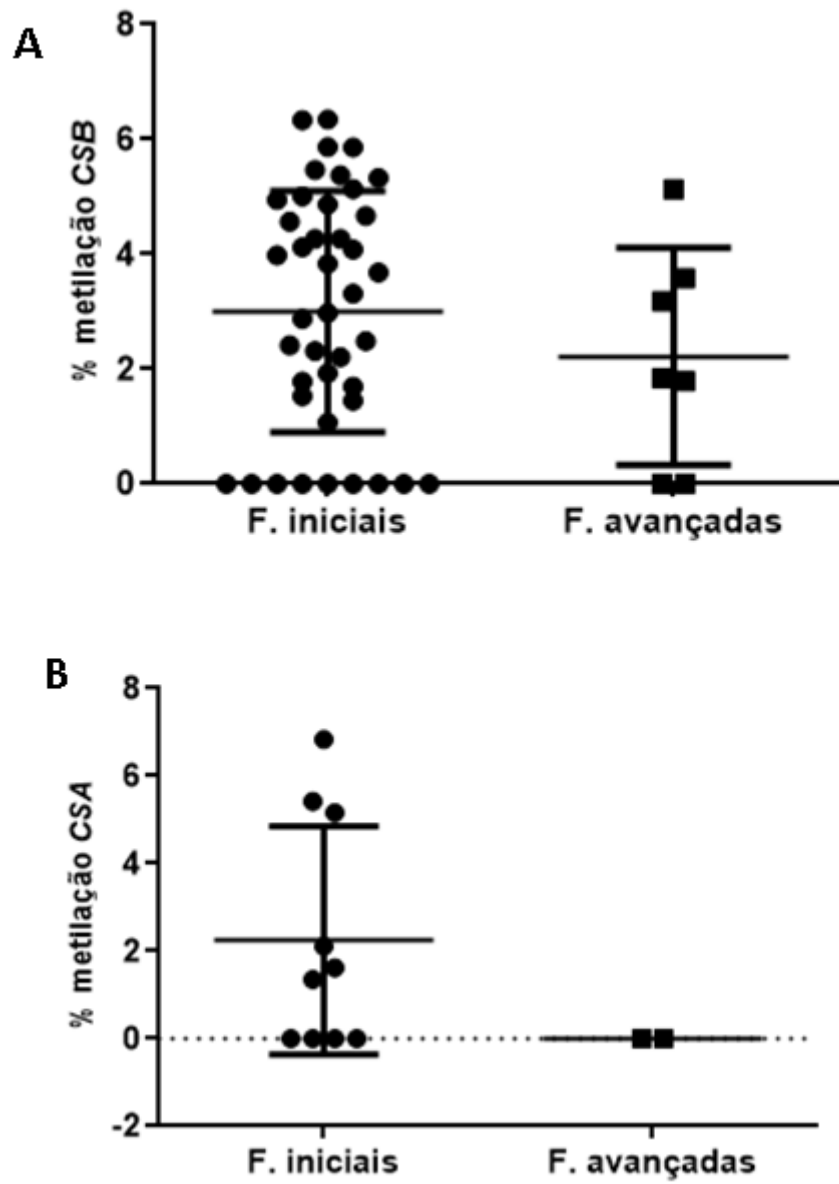
Ao categorizar as classificações da SMD em formas iniciais (SMD-SA-DU, SMD-DM, SMD-DU, SMD-SA-DM) e avançadas (SMD-EB1, SMD-EB2) da doença, foi possível observar uma porcentagem de metilação inferior em formas avançadas (mediana = 7,25) em relação as formas iniciais (mediana = 9,25) da doença ( $p = 0,019$ ) para o gene *XPA* (Figura 26). Quanto aos genes *CSB* (Figura 27A) e *CSA* (Figura 27B) não foi possível observar diferença na porcentagem de metilação para a variável formas da SMD ( $p > 0,05$ ) (Tabela 15).

**Figura 26.** Perfil de metilação do gene *XPA* em pacientes com SMD frente a variável formas da doença.



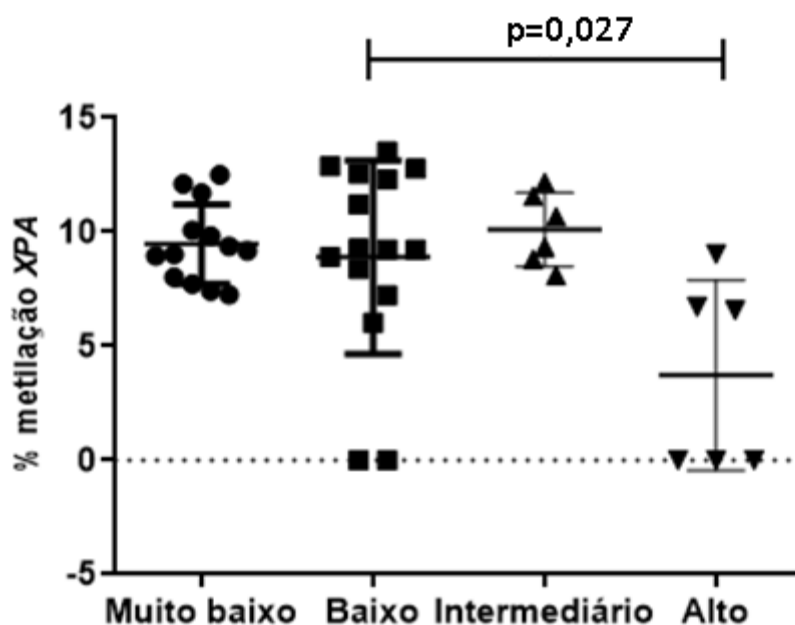
GENE <i>XPA</i>	Metilação					Teste de MannWhitney†
	Contagem (n)	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
Forma da SMD						
Formas Iniciais	46	9,25	3,30	0,00	13,52	<b>p=0,019</b>
Formas Avançadas	10	7,25	2,81	0,00	10,76	

**Figura 27.** Perfil de metilação dos genes *CSA* e *CSB* em pacientes com SMD frente a variável formas da doença.



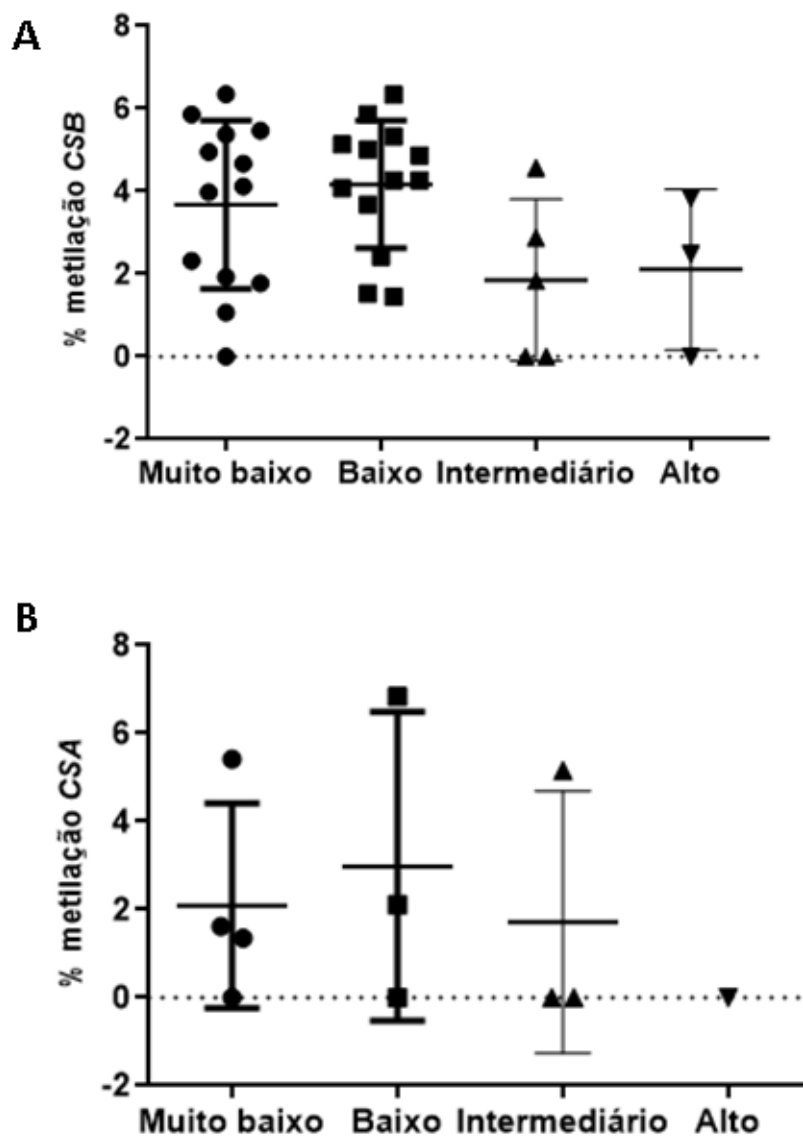
Em relação à variável classificação de risco do IPSS-R em que se enquadram os pacientes com SMD, foi observada diferença da porcentagem de metilação entre categoria alto risco e baixo risco ( $p = 0,027$ ) para o gene *XPA*, no qual o grupo alto risco mostrou menor porcentagem de metilação (mediana = 3,29) quando comparado ao grupo baixo risco (mediana = 9,24) (Figura 28). Para os genes *CSB* (Figura 29A) e *CSA* (Figura 29B) não foram encontradas diferenças de metilação para a classificação de risco do IPSS-R ( $p > 0,05$ ) (Tabela 15).

**Figura 28.** Perfil de metilação do gene *XPA* em pacientes com SMD frente a variável classificação de risco do IPSS-R.



GENE <i>XPA</i>		Metilação					Teste de Kruskal- Wallis†
		Contagem (n)	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
CATEGORIAS DE RISCO DO IPSS-R	M.Baixo	13	9,17	1,74	7,21	12,50	<b>p= 0,027</b>
	Baixo	15	9,24	4,25	0,00	13,52	
	Interm.	6	10,01	1,61	8,11	12,18	
	Alto	6	3,29	4,17	0,00	9,04	
	M. Alto	0	-	-	-	-	

**Figura 29.** Perfil de metilação dos genes *CSB* e *CSA* em pacientes com SMD frente à variável classificação de risco do IPSS-R.



Não foram encontradas diferenças significantes com relação ao perfil de metilação dos genes *XPA*, *CSB* e *CSA* para as demais variáveis: Gênero, Níveis de Hemoglobina, Contagem absoluta de neutrófilos (ANC), Níveis de Plaquetas, Celularidade da MO, Displasias, Classificação da WHO 2016, Cariótipo, Dependência transfusional e Evolução para LMA ( $p > 0,05$ ) (Tabela 15).



**Tabela 15.** Descrição dos resultados de perfil de metilação das variáveis de SMD analisadas no estudo.

		% XPA		% CSB		% CSA	
		Mediana (mínimo - máximo)	Sig.	Mediana (mínimo - máximo)	Sig.	Mediana (mínimo - máximo)	Sig.
<i>Sexo</i>	Feminino	9,22 (0,00 - 13,52)	0,755	3,08 (0,00 - 6,35)	0,626	1,62 (0,00 - 5,42)	0,639
	Masculino	8,80 (0,00 - 12,89)		2,88 (0,00 - 5,87)		0,00 (0,00 - 6,84)	
<i>Celularidade</i>	Hipocelular	10,68 (10,68 - 10,68)	0,483	2,88 (2,88 - 2,88)	0,431	0,00 (0,00 - 0,00)	0,335
	Normocelular	9,22 (8,95 - 12,18)		1,73 (1,53 - 1,93)		5,42 (5,42 - 5,42)	
	Hiper celular	8,80 (0,00 - 15,30)		4,08 (0,00 - 6,34)		1,87 (0,00 - 6,84)	
<i>Diseritro</i>	Sim	9,09 (0,00 - 13,52)	0,700	3,45 (0,00 - 6,35)	0,783	0,00 (6,84 - 0,00)	0,500
	Não	9,22 (6,77 - 12,30)		4,08 (1,53 - 5,13)		5,16 (5,16 - 5,16)	
<i>Disgranulo</i>	Sim	8,95 (0,00 - 12,89)	0,575	3,32 (0,00 - 5,87)	0,842	1,06 (0,00 - 5,42)	0,818
	Não	9,19 (0,00 - 13,52)		3,91 (0,00 - 6,35)		0,68 (0,00 - 6,84)	
<i>Dismega</i>	Sim	9,25 (0,00 - 13,52)	0,182	3,25 (0,00 - 6,34)	0,565	0,00 (0,00 - 5,16)	0,639
	Não	8,80 (0,00 - 12,50)		3,84 (0,00 - 6,35)		1,35 (0,00 - 6,84)	
<i>Hb</i>	< 10	8,98 (0,00 - 13,52)	0,219	3,58 (0,00 - 6,35)	0,886	0,68 (0,00 - 6,84)	-
	>= 10	9,83 (7,25 - 12,18)		3,32 (1,07 - 4,95)			
<i>Hb categorizada</i>	< 8	9,13 (0,00 - 12,77)	0,301	3,18 (0,00 - 6,35)	0,886	0,68 (0,00 - 5,42)	-
	8 - 10	8,41 (0,00 - 13,52)		3,96 (0,00 - 6,34)		1,06 (0,00 - 6,84)	
	> 10	9,83 (7,25 - 12,18)		3,32 (1,07 - 4,95)			
<i>ANC</i>	< 1.800	8,80 (0,00 - 12,89)	0,052	2,21(0,00 - 6,34)	0,243	0,00 (0,00 - 6,84)	1,000
	>= 1.800	9,34 (0,00 - 13,52)		4,03 (0,00 - 6,35)		1,35 (0,00 - 5,16)	
<i>Plaquetas</i>	< 100.000	9,21 (0,00 - 13,52)	0,749	2,49 (0,00 - 6,34)	0,094	0,00 (0,00 - 6,84)	0,432
	>= 100.000	9,121 (0,00 - 12,55)		4,05 (0,00 - 6,35)		1,62 (0,00 - 5,16)	
<i>Plaquetas categorizada</i>	< 50.000	8,41 (0,00 - 13,52)	0,686	3,03 (0,00 - 5,13)	0,886	0,00 (0,00 - 0,00)	-
	50.000 - < 100.000	9,25 (0,00 - 12,89)		2,12 (0,00 - 6,34)		5,42 (0,00 - 6,84)	

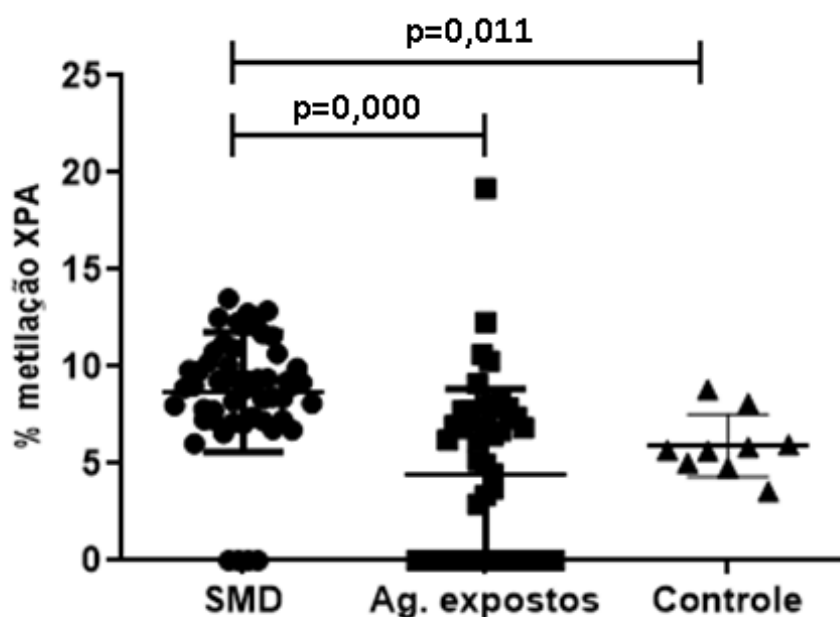
	>= 100.000	9,12 (0,00 - 12,55)		4,05 (0,00 - 6,35)		1,62 (0,00 - 5,16)	
<i>Cariotipo</i>	Normal	9,13 (0,00 - 12,89)		4,03 (0,00 - 6,35)		1,87 (0,00 - 5,42)	
	Alterado	9,10 (0,00 - 13,52)	0,741	3,50 (0,00 - 5,38)	0,470	0,00 (0,00 - 6,84)	0,537
<i>Classificação WHO 2016</i>	SMD-SA-DU	10,07 (6,58 - 12,50)		4,12 (3,84 - 6,35)		0,68 (0,00 - 1,35)	
	SMD-DU	9,37 (0,00 - 12,30)		3,98 (0,00 - 5,47)		4,23 (1,62 - 6,84)	
	SMD-DM	9,28 (0,00 - 13,52)	0,209	2,32 (0,00 - 6,34)	0,409	1,06 (0,00 - 5,42)	0,402
	SMD-SA-DM	8,35 (0,00 - 12,55)		4,27 (0,00 - 5,86)			
	SMD-EB1	8,03 (6,77 - 9,04)		1,84 (1,79 - 5,13)		0 (0,00 - 0,00)	
	SMD-EB2	7,15 (0,00 - 10,76)		159 (0,00 - 3,58)		0 (0,00 - 0,00)	
<i>Formas da SMD</i>	Formas iniciais	9,25 (0,00 - 13,52)		3,15 (0,00 - 6,35)		1,49 (0,00 - 6,84)	
	Formas avançadas	7,25 (0,00 - 10,76)	<b>0,019</b>	1,84 (0,00 - 5,13)	0,361	0 (0,00 - 0,00)	0,273
<i>Categoria de risco IPSS-R</i>	Muito baixo	9,17 (7,25 - 12,50)		4,12 (0,00 - 6,35)		1,49 (0,00 - 5,42)	
	Baixo	9,24 (0,00 - 13,52)		4,27 (1,45 - 6,34)		2,11 (0,00 - 6,84)	
	Intermediario	10,01 (8,11 - 12,18)	<b>0,027</b>	1,84 (0,00 - 4,57)	0,117	0,00 (0,00 - 5,16)	0,608
	Alto	3,29 (0,00 - 9,04)		2,49 (0,00 - 3,84)		0 (0,00 - 0,00)	
	Muito alto						
<i>Dependencia transfusional</i>	Sim	8,70 (0,00 - 12,89)		3,63 (0,00 - 6,34)		1,62 (0,00 - 6,84)	
	Não	9,06 (6,03 - 12,50)	0,575	3,10 (0,00 - 6,35)	0,912	0,68 (0,00 - 5,42)	0,662
<i>Progressão para LMA</i>	Sim	7,25 (6,03 - 10,76)		5,14 (0,00 - 5,87)		2,11 (2,11 - 2,11)	
	Não	9,23 (0,00 - 12,89)	0,209	3,58 (0,00 - 6,35)	0,687	0,00 (0,00 - 5,42)	0,600

Legenda: sig. significância, valor de “p”. Valor estatisticamente significante para  $p \leq 0,05$ .

#### 4.5. Perfil de metilação entre os grupos avaliados no estudo dos genes *XPA*, *CSB* e *CSA*

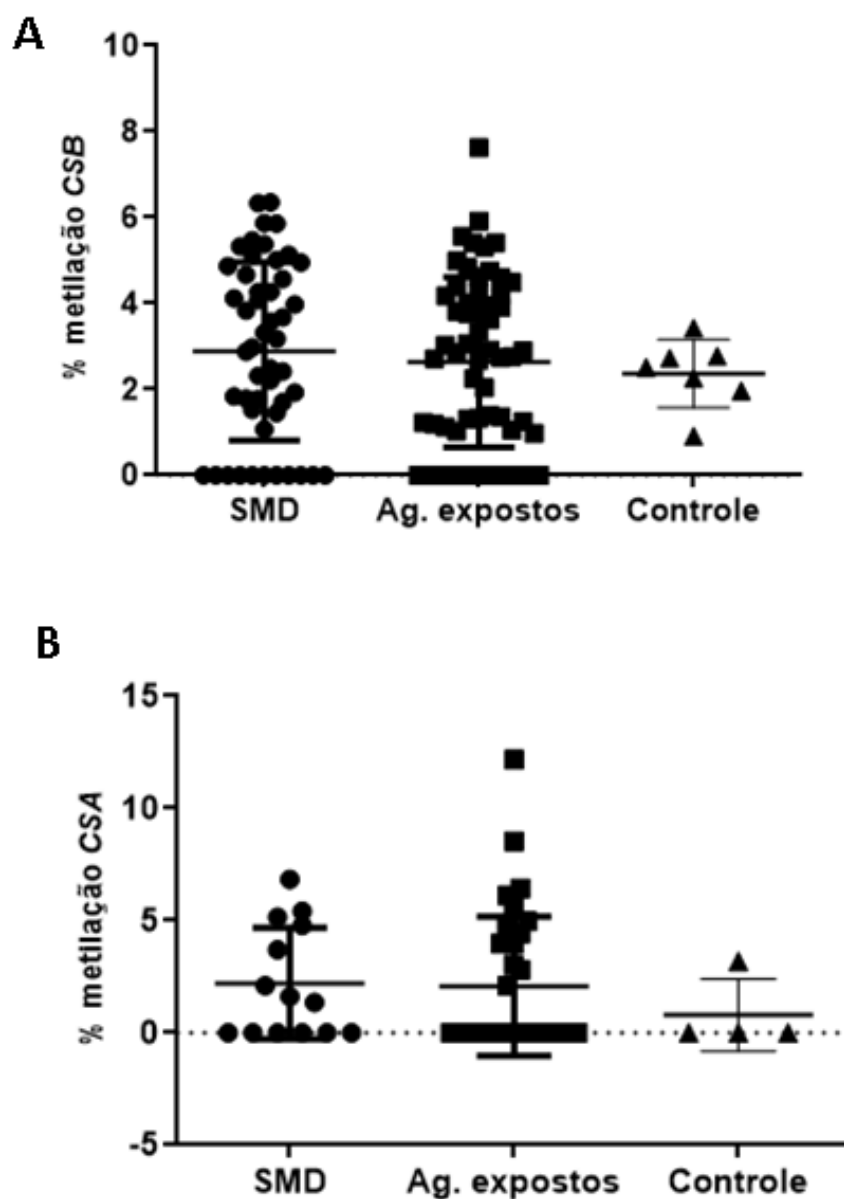
Como a exposição a agrotóxicos pode estar relacionada com o desenvolvimento de neoplasias, o perfil de metilação dos genes *XPA*, *CSB* e *CSA* foi comparado entre o grupo SMD e agricultores. Também foi avaliado o perfil de metilação em relação ao grupo de indivíduos controle. Foi observado uma diferença do perfil de metilação entre os três grupos, no qual o grupo SMD apresentou maior porcentagem de metilação (mediana = 9,04) em relação ao grupo de agricultores expostos (mediana= 4,98) ( $p=0,000$ ) e também em relação ao grupo controle (mediana = 5,70) ( $p = 0,011$ ) (Figura 30). Em relação ao gene *CSB* (Figura 31A) e *CSA* (Figura 31B) não houve diferença no perfil de metilação entre estes grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 16).

**Figura 30.** Perfil de metilação do gene *XPA* entre os grupos SMD, agricultores expostos e controle.



GENE <i>XPA</i>		Metilação					Teste de Kruskal- Wallis†
		Contagem (n)	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
GRUPOS	SMD	55	9,04	3,08	0,00	13,52	p= 0,000
	Ag. Exposto	47	4,98	4,40	0,00	19,20	
	Controle	10	5,70	1,62	3,57	8,82	

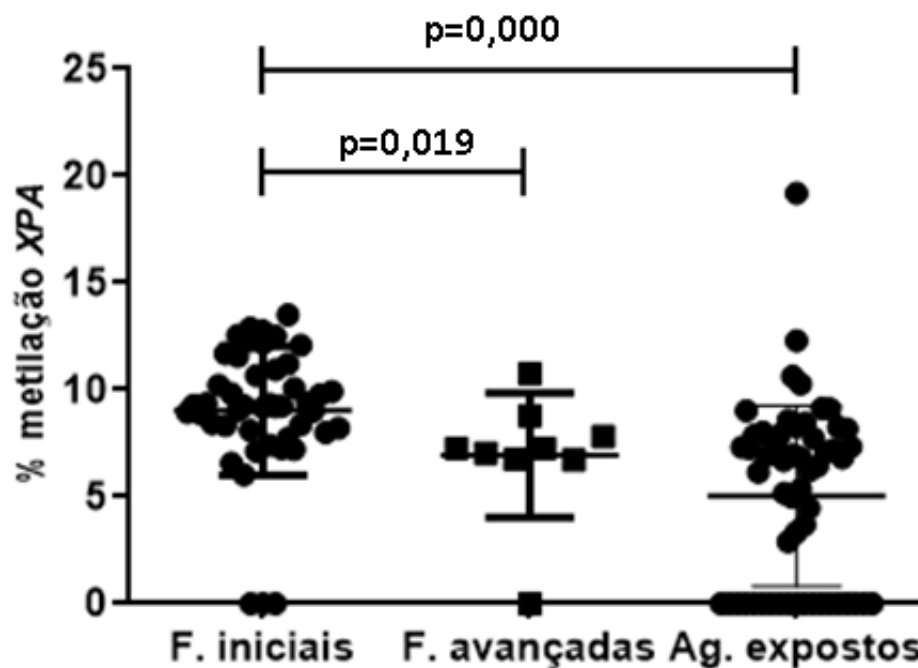
**Figura 31.** Perfil de metilação dos genes *CSA* e *CSB* entre os grupos SMD, agricultores expostos e controle.



Ao estratificar o grupo de pacientes com SMD nas fases iniciais e avançadas da doença para avaliar o perfil de metilação em relação aos agricultores expostos, foi possível observar uma porcentagem maior de metilação da SMD na fase inicial (mediana = 9,25) em relação ao grupo de agricultores expostos (mediana = 4,98) ( $p = 0,000$ ) para o gene *XPA* (Figura 32). Para a SMD na sua fase avançada (mediana = 7,25) não foi observada diferença em relação ao grupo de agricultores ( $p > 0,05$ ) (Figura 32). Para o

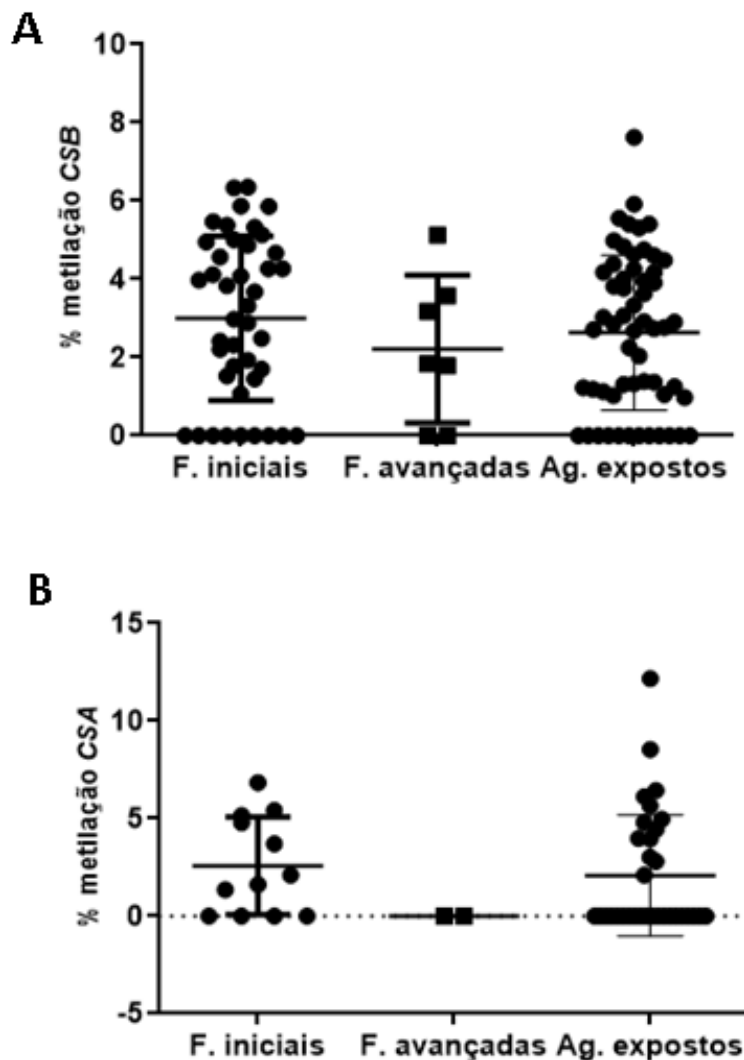
gene *CSB* (Figura 33A) e *CSA* (Figura 33B) não foi observada diferença entre estes grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 16).

**Figura 32.** Perfil de metilação do gene *XPA* entre os grupos SMD nas suas formas iniciais e avançadas e o grupo de agricultores expostos.



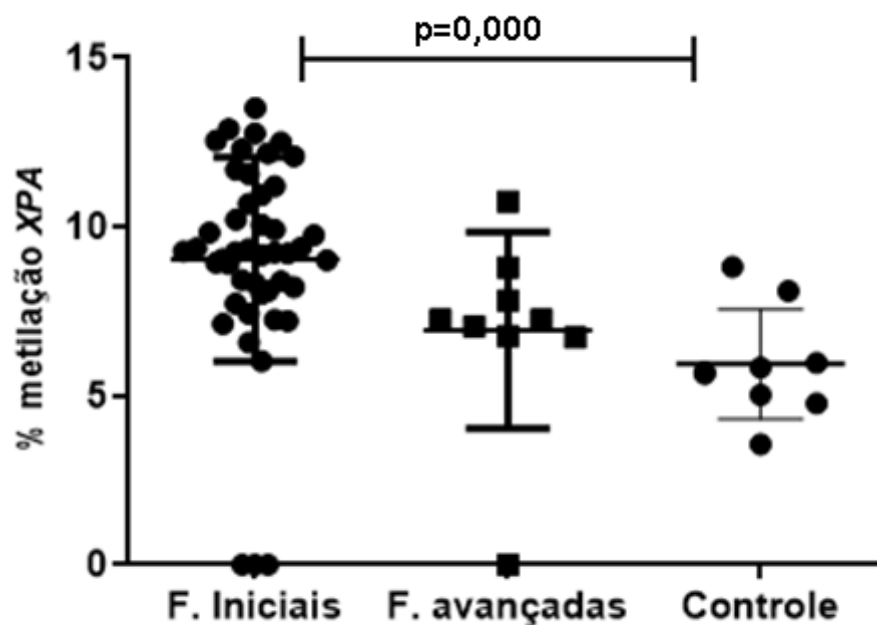
GENE <i>XPA</i>		Metilação					Teste de Kruskal- Wallis†
		Contagem (n)	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
GRUPOS	Formas Iniciais	45	9,25	3,02	0,00	13,52	<b>p= 0,000</b>
	Formas avançadas	10	7,25	2,90	0,00	10,76	
	Ag. Exposto	47	4,98	4,40	0,00	19,20	

**Figura 33.** Perfil de metilação dos genes *CSB* e *CSA* entre os grupos SMD nas suas formas iniciais e avançadas e o grupo de agricultores expostos.



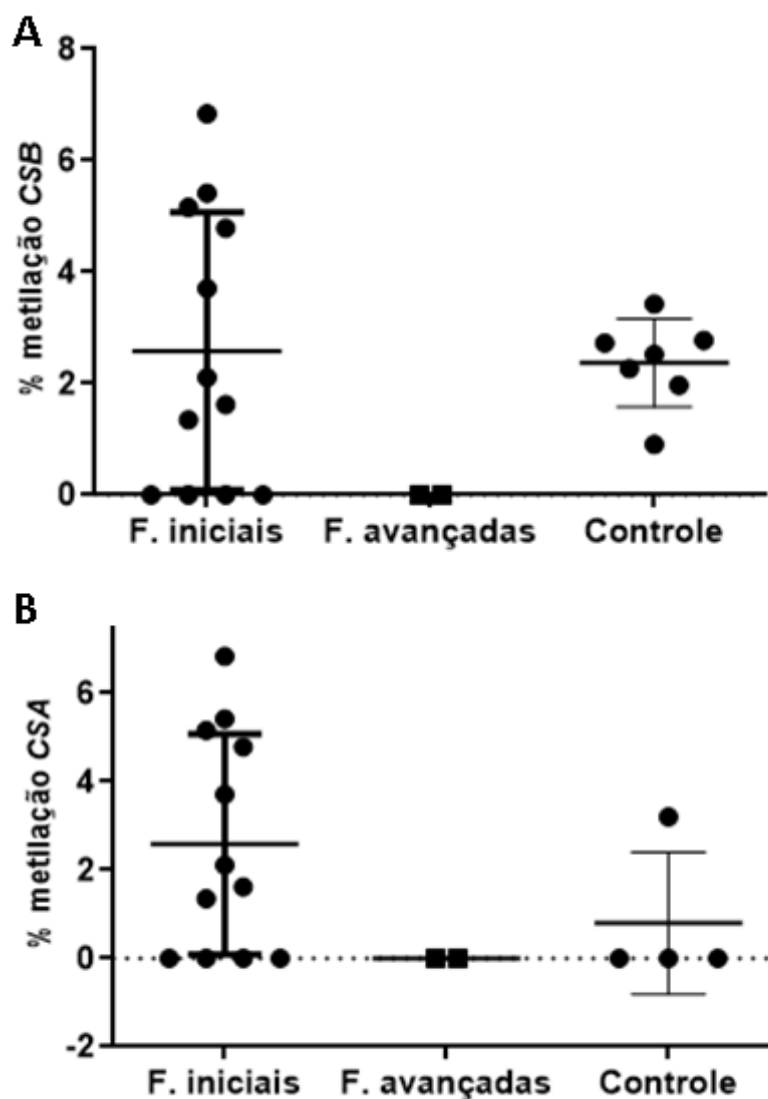
Também foi avaliado o perfil de metilação entre as formas da SMD e o grupo controle. Foi observado uma maior porcentagem de metilação no grupo de SMD na sua forma inicial (mediana = 9,25) em relação ao grupo controle (mediana = 5,70) ( $p = 0,000$ ) (Figura 34). Não foi visto diferença entre a SMD na sua forma avançada com o grupo controle ( $p > 0,05$ ). Para o gene *CSB* (Figura 35A) e *CSA* (Figura 35B) não foi observada diferença entre estes grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 16).

**Figura 34.** Perfil de metilação do gene *XPA* entre os grupos SMD nas suas formas iniciais e avançadas e o grupo controle.



GENE <i>XPA</i>		Metilação					Teste de Kruskal- Wallis†
		Contagem (n)	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
GRUPOS	Formas Iniciais	45	9,25	3,02	0,00	13,52	$p= 0,000$
	Formas avançadas	10	7,25	2,90	0,00	10,76	
	Controle	10	5,70	1,62	3,57	8,82	

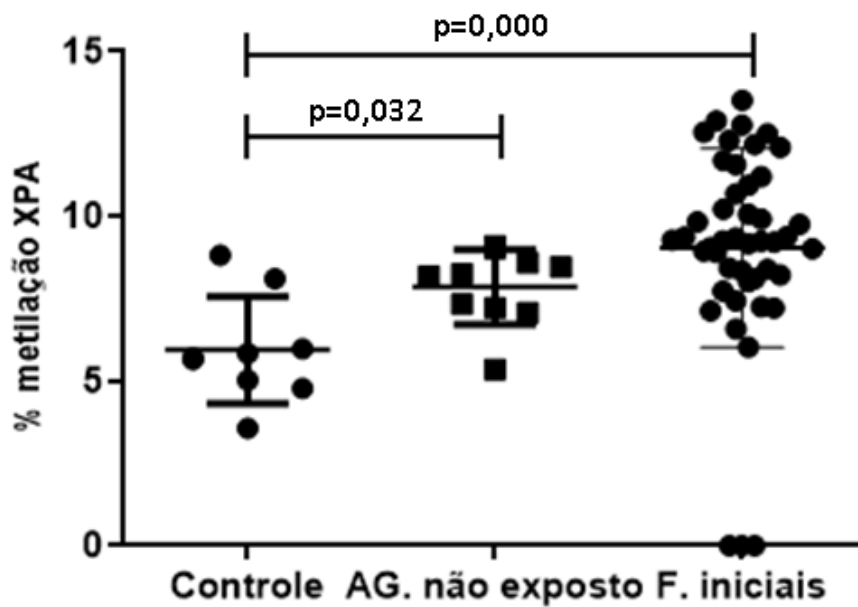
**Figura 35.** Perfil de metilação dos genes *CSB* e *CSA* entre os grupos SMD nas suas formas iniciais e avançadas e o grupo controle.



Foi analisado o perfil de metilação entre os grupos formas iniciais da SMD, agricultores não expostos e o grupo controle. Logo, foi possível observar maior porcentagem de metilação no grupo da SMD (mediana = 9,25) em relação ao grupo da agricultura ecológica (não expostos) (mediana = 8,21) ( $p=0,032$ ) e também em relação ao grupo controle (mediana = 5,70) ( $p=0,000$ ) (Figura 36). Quanto ao gene *CSB* (Figura 37A) e *CSA* (Figura 37B) não foi observada diferença entre estes grupos ( $p > 0,05$ ), apesar de mostrarem maiores medianas para SMD (Tabela 16).

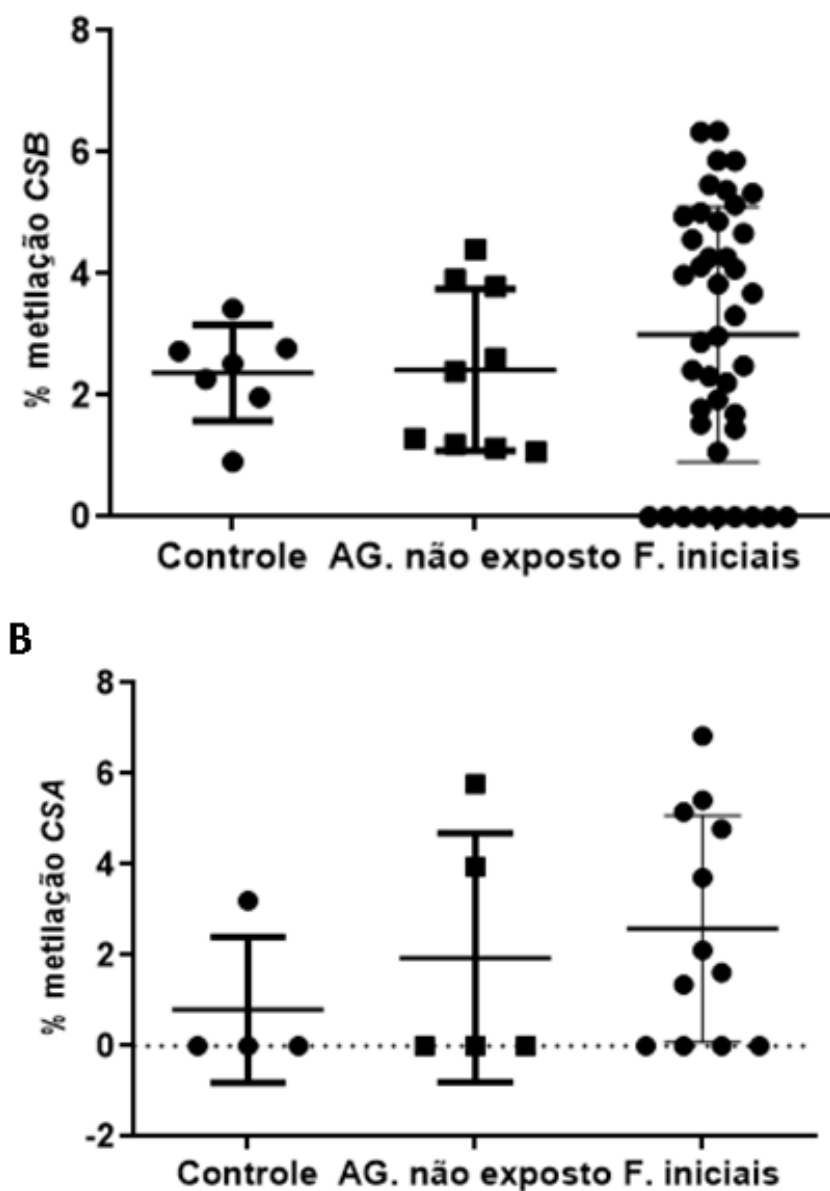


**Figura 36.** Perfil de metilação do gene *XPA* entre os grupos SMD nas suas formas iniciais, agricultores não expostos e controle.



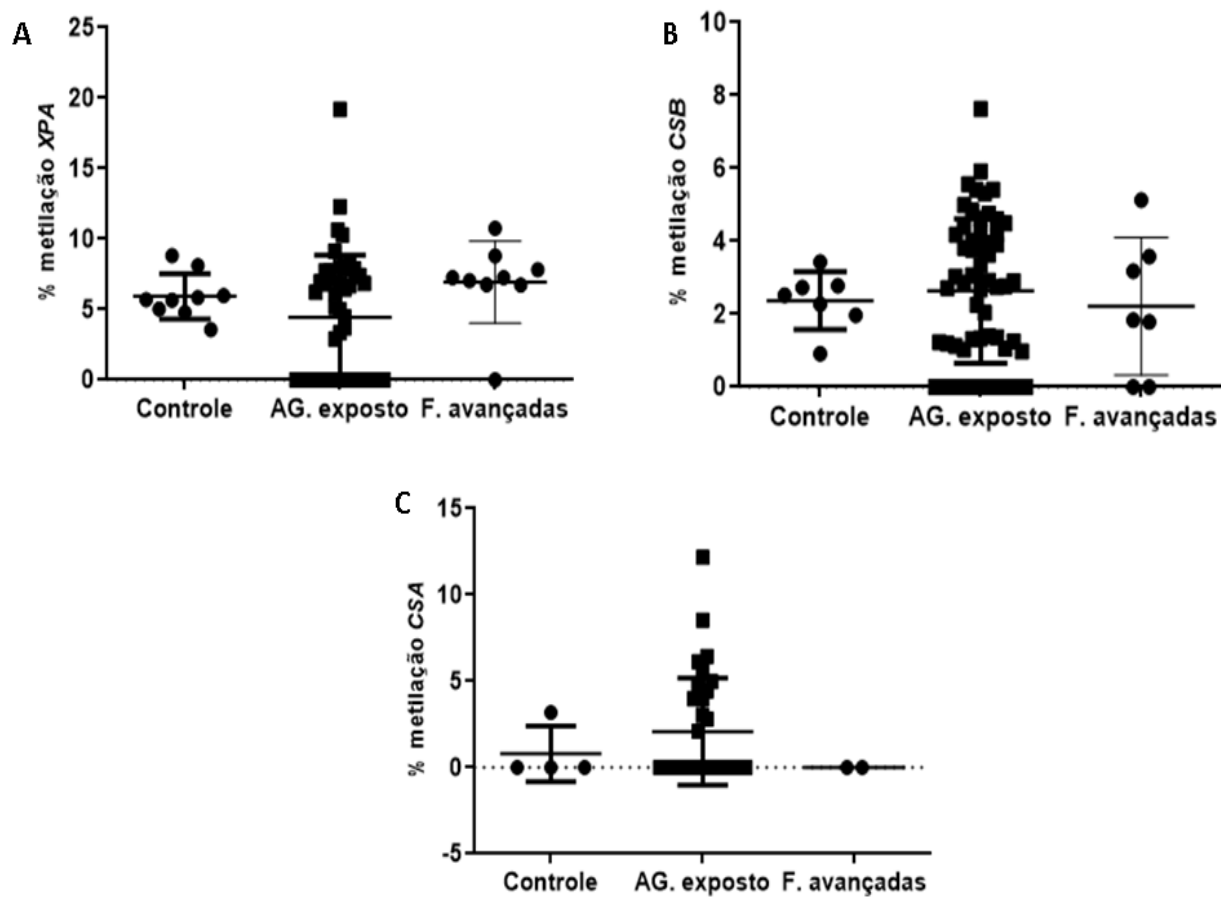
GENE <i>XPA</i>		Metilação					Teste de Kruskal- Wallis†
		Contagem (n)	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	
GRUPOS	Controle	10	5,70	1,62	3,57	8,82	p= 0,000
	Formas Iniciais	45	9,25	3,02	0,00	13,52	
	Ag. Não exposto	10	8,21	1,14	5,36	9,11	

**Figura 37.** Perfil de metilação dos genes *CSB* e *CSA* entre os grupos SMD nas suas formas iniciais, agricultores não expostos e controle.



Também foi avaliado o perfil de metilação entre os grupos formas avançadas da SMD, agricultores expostos e o grupo controle. No entanto, não foi encontrada diferença no perfil de metilação entre estes grupos para o gene *XPA* (Figura 38A), *CSB* (Figura 38B) e *CSA* (Figura 38C) ( $p > 0,05$ ) (Tabela 16).

**Figura 38.** Perfil de metilação dos genes *XPA*, *CSB* e *CSA* entre os grupos SMD na sua forma avançada, agricultores expostos e controle.



**Tabela 16.** Descrição dos resultados de perfil de metilação entre os grupos avaliados no estudo.

		Metilação XPA		Metilação CSB		Metilação CSA	
		Mediana (mínimo – máximo)	sig	Mediana (mínimo – máximo)	sig.	Mediana (mínimo – máximo)	sig
<b>Grupos SMD_AGexp_CT</b>	Controle	5,70 (3,57 - 8,82)		2,52 (0,91 - 3,43)		0,00 (0,00 - 3,20)	
	SMD	9,04 (0,00 - 13,52)	0,000	2,98 (0,00 - 6,35)	0,642	1,41 (0,00 - 6,84)	0,537
	AG exposto	4,98 (0,00 - 19,20)		2,77 (0,00 - 7,63)		0,00 (0,00 - 12,17)	
<b>Grupos SMD_AGexp</b>	SMD	9,04 (0,00 - 13,52)	0,000	2,98 (0,00 - 6,35)	0,443	1,49 (0,00 - 6,84)	0,523
	AG exposto	4,98 (0,00 - 19,20)		2,77 (0,00 - 7,63)		0,00 (0,00 - 12,17)	
<b>Formas SMD_AGexp</b>	SMD formas avançadas	7,25 (0,00 - 10,76)		1,84 (0,00 - 5,13)		1,87 (0,00 - 0,00)	
	SMD formas iniciais	9,25 (0,00 - 13,52)	0,000	3,15 (0,00 - 6,35)	0,471	0,00 (0,00 - 6,84)	0,264
	AG exposto	4,98 (0,00 - 19,20)		2,77 (0,00 - 7,63)		0,00 (0,00 - 12,17)	
<b>Formas SMD_CT</b>	Controle	5,70 (3,57 - 8,82)		2,52 (0,91 - 3,43)		0,00 (0,00 - 3,20)	
	SMD alto risco	7,25 (0,00 - 10,76)	0,000	1,84 (0,00 - 5,13)	0,504	0,00 (0,00 - 0,00)	0,148
	SMD baixo risco	9,25 (0,00 - 13,52)		3,15 (0,00 - 6,35)		1,87 (0,00 - 6,84)	
<b>SMD FA_AGexp_CT</b>	Controle	5,70 (3,57 - 8,82)		2,52 (0,91 - 3,43)		0,00 (0,00 - 3,20)	
	AG exposto	4,98 (0,00 - 19,20)	0,125	2,77 (0,00 - 7,63)	0,807	0,00 (0,00 - 12,17)	0,446
	SMD formas avançadas	7,25 (0,00 - 10,76)		1,84 (0,00 - 5,13)		0,00 (0,00 - 0,00)	
<b>SMD FI_AG não exp_CT</b>	Controle	5,70 (3,57 - 8,82)		2,52 (0,91 - 3,43)		0,00 (0,00 - 3,20)	
	AG não exposto	8,21 (5,36 - 9,11)	0,000	2,40 (1,07 - 4,40)	0,526	0,00 (0,00 - 5,78)	0,371
	SMD formas iniciais	9,25 (0,00 - 13,52)		3,15 (0,00 - 6,35)		1,87 (0,00 - 6,84)	

**Legenda.** AGexp. agricultor exposto; AGnão exp. agricultor não exposto; FA. formas avançadas; FI. formas iniciais; CT. controle.

#### 4.6 Análises de correlação e associação entre os níveis de expressão e metilação dos genes *XPA*, *CBS* e *CSA* para os grupos de estudo.

Para análise de correlação entre as expressões e metilação dos genes de reparo foram utilizados dados de expressão gênica previamente estabelecidos pelo nosso grupo de pesquisa.

Foi realizada correlação de *Spearman* entre as expressões e as metilações dos agricultores avaliados no estudo. No entanto, não foi observada correlação significativa para os genes *XPA*, *CSB* e *CSA* (Tabela 17).

**Tabela 17:** Análise de correlação entre os níveis de expressão e metilação dos genes *XPA*, *CSB* e *CSA* em amostras de agricultores expostos a pesticidas.

Genes	Coefficiente de correlações	Teste	N
<b>Correlação_Expressão_XPA</b>			
<b>Correlação_Metilação_XPA</b>	0,197	Teste de Spearman	43
<b>Correlação_Expressão_CSB</b>			
<b>Correlação_Metilação_CSB</b>	0,087	Teste de Spearman	47
<b>Correlação_Expressão_CSA</b>			
<b>Correlação_Metilação_CSA</b>	0,152	Teste de Spearman	28

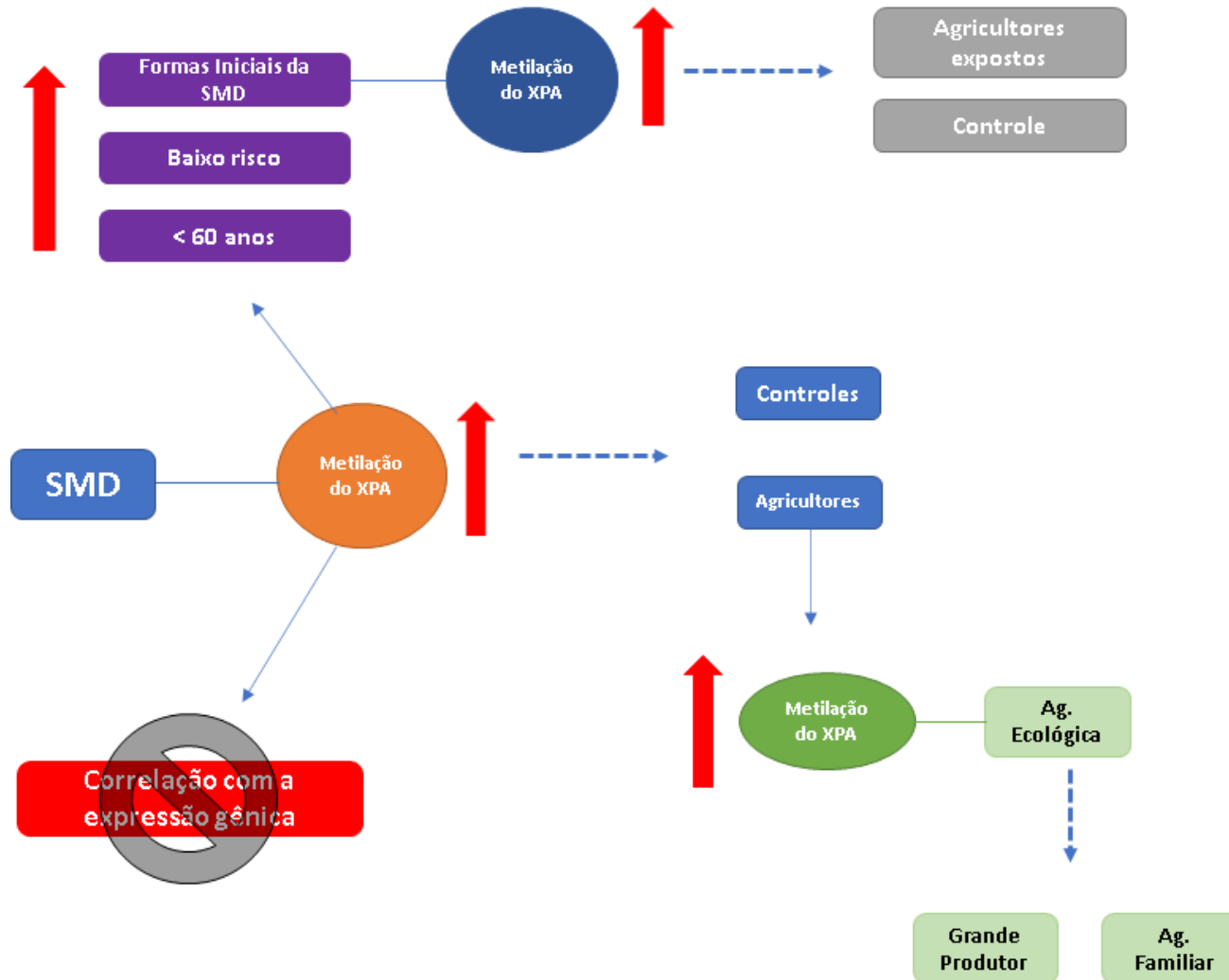
Não foi observada correlação entre as expressões e as metilações dos pacientes de SMD para os genes *XPA*, *CSB* e *CSA* (Tabela 18).

Correlações de expressão e metilação também foram realizadas para pacientes em fases avançadas da SMD e também para as formas iniciais, porém também não foram encontradas correlações significantes para o gene *XPA*, *CSB* e *CSA* (Tabela 18).

**Tabela 18:** Análise de correlação entre os níveis de expressão e metilação dos genes *XPA*, *CSB* e *CSA* em amostras de pacientes com SMD.

<b>Genes</b>	<b>Coefficiente de correlações</b>	<b>Teste</b>	<b>N</b>
<b>Correlação_Expressão_XPA</b> <b>Correlação_Metilação_XPA</b>	0,136	Teste de Spearman	56
<b>Correlação_Expressão_CSB</b> <b>Correlação_Metilação_CSB</b>	-0,033	Teste de Spearman	49
<b>Correlação_Expressão_CSA</b> <b>Correlação_Metilação_CSA</b>	-0,096	Teste de Spearman	12
<b>Correlação_Expressão_XPA</b> <b>Correlação_Metilação_XPA</b>	0,355	Teste de Spearman	10
<b>Correlação_Expressão_CSB</b> <b>Correlação_Metilação_CSB</b>	0,144	Teste de Spearman	7
<b>Correlação_Expressão_CSA</b> <b>Correlação_Metilação_CSA</b>	-	Teste de Spearman	2
<b>Correlação_Expressão_XPA</b> <b>Correlação_Metilação_XPA</b>	0,184	Teste de Spearman	46
<b>Correlação_Expressão_CSB</b> <b>Correlação_Metilação_CSB</b>	-0,011	Teste de Spearman	42
<b>Correlação_Expressão_CSA</b> <b>Correlação_Metilação_CSA</b>	-0,025	Teste de Spearman	10

**Figura 39.** Figura resumo dos principais resultados apresentados no presente estudo.



#### 4. DISCUSSÃO

O DNA é continuamente afetado por lesões, mas há um equilíbrio dinâmico entre esses danos e a capacidade que o organismo tem de os corrigir por meio das vias de reparo. Essas lesões podem ter origem intrínsecas e extrínsecas, gerando estresse genotóxico nas células que podem variar de metabólitos celulares, espécies reativas de oxigênio (ROS), contaminações ambientais e radiação ultravioleta (UV). Quase todos esses agentes prejudiciais podem ser reparados, no entanto, essas vias também podem ser prejudicadas e terem sua eficácia reduzida por falhas em seus mecanismos de regulação, suprimindo ou ativando genes que atuam no processo de reparo. A consequência das falhas desse sistema poderá implicar em processos mutagênicos, carcinogênicos, senescência e morte celular, o que está relacionado ao desenvolvimento de várias doenças, como o câncer (ARAÚJO, 2019; RIBEZZO, 2016; PILIÉ, 2018; LANGIE, 2015).

As deleções cromossômicas encontradas na SMD podem ser resultado típico de quebra da fita de DNA, reparadas de forma errônea ou até não reparadas, o que aponta para defeitos na maquinaria de reparo de DNA. (KURAMOTO et al., 2002; MUFTI, 1992). Na SMD, a avaliação de alterações cromossômicas é um dos principais fatores prognósticos (GREENBERG et al, 2012) e nesse estudo encontramos alterações cromossômicas em 28,6% dos casos avaliados. No grupo de agricultores, também foram observadas alterações citogenéticas, principalmente nos grupos expostos aos agrotóxicos (grandes produtores), demonstrando assim que alterações cromossômicas estão mais evidenciadas com a exposição mais intensa. Os danos cromossômicos são biomarcadores relevantes para a predisposição ao câncer e o biomonitoramento citogenético é considerado ferramenta importante para avaliar os possíveis efeitos genotóxicos de uma determinada exposição (KOIFMAN; HATAGIMA, 2003). A presença de alterações cromossômicas nos agricultores expostos fortalece essa exposição como um fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias, visto que a presença de alterações citogenéticas é uma das consequências das lesões de DNA.

Apesar da sua patogênese ainda não ser bem elucidada, a metilação do DNA tem sido descrita como um importante fator desencadeador da SMD (CAVALCANTE et al., 2020; DE SOUSA et al., 2019; MAEGAWA et al., 2014; YAMAZAKI; ISSA, 2013). Avaliamos o perfil de metilação em genes de reparo de fita simples do DNA em amostras de MO de pacientes diagnosticados com síndrome mielodisplásica e de agricultores expostos a agrotóxicos, ou seja, que apresentam um fator de risco contribuinte para o



desenvolvimento da SMD. Este tipo de estudo nunca antes foi realizado, compreendendo dados novos e intrigantes, mas que necessitarão de mais pesquisas e estudos para melhor compreensão da atuação dos agrotóxicos e para possíveis descobertas de biomarcadores de exposição contribuintes para o desenvolvimento da SMD.

A metilação do DNA tem sido cada vez mais reconhecida como uma ligação importante entre exposição ambiental e o desenvolvimento de doenças (TERRY et al., 2011; VAN DER PLAAT et al., 2018). Várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de enfatizar os danos que os agrotóxicos podem apresentar à saúde humana (BARRÓN CUENCA et al., 2020; BRASIL et al., 2018; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2017), Van Der Plaat e colaboradores (2018) buscaram associar a exposição ocupacional de 1.561 indivíduos com a metilação do DNA em todo genoma e identificaram que a alta exposição a pesticidas estava associada a metilação de DNA de 31 pontos CGs em 29 genes. Vários dos genes encontrados, como *RYR1*, *ALLC*, *PTPRN2*, *LRRC3B*, *PAX2* e *VTRNA2-1* já haviam sido previamente relacionados a exposição a pesticidas. Além disso, sete de 31 pontos CpGs foram associados com os níveis de expressão gênica (VAN DER PLAAT et al, 2018).

Ao avaliarmos a metilação no grupo que apresenta um fator de risco para o desenvolvimento da SMD, o de agricultores expostos aos agrotóxicos, observamos porcentagens de metilação do gene *XPA* nos três subgrupos avaliados (grande produtor, agricultura familiar e agricultura ecológica), no entanto, o grupo da agricultura ecológica (não exposto nos últimos 10 anos) mostrou um perfil maior de metilação em relação aos grupos com exposição. *XPA* é uma proteína central da via NER, necessária tanto para o GG-NER quanto para o TC-NER. Apesar de não ter atividade enzimática, atua na montagem do complexo pré-incisão da lesão no DNA, sua interação com TFIIH permite o seu recrutamento para o local do dano seguido da atividade de levar ao posicionamento adequado dos demais fatores de NER, como a endonuclease *XPF* para que ocorra a incisão do dano (DUAN et al., 2020; KEMP; HU, 2017; SCHÄRER, 2013b). Podemos sugerir que a menor metilação do gene *XPA* nos grupos expostos pode estar relacionada com uma maior atividade do gene nesse grupo, que devido aos danos possivelmente ocasionados pela exposição, neste momento, necessitam de maior atuação do sistema de reparo do DNA, que pode estar funcionando ativamente, ou seja, com maior atividade gênica após anos de exposição.

Em pacientes portadores de SMD, observamos um menor perfil de metilação dos genes *XPA* e *CSB* naqueles com idade superior a 60 anos. O dano de DNA é o processo que mais contribui com o envelhecimento e senescência celular, sendo a falha no sistema de resposta ao dano de DNA um dos grandes causadores do processo de senescência (HERNANDEZ-SEGURA; NEHME; DEMARIA, 2018; OU; SCHUMACHER, 2018). O processo de senescência nas células-tronco hematopoiéticas está relacionado a alterações epigenéticas e metabólicas, porém o papel dos danos de DNA e os efeitos da senescência nessas células ainda não está bem elucidada (MCNEELY et al., 2020; SUN et al., 2014). Como SMD é uma doença de idosos, possivelmente, essa menor metilação dos genes *XPA* e *CSB* em indivíduos mais idosos simboliza a necessidade de ativação desse gene, servindo como mecanismo de proteção contra a evolução clonal.

A metilação do *XPA* também apresentou uma diminuição em pacientes nas fases mais avançadas da doença, assim como pacientes inseridos na classificação de alto risco frente a pacientes nas fases iniciais e em classificações de menor risco. Esse gene, portanto, em categorias de maior risco da SMD pode estar menos silenciado, ou seja, nessas fases o gene *XPA* se encontra em atividade gênica. Esse achado corrobora com ideia de que esse gene precisa de maior ativação. Em um estudo prévio do nosso grupo, avaliamos a expressão de genes de reparo de fita simples e fita dupla do DNA em uma coorte de 51 pacientes com SMD e encontramos que os genes *XPA* e *XPC*, que atuam no reconhecimento e checagem do dano, consecutivamente, encontravam-se hiper ativados, isto é, com aumento da expressão em pacientes de risco intermediário, alto risco e muito alto risco do R-IPSS (RIBEIRO et al., 2017). Sendo assim, podemos sugerir que em fases mais avançadas os pacientes com SMD apresentam uma menor porcentagem de metilação e consequentemente maior atividade gênica de *XPA*.

Quando comparamos a metilação em pacientes com Síndrome Mielodisplásica com o grupo de agricultores, encontramos um perfil definitivamente aumentado na SMD em relação aos agricultores e ao grupo controle. Vale salientar que demais estudos têm mostrado resultados de metilação aumentada com a SMD, demonstrando que a hipermetilação da região promotora de vários genes está associada com a progressão da doença (KANG et al., 2015; QIAN et al., 2014; RONG FAN , 2014; WONG, YAN-FUNG, 2014; YAMAZAKI; ISSA, 2013), além desses, Jiang e colaboradores (2009) demonstraram que pacientes com SMD de alto risco possuíam um maior nível de metilação do que em pacientes de SMD de baixo risco e controles normais (JIANG et al.,

2009). Em um estudo avaliando amostras de 317 pacientes com SMD, Shen e colaboradores (2010) selecionaram um painel de genes, após um screening inicial, e detectaram que os genes *E-caderina (CDH1)*, *N-caderina (CDH13)*, *Receptor alfa-estrogênico (ER $\alpha$ )*, *Nucleoplasmina 2 (NPM2)*, *Fator 2 de transcrição de Oligodendrócitos (OLIG2)*, *Inibidor 2b de quinase dependente de ciclina (p15<sup>INK4B</sup>)*, *Receptor A da progesterona (PGRA)*, *Receptor B da Progesterona (PGRB)*, *Domínio 4 PDZ* e *LIM (RIL)* apresentavam metilação aberrante em mais de 10% dos pacientes (SHEN et al., 2010). Nosso grupo também demonstrou, por meio da análise de todos os genes da família dos reguladores de interferon (SOUSA et al., 2019), efeito da metilação em genes conhecidos como fatores de transcrição da família dos Interferons (*IRF1*, *IRF-2*, *IRF-3*, *IRF-4*, *IRF-5*, *IRF-6*, *IRF-7*, *IRF-8* e *IRF-9*) em 111 pacientes com SMD categorizados nas fases iniciais e avançadas. Neste estudo foi encontrado que os *IRF-3* e *IRF-5* estavam hipermetilados em comparação a controles saudáveis e *IRF-1*, *IRF-3*, *IRF-5*, *IRF-6* e *IRF-8* se encontravam hipermetilados nas fases avançadas da SMD (SOUSA et al., 2019), demonstrando que apesar do fenômeno de hipermetilação ser comum na doença, parece envolver especificamente alguns genes de uma determinada família ou função, mas não todos os genes.

Sabemos que a metilação do DNA é um mecanismo importante na regulação gênica. Os primeiros estudos com metilação mostravam principalmente sua relação com silenciamento do gene, no entanto, novas análises têm mostrado que a metilação está associada tanto a diminuição como o aumento da expressão gênica e que a metilação pode ser desencadeada por variações na sequência do DNA (MARTIN GOMEZ et al, 2020). Este fato nos ajuda a entender nossos resultados de correlação, em que não encontramos correlações significantes entre os dados de metilação e expressão gênica, embora alguns tenham apresentado correlação positiva e outros correlação negativa, mas nenhum foi significativo. Previamente já tínhamos encontrado que a associação entre metilação e expressão gênica não segue, necessariamente, um padrão de correlação clássico como esperamos, de maior metilação e menor expressão. Em outro estudo recente de nosso grupo, Cavalcante e colaboradores (2020) avaliaram a metilação global (5-metilcitosina e 5-hidroximetilcitosina) com uso da técnica de tissue micro-array (TMA) em biópsias de medula de pacientes com SMD com o objetivo de associar a variáveis clínicas e laboratoriais e correlacionar com a expressão de 21 genes que podem estar envolvidos na patogênese da SMD. Achados importantes foram apresentados, em que a hipermetilação

da medula óssea estava associada a alterações cromossômicas e com a baixa expressão de genes relacionados ao reparo final do DNA, as DNA Polimerases com atividade translesão (TLS). No entanto, não encontramos relações entre as expressões e a metilacao global da medula óssea em diversos outros grupos de genes nesse mesmo estudo (CAVALCANTE, 2020).

Peter Laird, em 2003, afirmou que os avanços nos estudos sobre metilação do DNA em câncer iriam levar a grandes descobertas de biomarcadores relacionados à evolução das doenças. Seu argumento estava embasado no fato de serem encontrados de forma precoce e frequente no câncer com fácil detecção por haver técnicas estabelecidas, detecção em vários tipos de células e outras características que poderiam levar a descobertas de novos alvos terapêuticos (LAIRD, 2003). De fato, o interesse em encontrar biomarcadores em metilação levou a muitas publicações científicas sobre o assunto. Todavia, em uma pesquisa relativamente recente realizada por Koch e colaboradores (2018) publicada no renomado periódico *Nature*, sobre biomarcadores de metilação publicados e disponíveis, foi demonstrado que o número de alvos que realmente são usados na clínica médica e comercializados são bem inferiores, sugerindo que a localização genômica precisa para a determinação do biomarcador tem sido um obstáculo. Dentre 14.743 publicações de biomarcadores de câncer baseados na metilação, 1.800 foram relacionados a prognósticos e apenas 14 são utilizados na clínica e estão disponíveis comercialmente. Neste mesmo estudo foram detectados alguns fatores que devem ser estabelecidos para se detectar um bom biomarcador de metilação: 1) a localização genômica, que se sugere que esteja em regiões de ilhas CpG e em regiões promotoras do gene; 2) regiões com relevância clínica e também alvos que tenham relação com a expressão do gene (KOCH et al., 2018). Em nosso estudo buscamos em base de dados de publicações regiões dos genes que apresentassem maior grau de correlação com a expressão dos genes em doenças Mieloproliferativas e que estivessem dentro da região promotora do gene. Para a região escolhida do gene *XPA*, encontramos correlação negativa com a expressão do gene em LMA, e dentro da região escolhida haviam dois pontos CGs, sendo utilizada a média dos dois sítios para as análises, pois apresentavam padrão mais homogêneo dos casos. Portanto, buscamos utilizar características relevantes, como as citadas no trabalho de Koch (2018), para a melhor escolha da região de estudo do gene.

Em nosso estudo não conseguimos encontrar resultados positivos para todos os genes e em dois deles não foi possível avaliar o perfil de metilação. Possivelmente, como não há estudos prévios e o fato de não ter sido encontrados dados de expressão correlacionáveis com a metilação de todos os genes avaliados em nossa pesquisa, demais regiões dentro desses alvos devem ser estudadas. Vale ressaltar que demonstrar que nessas regiões não foram encontrados dados positivos de metilação para a SMD e agricultores também são dados importantes, visto que em estudos futuros regiões diferentes devam ser avaliadas na busca de possíveis biomarcadores.

Por fim, acreditamos que estudos que busquem associar fatores de risco com a doença devam continuar a serem desenvolvidos, na tentativa de melhor elucidar os riscos e, dessa forma, diminuir os agravos e os fatores contribuintes para o desenvolvimento da SMD. Assim, vale salientar nosso último estudo com agricultores, no qual avaliamos a expressão de 12 genes de reparo de fita simples e fita dupla do DNA (*XPA*, *XPG*, *CSA*, *CSB*, *ATM*, *LIG4*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *XRCC5* e *XRCC6*) em agricultores expostos e não expostos aos agrotóxicos em que foi identificada atividade reduzida nos genes *XPG*, *CSA*, *ATM* e *LIG4* nos agricultores expostos frente aos não expostos (COSTA et al., 2021). Portanto, esses resultados destacam que a exposição genotóxica a pesticidas afeta negativamente o perfil de expressão de importantes genes de reparo e favorecem lesões que podem ser irreparáveis ao genoma.

## CONCLUSÃO

O fenômeno da metilação é comum na SMD e demonstra isso em comparação aos grupos de agricultores e grupo controle para alguns genes de reparo do DNA. Ao contrário do esperado, a metilação de gene *XPA* foi menos evidente nas fases avançadas da doença, em pacientes com idade mais avançada e dentre os agricultores expostos, mostrando que nesse momento há maior silenciamento gênico e maior ativação do gene, e sugerindo que em fases iniciais da doença e no grupo dos agricultores ecológico haja a necessidade de maior ativação gênica. Diante de tamanha heterogeneidade da Síndrome Mielodisplásica, necessitamos de confirmação de nossos dados com cada vez maior número de pacientes em novos estudos. Além disso, acreditamos que estudos que busquem associar fatores de risco com a doença devam continuar a serem desenvolvidos, na tentativa de melhor elucidar os riscos e, dessa forma, diminuir os agravos e os fatores contribuintes para o desenvolvimento da SMD.

## REFERÊNCIAS

- ADÈS, L.; ITZYKSON, R.; FENAUX, P. Myelodysplastic syndromes. **The Lancet**, v. 383, p. 2239–2252, 2014.
- ALEKSEEV, S.; COIN, F. Orchestral maneuvers at the damaged sites in nucleotide excision repair. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2015.
- ALOIZOUA A. M. ET AL. Parkinson's disease and pesticides: Are microRNAs the missing link? **Science of The Total Environment**, v. 744, 2020.
- ALTER, P. B. Fanconi anemia and the development of leukemia. **Best Pract Res Clin Haematol**, 2014.
- APOSTOLOU, Z. et al. Nucleotide Excision Repair and Transcription-Associated Genome Instability. **BioEssays**, v. 41, n. 4, p. 1–12, 2019.
- ARAÚJO, S. J.; KURAOKA, I. Nucleotide excision repair genes shaping embryonic development. **Open biology**, v. 9, n. 10, p. 190166, 2019.
- ARBER, D. A.; HASSERJIAN, R. P. Reclassifying myelodysplastic syndromes: What's where in the new WHO and why. **Hematology (United States)**, v. 2015, n. 1, p. 294–298, 2015.
- AVGERINO, C. et al. Occupational, dietary, and other risk factors for myelodysplastic syndromes in Western Greece. **Hematology**, v. 22, n. 7, p. 419–429, 2017.
- BARAKAT, K.; GAJEWSKI, M.; A. TUSZYNSKI, J. DNA Repair Inhibitors: The Next Major Step to Improve Cancer Therapy. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2012.
- BARRÓN CUENCA, J. et al. Increased levels of genotoxic damage in a Bolivian agricultural population exposed to mixtures of pesticides. **Science of the Total Environment**, 2019.
- BARRÓN CUENCA, J. et al. Pesticide exposure among Bolivian farmers: associations between worker protection and exposure biomarkers. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 30, n. 4, p. 730–742, 2020.

BEJAR, R. et al. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. **New England Journal of Medicine**, 2011.

BEJAR, R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 99, n. 6, p. 956–964, 2014.

BELLI, C. B. et al. Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 10, p. 851–858, 2015.

BENETATOS, L.; VARTHOLOMATOS, G. Enhancer DNA methylation in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 11, p. 1999–2009, 2018.

BENNETT, J. M. ET AL. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndrome. **Br J Haematol**, v. 51, p. 189–199, 1982.

BRASIL, V. L. M. et al. Pesticides as risk factors for head and neck cancer: A review. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 47, n. 7, p. 641–651, 2018.

BRENERMAN, B. M.; ILLUZZI, J. L.; WILSON, D. M. Base excision repair capacity in informing healthspan. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 12, p. 2643–2652, 2014.

BUDDEN, T.; BOWDEN, N. A. **The role of altered nucleotide excision repair and UVB-induced DNA damage in melanomagenesis** **International Journal of Molecular Sciences**, 2013.

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**, 2020.

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. et al. Incidence of the myelodysplastic syndromes using a novel claims-based algorithm: High number of uncaptured cases by cancer registries. **Blood**, v. 117, n. 26, p. 7121–7125, 2011.



COSTA, M. B. et al. Chromosomal abnormalities and dysregulated DNA repair gene expression in farmers exposed to pesticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 82, n. December 2020, 2021.

DE ADAD, L. M. M. et al. Occupational exposure of workers to pesticides: Toxicogenetics and susceptibility gene polymorphisms. **Genetics and Molecular Biology**, 2015.

DE SOUSA, J. C. et al. Dysregulation of interferon regulatory genes reinforces the concept of chronic immune response in myelodysplastic syndrome pathogenesis. **Hematological Oncology**, v. 37, n. 4, p. 523–526, 2019.

DEXHEIMER, G. M. et al. **DNA Methylation Events as Markers for Diagnosis and Management of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome Disease Markers**, 2017.

DIZDAROGLU, M. **Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, 2015.

DUAN, M. et al. Role of nucleotide excision repair in cisplatin resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 1–13, 2020.

ELIAS, H. K. et al. **Stem cell origin of myelodysplastic syndromes Oncogene**, 2013.

EUN-JU LEE, NIKOLAI PODOLTSEV, STEVEN D GORE, A. M. Z. The evolving field of prognostication and risk stratification in MDS: Recent developments and future directions. **Blood Rev .**, v. 30, n. 1, p. 1–10, 2016.

FRANCO LOCATELLI, B. S. How I treat myelodysplastic syndromes of childhood. **Blood**, v. 131, n. 13, p. 1406–1414, 2018.

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

GREENBERG P, C COX, M M LEBEAU, P FENAUX, P MOREL, G SANZ, M SANZ, T VALLESPI, T HAMBLIN, D OSCIER, K OHYASHIKI, K TOYAMA, C AUL, G MUFTI, J. B. No Title International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood Rev .**, 1997.

GREENBERG, P. L. et al. Revised international prognostic scoring system for

- myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454–2465, 2012.
- HASSERJIAN, R. P. Myelodysplastic Syndrome Updated. **Pathobiology**, v. 86, n. 1, p. 53–61, 2019.
- HERMANS, N. et al. Dual daughter strand incision is processive and increases the efficiency of DNA mismatch repair. **Nucleic Acids Research**, 2016.
- HERNANDEZ-SEGURA, A.; NEHME, J.; DEMARIA, M. Hallmarks of Cellular Senescence. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 6, p. 436–453, 2018.
- HOAD, G.; HARRISON, K. The design and optimization of DNA methylation pyrosequencing assays targeting region-specific repeat elements. **Methods in Molecular Biology**, v. 1589, p. 17–27, 2017.
- HORVATH, S.; RAJ, K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 6, p. 371–384, 2018a.
- HORVATH, S.; RAJ, K. **DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing** *Nature Reviews Genetics*, 2018b.
- HOSONO, N. **Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS** *International Journal of Clinical Oncology*, 2019.
- IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair**, 2013.
- JIANG, Y. et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. **Blood**, v. 113, n. 6, p. 1315–1325, 2009.
- JIN, J. et al. Pesticide exposure as a risk factor for myelodysplastic syndromes: A meta-analysis based on 1,942 cases and 5,359 controls. **PLoS ONE**, 2014.
- JONAS, B. A.; GREENBERG, P. L. MDS prognostic scoring systems – past, present, and future. **Best Pract Res Clin Haemato**, v. 28, n. 1, p. 3–13, 2015.
- KANG, H. et al. Clinical implications of the quantitative detection of ID4 gene methylation in myelodysplastic syndrome. **European Journal of Medical Research**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2015.
- KATHIRVEL MARUTHAI, ELLAPPAN KALAIARASAN, NOYAL MARIYA

- JOSEPH, SUBHASH CHANDRA PARIJA, S. M. Assessment of global DNA methylation in children with tuberculosis disease. **International Journal of micobacteriology**, v. 7, n. 14, p. 338–342, 2018.
- KEMP, M. G.; HU, J. PostExcision Events in Human Nucleotide Excision Repair. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, n. 1, p. 178–191, 2017.
- KLINAKIS, A.; KARAGIANNIS, D.; RAMPIAS, T. Targeting DNA repair in cancer: current state and novel approaches. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 4, p. 677–703, 2020.
- KOCH, A. et al. Analysis of DNA methylation in cancer: Location revisited. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 7, p. 459–466, 2018.
- KOIFMAN, S.; HATAGIMA, A. Exposição aos agrotóxicos e câncer ambiental. In: **É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente**. [s.l: s.n.].
- KURAMOTO, K. et al. Chromosomal instability and radiosensitivity in myelodysplastic syndrome cells. **Leukemia**, v. 16, n. 11, p. 2253–2258, 2002.
- LAIRD, P. W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 4, p. 253–266, 2003.
- LANGIE, S. A. S. et al. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. **Carcinogenesis**, 2015.
- LINDSLEY, R. C. Uncoding the genetic heterogeneity of myelodysplastic syndrome. **Hematology**, v. 2017, n. 1, p. 447–452, 2017.
- LOVATEL, V. L. et al. Expression profiles of DNA methylation and demethylation machinery components in pediatric myelodysplastic syndrome: Clinical implications. **Cancer Management and Research**, 2020.
- MACEDO, LUCIANA CONCI; MATTOS, JAQUELYNNE RODRIGUES; SILVA, D. M. DA. Síndrome Mielodisplásica: da suspeita ao diagnóstico definitivo. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, 2016.
- MAEGAWA, S. et al. Age-related epigenetic drift in the pathogenesis of MDS and AML. **Genome Research**, v. 24, n. 4, p. 580–591, 2014.

MAGALHÃES, S. M. M.; MADEIRA, T. S.; BITTENCOURT, R.; VELLOSO, E. .; CHAUFFAILLE, M. L.; AZEVEDO, A. A.; FAGUNDES, E. M.; ZANICHELLI, M. A. .; BONFIM, G.; MELO, L. G.; TAVARES, R. S.; BORTOLHEIRO, T. C.

Epidemiological and Clinicopathological Data From the Brazilian Registry of Patients with Myelodysplastic 130 Syndromes and Comparative Analysis between different geographic areas. **Blood Rev .**, v. 116, 2010.

MARTAKULIS; MANELESTELLER. DNA Methylation and Cancer. **Advances in Genetics**, v. 70, p. 27–556, 2010.

MARTEIJN, J. A. et al. **Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014.

MCNEELY, T. et al. DNA damage in aging, the stem cell perspective. **Human Genetics**, v. 139, n. 3, p. 309–331, 2020.

MOHAMMAD, F.; MONDAL, T.; KANDURI, C. Epigenetics of imprinted long noncoding RNAs. **Epigenetics**, 2009.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 549–599, 2017.

MUFTI, G. Chromosomal deletions in the myelodysplastic syndrome. **Leuk Res.**, v. 16, n. 1, p. 35–41, 1992.

NAEIM, F.; RAO, P. N.; GRODY, W. W. Myelodysplastic Syndromes. **Hematopathology: morphology, immunophenotype, cytogenetics and molecular approaches**, p. 129–154, 2008.

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

OU, H. L.; SCHUMACHER, B. DNA damage responses and p53 in the aging process. **Blood**, v. 131, n. 5, p. 488–495, 2018.

OZTURK, S.; DEMIR, N. **DNA repair mechanisms in mammalian germ cells** *Histology and Histopathology*, 2011.

PAPAEMMANUIL, E. et al. Clinical and biological implications of driver mutations in

myelodysplastic syndromes. **Blood**, 2013.

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

PICCOLI, C. et al. Occupational exposure to pesticides and hematological alterations: A survey of farm residents in the south of Brazil. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 24, n. 6, p. 2325–2340, 2019.

QIAN, J. et al. Aberrant hypermethylation of CTNNA1 gene is associated with higher IPSS risk in patients with myelodysplastic syndrome. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 52, n. 12, p. 1859–1865, 2014.

RESZKA, E. et al. Circadian gene methylation in rotating-shift nurses: a cross-sectional study. **Chronobiology International**, v. 35, n. 1, p. 111–121, 2018.

RIBEIRO, H. L. et al. Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. **Hematological Oncology**, 2015.

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

RODVALL, Y.; DICH, J.; WIKLUND, K. Cancer risk in offspring of male pesticide applicators in agriculture Sweden. **Occupational and Environmental Medicine**, 2003.

RONG FAN, XIAO-LI ZHAO, HONG WANG, HAI-YAN HE, ZHEN-PING PENG, BO YANG, TAO HAN, WEI WANG, XIAO-QIN WANG, G.-W. L. Abnormal methylation of the sex-determining region Y-box 17 (SOX17) promoter predicts poor prognosis in myelodysplastic syndrome. **Clin Lab**, v. 60, n. 9, p. 1465–74, 2014.

ROUILLON, C.; WHITE, M. F. The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins. **Research in Microbiology**, 2011.

SAGHAFINIA, S. et al. Pan-Cancer Landscape of Aberrant DNA Methylation across Human Tumors. **Cell Reports**, v. 25, n. 4, p. 1066–1080.e8, 2018.

SCHÄRER, O. D. **Nucleotide excision repair in Eukaryotes** Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013a.

- SCHÄRER, O. D. Nucleotide excision repair in Eukaryotes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 10, p. 1–19, 2013b.
- SHEN, L. et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 4, p. 605–613, 2010.
- SOUBRY, A. et al. Obesity-related DNA methylation at imprinted genes in human sperm: Results from the TIEGER study. **Clinical Epigenetics**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2016.
- SPENCER, D. H. et al. CpG Island Hypermethylation Mediated by DNMT3A Is a Consequence of AML Progression. **Cell**, 2017.
- STROM, S. S.; VELEZ-BRAVO, V.; ESTEY, E. H. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. **Semin. Hematol.**, v. 45, n. 1, p. 8–13, 2008.
- SUN, D. et al. Epigenomic profiling of young and aged HSCs reveals concerted changes during aging that reinforce self-renewal. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 5, p. 673–688, 2014.
- SWERDLOW, S. H. ET AL. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. **IARC Press**, 2008.
- SWERDLOW, S. H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2375–2390, 2016.
- T, Z. et al. Potential relationship between inadequate response to dna damage and development of myelodysplastic syndrome. **International Journal of Molecular Sciences**, 2015.
- TERRY, M. B. et al. DNA methylation in white blood cells: Association with risk factors in epidemiologic studies. **Epigenetics**, v. 6, n. 7, p. 828–837, 2011.
- TOBIASSON, M.; KITTANG, A. O. Treatment of myelodysplastic syndrome in the era of next-generation sequencing. **Journal of Internal Medicine**, v. 286, n. 1, p. 41–62, 2019.
- TORGASHEVA, N. A. et al. Base excision DNA repair in the embryonic development of the sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*. **Molecular BioSystems**, 2016.

UROSHLEV, L. A. et al. A Method for Identification of the Methylation Level of CpG Islands From NGS Data. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–5, 2020.

UYANIK, M. S. et al. Could the mosaic pattern of chromosomal abnormality predict overall survival of patients with myelodysplastic syndrome? **Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy**, 2016.

VAN DER PLAAT, D. A. et al. Occupational exposure to pesticides is associated with differential DNA methylation. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 75, n. 6, p. 427–435, 2018.

VASSALLO, J.; MAGALHÃES, S. M. M. Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/ mieloproliferativas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 4, p. 267–272, 2009.

WILSON, D. M. et al. **Variation in base excision repair capacity** *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2011.

WONG, YAN-FUNG, ET AL. Longitudinal Analysis of DNA Methylation in CD34+ Hematopoietic Progenitors in Myelodysplastic Syndrome. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 3, n. 10, p. 1188–1198, 2014.

YAMAZAKI, J.; ISSA, J. P. J. Epigenetic aspects of MDS and its molecular targeted therapy. **International Journal of Hematology**, v. 97, n. 2, p. 175–182, 2013.

YANG, Z. K. et al. DNA Methylation and Uveal Melanoma. **Chinese Medical Journal**, v. 131, n. 7, p. 845–851, 2018.