



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**DANIELA DE PAULA BORGES**

**O PAPEL DO RNA LONGO NÃO CODIFICANTE *H19* NO DESENVOLVIMENTO  
DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

**FORTALEZA**

**2022**

DANIELA DE PAULA BORGES

O PAPEL DO RNA LONGO NÃO CODIFICANTE *H19* NO DESENVOLVIMENTO DA  
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças Crônicas Degenerativas

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA

2022

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)

---

B731p

Borges, Daniela de Paula.

O papel do RNA longo não codificante H19 no desenvolvimento da Síndrome Mielodisplásica /  
Daniela de Paula Borges. – 2022.

91 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.

1. Síndromes Mielodisplásicas. 2. Imprinting genético. 3. Metilação de DNA. I. Título.

CDD 610

---

DANIELA DE PAULA BORGES

O PAPEL DO RNA LONGO NÃO CODIFICANTE *H19* NO DESENVOLVIMENTO DA  
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças Crônicas Degenerativas

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

Aprovada em: 29/04/2022

BANCA EXAMINADORA

Ronald Feitosa Pinheiro (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Sílvia Maria Meira Magalhães  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Fábio Rocha Fernandes Távora  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Cristiana Libardi Miranda Furtado  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)

Gilvan Pessoa Furtado  
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-CE)

FORTALEZA

2022

*Às meus pais  
e minha tia Terezinha.*

## AGRADECIMENTOS

A finalização do meu doutorado, representada por essa tese, representa muito mais do que foi possível colocar em documento. Esse trajeto se inicia durante a minha graduação, especialmente após o início da minha iniciação científica, em 2013, que foi que foi quando eu comecei a descobrir meu amor pela ciência e a vontade de seguir nessa área. Durante todo esse período, eu sempre tive várias pessoas ao meu redor, participando de todas essas etapas.

Não conseguiria começar os meus agradecimentos por outras pessoas que não fossem os meus pais, **José Luiz** e **Leonina**, que sempre me incentivaram nos estudos desde muito nova e sempre fizeram o possível e o impossível para me apoiar em todas as minhas escolhas. Me considero uma pessoa muito privilegiada por ter, desde sempre, o amor e cuidado de vocês na minha vida.

À minha tia **Terezinha Schwenck** não tenho nem palavras para agradecer por tudo! Uma das minhas maiores incentivadoras, que vibra junto, que está sempre disponível, que teve um papel muito importante na minha formação acadêmica e pessoal.

Aos meus irmãos **Douglas** e **Elomar**, agradeço muito pela nossa relação de amizade e companheirismo, por ir muito além de ter o mesmo sangue, mas estarem sempre presente e torcerem pelo meu crescimento.

À minha família emprestada que nos acolheu quando chegamos em Fortaleza, **Sr. Clauder, Ana Carla, Maria, Marconi**. Agradeço por todos os momentos compartilhados e, em especial, ao **Sr Clauder**, por abrir as portas do curso de Biomedicina para mim.

Por falar no curso de Biomedicina, não posso deixar de agradecer a minha amiga e ex-coordenadora **Milena Abrão**, por me incentivar a continuar no curso e me ajudar a encontrar minha área de atuação.

Às minhas pessoas, **André** e **Luana**, que estão do meu lado há mais de 10 anos, passaram por toda trajetória acadêmica comigo e se tornaram pessoas essenciais na minha vida. Só tenho a agradecer pela amizade e companheirismo de vocês.

À **Juliana Cordeiro**, por ter sido responsável pelo meu ingresso no Laboratório de Citogenômica do Câncer e por ter despertado em mim a vontade de trabalhar com Biologia molecular e Citogenética e por me acompanhar e ver potencial em mim.

Ao meu orientador, **Dr. Ronald Pinheiro**, por ter participado do meu crescimento durante minha trajetória acadêmica, e, principalmente, por sempre confiar no meu trabalho e colaborar com meu crescimento intelectual.

Durante esses 9 anos que faço parte do Laboratório de Citogenômica do Câncer (LCC), tive o prazer de conviver com diversos grupos de pessoas e cada uma delas teve impacto no meu desenvolvimento acadêmico.

Gostaria de agradecer à 1ª temporada do LCC, **Juliana, Howard, Allan, Luiz** e **Fabiola**, que foram responsáveis pelos meus primeiros ensinamentos no lab. E as meninas que eram ICs junto comigo, **Roberta, Marília** e **Izabelle**, é muito gratificante ver o quanto mudamos e crescemos juntas.

E à 2ª temporada do LCC, agradeço muito por ter tido vocês comigo nos meus dias, noites, finais de semana. A gente sempre se denominou como melhor lab, mais unido etc. E é muito massa ver que isso é real, mesmo após a saída de alguns. Todos vocês foram muito importantes durante minha vida na pós e fico muito feliz de ter encontrado amigos queridos em vocês! Muito, em especial **Roberta, Izabelle, Marília, Mayara, Wesley, Rinna, Gabriel, Manu, Shay, Gabi, Cris, Bruna** e **Letícia**. Um agradecimento especial ao **Wesley**, que foi meu IC durante o mestrado, me ajudou muito durante aquele período e, cada vez mais, se mostra ser uma pessoa que genuinamente quer ver o meu sucesso e

felicidade, agradeço muito o momento que você me ofereceu ajuda com meus experimentos e levou à amizade que temos hoje.

Com um carinho especial, agradeço à minha amiga **Roberta**, quem diria que hoje a gente seria tão amigas e tão unidas assim?! Foram 9 anos de muita coisa, muito drama, muita briga, mas, principalmente, muito amor e companheirismo. Fico muito feliz com suas conquistas e de ver como aquelas duas bobinhas que eram ICs juntas cresceram tanto.

Não poderia falar do lab sem destacar mais duas pessoas, a **Mayara** e a **Magna**. Obrigada por todas as noites de experimento, que a gente estava lá uma pela outra. Pelos finais de semana que você ia para o lab simplesmente porque sabia que eu poderia estar precisando de ajuda. Por receber as humilhações junto comigo (e coloca humilhação nisso né...), por ser realmente parceira, conte comigo para tudo!

Finalizando os agradecimentos ao LCC, agradeço à **Dra. Sílvia** e ao **Dr. Sílvio**, por todos os anos que tive o prazer de acompanhar o atendimento de vocês no ambulatório, aprender muito e presenciar o cuidado que sempre tiveram com os pacientes.

Com muito carinho, agradeço a **Cris Libardi**, por ter possibilitado a conclusão dessa tese, por ter colocado seu projeto a disposição e ter realizado a minha coorientação desde então. Obrigada por ouvir meus desabafos e por ser essa pessoa tão disponível a ajudar. Aproveitando, agradeço a ajuda dos alunos da Cris, **Sarinha** e **Renan**, que me ajudaram com a parte experimental do projeto, em especial o **Renan**, pela ajuda com as análises, vocês foram essenciais nesse processo.

Durante o período de um ano do meu doutorado, realizei um estágio sanduíche na Austrália, que contribuiu muito com o meu crescimento pessoal e profissional. Gostaria de agradecer a todos do Hannan Lab: **Ross Hannan**, **Kate Hannan** (*in memoriam*), **Amee George**, **Thejaani**, **Lorena**, à minha supervisora **Rita Ferreira**, que me ensinou quase tudo do que aprendi nesse período, sempre com muita disponibilidade e paciência. Em especial, à minha amiga **Sarah**, que estava comigo no laboratório e fora dele, que dividiu tudo comigo durante esse período e que foi meu ponto de apoio para conseguir concluir.

A todos os amigos que fiz durante esse período na Austrália, destacando **Léo** e **Jé**, que são pessoas diferenciadas no mundo, que tem uma luz própria e que me acolheram com tanto carinho e a **Maria**, que foi um presente na minha vida, parceira de saídas e de jogar conversa fora e que sinto muitas saudades. Aos meus queridos amigos **Sarah**, **Ana** e **Lucas**, não existe agradecimento suficiente a vocês, obrigada por tudo! Não quero nem imaginar como seria sem vocês por perto, minha família do outro lado do mundo.

Gostaria de agradecer ao **Dr. Fábio Távora**, por ter possibilitado a realização dos experimentos de IHQ no seu laboratório, por realizar a análise dos resultados e pela torcida pelo meu crescimento profissional.

Gostaria de agradecer aos professores que fizeram parte das bancas de qualificação e defesa: **Prof. Gilvan Pessoa**, **Prof. Antônio Roberto**, **Prof. Sílvia Magalhães**, **Prof. Fábio Távora** e **Prof. Cristiana Libardi** pela disponibilidade e por todas as contribuições, que vão além do momento da defesa.

Por fim, gostaria de agradecer a **Ivone** e a **Rita**, por sempre estarem a disposição para ajudar.

*“Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais, é só a fazer  
maiores perguntas”*

*(João Guimarães Rosa, em “Grande Sertão: Veredas”)*



## RESUMO

O *H19* é um RNA longo não codificante (lncRNA) que possui expressão monoalélica materna controlada por *imprinting*. A transcrição do *H19* é controlada pela Região Controladora de *Imprinting* (ICR, do inglês *Imprinting Control Regions*) contida na Região Diferencialmente Metilada (DMR, do inglês *Differentially Methylated Regions*) H19DMR e mediada pela proteína CTCF. O *H19* regula diversas funções no organismo e desempenha funções tanto como oncogene quanto supressor de tumor nas mais diversas neoplasias, o que o torna um possível alvo para terapias, principalmente em doenças muito heterogêneas, como a Síndrome Mielodisplásica (SMD). O principal desafio na SMD tem sido a descoberta de biomarcadores que facilitem a diferenciação entre mutações nas células progenitoras hematopoiéticas (CPH) normais e às que levam ao desenvolvimento neoplásico, possibilitando o estudo de novos fármacos alvo específicos que prolonguem a sobrevida dos pacientes. Nesse estudo, avaliamos os níveis de expressão do *H19*, por RT-qPCR, o padrão de metilação da região H19DMR pela técnica de sequenciamento após modificação do DNA com bissulfato de sódio e expressão proteica do CTCF por imunohistoquímica, em 70 pacientes com SMD considerados classicamente como de baixo risco (SMD com sideroblasto em anel/mutação do SF3B1 – SMD-SA), de alto risco (SMD com excesso de blastos – SMD-EB), 11 pacientes com LMA secundária a SMD (LMA sec) e 8 controles saudáveis. Identificamos um aumento dos níveis de expressão do *H19* no grupo controle saudável, quando comparados com os pacientes com SMD-SA ( $p=0,004$ ), além do aumento da expressão no grupo de SMD-SA, em relação aos grupos SMD-EB ( $p=0,006$ ) e LMA sec ( $p=0,049$ ). Os pacientes com LMA sec apresentaram aumento da metilação da região H19DMR ( $p=0,022$ ), que também foi observado em pacientes com SMD com idade superior a 60 anos ( $p=0,031$ ). O aumento da expressão do *H19* foi encontrado em indivíduos com idade inferior a 60 anos ( $p=0,614$ ), cariótipo normal ( $p=0,003$ ) e contagem de plaquetas superior a 100 mil/mm<sup>3</sup> ( $p=0,019$ ), ambos associados ao prognóstico favorável na SMD. Os pacientes com SMD que com aumento da expressão do *H19* apresentaram maior sobrevida global ( $p=0,379$ ). Os resultados sugerem uma associação da expressão de *H19* com uma apresentação clínica de comportamento mais favorável para SMD com um aumento de sua metilação na evolução da doença, possivelmente funcionando com um gene supressor tumoral para a Síndrome Mielodisplásica, uma doença extremamente heterogênea.

**Palavras-chave:** Síndromes Mielodisplásicas, Metilação de DNA, *imprinting* genético.

## ABSTRACT

*H19* is a long noncoding RNA (lncRNA) expressed only from the maternal allele by imprinting. *H19* transcription is controlled by the Imprinting Control Region (ICR) of the Differentially Methylated Region (DMR) H19DMR mediated by the protein CTCF. *H19* regulates several physiological functions and can act both as an oncogene and tumor suppressor in many neoplasias, suggesting a promising target for therapies, especially in very heterogeneous diseases such as Myelodysplastic Syndrome (MDS). The main challenge in MDS has been the discovery of biomarkers to differentiate between mutations in normal hematopoietic progenitor cells and those that lead to neoplastic development, enabling the study of new specific target drugs that increase patient survival. In this study, we evaluated the expression levels of *H19*, by RT-qPCR, the methylation pattern of the H19DMR region by DNA sequencing technique after modification with sodium bisulfite, and protein expression of CTCF by immunohistochemistry, in 70 patients with SMD classically considered as low-risk (SMD with ring sideroblast/SF3B1 mutation - SMD-RS), high-risk (SMD with excess blasts - SMD-EB), 11 patients with AML secondary to SMD (AML sec) and 8 healthy controls. We identified increased *H19* expression levels in the healthy control group compared to the SMD-RS patients ( $p=0.004$ ), in addition to increased expression in the SMD-RS group compared to the SMD-EB ( $p=0.006$ ) and AML sec ( $p=0.049$ ) groups. Patients with AML sec showed increased methylation of the H19DMR region ( $p=0.022$ ), which was also observed in MDS patients older than 60 years ( $p=0.031$ ). Increased *H19* expression was found in individuals aged less than 60 years ( $p=0.614$ ), normal karyotype ( $p=0.003$ ), and platelet count higher than 100,000/mm<sup>3</sup> ( $p=0.019$ ), both associated with good prognosis in MDS. Patients with MDS and increased *H19* expression had longer overall survival ( $p=0.379$ ). The results suggest an association of *H19* expression with a more favorable clinical presentation for MDS with an increase of its methylation in the evolution of the disease, possibly functioning as a tumor suppressor gene for Myelodysplastic Syndrome, an extremely heterogeneous disease.

**Keywords:** Myelodysplastic syndromes, DNA methylation, genomic imprinting.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema ilustrativo do processo de metilação e desmetilação do DNA.....	17
<b>Figura 2:</b> Atuação da proteína bloqueadora CTCF na transcrição dos genes H19 e IGF2 .....	20
<b>Figura 3:</b> Vias de interação do H19 e os tipos de neoplasias relacionados .....	23
<b>Figura 4:</b> Classificação da SMD segundo os critérios da OMS de 2016 .....	27
<b>Figura 5:</b> Categorias de risco e escores prognóstico do IPSS-R .....	29
<b>Figura 6:</b> Representação dos resultados encontrados na citogenética por banda G .....	37
<b>Figura 7:</b> Sequência genômica da H19DMR e alinhamento dos primers .....	39
<b>Figura 8:</b> Identificação das células com marcação positiva no software QuPath .....	43
<b>Figura 9:</b> Fluxograma representativo do delineamento experimental do estudo .....	46
<b>Figura 10:</b> Padrão de metilação da H19DMR entre os grupos.....	52
<b>Figura 11:</b> Níveis de expressão do gene H19 em relação aos grupos estudados .....	53
<b>Figura 12:</b> Níveis de metilação da H19DMR em relação aos grupos estudados .....	54
<b>Figura 13:</b> Níveis de expressão do gene H19 em relação a idade dos pacientes com SMD ...	55
<b>Figura 14:</b> Níveis de metilação da H19DMR em relação a idade dos pacientes com SMD ...	56
<b>Figura 15:</b> Níveis de expressão do gene H19 em relação ao grupo de risco pelo IPSS-R nos pacientes com SMD.....	57
<b>Figura 16:</b> Níveis de metilação da H19DMR em relação ao prognóstico dos pacientes com SMD.....	58
<b>Figura 17:</b> Níveis de expressão do gene H19 em relação ao sexo dos pacientes com SMD ..	59
<b>Figura 18:</b> Níveis de metilação da H19DMR em relação ao sexo dos pacientes com SMD ..	60
<b>Figura 19:</b> Níveis de expressão do gene H19 em relação ao cariótipo dos pacientes com SMD .....	61
<b>Figura 20:</b> Níveis de expressão do gene H19 em relação a contagem de plaquetas dos pacientes com SMD.....	62
<b>Figura 21:</b> Níveis de expressão do gene H19 em relação a dependência transfusional em pacientes com SMD.....	63
<b>Figura 22:</b> Representação esquemática dos resultados encontrados .....	64
<b>Figura 23:</b> Níveis de expressão proteica da CTCF entre os grupos de pacientes com SMD ..	67
<b>Figura 24:</b> Níveis de expressão proteica da CTCF em relação ao sexo dos pacientes com SMD.....	68

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Genes utilizados na avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real .....	41
<b>Tabela 2:</b> Características dos anticorpos primários utilizados e condições experimentais ....	42
<b>Tabela 3:</b> Caracterização sociodemográfica e das variáveis clínicas dos pacientes com SMD .....	47
<b>Tabela 4:</b> Metilação da H19DMR nos pacientes com SMD e LMA.....	50
<b>Tabela 5:</b> Distribuição genotípica dos SNPs rs2107425 e rs2071094.....	65
<b>Tabela 6:</b> Associação dos SNPs com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5caC	5-carboxicitosina
5fC	5-formilcitosina
5hmC	5-hidroximetilcitosina
5mC	5-metilcitosina
ANC	Contagem Absoluta de Neutrófilos (Absolute Neutrophil Count)
<i>B2M</i>	<i>Beta-2-microglobulin</i>
cDNA	DNA complementar
CH3	grupamento metil
CPH	Células progenitoras hematopoiéticas
Cq	<i>Cycle threshold</i>
CTCF	fator de ligação CCCTC
DMR	Regiões Diferencialmente Metiladas ( <i>Differentialy Methylated Regions</i> )
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferases
<i>H19</i>	<i>H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript</i>
Hb	Hemoglobina
<i>HPRT1</i>	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>
HR	Razão de chance (Hazard ratio)
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
IC	Intervalo de confiança
ICR	Regiões Controladoras de <i>Imprinting</i> ( <i>Imprinting Control Regions</i> )
<i>IGF1</i>	<i>insulin-like growth factor 1</i>
<i>IGF2</i>	<i>insulin-like growth factor 2</i>
IHQ	Imunohistoquímica
IPSS	Sistema Internacional de Escores Prognósticos
IPSS-R	Sistema Internacional de Escores Prognósticos Revisado
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana
lncRNA	RNAs longos não codificantes
miRNA	micro RNA
MO	Medula óssea
mRNA	RNA mensageiro

ncRNA	RNAs não codificantes
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NGS	Sequenciamento de última geração (Next generation sequencing)
NTC	No Template control
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Razão de chance ( <i>odds ratio</i> )
<i>PPIA</i>	<i>Peptidylprolyl Isomerase A</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real após transcrição reversa
<i>SF3B1</i>	<i>Splicing factor 3b subunit 1</i>
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SMD-DM	SMD com displasia em múltiplas linhagens
SMD-DU	SMD com displasia em única linhagem
SMD-EB1	SMD com excesso de blastos tipo 1
SMD-EB2	SMD com excesso de blastos tipo 2
SMD-SA-DM	SMD com sideroblastos em anel e displasia em múltiplas linhagens
SMD-SA-DU	SMD com sideroblastos em anel e displasia em única linhagem
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TET	<i>Ten-Eleven-Translocation</i>
TNF-α	Human Tumor Necrosis Factor-α
t-SMD	SMD relacionada a terapia
<i>UBC</i>	<i>Ubiquitin C</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1. Epigenética e câncer .....	15
1.1.1. Imprinting genômico e RNAs não codificantes (ncRNAs).....	17
1.1.2. Região diferencialmente metilada do H19 (H19DMR) .....	19
1.2. Síndrome Mielodisplásica.....	25
1.2.1. Classificação e heterogeneidade.....	25
1.2.2. Genômica e epigenômica da SMD .....	29
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
2.1. Objetivo Geral.....	34
2.2. Objetivos específicos .....	34
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>35</b>
3.1. Aspectos éticos.....	35
3.2. Coleta e preparo de amostras .....	35
3.3. Cariótipo por banda-G .....	35
3.4. Sequenciamento pós modificação do DNA por bissulfito de sódio (Bis-seq).....	38
3.4.1. Extração de DNA genômico e modificação por bissulfito de sódio .....	38
3.4.2. Sequenciamento de última geração (NGS) .....	39
3.5. Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	40
3.5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	40
3.5.2. PCR em tempo real.....	41
3.6. Expressão proteica por Imunohistoquímica (IHQ) em plataforma automatizada ....	42
3.7. Análise estatística.....	44
3.7.1. Análise de Sequenciamento pós modificação por bissulfito .....	44
3.7.2. Análise dos dados de expressão gênica e metilação do DNA.....	44
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
4.1. Caracterização dos pacientes .....	47

4.2.	Análise do sequenciamento pós modificação do DNA com bissulfito de sódio ( <i>Bis-seq</i> )	50
4.3.	Análise da expressão gênica e metilação do DNA	53
4.3.1.	Análise da comparação entre os grupos	53
4.3.2.	Análise em relação à idade dos pacientes com SMD	55
4.3.3.	Análise em relação ao grupo de risco de acordo com o IPSS-R	57
4.3.4.	Análise em relação ao sexo dos pacientes com SMD	59
4.3.5.	Análise em relação à citogenética	61
4.3.6.	Análise em relação à contagem de plaquetas (IPSS-R)	62
4.3.7.	Análise em relação à dependência transfusional	63
4.4.	Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP)	65
4.5.	Análise da expressão proteica por imunohistoquímica (IHQ)	67
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>86</b>
	Anexo I: Descrição clínica dos pacientes.	86



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Epigenética e câncer

O câncer é uma doença multifatorial, que representa umas das principais causas de morte no mundo. Devido a sua grande diversidade, foi desenvolvida uma ferramenta para auxiliar na sua compreensão, a partir da determinação das principais características (conhecidas como *hallmarks*) adquiridas durante o processo de desenvolvimento e crescimento tumoral (HANAHAN E WEINBERG, 2000, 2011; WANG et al 2018). A instabilidade genômica e presença de mutações estão entre as características descritas. Acredita-se que o desenvolvimento do câncer envolve o acúmulo de alterações no genoma, que pode afetar genes que regulam diversos processos importantes no organismo, como o crescimento celular e reparo do DNA (HANAHAN E WEINBERG, 2000, 2011; SODIR E EVAN, 2011).

Em janeiro de 2022, foi publicada uma nova atualização dos *hallmarks* do câncer, sendo inserida a reprogramação epigenética não mutacional como uma das principais características do câncer (HANAHAN, 2022). O termo epigenética foi definido pela primeira vez por Waddington em 1942, como o mecanismo pelo qual o genótipo produz o fenótipo durante o processo de desenvolvimento. A partir da evolução nos estudos dessa área, as definições foram sendo modificadas, sendo bem aceito o conceito de que a epigenética trata de alterações herdáveis, permanentes ou temporárias, que afetam a expressão dos genes sem modificações na sequência do DNA (CAVALLI E HEARD, 2019; HARVEY et al., 2018; TOH et al., 2017; WADDINGTON, 2012).

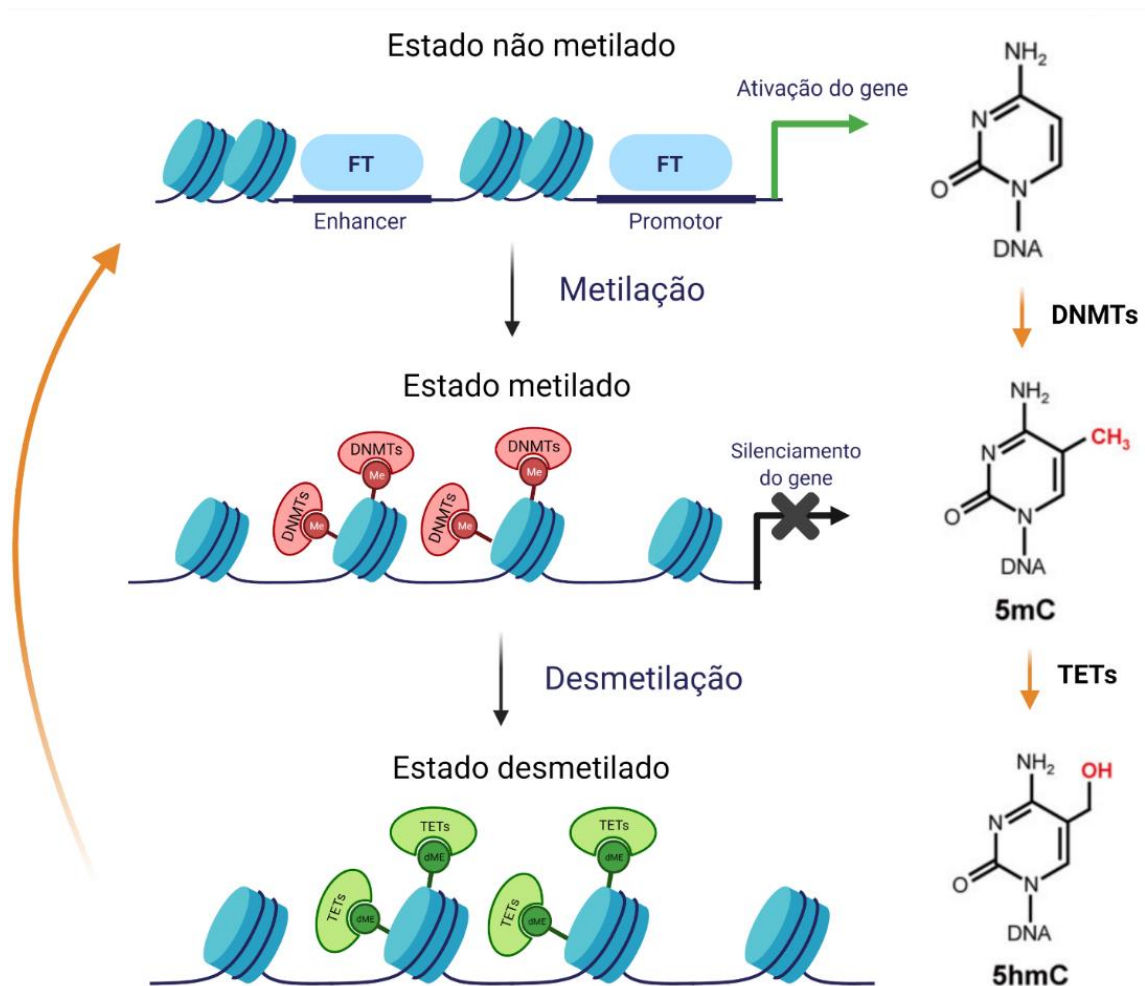
Os mecanismos epigenéticos são responsáveis pela regulação de diversos processos essenciais para o funcionamento do organismo, como expressão gênica, diferenciação celular, embriogênese e *imprinting* (ou marcação) genômico. Os principais mecanismos da regulação epigenética são: metilação do DNA, atividade dos RNAs não codificantes (ncRNA) e modificações nas histonas (CAVALLI E HEARD, 2019; NEBBIOSO et al., 2018; VILLOTA-SALAZAR et al., 2016).

A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos mais bem definidos, ela ocorre prioritariamente nas ilhas CpG, regiões ricas em dinucleotídeos C seguidos por G (CpG), onde cerca de 60 a 70% dos promotores dos genes estão localizados e onde ocorre cerca de 35% das mutações, incluindo em genes supressores de tumor. O processo de

metilação do DNA consiste na adição de um grupamento metil (CH<sub>3</sub>) em um resíduo de citosina presente em um dinucleotídeos CpG, mediado pela ação da família de enzimas DNA metiltransferases (DNMT), resultando na 5-metilcitosina (5mC) (Figura 1) (BISHOP E FERGUSON, 2015; SRIRAMAN et al., 2020; TOH et al., 2017; VILLOTA-SALAZAR et al., 2016; WU et al., 2015).

O processo de desmetilação, reversão da metilação do DNA, é realizado pela ação da família de proteínas TET (*Ten-Eleven-Translocation*), que catalisa a oxidação da 5mC em 5-hidroximetilcitosina (5hmC) e outros produtos menos abundantes, como a 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxicitosina (5caC) (Figura 1). A metilação do DNA leva a inibição da transcrição, necessária para o controle da expressão gênica e silenciamento de alguns elementos repetitivos do genoma, sendo essencial para o desenvolvimento normal das células, mas também podem levar ao desenvolvimento de neoplasias (BISHOP E FERGUSON, 2015; SKVORTSOVA et al., 2017; SRIRAMAN et al., 2020; TOH et al., 2017; VILLOTA-SALAZAR et al., 2016; WU et al., 2015).

**Figura 1:** Esquema ilustrativo do processo de metilação e desmetilação do DNA



**Legenda:** Demonstração de um gene no estado não metilado, com atuação dos fatores de transcrição (FT) e expressão do gene, seguido de silenciamento causado pela adição do grupo metil CH<sub>3</sub> (ME) pela ação das DNMTs, formando a 5mC e processo de desmetilação pela ação das TETs levando a hidroximetilação (dME) com a formação da 5hmC e retorno do gene ao seu estado ativado.

**Fonte:** Elaborado pela autora.

### 1.1.1. *Imprinting genômico e RNAs não codificantes (ncRNAs)*

Um dos principais papéis da metilação do DNA é controlar o processo de *imprinting* genômico (ou marcação genômica). *Imprinting* é um processo responsável pela regulação gênica em que ocorre o silenciamento de um par alélico, permitindo a expressão de somente o de uma origem parental. Esse processo é essencial no desenvolvimento de mamíferos, sendo descritos cerca de 100 genes regulados por *imprinting* que geralmente são encontrados em *clusters* com três ou quatro genes, o que facilita o controle da sua expressão. A maioria dos genes que estão em *cluster* possuem expressão monoalélica, mas é possível

encontrar alguns com expressão bialélica ou genes que estejam fora de algum *cluster* (ELHAMAMSY, 2017; THAMBAN et al., 2020; TUCCI et al., 2019).

Os genes regulados por *imprinting* atuam nos processos de desenvolvimento placentário, crescimento embrionário, funções neurológicas, entre outros, e sua desregulação pode levar ao desenvolvimento de síndromes. A metilação do DNA nesses genes ocorre, em sua maioria, nas Regiões Diferencialmente Metiladas (DMR – *Differentialy Methylated Regions*) sob controle de elementos do DNA chamados de Regiões Controladoras de *Imprinting* (ICR – *Imprinting Control Regions*) que são compostos de regiões ricas em CpG que controlam a expressão de diversos transcritos, incluindo não codificantes (ELHAMAMSY, 2017; HANNA, 2020; MAUPETIT-MÉHOUS et al., 2016).

Durante muitos anos, acreditou-se que os transcritos que não atuam na codificação de proteínas não desempenhavam funções relevantes no organismo, sendo chamados de “DNA lixo” ou “matéria negra”. A partir do avanço das técnicas de sequenciamento do DNA, descobriu-se que cerca de 98% desse “DNA lixo” podem ser transcritos. Os RNA não codificantes (ncRNA) são transcritos que não codificam proteínas e que participam do processo de regulação da expressão gênica. Essa categoria é dividida em ncRNA curtos (em que estão incluídos os micro RNAs e os RNAs de interferência) e os transcritos longos (lncRNA) (DYKES E EMANUELI, 2017; SANCHEZ CALLE et al., 2018; VILLOTA-SALAZAR et al., 2016; ZHANG et al., 2019).

Os RNAs longos não codificantes (lncRNA) são a classe de ncRNA mais abundante e diversificada, conseguem interagir com vários tipos de proteínas e com outros ncRNAs. Estão incluídos nesse grupo moléculas com diferentes funções, atuando na regulação gênica, no processo de *imprinting* genômico, regulação de atividades enzimáticas, ciclo celular, apoptose, integridade celular, entre outros. Os lncRNA podem estar presentes tanto no citoplasma quanto no núcleo das células, realizando a regulação da expressão de diversas formas, como a modificação epigenética da cromatina ou modulação da estabilidade do RNA mensageiro (mRNA). A expressão dos lncRNAs está estritamente relacionada às ICRs, seus promotores geralmente estão perto de uma ICR e sua expressão só ocorre mediante à desmetilação da ICR (CHI et al., 2019; ESTELLER, 2011; LIN et al., 2020; MACDONALD E MANN, 2020; PANNI et al., 2020; CALLE et al., 2018).

Quando comparados aos mRNAs, os lncRNA são menores e sua expressão possui níveis relativamente mais baixos e é, provavelmente, mais estritamente regulada. Alterações na expressão dos lncRNA e presença de mutações tem sido relacionados ao desenvolvimento de neoplasias. Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP - *single nucleotide polymorphisms*) estão entre as alterações mais relacionadas com um alto risco de câncer, sendo que cerca de 85% dos SNP associados às neoplasias se encontram em regiões não codificantes (GUTSCHNER E DIEDERICHS, 2012; PANNI et al., 2020; QUINN E CHANG, 2016; CALLE et al., 2018).

Muitos fatores de transcrição atuam no processo de regulação da expressão dos lncRNA, incluindo o p53, que, por sua vez, também é regulado por alguns micro RNAs (miRNA), mostrando a forte interligação entre proteínas, genes e elementos não codificantes (DI AGOSTINO, 2020; PANNI et al., 2020; CALLE et al., 2018). Outro fator de transcrição relacionado ao processo de regulação de lncRNAs é a proteína CTCF (fator de ligação CCCTC), que consegue mediar a desmetilação do DNA através da interação com 5mC e com as enzimas da família TET, sendo capaz de promover a desmetilação e controlar a expressão de diversos genes através da ligação com seus sítios de transcrição (ANGELONI E BOGDANOVIC, 2019; DEBAUGNY E SKOK, 2020).

CTCF é um dos reguladores da expressão gênica mais bem descritos, envolvido nos processos de modulação epigenética (regulação de metilação, modificação de histonas, remodelação da cromatina), *imprinting* genômico, transcrição e *splicing*. CTCF possui três domínios que passam por modificações pós traducionais distintas, se ligando em sítios inter e intragênicos e possibilitando o desempenho de suas várias funções. No seu papel relacionado ao processo de regulação de lncRNAs, ele atua como um bloqueador, impedindo a ligação entre um *enhancer* (pequenas sequências de DNA que tem a capacidade se ligarem a fatores de transcrição) e o promotor de um gene, levando ao bloqueio da sua transcrição (ALHARBI et al., 2021; DEBAUGNY E SKOK, 2020; FANG et al., 2020; KIM et al., 2015).

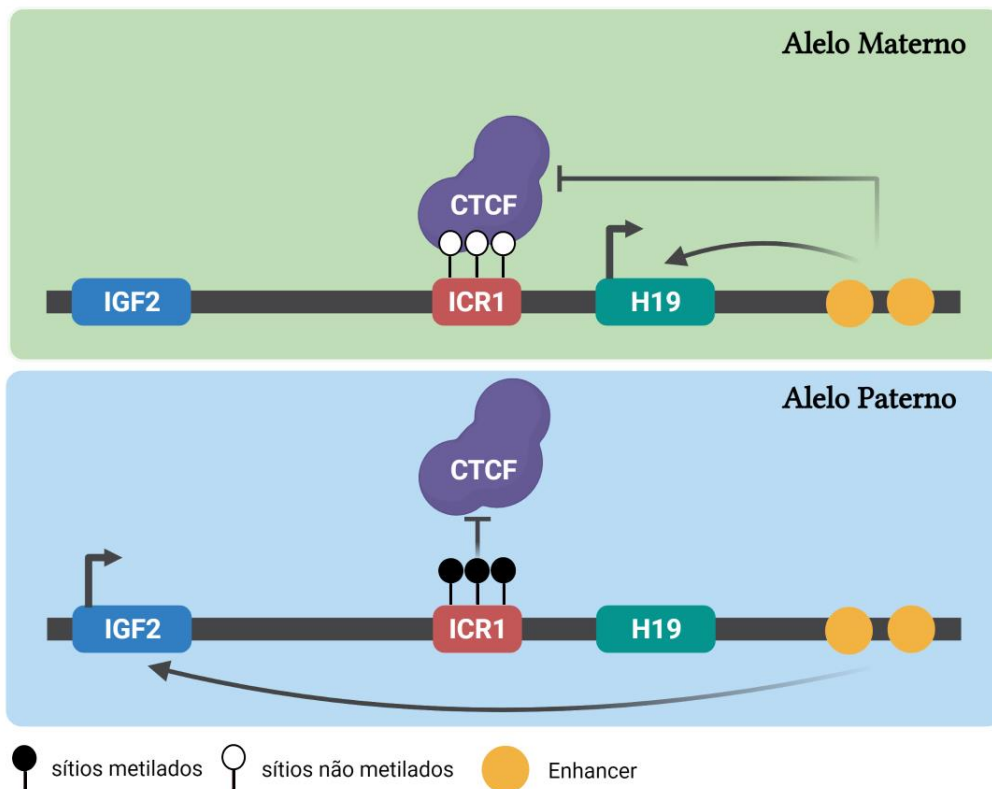
### ***1.1.2. Região diferencialmente metilada do H19 (H19DMR)***

O papel da CTCF como bloqueador ocorre em uma das ICRs mais bem estabelecidas, a ICR1 presente na H19DMR, que controla o cluster *H19/IGF2*, localizado na posição intergênica entre o *H19* e *IGF2* (*insulin-like growth factor 2*) na região 11.5 do braço

curto do cromossomo 11 (11p15.5). Os genes *H19* e *IGF2* são controlados por *imprinting* e possuem expressão monoalélica materna e paterna, respectivamente, sendo ativados pelo mesmo conjunto de *enhancers*. A ICR contida na H19DMR possui diversos sítios de ligação com a CTCF, que é sensível a metilação nesse cluster, e impede a ação concomitante dos *enhancers* no *IGF2* e *H19*, ou seja, apenas um deles será transcrito em cada alelo (CHI et al., 2019; ELHAMAMSY, 2017; THAMBAN et al., 2020).

Quando o bloqueador CTCF se liga à ICR no alelo materno não metilado, promove o bloqueio da interação do *enhancer* com os promotores do *IGF2*, que promovem a transcrição dos genes e levando o *enhancer* a interagir com o promotor do *H19*, promovendo sua transcrição no alelo materno. No alelo paterno, quando a metilação na ICR impede a ligação com o CTCF, possibilitando a ligação do *enhancer* com o promotor do *IGF2*, ativando sua transcrição no alelo paterno (Figura 2). Deleções dos sítios de ligação do CTCF causadas por mutações ou metilação podem levar à expressão bialélica do *IGF2* e inativação do *H19* (ELHAMAMSY, 2017; MACDONALD E MANN, 2020; THAMBAN et al., 2020).

**Figura 2:** Atuação da proteína bloqueadora CTCF na transcrição dos genes *H19* e *IGF2*



**Legenda:** Esquema mostrando a ligação da CTCF na ICR, inibindo a transcrição do IGF2 no alelo materno e consequente expressão do H19, seguido do bloqueio da ligação devido a metilação da ICR no alelo paterno, permitindo a transcrição do IGF2.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

O *IGF2*, transcrito no alelo paterno, é um fator de crescimento análogo à insulina que é responsável, principalmente, pelo crescimento fetal e placentário, além de atuar no processo de troca de nutrientes materno-fetal. Ele foi o primeiro gene de *imprinting* identificado e está expresso na maioria dos tecidos normais durante o desenvolvimento fetal, decaindo após o nascimento. O *IGF2* desempenha funções biológicas similares a outro análogo da insulina, o *IGF1* (*insulin-like growth factor 1*). Enquanto o *IGF2* possui sua expressão aumentada durante os períodos embrionário e fetal, a expressão do *IGF1* ocorre apenas após o nascimento, aumentando durante a infância e diminuindo após o período de puberdade (BERGMAN et al., 2013; MANCARELLA et al., 2021; NORDIN et al., 2014).

*IGF2* atua na regulação dos processos de crescimento, proliferação e diferenciação celular, através da interação com diversas proteínas e tem sido correlacionado com o desenvolvimento e progressão de neoplasias, provavelmente devido a reativação dos promotores fetais de *IGF2*. O aumento da sua expressão também tem sido associado à piora de prognóstico e resistência a quimioterápicos. O controle da expressão do *IGF2* através da metilação da DMR durante o processo de *imprinting*, impede o aumento da sua expressão, o que poderia levar a proliferação celular aberrante. A perda de *imprinting* no *locus IGF2/H19* leva à hiperexpressão do *IGF2* e está relacionada a síndromes (como a síndrome de Beckwith-Wiedemann) e ao desenvolvimento organomegalias e sarcomas pediátricos (AYKROYD et al., 2022; BROUWER-VISSER E HUANG, 2015; LIVINGSTONE, 2013; RATAJCZAK, 2012)

O processo de *imprinting* no *locus H19/IGF2* no alelo materno possibilita a ativação do gene *H19*. A transcrição do *H19* resulta em um lncRNA, um dos primeiros identificados nos mamíferos, que está relacionado à repressão do crescimento e processo de diferenciação celular, possuindo um baixo índice de mutações. Como citado anteriormente, os lncRNAs possuem diversas funções biológicas, dentre as funções do *H19* como lncRNA está a geração de dois miRNAs (miR-675-5p e miR-675-3p) que atuam em conjunto com o *H19* na regulação da diferenciação celular e na regulação de diversos genes, como *RUNX1*. O *H19* também tem sido associado a regulação de processos inflamatórios, através da sua ligação com NFκB, receptores *toll-like* e TNF-α (LIN et al., 2020, 2020; LIU et al., 2017; MACDONALD E MANN, 2020; RAVEH et al., 2015; WANG et al., 2020).

A expressão do *H19* está alta durante o desenvolvimento embrionário e possui capacidade de inibir o crescimento placentário, além de controlar a transcrição de diversos

genes relacionados ao *imprinting* durante o desenvolvimento fetal. Após o nascimento, ocorre uma diminuição gradativa da expressão do *H19* em quase todos os tecidos, mas se mantém alta no músculo esquelético, cardíaco e em cartilagens. Acredita-se que os miRNAs miR-675-5p e miR-675-3p tenham papel crucial no processo de diferenciação e regeneração desse tecido, realizando a repressão de fatores de transcrição que realizam a inibição da diferenciação (DEY et al., 2014; JIANG E NING, 2020; LIU et al., 2016; LIU et al., 2017; WANG et al., 2020).

Acredita-se que as funções do *H19* tenham relação, principalmente, com sua capacidade modular miRNAs e proteínas em diferentes tipos de tecidos. O *p53*, gene supressor tumoral mais atuante no câncer, possui a capacidade de suprimir a expressão do *H19*, induzindo a desmetilação da ICR presente na H19DMR. Por outro lado, alguns estudos mostram a atuação do *H19* ou de seus miRNA derivados na inativação do *p53*, podendo-se dizer que esses dois genes possuem uma relação mútua de regulação. PARP-1, uma enzima que age no sistema de reparo do DNA, é um conhecido regulador e estabilizador da TP53 e também apresenta associação com a repressão da expressão do *H19* (LIU et al., 2016; MATOUK et al., 2010; RAVEH et al., 2015; RAVID et al., 2014; YANG et al., 2012).

Com relação ao desenvolvimento de células hematopoiéticas, alguns estudos identificaram a atuação de lncRNAs no processo de diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas (CPH). A deficiência do *H19* foi associada ao bloqueio da transição de células endoteliais para hematopoiéticas através do aumento da metilação de diversos fatores de transcrição, como o RUNX1, essenciais para o processo de desenvolvimento de CPH. Além disso, a expressão do *H19* apresenta-se aumentada nas chamadas CPH de longo prazo, em comparação com as de curto prazo. As CPH de longo prazo possuem maior capacidade de auto renovação e diferenciação celular, enquanto essa capacidade nas CPH de curto prazo é limitada (HUANG et al., 2016; LECERF et al., 2020; LIU et al., 2012; VENKATRAMAN et al., 2013; ZHOU et al., 2019).

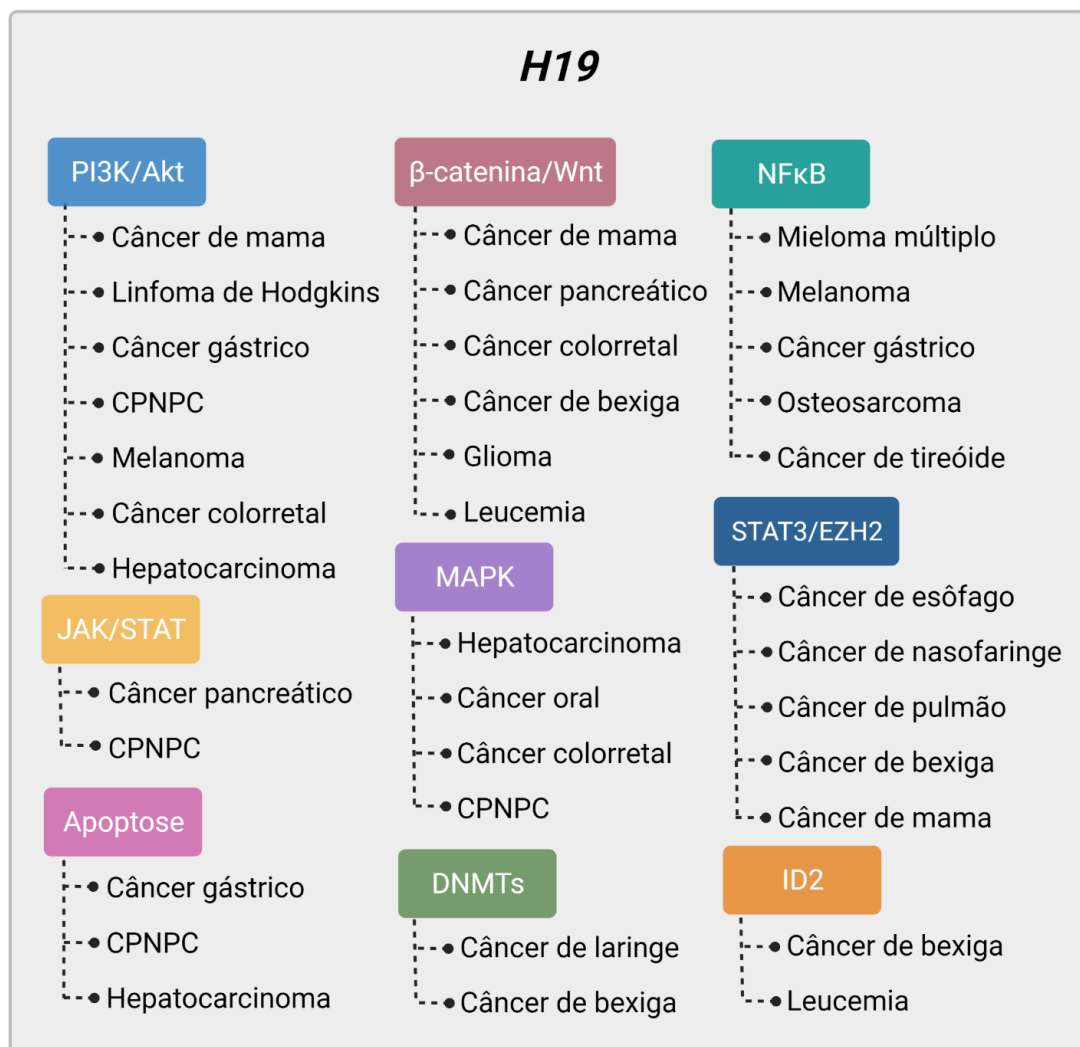
Além do seu envolvimento em funções fisiológicas, como o crescimento e diferenciação celular, alterações na expressão do *H19* têm sido associadas com o desenvolvimento e progressão de diversos tipos de neoplasias. Em condições fisiológicas normais, o *H19* age como um supressor tumoral, porém, o seu papel no desenvolvimento de neoplasias tem sido controverso, atuando tanto como um oncogene quanto como supressor tumoral, adquirindo perfis diferentes de acordo com o tipo de tecido ou contexto, podendo



desempenhar funções distintas em diferentes estágios da mesma neoplasia (CHI et al., 2019; DEY et al., 2014; WANG et al., 2019; WEIDLE et al., 2017; YANG et al., 2021; YOSHIMIZU et al., 2008).

Os mecanismos pelos quais o *H19* atua nas neoplasias variam de acordo com o tipo do tumor, tendo relação com mecanismos de expressão heterotópica, controle do ciclo celular, proliferação e invasão celular, autofagia, apoptose, regulação de miRNAs, entre outros (CHI et al., 2019; PAN et al., 2019; YANG et al., 2021). A capacidade de interação que o *H19* possui com genes, proteínas e enzimas possibilita sua atuação em processos fisiológicos e patológicos, a Figura 3 apresenta algumas vias de interação com o *H19* e o tipo de neoplasia em que atuam, seja no desenvolvimento ou progressão.

**Figura 3:** Vias de interação do *H19* e os tipos de neoplasias relacionados



**Legenda:** CPNPC – Câncer de Pulmão Não Pequenas Células

**Fonte:** Elaborada pela autora.

Alguns estudos têm demonstrado a atuação do *H19* na resposta ao tratamento de diversas neoplasias. Devido a sua capacidade de ligação com diversas proteínas e modulação de miRNAs, a expressão do *H19* pode favorecer alterações no microambiente tumoral, que pode ser o principal responsável pela associação do aumento da expressão do *H19* e a resistência a quimioterapias. Por outro lado, devido ao seu comportamento como supressor tumoral em algumas neoplasias, o *H19* também apresentou relação com o aumento da sensibilidade a terapias, como observado por Schultheiss e colaboradores (2017) em pacientes portadores de hepatocarcinoma. (GHAFOURI-FARD et al., 2021; JIA et al., 2018; JIANG et al., 2020; PAN et al., 2019; SCHULTHEISS et al., 2017; SHERMANE LIM et al., 2021; TIAN et al., 2021; WANG et al., 2020b).

A busca por novos fármacos tem motivado a maioria dos estudos recentes sobre as neoplasias de forma geral. Desregulações nos processos epigenéticos têm sido considerados como um dos principais fatores envolvidos na patogênese tumoral, e, devido a sua capacidade modulatória, favorecem o desenvolvimento de moléculas inibidoras desses processos. As chamadas epidrogas atuam na reprogramação de processos como a metilação do DNA e acetilação de histonas e regulação dos genes envolvidos nesses processos. A azacitidina e a decitabina, inibidores da ação das enzimas DNMTs, estão entre as primeiras epidrogas utilizadas no tratamento de neoplasias. Seu uso no tratamento da Síndrome Mielodisplásica (SMD) e da Leucemia Mielóide Aguda (LMA) já faz parte da prática clínica e representa um dos poucos tratamentos para pacientes com prognóstico desfavorável, porém ainda apresenta altas taxas de resistência e perda de resposta nesses pacientes (CHAMSEDDINE et al., 2016; EL BAHHAJ et al., 2014; HOLČÁKOVÁ, 2018; MIRANDA FURTADO et al., 2019; SHAHRABI et al., 2016; ŠIMONIČOVÁ et al., 2022).

Devido a capacidade do *H19* em participar da regulação de processos envolvidos na patogênese de diversos tumores, bem como evidências de sua atuação como oncogene ou supressor de tumor, fazem com que ele seja considerado como um possível alvo terapêutico. A necessidade de diferenciação entre processos naturais e neoplásicos, através do estudo molecular de possíveis biomarcadores, representa a probabilidade de melhorar o prognóstico e sobrevida dos pacientes, principalmente em doenças muito heterogêneas, como a SMD.

## **1.2. Síndrome Mielodisplásica**

Síndrome Mielodisplásica (SMD) corresponde a um conjunto de desordens clonais das células progenitoras hematopoiéticas (CPH), levando a uma hematopoiese ineficaz e aumento da apoptose. A insuficiência medular na SMD leva a presença de displasia em uma ou mais linhagens celulares e citopenias periféricas, o que pode ter como consequência o aumento de blastos na medula óssea e, em menor proporção, no sangue periférico. Os pacientes portadores de SMD possuem alta susceptibilidade a infecções e hemorragias, devido a presença de citopenias, além de ser observado um aumento do risco de desenvolvimento de leucemia mielóide aguda (LMA) (ARBER et al., 2016b, 2016b, 2016b; CHAMSEDDINE et al., 2016; HASSERJIAN, 2019).

A SMD ocorre, prioritariamente, em indivíduos idosos com idade superior a 70 anos, sendo mais comum em indivíduos do sexo masculino. De acordo com a última publicação da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2016, a incidência da SMD em indivíduos acima de 70 anos era de 20 casos por 100.000 de habitantes, porém estima-se que a real incidência nessa faixa de idade seja de 75 casos por 100.000 habitantes, devido à baixa notificação de casos de câncer em geral. Apesar da patologia da SMD ainda não estar completamente elucidada, sabe-se que a exposição a agentes citotóxicos, como o benzeno e cigarro, podem ser nocivos à medula óssea e são considerados como possíveis agentes etiológicos da SMD. Em um estudo recente do nosso grupo, encontramos associação entre a exposição a agrotóxicos e desregulações na expressão de genes relacionados ao sistema de reparo do DNA, além da identificação de alterações citogenéticas na medula óssea de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos, demonstrando o impacto da exposição a agentes genotóxicos nas células da medula óssea (CHAMSEDDINE et al., 2016; COSTA et al., 2021; SWERDLOW et al., 2017).

### ***1.2.1. Classificação e heterogeneidade***

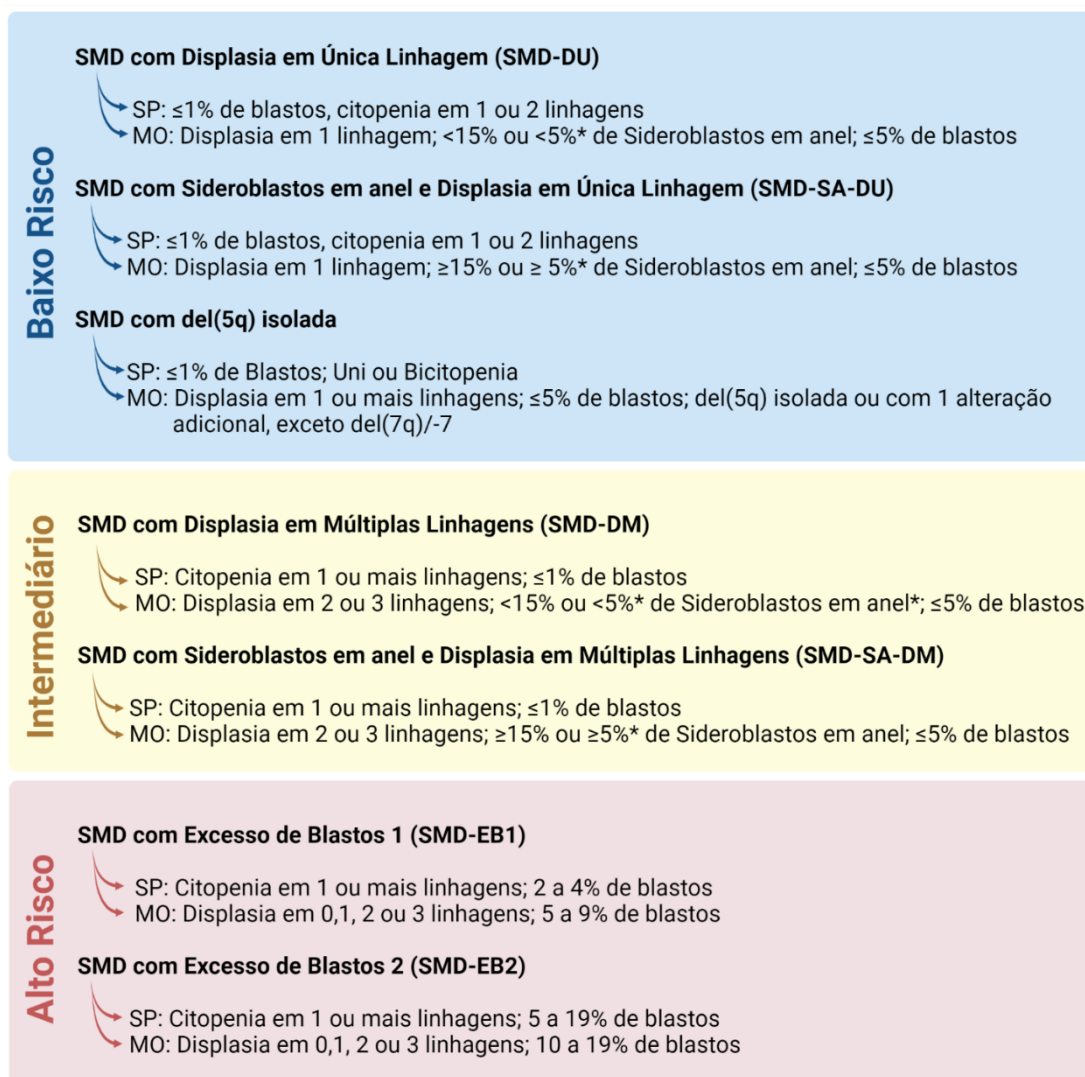
Com relação ao seu diagnóstico e classificação, a SMD é considerada uma das neoplasias hematológicas mais desafiadoras, pois possui características muito variadas, mesmo entre pacientes de um mesmo subgrupo. O diagnóstico da SMD ainda é, prioritariamente, baseado nas manifestações clínicas e morfológicas, porém, nas atualizações mais recentes da classificação pela OMS foram incorporadas algumas características

moleculares (ARBER et al., 2016b; SHAHRABI et al., 2016; SWERDLOW et al., 2017b; VARDIMAN et al., 2009).

A classificação da SMD pela OMS é definida pela presença de citopenias ao diagnóstico, quantidade de linhagens mielóides que apresentam displasia, presença de blastos na medula óssea e/ou sangue periférico e presença de sideroblastos em anel. A presença de alterações citogenéticas é identificada em cerca de 50-60% dos pacientes, porém apenas 1 alteração citogenética está relacionada diretamente com um dos subgrupos, a SMD com del(5q) isolada. Com relação às características moleculares, a mutação no gene *Splicing factor 3b subunit 1 (SF3B1)* apresenta forte relação com o subtipo SMD com sideroblastos em anel (SMD-SA), sendo a única mutação adicionada à classificação da OMS até o momento (ARBER et al., 2016b; SWERDLOW et al., 2017b; VARDIMAN et al., 2009).

Devido à grande variação nas características clínicas e laboratoriais entre os subgrupos da SMD, o curso clínico ocorre de maneira distinta entre eles. O risco de evolução para leucemia aguda varia de acordo com a classificação do paciente, alguns subgrupos possuem baixa taxa de evolução para LMA, com um curso clínico que está associado a uma maior sobrevida, enquanto os grupos com características clínicas mais avançadas, como o aumento de blastos, apresentam mais frequência de evolução para LMA e consequente taxa de sobrevida mais baixa. Baseado nos dados de sobrevida e evolução para LMA, os subgrupos da SMD classificados pela OMS podem ser divididos em baixo risco, intermediário e alto baixo risco (ARBER et al., 2016b). A classificação dos subgrupos da OMS está apresentada na figura 4.

**Figura 4:** Classificação da SMD segundo os critérios da OMS de 2016



**Legenda:** SMD - Síndrome Mielodisplásica; SP – Sangue Periférico; MO – Medula Óssea; \*Na presença de mutação do gene *SF3B1*.

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

Os pacientes que evoluem para LMA estão inseridos na categoria LMA com alterações relacionadas a mielodisplasia da classificação da OMS, que compreende casos com SMD em que a porcentagem de blastos ultrapassou o limiar de 20%, considerado para diagnósticos de LMA. As alterações displásicas presentes na medula com SMD permanecem após a evolução do seu quadro clínico, geralmente associados a uma evolução clonal com aumento de mutações no DNA e de alterações citogenéticas, incluindo maior risco da presença de cariótipo complexo (com três ou mais alterações no mesmo clone). Os pacientes com SMD que evoluem geralmente apresentam pancitopenia severa e possuem pior prognóstico do que pacientes com LMA *de novo*, tendo uma baixa taxa de resposta à quimioterápicos usados no tratamento de pacientes com LMA *de novo* e, devido a evolução,

provavelmente não apresentaram resposta a tratamentos prévios para SMD (ARBER et al., 2016b).

A grande heterogeneidade da SMD tornou necessário o desenvolvimento de ferramentas que possibilitem uma avaliação prognóstica mais acurada, com relação a sobrevida e evolução para LMA, a fim de auxiliar nas decisões clínicas e terapêuticas. A utilização de sistemas de prognóstico baseados em escores favorece a estratificação dos pacientes baseado em um grupo de parâmetros, o que visa diminuir as barreiras de classificação entre os grupos. Com o intuito de padronizar as variáveis que devem ser utilizadas para definir o prognóstico dos pacientes com SMD, foi desenvolvido em 1997 um sistema internacional em colaboração com diversos centros especializados no mundo (incluindo o Brasil, na figura da pesquisadora do nosso grupo, a Prof. Dra. Sílvia Magalhães), o Sistema Internacional de Escores Prognósticos (IPSS) (GREENBERG et al., 1997).

O IPSS utilizou diversas características clínicas e laboratoriais para determinar as que exerciam maior influência na sobrevida e evolução para LMA. Esse sistema consiste em uma soma de valores de escores, que juntos irão determinar a qual grupo de risco o paciente pertence. Em 2012 o IPSS foi revisado (IPSS-R), após a adição de maior número de pacientes, fazendo um refinamento nos parâmetros, sendo ainda hoje o principal sistema prognóstico utilizado na SMD. As variáveis utilizadas no IPSS-R são: alterações citogenéticas, porcentagem de blastos na medula óssea, valores de hemoglobina, plaquetas e contagem absoluta de neutrófilos (ANC). A figura 5 apresenta as estratificações utilizadas e os grupos de risco correspondente a cada soma de escores (GREENBERG et al., 1997, 2012).

**Figura 5:** Categorias de risco e escores prognóstico do IPSS-R

Classificação prognóstica - Cariótipo	ESCORES							
	VARIÁVEIS	0	0,5	1	1,5	2	3	4
<b>Muito Favorável</b> Única: del(11q) ou -Y	Cariótipo	Muito Favorável		Favorável		Intermediário	Desfavorável	Muito Desfavorável
<b>Favorável</b> Normal Única: del(5q), del(12p) ou del(20p) Dupla: Incluindo del(5q)	Blastos MO (%)	≤2		>2 a <5		5 a 10	>10	
<b>Intermediário</b> Única: del(7q), +8, i(17q), +19 ou qualquer outra simples ou dupla	Hb (g/dL)	≥10		8 a <10	<8			
<b>Desfavorável</b> Única: del(3q) ou -7 Dupla: Incluindo -7/7q- Complexo: 3 alterações	ANC (mm <sup>3</sup> )	≥800		<800				
<b>Muito Desfavorável</b> Muito complexo: > 3 alterações	Plaquetas (mil cél/mm <sup>3</sup> )	≥100	50 a <100	≤50				
	GRUPOS DE RISCO							
	Categoria	Muito Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Muito Alto		
	Escores	≤1,5	>1,5- 3	>3-4,5	>4,5-6	>6		
	Sobrevida (anos)	8,8	5,3	3	1,6	0,8		

**Legenda:** MO – Medula óssea; ANC – Contagem Absoluta de Neutrófilos

**Fonte:** Adaptado de Greenberg et al. (2012)

### 1.2.2. Genômica e epigenômica da SMD

O IPSS-R é o sistema de determinação prognóstica mais bem aceito para pacientes com SMD, porém, diante do avanço nas descobertas moleculares, novas variáveis precisam ser avaliadas para tornar a ferramenta mais robusta e aumentar sua aplicabilidade. As características heterogêneas da SMD são um reflexo da diversidade de processos moleculares envolvidos na sua patogênese.

Acredita-se que o desenvolvimento da SMD ocorra sob a influência de diversos fatores nas células progenitoras hematopoiéticas, como a desregulação imune, alterações no microambiente medular, mecanismos de *splicing* aberrantes, presença de mutações somáticas e desregulação epigenética. A teoria mais aceita com relação a patogênese da SMD sugere que ela ocorra em diversas etapas, que levam a um acúmulo de alterações nas CPH e consequente aumento da capacidade de proliferação do clone tumoral, resultando no processo de hematopoiese ineficaz e aumento da instabilidade genética e epigenética (BEJAR et al., 2011; CHAMSEDDINE et al., 2016; ELIAS et al., 2014; HAFERLACH, 2019).

Uma das maiores comprovações da influência da instabilidade genômica na patogênese da SMD está na presença de alterações citogenéticas, que ocorre em cerca de 50-60% dos pacientes e é um dos principais fatores para avaliação do prognóstico. No caso de

pacientes com SMD relacionada a terapia (t-SMD), em que o desenvolvimento da doença ocorre após um período prévio de exposição à radio e/ou quimioterápicos, as alterações citogenéticas estão presentes em cerca de 80% dos casos. Pacientes com t-SMDs possuem características clínicas mais agressivas, menor índice de resposta a tratamentos e cariótipo complexo (CHAMSEDDINE et al., 2016; GREENBERG et al., 1997, 2012; SWERDLOW et al., 2017b).

Apesar da alta frequência de alterações citogenéticas nos pacientes com SMD, apenas uma alteração apresenta relação direta com a base fisiopatológica de um subgrupo, a SMD com del(5q) isolada. O fenótipo da SMD com del(5q) isolada está estritamente relacionado com a haploinsuficiência dos genes *RPS14* e *CSNK1A1*, localizados na região deletada do cromossomo 5, provavelmente causada pela ação da p53. Os pacientes desse grupo possuem uma média de sobrevida alta com risco de evolução para LMA de menos de 10%, além de apresentarem resposta positiva a um medicamento alvo específico, a lenalidomida. O tratamento com lenalidomida diminui o fenótipo da doença e aumenta a sobrevida dos pacientes, porém, a presença de mutações no *TP53* aumenta a resistência ao tratamento com lenalidomida (JAN; SPERLING; EBERT, 2021; SHAHRABI et al., 2016; SWERDLOW et al., 2017b).

A primeira análise de mutações na SMD foi publicada em 2011 por Bejar e colaboradores, que identificaram 18 genes, dentre eles o *TP53*, que apresentaram associação com prognóstico e sobrevida dos pacientes. Após o estudo de Bejar e colaboradores (2011), dois outros grupos, de Papaemmanuil (2013) e Haferlach (2014), publicaram trabalhos importantes para a elucidação do papel das mutações na SMD. A partir da publicação desses dois trabalhos, foram determinados os genes mais comumente mutados nos pacientes com SMD, mostrando a relação direta entre as mutações e o desenvolvimento e prognóstico da SMD (BEJAR et al., 2011; HAFERLACH et al., 2014; PAPAEMMANUIL et al., 2013).

Mutações somáticas são encontradas em até 90% dos pacientes portadores de SMD e, segundo Haferlach e colaboradores (2014), o número de mutações por paciente aumenta de acordo com o aumento da porcentagem de blastos. Os genes que apresentam maior frequência de mutações identificada na SMD, em sua maioria, são reguladores epigenéticos, dos processos de *splicing*, mediadores de resposta ao dano de DNA e fatores de transcrição. De acordo com Papaemmanuil e colaboradores (2013) o surgimento de mutações na SMD variam e se modificam de acordo com o estágio em que a doença se encontra.



Mutações em genes envolvidos no processo de *splicing* ocorrem durante o início do desenvolvimento da doença enquanto genes relacionados ao processo de sinalização celular se apresentam mutados em fases mais tardias, o que demonstra o surgimento de novas mutações dependendo do curso clínico da SMD (Figura 6) (HAFERLACH et al., 2014; PAPAEMMANUIL et al., 2013).

O *SF3B1*, gene que participa da maquinária do *splicing*, foi identificado como o gene mais mutado na SMD, sendo adicionado na classificação mais recente da OMS e aumentando as opções de tratamento alvo específico com a droga luspatercept, recentemente aprovada pelo FDA para uso na SMD-SA. A adição da mutação do gene *SF3B1* na classificação da OMS demonstra o começo do uso de ferramentas de sequenciamento do DNA na estratificação dos pacientes com SMD, que possui estimativa de ser inserida também nos escores prognósticos (HAFERLACH et al., 2014; HAFERLACH, 2019; HASSERJIAN, 2019; KOMROKJI et al., 2022; SWERDLOW et al., 2017b).

Mutações no *TP53*, o gene mais mutado nas neoplasias em geral, têm sido associadas a um pior prognóstico na SMD, independente da classificação do paciente pelo IPSS-R. Uma publicação recente, que teve participação do nosso grupo de estudos, avaliou a presença de mutações de acordo com o perfil alélico. A presença de mutação bialélica do *TP53*, bem como o acúmulo de mutações nesse gene, foi associado ao desenvolvimento de cariótipo complexo e prognóstico desfavorável, enquanto pacientes com mutação em apenas um dos alelos não apresentou diferença na resposta a tratamento e prognóstico dos casos sem mutação nesse gene. O uso do Venetoclax, um inibidor da atividade da BCL-2, em conjunto com o hipometilante azacitidina, tem apresentado resultados promissores no tratamento da LMA *de novo* e LMA secundária a SMD, mesmo na presença de mutação no *TP53*, evidenciando a importância do estudo de novos medicamentos alvo específicos (BERNARD et al., 2020; CUMBO et al., 2020; HASSERJIAN, 2019; QIN et al., 2022; ZAMORA et al., 2021).

A segunda classe de genes mais mutados na SMD corresponde genes envolvidos em processos epigenéticos. O *TET2*, um dos responsáveis pelo processo de desmetilação do DNA, é o segundo gene mais comumente mutado na SMD e a *DNMT3A*, que atua na metilação do DNA, ocupa a quinta posição. Mutações no *TET2* apresentaram associação com a desregulação da hidroximetilação do DNA, o que sugere aumento da metilação global nesses pacientes e consequente silenciamento gênico. As mutações na *DNMT3A* e *DNMT3B*,

foram associadas a uma pior sobrevida e a aumento de evolução para LMA, juntamente com outros moduladores epigenéticos comumente mutados na SMD, como o *IDH1* e *EZH2* (HAFERLACH et al., 2014; KENNEDY; EBERT, 2017; PAPAEMMANUIL et al., 2013).

Em um estudo recente publicado pelo nosso grupo, encontramos diminuição da desmetilação global do DNA em pacientes com SMD, quando comparados aos controles saudáveis e a associação do aumento de metilação global com a presença de alterações citogenéticas (CAVALCANTE et al., 2020). Os dois principais medicamentos utilizados no tratamento da SMD são os agentes hipometilantes Decitabina e Azacitidina, indicados para o tratamento de pacientes de alto risco. Cerca de 30-60% dos pacientes com SMD apresentam resposta inicial positiva ao tratamento com agentes hipometilantes, porém, a taxa de resposta tende a cair no decorrer dos ciclos de tratamento, podendo estar associado a presença de mutações somáticas (GONDEK; DEZERN, 2020; GUO et al., 2020; SHAHRABI et al., 2016; ŠIMONIČOVÁ et al., 2022).

As células progenitoras hematopoiéticas (CPH) possuem a capacidade de auto renovação, o que permite o desenvolvimento de diferentes linhagens celulares. O microambiente medular é rico em citocinas, fatores de transcrição, fatores de crescimento, entre outros componentes que favorecem a proliferação celular. O processo normal de envelhecimento leva ao surgimento de mutações nessas células, com consequente expansão clonal. A mutação do gene *TET2*, o mais mutado na SMD, é uma das mutações nas CPH que já foram identificadas no processo de envelhecimento natural, que também tem sido associado com níveis mais elevados de metilação global. Devido a esses fatores, a chamada hematopoiese clonal de potencial indeterminado (CHIP) tem sido alvo de estudos que buscam a compreensão do desenvolvimento de neoplasias mielóides, como a SMD e a LMA (BUSQUE et al., 2012; CAVALCANTE et al., 2020; CHAN; WILEY; BOLTON, 2022; HASSERJIAN, 2019; HOERMANN et al., 2020; YAMASHITA; IWAMA, 2022).

O desenvolvimento de resistência aos agentes hipometilantes, medicamentos mais utilizados no tratamento das SMDs de alto risco, e a baixa aplicabilidade do transplante halogênico de medula óssea (devido a idade geralmente avançada dos pacientes), potencializam a necessidade de novas formas de tratamento que se apliquem à prática clínica. O principal desafio tem sido a descoberta de biomarcadores que facilitem a diferenciação entre mutações nas CPH normais e às que levam ao desenvolvimento neoplásico, possibilitando o estudo de novos fármacos alvo específicos que prolonguem a sobrevida dos

pacientes com SMD. Devido sua atuação nos processos de crescimento e diferenciação celular, o lncRNA *H19* pode ser um forte candidato a biomarcador na SMD.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel do RNA longo não codificante *H19* no desenvolvimento e progressão da SMD.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Comparar o padrão de metilação da região H19DMR em pacientes com SMD de baixo e alto risco;
2. Comparar o padrão de metilação da H19DMR entre pacientes com SMD de alto e baixo risco e com LMA secundária a SMD;
3. Avaliar os níveis de expressão do gene *H19* entre pacientes portadores de SMD, LMA secundária a SMD e grupo controle;
4. Avaliar a associação entre os níveis de expressão gênica com as características clínico-laboratoriais dos pacientes portadores de SMD;
5. Associar os dados de expressão gênica com a expressão proteica da CTCF;
6. Avaliar a presença de polimorfismos funcionais na H19DMR e sua associação com as características clínico-laboratoriais dos pacientes portadores de SMD;
7. Associar os níveis de expressão do *H19* com a sobrevida dos pacientes com SMD.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Aspectos éticos**

A presente pesquisa foi submetida e aprovada (Nº do parecer: 4.505.895) pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará (UFC), através do sistema da Plataforma Brasil, utilizando-se de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Nestes termos, a equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

#### **3.2. Coleta e preparo de amostras**

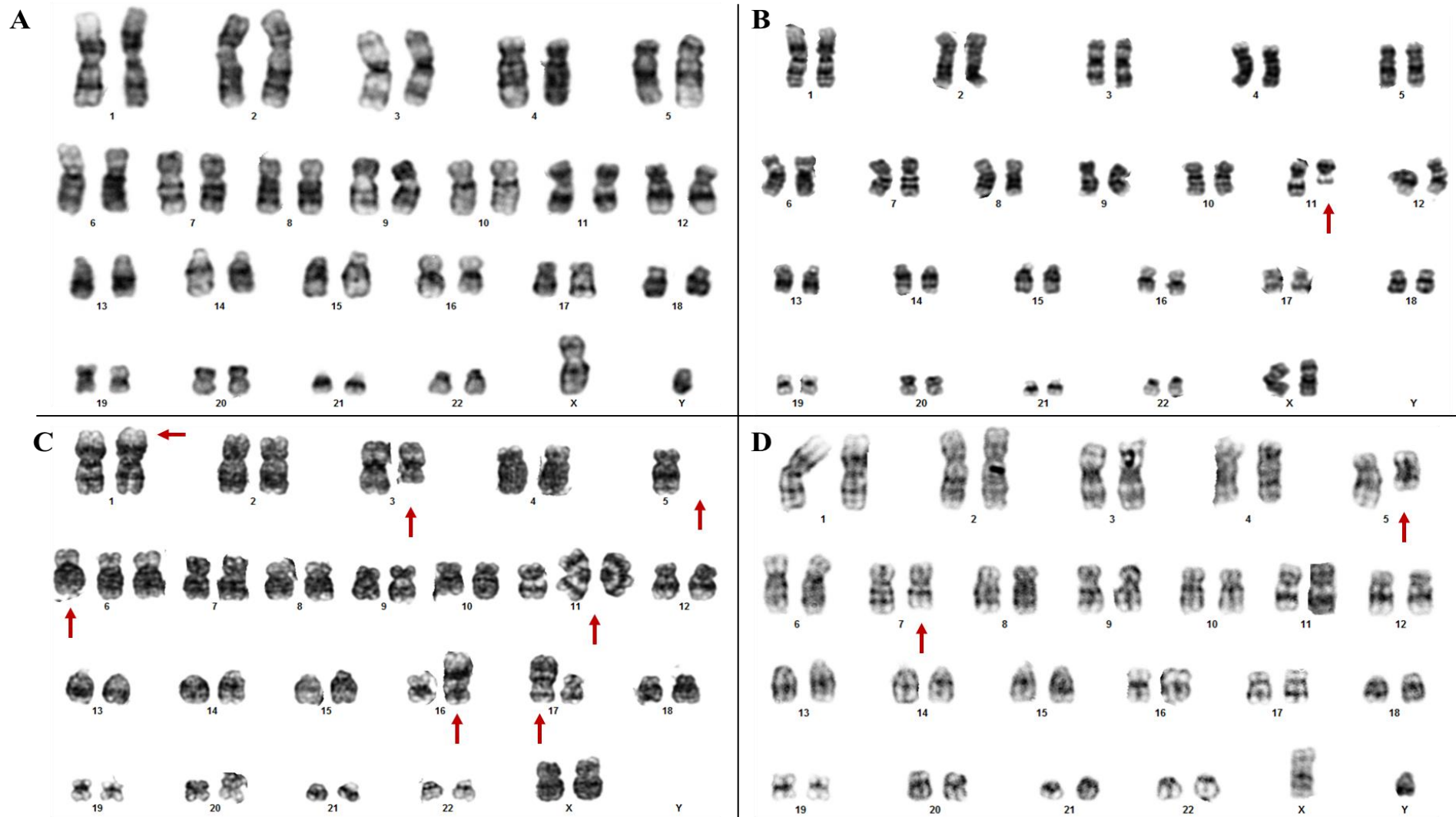
Neste estudo foram incluídas 70 amostras de medula óssea de pacientes portadores de SMD e 11 de LMA secundárias a SMD (LMA sec), diagnosticados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (ARBER et al., 2016b) e regularmente inscritos no ambulatório de hematologia do Hospital Geral de Fortaleza (HGF) ou do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará (HUWC/UFC) durante o período de junho de 2008 até maio de 2021. Foram utilizados como controles oito amostras de medula óssea de voluntários saudáveis, sem antecedentes de doença oncológica ou hematológica, após assinatura do TCLE. Todas as amostras foram coletadas por médico hematologista experiente, em seringa heparinizada para a avaliação do Cariótipo por banda G e em 2 tubos contendo EDTA, que foram utilizados para extração de RNA, DNA e proteínas. Foram obtidos 12 blocos de parafina de biopsias realizadas no mesmo momento da coleta do mielograma e cariótipo.

#### **3.3. Cariótipo por banda-G**

As análises dos cariótipos foram realizadas em todos os participantes da pesquisa, de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer, segundo a técnica descrita por Chauffaille e adaptada por Pinheiro (Pinheiro e Chauffaille, 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 (3:1), por 3 vezes.

Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia óptica e em seguida foram aquecidas por 3 minutos em micro-ondas na potência alta. O bandeamento será realizado pela técnica de tripsina e as bandas coradas com corante Wright. Foram analisadas 20 metáfases de cada paciente, sempre que possível, sendo capturadas e analisadas em sistema computadorizado com *software* para cariotipagem CytoVision®. Os resultados das análises citogenética de medula óssea foram estabelecidos de acordo com os critérios do Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (MCGOWAN-JORDAN et al., 2020). A avaliação dos cariótipos está exemplificada na figura 6.

**Figura 6:** Representação dos resultados encontrados na citogenética por banda G



**Legenda:** **A)** Paciente 62, apresentando cariótipo normal; **B)** Paciente 28, apresentando cariótipo com del(11q); **C)** Paciente 82, apresentando cariótipo complexo; **D)** Paciente 56, apresentando cariótipo com del(5q) e del(7q). As setas vermelhas indicam a localização das alterações cromossômicas

### 3.4. Sequenciamento pós modificação do DNA por bissulfito de sódio (Bis-seq)

#### 3.4.1. Extração de DNA genômico e modificação por bissulfito de sódio

Para a extração de DNA foram utilizados 200µL da amostra coletada em tubo de EDTA de 44 dos 81 pacientes (37 com SMD e sete com LMA sec) incluídos no estudo. Todas as amostras foram extraídas utilizando-se o kit PureLink™ Genomic DNA mini kit (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA genômico foi medida utilizando o equipamento de fluorimetria Qubit™ 2 e o kit DNA BR Assay kit (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

O DNA extraído foi modificado pelo tratamento com bissulfito de sódio, o qual permite a conversão *in vitro* das citosinas não metiladas presentes na molécula de DNA em uracilas. Durante a amplificação a *Taq DNA polimerase* reconhece a uracila como timina, a qual permanece no final da PCR no lugar das citosinas não metiladas. A análise do padrão de metilação é realizada pela presença das citosinas metiladas que permaneceram no DNA após a modificação (HERMAN et al., 1996). Para a conversão do DNA genômico, foi utilizado o kit EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research) de acordo com especificações do fabricante. Um total de 200ng de DNA genômico foi utilizado para a conversão por bissulfito de sódio. Resumidamente, foi adicionado 5µL do tampão M-Dilution, o volume foi ajustado para 50µL com água ultrapura e incubado a 37°C por 15 minutos, seguido da adição de 100 µL do reagente de conversão a cada amostra. As amostras foram então incubadas no termociclador Vapo.protect Mastercycler® Pro (Eppendorf) por 16 ciclos a 95°C por 30 segundos seguido de 50°C por 60 minutos. Após a ciclagem, as amostras foram mantidas a 4°C por 20 minutos.

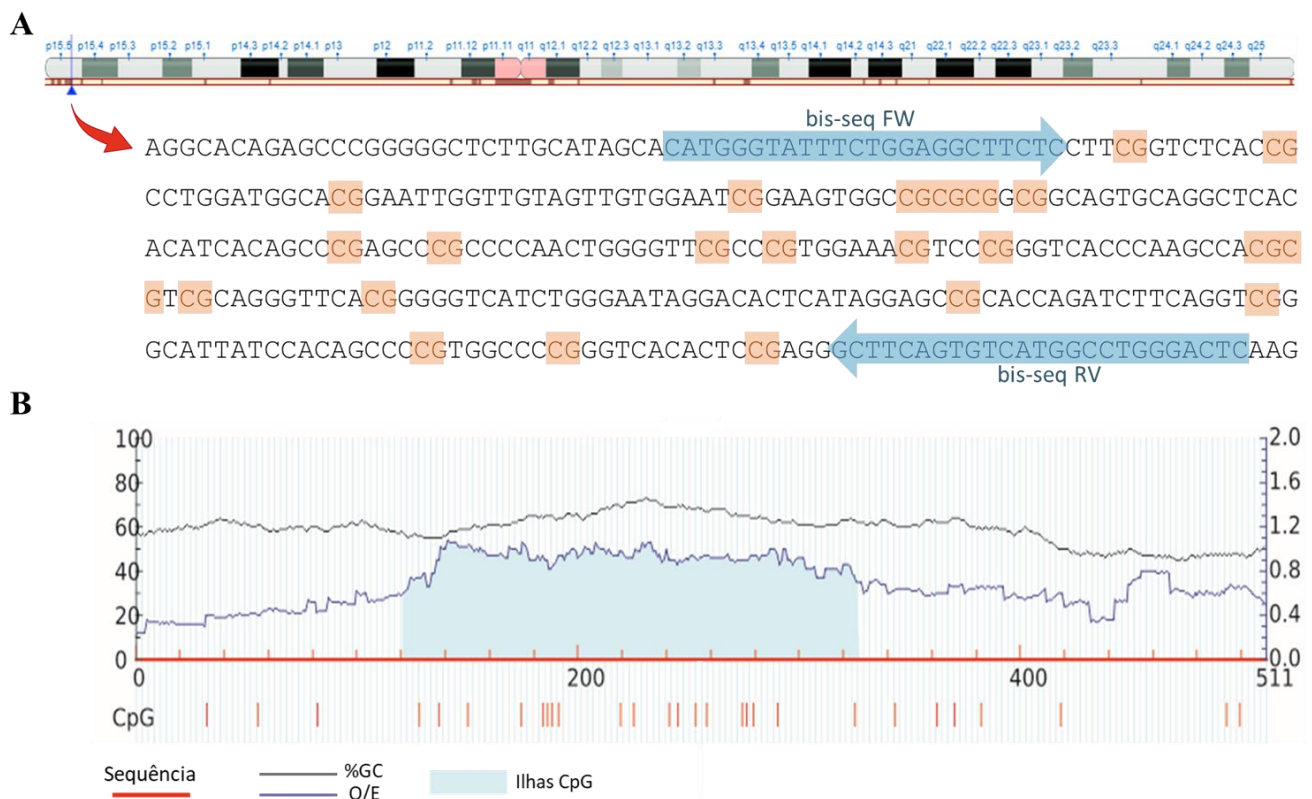
Após a incubação, foram adicionados 400µL de tampão de ligação na coluna Zymo-spin™ IC column e as amostras foram adicionadas em seguida, homogeneizadas por inversão e centrifugadas a 14000xg por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100µL de tampão de lavagem à coluna e novamente centrifugada a 14000xg por 30 segundos. Foram adicionados 200µL de tampão de dessulfonação M-desulphonization e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, as colunas foram centrifugadas a 14000xg por 30 segundos, lavadas duas vezes com 200 µL tampão de lavagem e centrifugadas novamente por 30 segundos. As amostras foram então eluídas em 15 µL de tampão de eluição em um microtubo de 1,5mL e armazenadas a -20°C.

O DNA modificado foi amplificado utilizando-se *primers* específicos para a H19DMR, os quais não discriminam os alelos metilados dos não metilados, contendo adaptadores (Figura 7A). As sequências para as regiões de estudo foram preditas por Kim e colaboradores (KIM et al., 2007) e os sítios CpGs foram determinados pelo programa *MethPrimer 2.0* (LI; DAHIYA, 2002). Os primers utilizados para amplificação da DMR foram: *Fw* 5'-**TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTATGGGTATTTTTGGAGGTTTTTT**-3' e *Rv* 5'-**GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAATCCCAAACCATAACACTAAAAC**-3' (as regiões em negrito correspondem aos adaptadores). As regiões analisadas compreenderam 23 dinucleotídeos CpGs para a H19DMR (390pb) (Figura 7B). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 30µl, contendo Platinum™ Hot



Start PCR 2X Master Mix (Invitrogen), *primers* 10pmol (de cada) e 1µL de DNA modificado. As ciclagens de temperatura foram realizadas no termociclador programável Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystem), as quais consistiram em um aquecimento inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento a 59°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e, posteriormente, uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose (1,5%) com 5% de brometo de etídio e mantidos a -20°C até o momento a purificação e sequenciamento.

**Figura 7:** Sequência genômica da H19DMR e alinhamento dos primers



**Legenda:** A) Sequência genômica da H19DMR evidenciando os dinucleotídeos CpGs analisados (em laranja) e as regiões de pareamento dos primers utilizados (em azul). B) Gráfico gerado pelo programa *MethPrimer*, evidenciando a ilha CpG (em azul) em fragmento correspondente a H19DMR.

%GC – porcentagem de dinucleotídeos CG; O/E – razão observada/esperada de CpG.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

### 3.4.2. Sequenciamento de última geração (NGS)

Após a amplificação do DNA modificado com os primers específicos, foi feita uma purificação dos produtos de PCR para posterior indexação. Foram utilizados 20µl dos produtos de PCR de cada amostra e 20µl de AMPure XP beads (Beckman Coulter) em uma placa de 96 poços para purificação do DNA. Após incubação por 5 minutos, a placa foi acoplada em um suporte magnético e realizada lavagem com etanol 80%, seguida da adição de Tris 10mM pH 8,5, o sobrenadante foi transferido para uma nova placa.

Em seguida, foi realizada a etapa de indexação através de uma reação de PCR para adicionar os identificadores (indexes) que foram utilizados para posterior recuperação das sequências provenientes de cada amostra. Foram utilizados 5µl de DNA purificado, 10µl do par de index Nextera® XT IDX Kt v2 Set B (Illumina), 25µl de 2X Kapa HiFi HotStart Ready (Roche) e 10µl de água. As ciclagens de temperatura foram realizadas no termociclador

programável Veriti™ Thermal Cycler (*Applied Biosystem*), as quais consistiram em um aquecimento inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 12 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, pareamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e, posteriormente, uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Após a indexação, foi realizada uma nova etapa de purificação com etanol 80% e Tris 10mM pH8,5. Ao final da purificação, foram transferidos 25µl do sobrenadante para uma nova placa e realizado visualização em gel de agarose (1,5%) com 5% de brometo de etídio, para verificação da indexação e tamanho dos fragmentos. As amostras indexadas foram quantificadas com o equipamento de fluorimetria Qubit™ 2 e o kit DNA BR Assay kit (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram normalizadas, seguindo o cálculo abaixo, baseado no tamanho dos *amplicons* (moléculas de ácido nucleico amplificadas durante reação de PCR) para possibilitar a mistura de quantidades equimolares das bibliotecas para o sequenciamento:

$$\frac{[\text{conc. em ng/ul}]}{660 \text{ g/mol} \times \text{média do tamanho dos fragmentos}} \times 10^6 = [\text{conc. em nM}]$$

Após a normalização das amostras, foram colocados 5µl de cada amostra em um microtubo de 1,5mL, homogeneizadas e transferido 5µl da mistura das bibliotecas para um novo tubo contendo 5µl de NaOH 0,2N, homogeneizados e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos e adicionado 990µL da solução HT1. A mistura das amostras foi quantificada o equipamento de fluorimetria Qubit™ 2 e o kit DNA HS Assay kit (Invitrogen) e o tamanho dos fragmentos obtidos pelo 4200 TapeStation System (Agilent), de acordo com as instruções do fabricante e a concentração foi ajustada para 10pM e mantidas em gelo. O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq System (Illumina) usando o kit de reagentes MiSeq Reagent Kit V3 600pb (Illumina), de acordo com as instruções do fabricante. Todos os experimentos de sequenciamento foram realizados na Central de Genômica e Bioinformática (CeGenBio) do NPDM.

### **3.5. Análise da expressão gênica por RT-qPCR**

#### **3.5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA**

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, deixado em banho de gelo por 15 minutos e centrifugado a 3000rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida foi desprezada a fase aquosa e acrescentado 250µL de PBS em cada tubo e, posteriormente, 750µL de TRIzol™ LS Reagent (Invitrogen) no tubo destinado a extração de RNA. Após este procedimento, o material foi armazenado no freezer a – 80°C até o seu uso.

A extração de RNA foi realizada a partir da utilização do TRIzol™ LS Reagent (Invitrogen) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para cada 1mL de TRIzol™ LS Reagent foram adicionados 200µL de Clorofórmio e 5µL de glicogênio, homogeneizadas com vórtex e, em seguida, centrifugadas a 14.000rpm por 15 minutos a 4° C. Retirou-se o sobrenadante de cada amostra, transferindo para novos tubos, seguidos de precipitação com

400µL de isopropanol, e incubado por 60 minutos a -20°C, após esse período, foi realizada outra centrifugação a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O pellet formado foi ressuspensão em etanol 70% (v/v) e novamente centrifugado por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado por inversão e, após seco, o pellet foi diluído em água livre de RNase. Foram realizadas leituras espectrofotométricas nos comprimentos de ondas de 230, 260 e 280nm, com o equipamento NanoDrop Lite (*Thermo Scientific*).

Após a extração do RNA, 1000ng de cada amostra foram utilizados na síntese do cDNA. A síntese do cDNA foi realizada com a utilização do Kit para Transcrição Reversa *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems)*, de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi diluído cinco vezes para ser utilizado nas reações de qPCR e armazenado a -20°C.

### 3.5.2. PCR em tempo real

A avaliação da expressão do gene *H19* foi realizada em 80 pacientes e nos oito controles saudáveis através da metodologia de RT-qPCR (Transcrição reversa associada a PCR quantitativa em tempo real), pelo equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System® (*Applied Biosystems*), em placas transparentes de 96 poços (*MicroAmp 96-well Plates, Applied Biosystems*). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata utilizando sondas *TaqMan assay®* com marcação FAM-MGB (*Applied Biosystems*) descritas na Tabela 1. O volume final de cada reação foi de 10µl, sendo 7µl de TaqMan Universal Mastermix, 0,5µl de primer (*TaqMan Assay*) e 2,5µl de cDNA. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneos). Todas as amostras foram realizadas em duplicatas para todos os genes. Como controle de contaminantes da PCR, foram utilizados NTCs (*no-templante controls*) adicionando-se água no lugar da amostra, em cada placa.

**Tabela 1:** Genes utilizados na avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real

GENES	CÓDIGO DE REFERÊNCIA
<b>Genes de Referência</b>	
<i>B2M (Beta-2-microglobulin)</i>	Hs00187844_m1
<i>HPRT1 (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1)</i>	Hs02800695_m1
<i>PPIA (Peptidylprolyl Isomerase A)</i>	Hs04194521_s1
<i>UBC (Ubiquitin C)</i>	Hs05002522_m1
<b>Genes de Estudo</b>	
<i>H19 (H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript)</i>	Hs00399294_g1

Para validar a estabilidade dos níveis de expressão gênica, foram utilizados quatro genes de referência: *B2M*, *HPRT1*, *PPIA* e *UBC*. Para a escolha do par de genes de referência mais estáveis, foi calculado o desvio padrão de cada gene de referência com base em valores brutos de *Cq (quantification cycle)* (BUSTIN et al., 2009). Entende-se como gene endógeno mais

estável, aquele ou aqueles que obtiverem o menor valor de desvio padrão. Após a análise do desvio padrão, foi realizado um cálculo de coeficiente de correlação de Pearson para cada par de genes de referência candidatos. Em seguida, foi feita a média geométrica de todos os genes, conhecida como média de tendência central (INDEX), e feito correlação de Pearson de cada gene, separadamente, com o INDEX obtido. Os genes de referência que apresentaram menor valor de desvio padrão e maior correlação entre si e com o valor INDEX ( $r > 0,7$ ) (BORGES et al., 2018; VANDESOMPELE et al., 2002), foram considerados os mais estáveis. Assim, para este estudo, obtivemos que os genes mais estáveis nas amostras de cDNA utilizadas foram a *B2M* e *UBC*.

A partir do *threshold* estabelecido, os valores de *Cq* foram fornecidos pelo *software* do aparelho 7500 *Real-Time PCR System*® (*Applied Biosystem*). Para normalizar os valores de *Cq*, de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, uma amostra de placenta foi utilizada como calibradora, por ser o tecido em que o *H19* se apresenta com maior expressão. A normalização da expressão gênica foi feita pelo método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001), sendo o  $\Delta Cq$  determinado pelo valor de *Cq* de uma amostra subtraído da média geométrica dos *Cq*'s dos genes de referência utilizados (*B2M* e *UBC*) da mesma amostra. O  $\Delta\Delta Cq$  corresponde ao  $\Delta Cq$  do calibrador (placenta) subtraído do  $\Delta Cq$  da amostra (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001).

### 3.6. Expressão proteica por Imunohistoquímica (IHQ) em plataforma automatizada

Foram obtidos blocos parafinizados de biópsias da medula óssea de 12 pacientes incluídos no estudo, sem seis do grupo SMD-SA e seis com SMD-EB, as coletas de biópsia foram realizadas no mesmo período das amostras de mielograma (utilizadas nos demais experimentos). Os cortes histológicos de 2-3 $\mu$ m foram realizados com o auxílio de um micrótomo em lâminas eletricamente carregadas. Os cortes histológicos foram colocados na estufa por 30 minutos a 60°C para secagem e fixação do material. Após a fixação, as lâminas foram colocadas no equipamento BenckMark ULTRA System (Roche Diagnostic), equipamento de imunohistoquímica (IHQ) automatizado, localizado no setor de IHQ do Laboratório ARGOS Patologia. Para a realização das reações, foi utilizado o kit de detecção ultraView Universal DAB Detection Kit (Roche Diagnostic). Ao final do processo, as lâminas são retiradas do equipamento e montadas com lamínula.

A validação dos anticorpos foi feita utilizando-se material parafinado de placenta, para definição da concentração e tempo de incubação de cada anticorpo primário. As descrições do anticorpo primário e as condições utilizadas estão descritas na tabela 2.

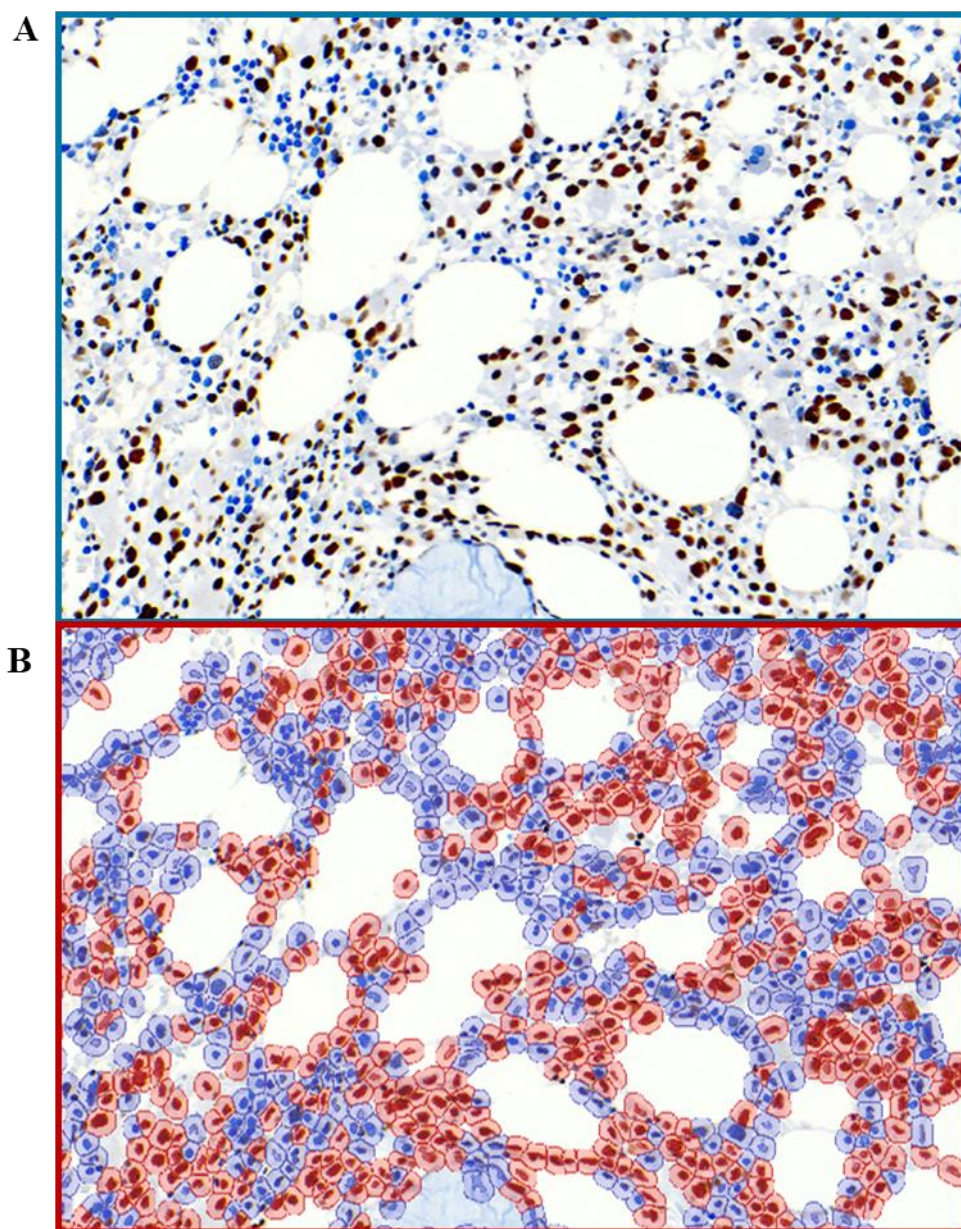
**Tabela 2:** Características dos anticorpos primários utilizados e condições experimentais

Proteína	Origem	Tipo de marcação	Catálogo	Diluição	Tempo de incubação
CTCF	Coelho	Nuclear	Invitrogen #14-9523-82	1:100	1 hora

Todas as lâminas foram digitalizadas após a montagem da lamínula, utilizando-se o equipamento MoticEasyScan Pro (Motic® Digital Pathology), no Laboratório ARGOS Patologia, e as imagens obtidas foram analisadas no *software* QuPath (BANKHEAD et al., 2017). O QuPath é um *software* gratuito de análise patológica digital, que permite a quantificação de diferentes tipos de marcações em tecidos histológicos.

Após a digitalização das lâminas, um patologista experiente avaliou cada marcação, e determinou as condições de marcação consideradas positivas e negativas no *software* QuPath, para cada marcador estudado. Após a definição das marcações no *software*, as áreas de cada lâmina analisadas foram selecionadas e as porcentagens de positividade foram geradas pelo *software*. A marcação das células positivas no QuPath está exemplificada na Figura 8.

**Figura 8:** Identificação das células com marcação positiva no *software* QuPath



**Legenda:** A- Amostra marcada com CTCF (marcação nuclear). B- Identificação das células com marcação do CTCF pelo QuPath, células com marcação positiva em vermelho e sem marcação em azul.

### 3.7. Análise estatística

#### 3.7.1. Análise de Sequenciamento pós modificação por bissulfito

Os arquivos FASTQ foram obtidos em pares para cada paciente avaliado. A avaliação da qualidade das sequências obtidas e a remoção dos adaptadores foi realizada na plataforma online *Galaxy* (<https://usegalaxy.eu>), utilizando as ferramentas *Multi QC* e *FASTQ info* para avaliar a qualidade das sequências e *Trim sequences* para remover os adaptadores. A Plataforma online *IGV – Integrative Genomics Viewer* foi utilizada para confirmar a conversão por bissulfito nas ilhas CpGs e visualização dos Polimorfismos de nucleotídeo únicos (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*). Os pares de sequências obtidos foram unificados com o auxílio da ferramenta *FLASH*, também disponível na plataforma *Galaxy*. O alinhamento das sequências e análise da metilação (através da contagem da quantidade de pares de bases que foram sequenciados - *reads*) e a visualização das ilhas CpGs metiladas foi realizado no programa *Bismark* (KRUEGER; ANDREWS, 2011).

#### 3.7.2. Análise dos dados de expressão gênica e metilação do DNA

Para a avaliação dos dados de expressão gênica, proteica e de metilação foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* para verificar se os dados de cada variável analisada se apresentavam com distribuição normal (dados paramétricos, com grupos com menos de 50 casos). Os valores de *outliers* foram retirados (quando ocorreram) por não representarem aqueles resultados aos quais o estudo tinha o objetivo de generalizar ( $p\text{-valor} > 0.05$  para o teste de *Shapiro-Wilk*).

Os dados paramétricos foram analisados através do teste *t* de *Student*, para a comparação da média entre dois grupos, e do teste de ANOVA *one-way*, para a comparação das médias em variáveis com mais de dois grupos. O pós-teste (*post-hoc*) para a ANOVA *one-way* foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de *Levene*. Caso houvesse homogeneidade de variâncias ( $p\text{-valor} \geq 0,05$ ), foi definido o teste de *Tukey*. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados ( $p\text{-valor} < 0,05$ ), foi definido o teste de *Games-Howell*.

Os dados sobre os níveis de expressão gênica (valores de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ), de metilação (porcentagens) e expressão proteica (porcentagem de positividade) foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, com intervalo de confiança (IC) superior e inferior, a fim de determinar a possível associação frente cada variável analisada. O nível de significância estatística utilizado foi de  $p < 0,05$ , todas as análises foram efetuadas com recurso do *software* SPSS para Windows (versão 24.0) e os gráficos confeccionados no programa *Graphpad Prism v.8*.

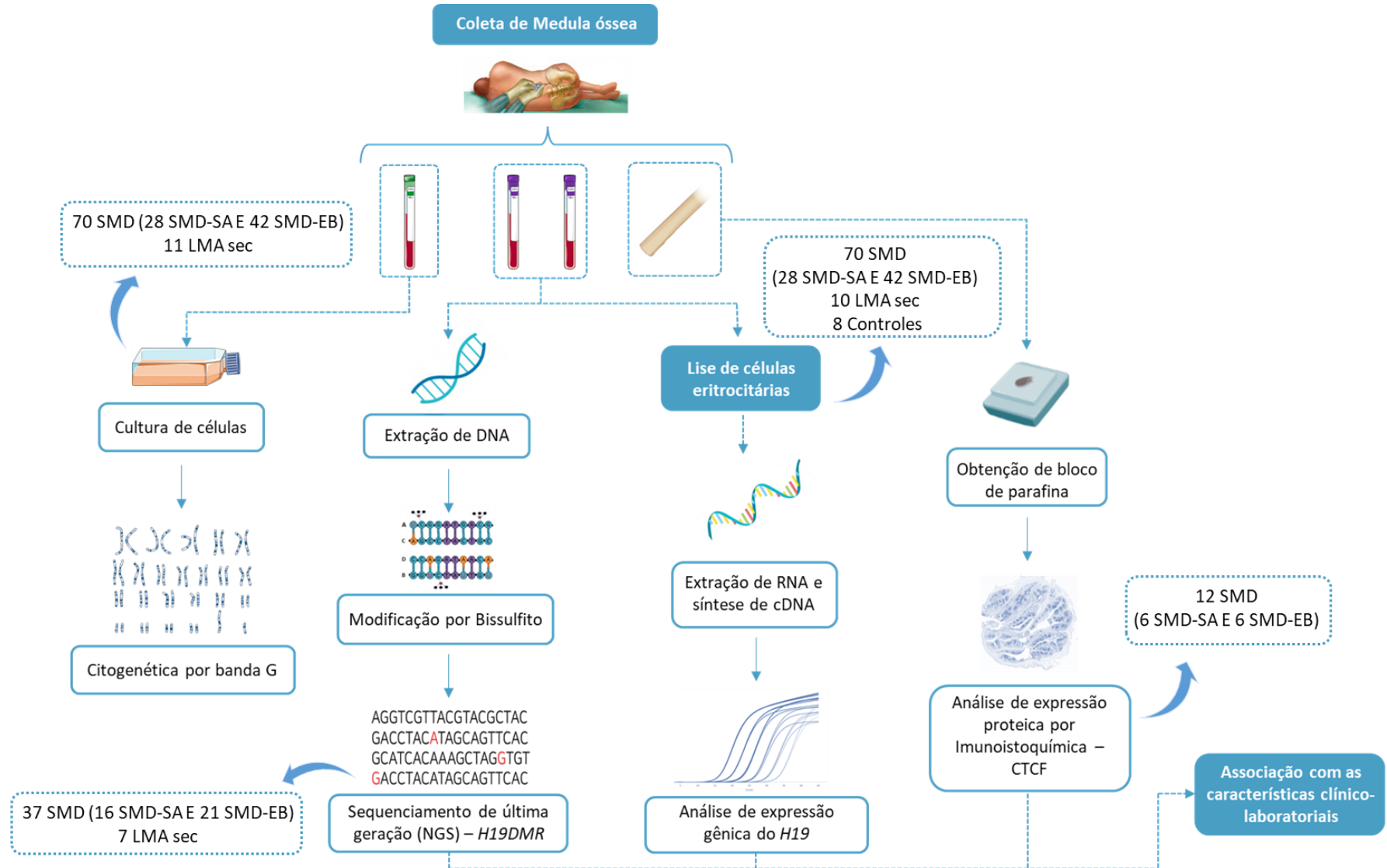
A análise de regressão logística foi utilizada para estimar a razão de chances (*odds ratio*) para as variáveis que contribuem para o risco de SMD em relação aos genótipo dos SNP avaliados e para ajustar as análises de fatores de confusão que contribuem para a susceptibilidade de SMD. O nível de significância estatística utilizado foi  $p < 0,05$  (*2-sided*).

As variáveis avaliadas estão descritas abaixo:

- \* Grupo: SMD com sideroblastos em anel, SMD com excesso de blastos, LMA sec e controle saudável;
- \* Sexo: masculino e feminino;
- \* Idade (categorização 1):  $\leq 60$  anos e  $> 60$  anos;
- \* Idade (categorização 2):  $\leq 60$  anos,  $> 60 - \leq 70$  anos,  $> 70$  anos;
- \* Celularidade da medula óssea: Hipocelular + Normocelular e Hiper celular;
- \* Porcentagens de Blastos (IPSS-R):  $\leq 2\%$ ,  $> 2\% - < 5\%$ ,  $5\% - 10\%$  e  $> 10\%$ ;
- \* Cariótipo: normal e alterado;
- \* Classificação dos valores de hemoglobina (Hb) (IPSS-R):  $\geq 10\text{g/dL}$ ,  $8 - < 10\text{g/dL}$  e  $< 8\text{g/dL}$ ;
- \* Classificação da contagem absoluta de neutrófilos (ANC) (IPSS-R):  $\geq 800/\text{mm}^3$  e  $< 800/\text{mm}^3$ ;
- \* Classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R):  $\geq 100.000/\text{mm}^3$ ,  $50.000 - < 100.000/\text{mm}^3$  e  $\leq 50.000/\text{mm}^3$ ;
- \* Classificação do grupo de risco (IPSS-R): muito baixo + baixo, intermediário e alto + muito alto;
- \* Dependência Transfusional: sim e não (utilizando-se o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (MALCOVATI et al., 2005).

A figura 9 apresenta o fluxograma representativo do delineamento experimental do estudo.

**Figura 9:** Fluxograma representativo do delineamento experimental do estudo



**Fonte:** Elaborada pela autora



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização dos pacientes

Foram incluídos nesse estudo 91 indivíduos, sendo 70 diagnosticados como SMD, 13 como LMA sec e oito indivíduos saudáveis (Tabela 3). Com relação aos pacientes portadores de SMD, foram incluídos nesse estudo apenas os classificados, de acordo com a OMS (ARBER et al., 2016b), como SMD com sideroblastos em anel (SMD-SA-DU e SMD-SA-DM) e SMD com excesso de blastos (SMD-EB-1 e SMD-EB-2), por serem os grupos de baixo e alto risco com características mais bem definidas, sendo 28 classificados como SMD-SA (8 SMD-SA-DU e 20 SMD-SA-DM) e 42 como SMD-EB (20 SMD-EB-1 e 22 SMD-EB-2) (Tabela 3).

Dos 70 pacientes diagnosticados como SMD, 39 indivíduos (55,7%) são do sexo masculino e 31 indivíduos (44,3%) do sexo feminino. Com relação a idade dos pacientes, a média foi de 70,8 anos e a mediana 72 anos (mínimo de 25 anos e máximo de 94 anos) com uma predominância de pacientes com idade superior a 60 anos em 81,4% (57/70) dos casos. Dos pacientes incluídos no estudo, 53,5% (38 pacientes) são dependentes de transporte transfusional (Tabela 3).

A citogenética por banda G foi realizada para todos os 70 pacientes com SMD, sendo que 53 (75,7%) apresentaram resultado e 17 (24,3%) apresentaram ausência de metáfases. Dos 53 pacientes com resultado citogenético, 31 (58,5%) apresentaram cariótipo normal, frente a 22 (41,5%) de pacientes com alterações, destes, quatro (18,2%) pacientes apresentaram cariótipo complexo (Tabela 3).

**Tabela 3:** Caracterização sociodemográfica e das variáveis clínicas dos pacientes com SMD

Variáveis	Descrição	Número de Pacientes	Porcentagem
<b>Grupo</b>	SMD	70	76,9
	LMA sec	13	14,3
	Controle saudável	8	8,8
<b>Classificação OMS 2016*</b>	SMD-SA-DU	8	11,3
	SMD-SA-DM	20	28,2
	SMD-EB-1	20	29,6
	SMD-EB-2	22	30,9
<b>Idade</b>	≤60	12	17,2
	>60-70	19	27,1
	>70-80	19	27,1

	>80	20	28,6
<b>Sexo</b>	Masculino	39	55,7
	Feminino	31	44,3
<b>Origem</b>	Rural	27	42,9
	Urbana	36	57,1
<b>Hemoglobina (g/dL) (IPSS-R)</b>	≥10	10	14,3
	8-<10	21	30,0
	<8	39	55,7
<b>ANC (IPSS-R)</b>	≥ 800	49	70,0
	<800	21	30,0
<b>Plaquetas (IPSS-R)</b>	≥ 100	39	55,7
	50-<100	10	14,3
	<50	21	30,0
<b>Blastos MO (IPSS-R)</b>	≤ 2	24	34,3
	>2% - <5%	8	11,4
	5%-10%	19	27,1
	>10%	19	27,1
<b>Sideroblastos em anel</b>	0	34	48,6
	>1-<15%	3	4,3
	≥ 15%	33	47,1
<b>Celularidade MO</b>	Hipocelular	3	7,3
	Normocelular	6	14,6
	Hipercelular	32	78,0
<b>Cariótipo (Normal/Alterado)</b>	Normal	31	58,5%
	Alterado	22	41,5%
<b>Cariótipo (Alterações)</b>	Normal	31	58,5%
	1 alteração	10	18,9%
	2 alterações	8	15,1%
	3 ou mais alterações (Complexo)	4	7,5%
<b>Grupo de risco (IPSS-R)</b>	Muito Baixo	4	7,5
	Baixo	16	30,2
	Intermediário	10	18,9
	Alto	11	20,8
	Muito Alto	12	22,6

**Legenda:** OMS – Organização Mundial de Saúde; ANC – Contagem Absoluta de Neutrófilos; MO – Medula óssea; IPSS-R – Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado; SMD-SA-DU – SMD com sideroblastos em anel e displasia em única linhagem; SMD-SA-DM – SMD com sideroblastos em anel e displasia em múltiplas linhagem; SMD-EB-1 - SMD com excesso de blastos 1; SMD-EB-1 - SMD com excesso de blastos 2; LMA sec – LMA secundária a SMD.

No grupo de pacientes diagnosticados como LMA sec, a média de idade foi de 73,8 com mediana 76 (mínimo 44 e máximo 91 anos), com predomínio do sexo feminino em 63,6% dos casos (7 pacientes). Obtivemos informações sobre tratamento de nove dos 11 pacientes com LMA sec. Destes, seis pacientes fizeram uso de agentes hipometilantes, não obtivendo resposta, o que levou a evolução para LMA sec. A descrição clínica dos pacientes com SMD e LMA sec estão apresentadas no Anexo I.

#### 4.2. Análise do sequenciamento pós modificação do DNA com bissulfito de sódio (*Bis-seq*)

A metilação da H19DMR foi avaliada através da técnica de sequenciamento de DNA após modificação com bissulfito de sódio em 44 dos 81 pacientes incluídos nesse estudo, sendo 37 portadores de SMD (16 SMD-SA e 21 SMD-EB) e nove de LMA sec. Após o alinhamento das sequencias, foi possível avaliar a quantidade de pares de bases que foram sequenciados (chamados de *reads*) e separados entre os que se apresentaram metilados, não metilados e parcialmente metilados. Os dados de metilação foram apresentados como porcentagem, para melhor visualização e realização de análises comparativas. A tabela 6 e a figura 10 apresentam os dados referentes ao padrão de metilação e quantidade de *reads* avaliadas nos grupos estudados (SMD-SA, SMD-EB e LMA sec). A região H19DMR avaliada por sequenciamento possui dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP – do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*), rs2107425 e rs2071094, os genótipos encontrados estão apresentados na figura 10.

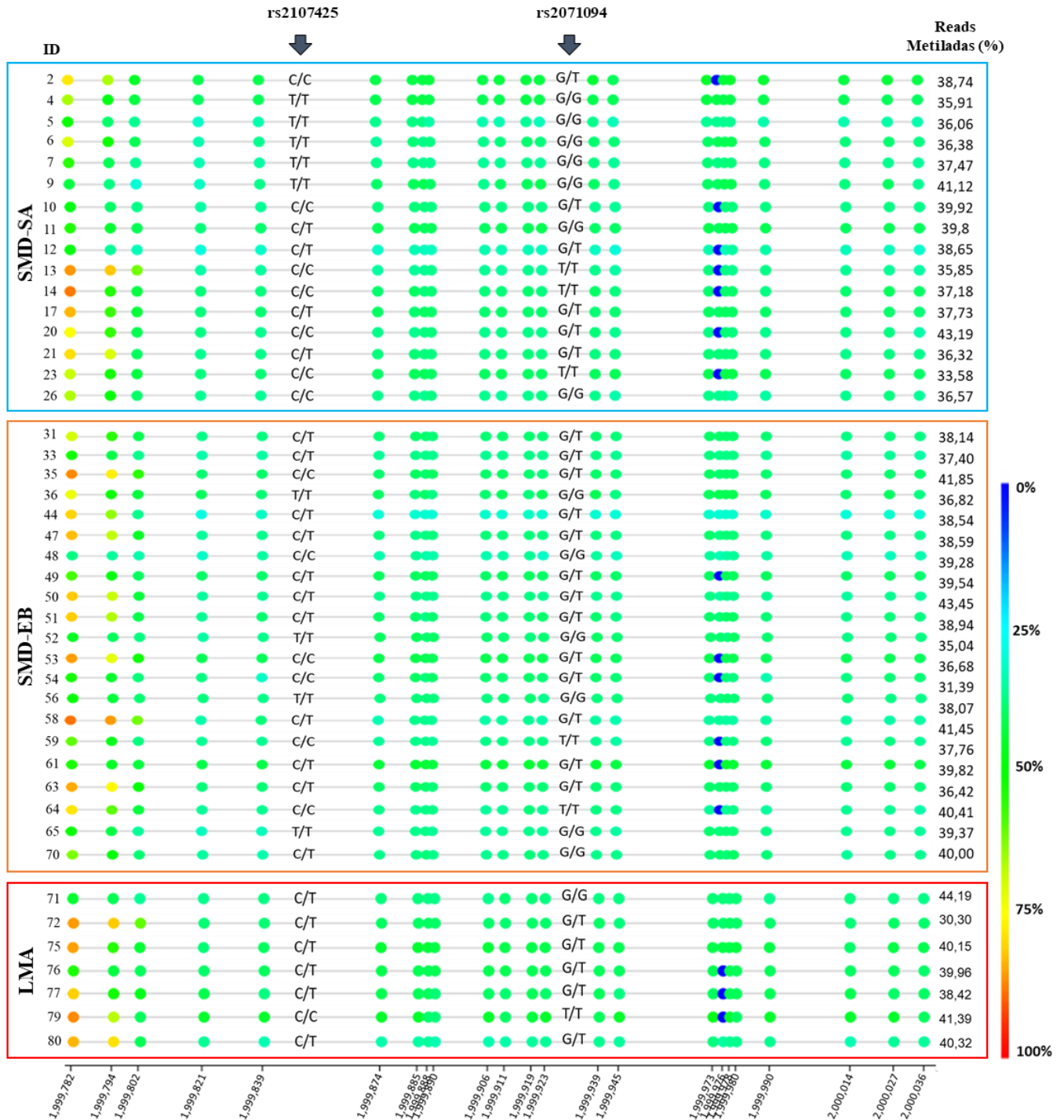
**Tabela 4:** Metilação da H19DMR nos pacientes com SMD e LMA

Grupo	ID	Total de reads	Reads metiladas	Reads não metiladas	Reads parcialmente metiladas
SMD-SA	2	90977	36131 (38,74%)	53920 (57,81%)	3207 (3,45%)
	4	104899	26069 (35,91%)	44189 (60,87%)	2329 (3,22%)
	5	66307	26556 (36,06%)	46036 (62,52%)	1036 (1,42%)
	6	93258	25709 (36,38%)	43572 (61,67%)	1372 (1,95%)
	7	68866	26913 (37,47%)	43899 (61,12%)	1002 (1,41%)
	9	75978	31330 (41,12%)	44085 (57,87%)	764 (1,01%)
	10	74486	31430 (39,92%)	46426 (58,97%)	870 (1,11%)
	11	77444	30240 (39,80%)	43776 (57,61%)	1962 (2,59%)
	12	79080	32697 (38,65%)	51271 (60,61%)	611 (0,74%)
	13	87921	24453 (35,85%)	43304 (63,5%)	437 (0,65%)
	14	85185	25609 (37,18%)	41682 (60,52%)	1575 (2,30%)
	17	104819	33933 (37,73%)	54014 (60,06%)	1978 (2,21%)
	20	90344	33022 (43,19%)	42755 (55,92%)	673 (0,89%)
	21	89925	28587 (36,32%)	47425 (60,25%)	2694 (3,43%)
23	88717	26561 (33,58%)	50677 (64,08%)	1842 (2,34%)	
26	77397	30949 (36,57%)	51816 (61,22%)	1864 (2,21%)	
SMD-EB	31	92346	26116 (38,14%)	39981 (58,39%)	2370 (3,47%)
	33	72587	27469 (37,4%)	44147 (60,11%)	1817 (2,49%)
	35	85800	43907 (41,85%)	58881 (56,13%)	2111 (2,02%)
	36	94894	28500 (36,82%)	48468 (62,62%)	429 (0,56%)
	44	70157	35599 (38,54%)	54194 (58,68%)	2553 (2,78%)
	47	73230	41964 (38,59%)	66029 (60,73%)	731 (0,68%)

	48	68194	34321 (39,28%)	51920 (59,42%)	1130 (1,30%)
	49	98292	30054 (39,54%)	45766 (60,21%)	188 (0,25%)
	50	84629	37942 (43,45%)	48055 (55,03%)	1319 (1,52%)
	51	111554	43442 (38,94%)	66009 (59,17%)	2103 (1,89%)
	52	68467	23240 (35,04%)	40421 (60,96%)	2646 (4,00%)
	53	91923	32010 (36,68%)	53618 (61,44%)	1627 (1,88%)
	54	76008	22023 (31,39%)	47474 (67,66%)	660 (0,95%)
	56	84579	31148 (38,07%)	49496 (60,5%)	1162 (1,43%)
	58	73628	32104 (41,45%)	44218 (57,09%)	1122 (1,46%)
	59	81806	28126 (37,76%)	45373 (60,91%)	987 (1,33%)
	61	87316	41749 (39,82%)	61957 (59,1%)	1113 (1,08%)
	63	87371	32026 (36,42%)	53651 (61,02%)	2244 (2,56%)
	64	87255	35853 (40,41%)	50556 (56,98%)	2308 (2,61%)
	65	78706	33545 (39,37%)	50388 (59,15%)	1252 (1,48%)
	70	71814	34324 (40,0%)	50677 (59,06%)	799 (0,94%)
	71	108724	24714 (44,19%)	31180 (55,76%)	24 (0,05%)
	72	78726	22804 (30,3%)	48417 (64,34%)	4024 (5,36%)
	75	76450	39468 (40,15%)	57641 (58,64%)	1183 (1,21%)
LMA sec	76	76179	38744 (39,96%)	56141 (57,91%)	2058 (2,13%)
	77	96943	28140 (38,42%)	44368 (60,58%)	722 (1,00%)
	79	55918	38054 (41,39%)	52744 (57,37%)	1125 (1,24%)
	80	70653	38265 (40,32%)	55498 (58,48%)	1131 (1,20%)

**Legenda:** SMD-SA - SMD com Sideroblastos em Anel, SMD-EB - SMD com Excesso de Blastos, LMA sec - Leucemia Mielóide Aguda secundária a SMD.

**Figura 10:** Padrão de metilação da H19DMR entre os grupos



**Legenda:** SMD-SA - SMD com Sideroblastos em Anel, SMD-EB - SMD com Excesso de Blastos, LMA - Leucemia Mielóide Aguda.

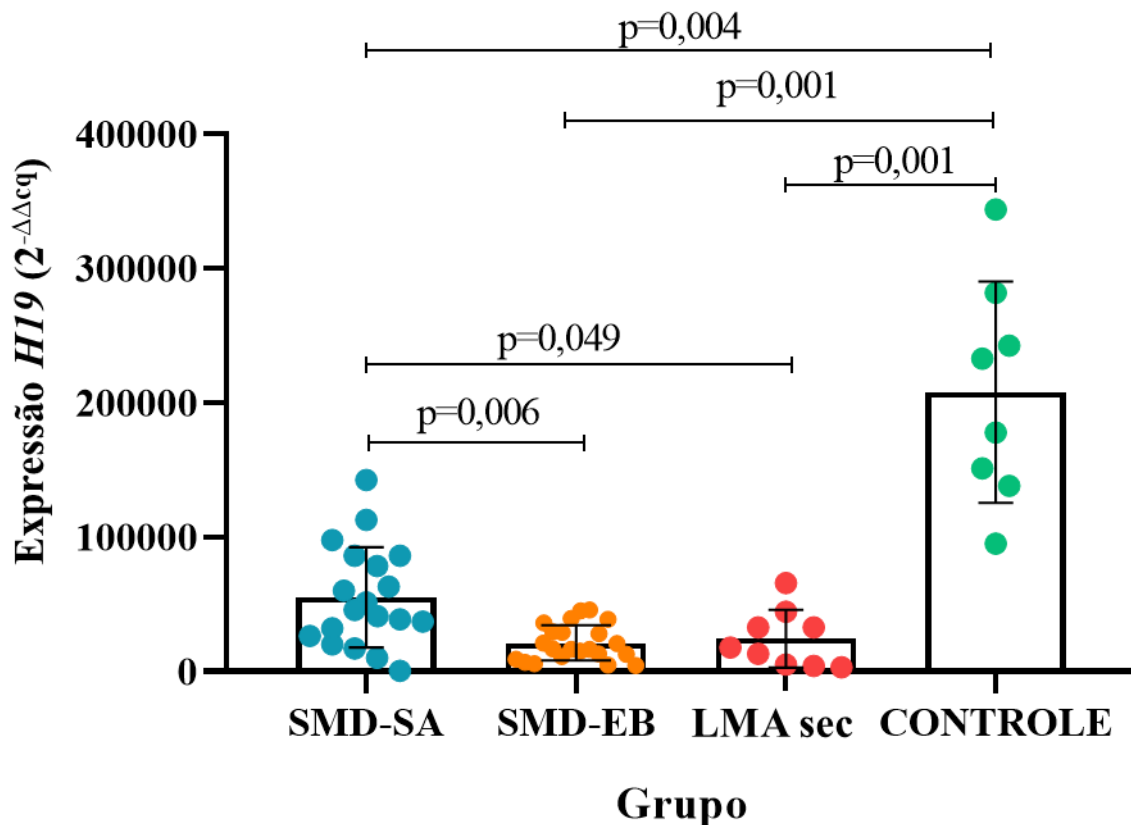
### 4.3. Análise da expressão gênica e metilação do DNA

As associações entre os níveis de expressão do gene *H19* e a metilação da região H19DMR com as variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD e sua comparação com portadores de LMA sec e grupo controle saudável serão apresentadas a seguir. As análises serão divididas por variável, para melhor compreensão.

#### 4.3.1. Análise da comparação entre os grupos

Ao compararmos o nível de expressão gênica de pacientes com SMD-SA, SMD-EB, LMA sec e controles saudáveis, verificamos um aumento na expressão do *H19* nos indivíduos saudáveis em relação aos pacientes com SMD-SA ( $p=0,004$ ), SMD-EB ( $p=0,001$ ) e LMA sec ( $p=0,001$ ) (Figura 10). Pacientes classificados como SMD-SA também apresentaram maiores níveis de expressão do *H19* comparado com SMD-EB ( $p=0,006$ ) e com LMA sec ( $p=0,049$ ) (Figura 11).

**Figura 11:** Níveis de expressão do gene *H19* em relação aos grupos estudados

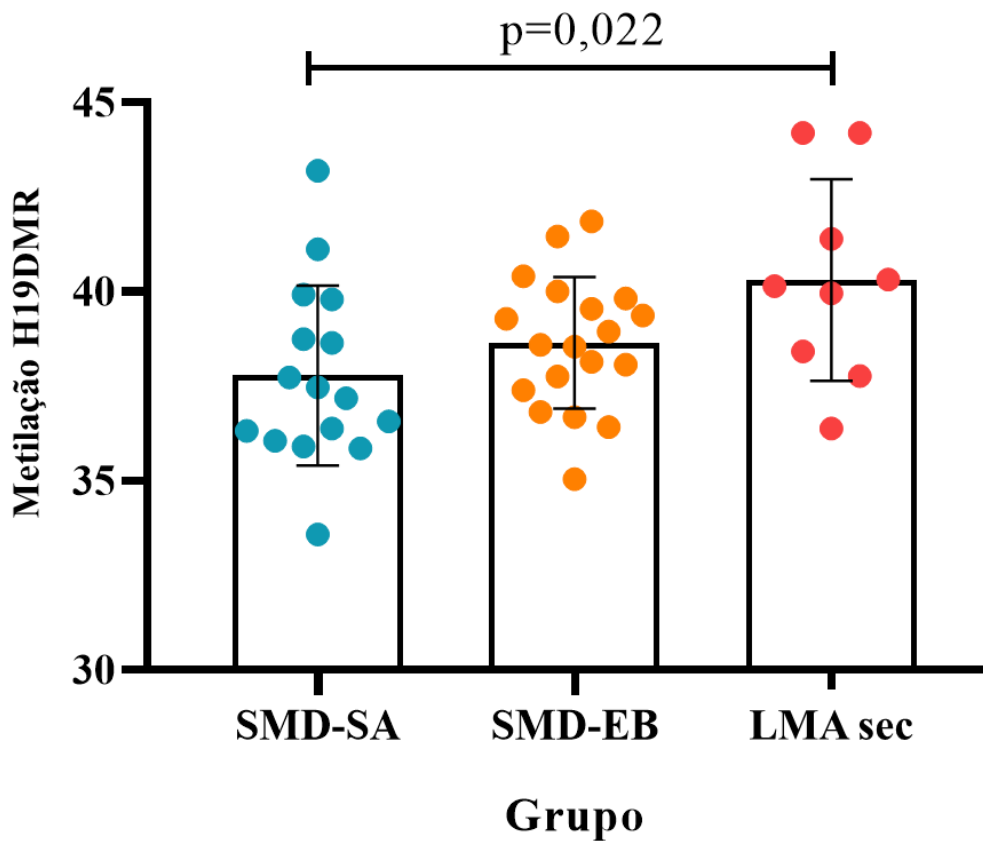


Variável	Expressão <i>H19</i> ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ )							
	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	ANOVA	Teste de Levene
SMD-SA	19	55177,9809	37451,0732	37127,1415	73228,8204	<0,001	<0,001	0,006 / 0,049 / 0,004
SMD-EB	22	21235,0700	13233,1183	15367,8340	27102,3060			0,006 / 0,001
LMA sec	9	24354,7615	21376,3258	7923,4628	40786,0601			0,049 / 0,001
Controle saudável	8	207943,0678	82282,7888	139152,9347	276733,2008			0,004 / 0,001 / 0,001

**Legenda:** SMD-SA – SMD com sideroblastos em anel; SMD-EB – SMD com excesso de blastos; LMA sec – Leucemia Mielóide Aguda secundária a SMD; N – número de casos; IC – Intervalo de confiança.

Com relação ao perfil de metilação da região H19DMR, foi observado um aumento nos níveis de metilação da H19DMR em pacientes com LMA, quando comparados com os pacientes com SMD-SA ( $p=0,029$ ) (Figura 12).

**Figura 12:** Níveis de metilação da H19DMR em relação aos grupos estudados





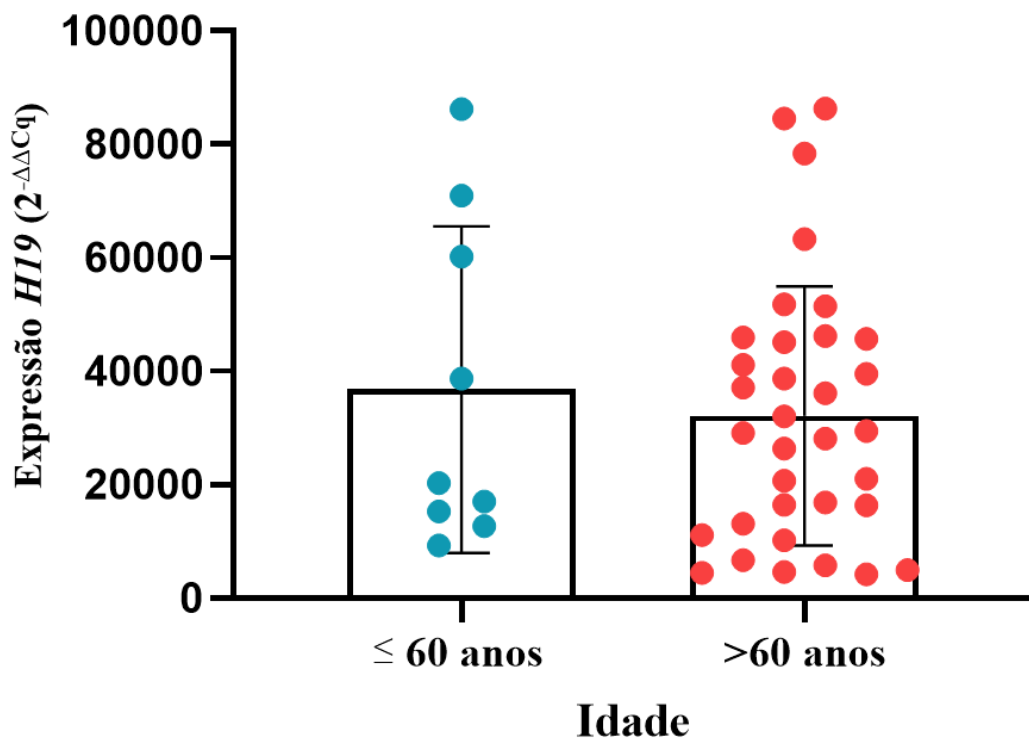
Variável	Expressão <i>H19</i> ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ )							
	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	ANOVA	Teste de Levene
SMD-SA	16	37,77	2,37	36,51	39,04	0,029	0,418	0,022
SMD-EB	19	38,63	1,73	37,80	39,47			-
LMA sec	9	40,30	2,66	38,25	42,35			0,022

**Legenda:** SMD-SA – SMD com sideroblastos em anel; SMD-EB – SMD com excesso de blastos; LMA sec – Leucemia Mielóide Aguda secundária a SMD; N – número de casos; IC – Intervalo de confiança.

#### 4.3.2. Análise em relação à idade dos pacientes com SMD

Com relação a idade, os pacientes foram divididos em dois grupos com idade acima e abaixo de 60 anos. Os pacientes com idade inferior a 60 anos (média  $2^{-\Delta\Delta Cq} = 36756,78$ ) apresentaram um aumento da expressão do *H19* quando comparados aos pacientes com idade superior a 60 anos (média  $2^{-\Delta\Delta Cq} = 32156,78$ ) ( $p=0,614$ ) (Figura 13).

**Figura 13:** Níveis de expressão do gene *H19* em relação a idade dos pacientes com SMD

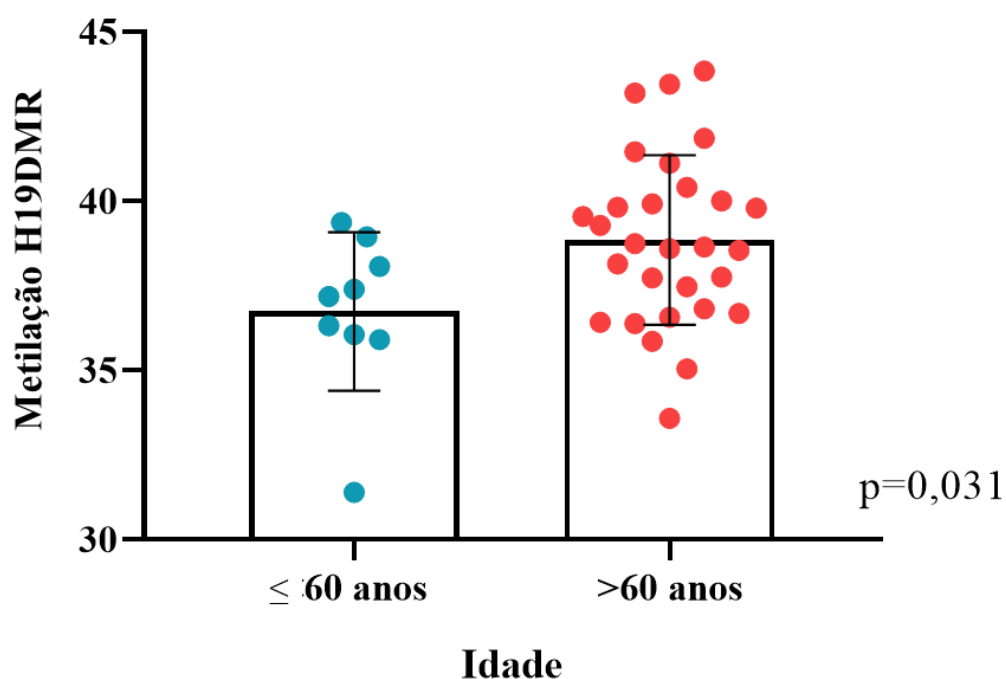


Variável	Expressão <i>H19</i> ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ )						
Idade	N	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	Teste de Levene	p-valor
≤60	9	36756,78185	28774,62	14638,6447	58874,9189	0,232	0,614
>60	34	32156,78493	22841,36	24187,0567	40126,5130		

**Legenda:** N – número de casos; IC – Intervalo de confiança.

Para associação entre os níveis de metilação da H19DMR e a idade dos pacientes com SMD, foi observado um aumento na metilação da região H19DMR nos pacientes com idade superior a 60 anos, comparados com os com idade inferior a 60 anos ( $p=0,031$ ) (Figura 14).

**Figura 14:** Níveis de metilação da H19DMR em relação a idade dos pacientes com SMD



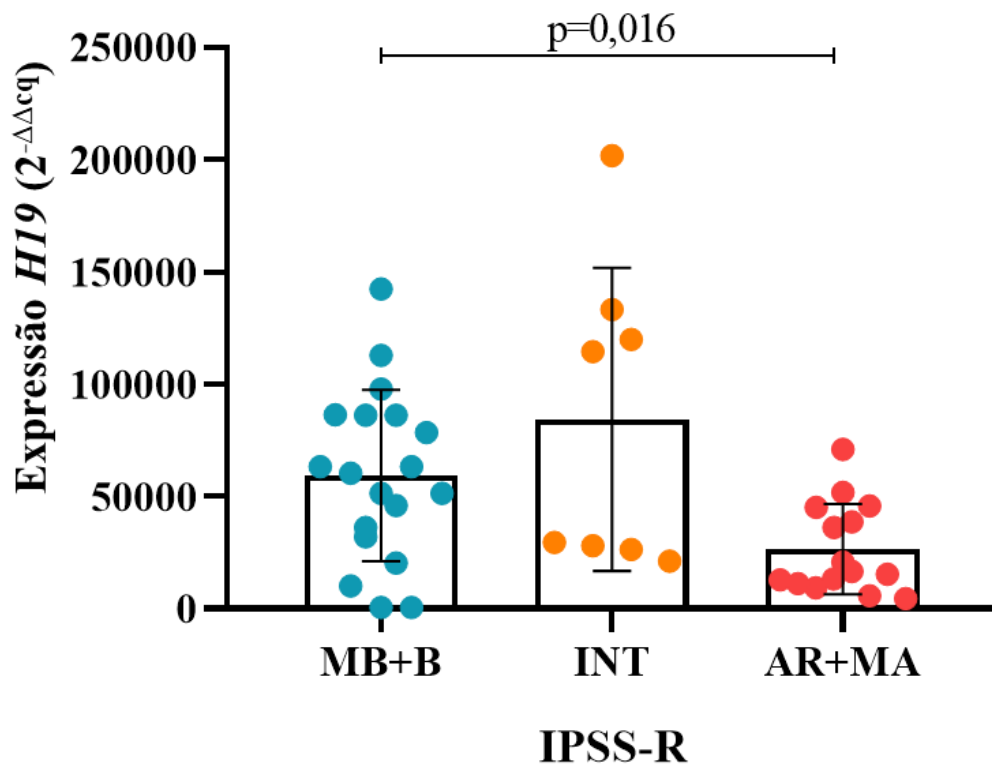
Variável	Metilação H19DMR						
Idade	N	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	Teste de Levene	p-valor
≤60	9	36,73	2,34	34,93	38,54	0,540	0,031
>60	29	38,84	2,50	37,89	39,80		

**Legenda:** N – número de casos; IC – Intervalo de confiança.

#### 4.3.3. Análise em relação ao grupo de risco de acordo com o IPSS-R

Com relação ao grupo de risco, de acordo com a classificação do IPSS-R (GREENBERG et al., 2012), foi identificado um aumento na expressão do *H19* em pacientes classificados como risco muito baixo ou baixo risco, quando comparados com pacientes de alto risco ou risco muito alto ( $p=0,016$ ) (Figura 15).

**Figura 15:** Níveis de expressão do gene *H19* em relação ao grupo de risco pelo IPSS-R nos pacientes com SMD

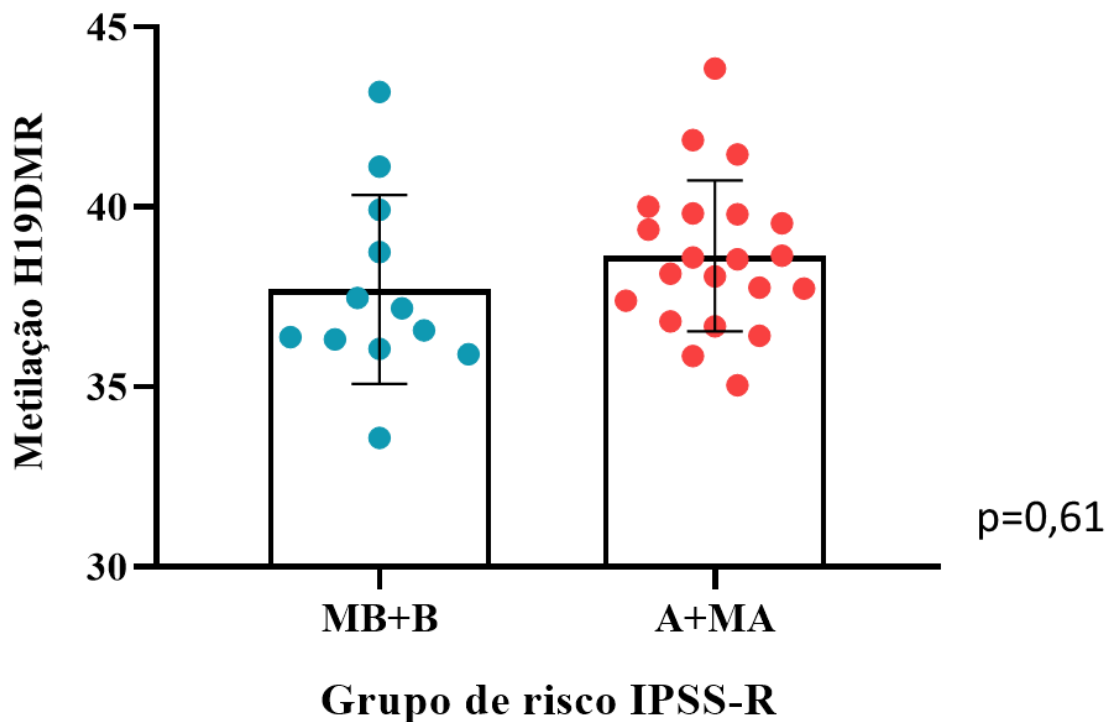


Variável	Expressão <i>H19</i> ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ )							
IPSS-R	N	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	ANOVA	Teste de Levene	Games-Howell
MB+BR	14	63425,155	40399,365	40099,256	86751,055	0,007	<0,001	0,016
Intermediário	8	84298,503	67502,985	27864,595	140732,412			-
AR+MA	15	26493,958	20086,301	15370,535	37617,381			0,016

**Legenda:** N – número de casos; IC – Intervalo de confiança; IPSS-R – Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado; BR+MB – Baixo risco + risco muito baixo; INT – Risco intermediário; AR+MA – Alto risco + risco muito alto.

Ao avaliarmos os níveis de metilação da região H19DMR em relação ao grupo de risco de acordo com o IPSS-R, foi identificado um aumento dos níveis de metilação em pacientes com SMD classificados como alto risco ou risco muito alto (média de 37,7% de *reads* metiladas), quando comparados ao grupo de pacientes de baixo ou muito baixo risco (média de 38,19% de *reads* metiladas) ( $p=0,611$ ) (Figura 16).

**Figura 16:** Níveis de metilação da H19DMR em relação ao prognóstico dos pacientes com SMD



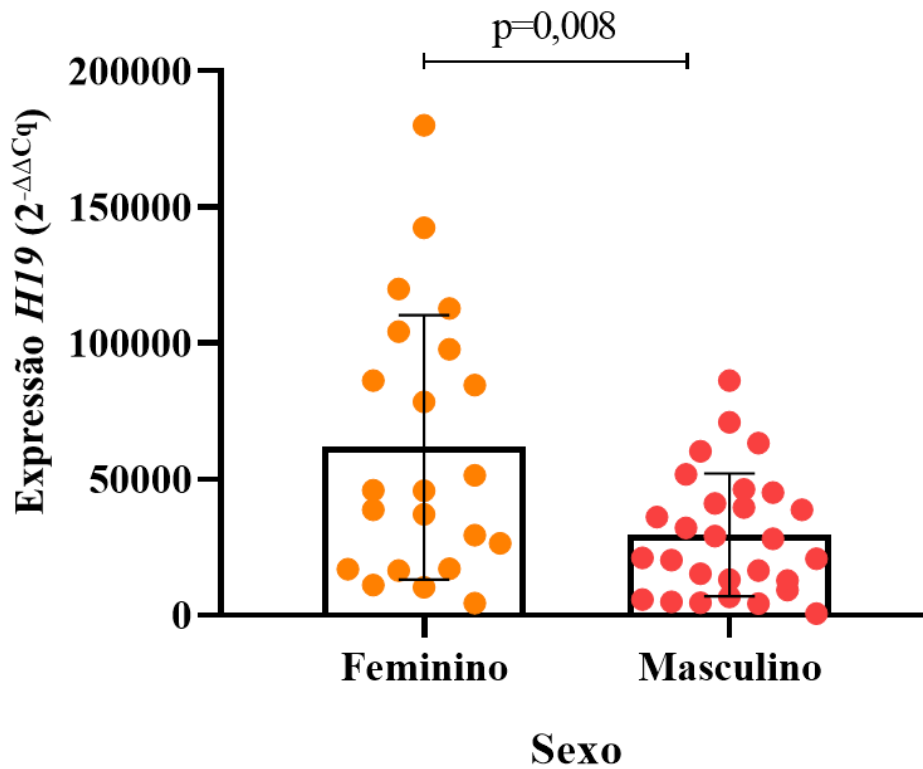
Variável	Metilação H19DMR						Teste de Levene	p-valor
	N	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior			
MB+BR	12	37,70	2,62	36,03	39,37	0,287	0,611	
AR+MA	11	38,19	1,81	36,97	39,41			

**Legenda:** N – número de casos; IC – Intervalo de confiança; IPSS-R – Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado; BR+MB – Baixo risco + risco muito baixo; AR+MA – Alto risco + risco muito alto.

#### 4.3.4. Análise em relação ao sexo dos pacientes com SMD

Ao compararmos o perfil de expressão do *H19* entre os pacientes com SMD do sexo feminino e masculino, foi observado um aumento dos níveis de expressão nos pacientes do sexo feminino, comparado com pacientes do sexo masculino ( $p=0,008$ ) (Figura 17).

**Figura 17:** Níveis de expressão do gene *H19* em relação ao sexo dos pacientes com SMD

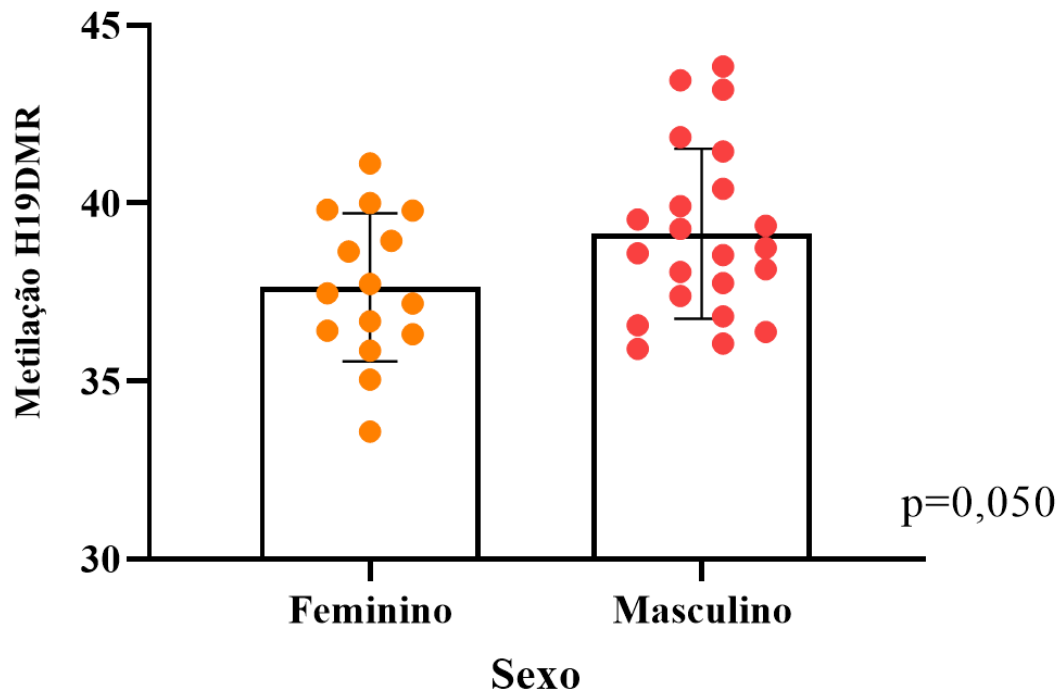


Variável	Expressão <i>H19</i> ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ )						Teste de Levene	p-valor
	Sexo	N	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior		
Feminino	22	61695,8917	48616,8101	40140,4056	83251,3777	<0,001	0,008	
Masculino	28	29451,5008	22574,2750	20698,1108	38204,8909			

**Legenda:** N – número de casos; IC – Intervalo de confiança.

Com relação ao padrão de metilação da região H19DMR entre os pacientes do sexo feminino e masculino, foi identificado um aumento nos níveis de metilação da H19DMR nos pacientes do sexo masculino ( $p=0,050$ ) (Figura 18).

**Figura 18:** Níveis de metilação da H19DMR em relação ao sexo dos pacientes com SMD



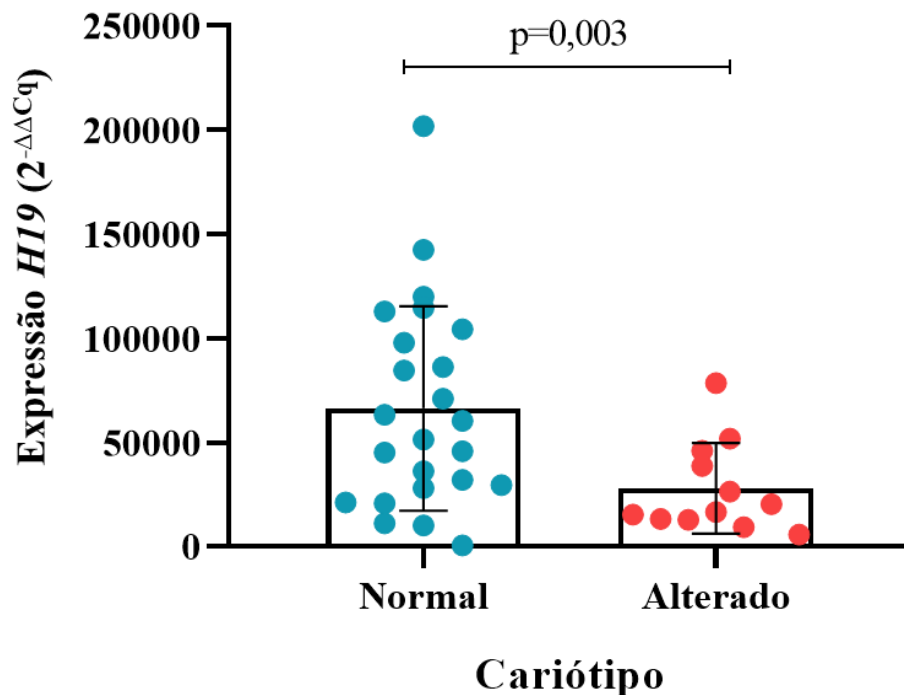
Variável	Metilação H19DMR						Teste de Levene	p-valor
	N	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior			
Feminino	15	39,14	2,08	36,48	38,79	0,626	0,050	
Masculino	22	37,64	2,38	38,09	40,20			

**Legenda:** N – número de casos; IC – Intervalo de confiança.

#### 4.3.5. Análise em relação à citogenética

Quanto ao cariótipo, os pacientes que apresentaram resultado na análise citogenética foram divididos em dois grupos, os que apresentaram cariótipo normal e os que apresentaram cariótipo com alterações cromossômicas. Foi observado um maior nível de expressão do *H19* em pacientes que apresentaram cariótipo normal, quando comparados com pacientes com cariótipo alterado ( $p=0,003$ ) (Figura 19). Não foram observadas diferenças nas médias de metilação da região da H19DMR com relação à citogenética (cariótipo normal média de 38,29% de *reads* metiladas e cariótipo alterado média de 38,47% de *reads* metiladas).

**Figura 19:** Níveis de expressão do gene *H19* em relação ao cariótipo dos pacientes com SMD



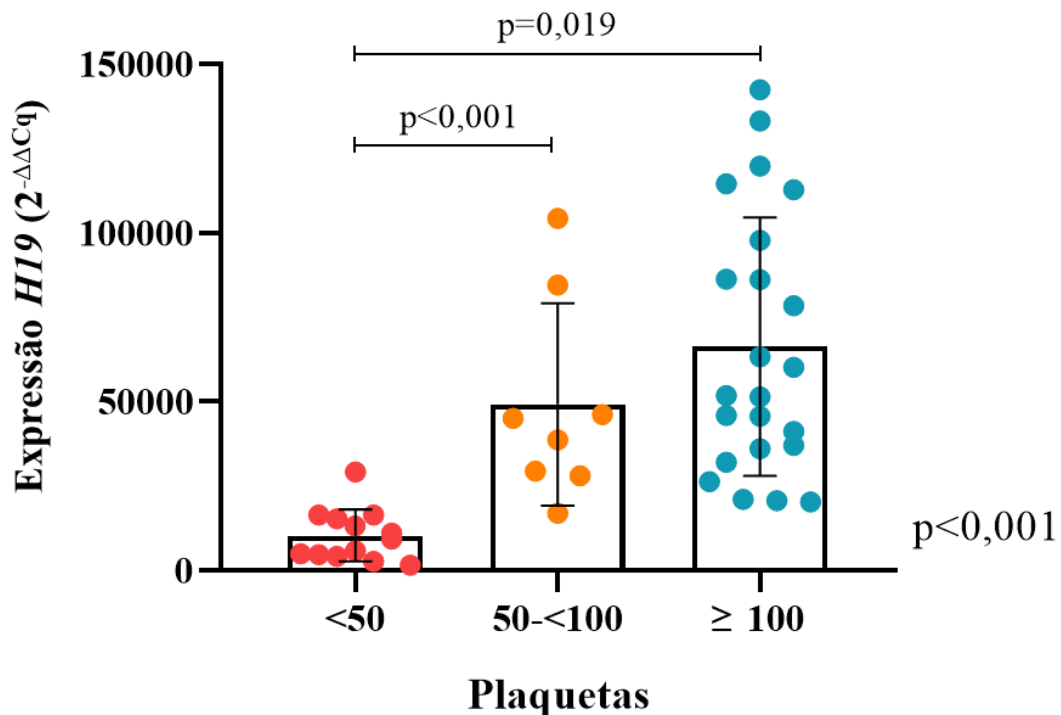
Variável	Expressão <i>H19</i> ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ )						
Cariótipo	N	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	Teste de Levene	p-valor
Normal	24	66265,4680	49075,0618	45542,8868	86988,0492	0,014	0,003
Alterado	12	27862,1908	21738,3517	14050,3011	41674,0806		

**Legenda:** N – número de casos; IC – Intervalo de confiança.

#### 4.3.6. Análise em relação à contagem de plaquetas (IPSS-R)

Para a variável contagem de plaquetas, estratificada de acordo com o IPSS-R (GREENBERG et al., 2012), foi observado um maior nível de expressão do gene *H19* em pacientes com contagem superior a 100.000/mm<sup>3</sup> e entre 50 e 100.000/mm<sup>3</sup>, quando comparados com pacientes com contagem inferior a 50.000/mm<sup>3</sup> (p=0,019 e p=0,001, respectivamente) (Figura 20). Não foram observadas diferenças nas médias de metilação da região da H19DMR com relação à contagem de plaquetas (contagem superior a 100.000/mm<sup>3</sup> média de 38,52% de *reads* metiladas, entre 50 e 100.000/mm<sup>3</sup> média de 37,72% de *reads* metiladas e inferior a 50.000/mm<sup>3</sup> com média de 38,33% de *reads* metiladas).

**Figura 20:** Níveis de expressão do gene *H19* em relação a contagem de plaquetas dos pacientes com SMD



Variável	Expressão <i>H19</i> ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ )							
Plaquetas	N	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	ANOVA	Teste de Levene	Games-Howell
<50	23	10368,0479	7726,5541	5698,9379	15037,1578	<0,001	<0,001	<0,001 / 0,019
50-<100	8	49160,6042	29990,1059	24088,2482	74232,9602			<0,001
≥100	13	66297,9707	38297,6292	49736,8339	82859,1076			0,019

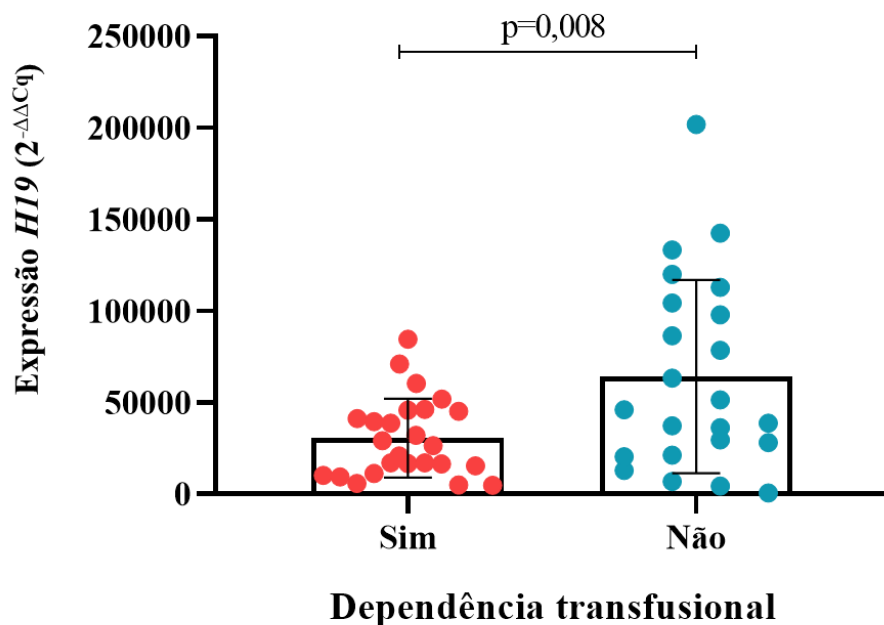
**Legenda:** N – número de casos; IC – Intervalo de confiança; <50 – contagem de plaquetas inferior a 50.000/mm<sup>3</sup>; 50-<100 – contagem de plaquetas entre 50 e 100.000/mm<sup>3</sup>; ≥100 – contagem de plaquetas igual ou superior a 100.000/mm<sup>3</sup>.



#### 4.3.7. Análise em relação à dependência transfusional

Quanto a variável dependência transfusional, identificamos que indivíduos dependentes de transfusão (MALCOVATI et al., 2005) apresentaram um menor nível de expressão do gene *H19*, comparando com pacientes com SMD que não são dependentes de transfusão ( $p=0,008$ ) (Figura 21). Não foram observadas diferenças nas médias de metilação da região da H19DMR com relação à dependência transfusional (pacientes dependentes de transfusão com média de 38,17% de *reads* metiladas e pacientes dependentes de transfusão com média de 38,56% de *reads* metiladas).

**Figura 21:** Níveis de expressão do gene *H19* em relação a dependência transfusional em pacientes com SMD

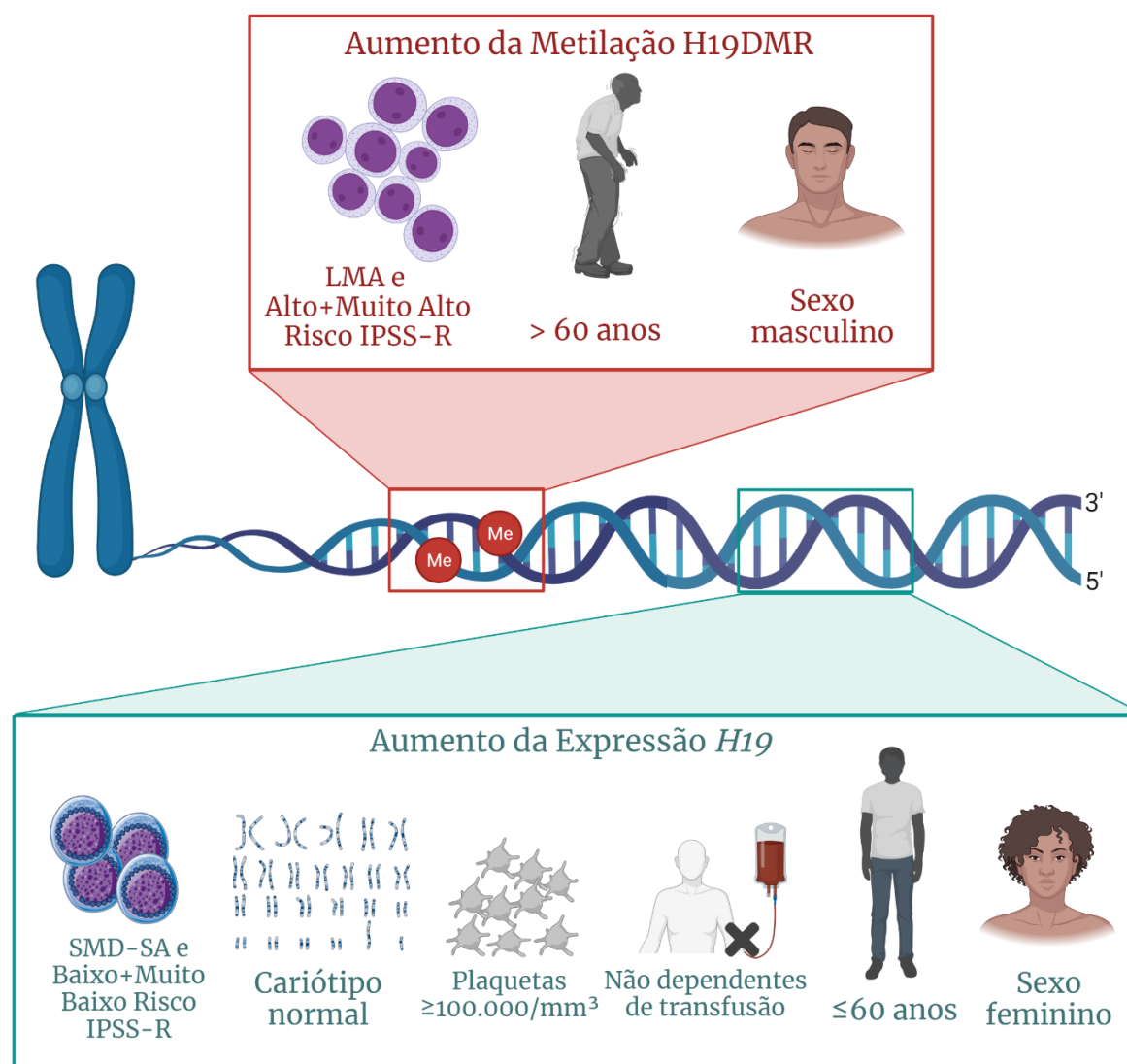


Variável	Expressão <i>H19</i> ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ )						Teste de Levene	p-valor
	N	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior			
Sim	25	30414,6112	21533,1885	21526,1478	39303,0746	<0,001	0,008	
Não	23	52774,1409	41207,1969	41207,1969	86849,6966			

**Legenda:** N – número de casos; IC – Intervalo de confiança.

A figura 22 apresenta o resumo dos principais resultados encontrados.

**Figura 22:** Representação esquemática dos resultados encontrados



#### 4.4. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP)

A região H19DMR avaliada por sequenciamento possui dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP – do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*), rs2107425 e rs2071094. A descrição dos genótipos observados está apresentada na figura 10 e as frequências alélica e genotípica estão apresentadas na tabela 5.

Na análise das frequências genotípicas do polimorfismo rs2107425 foi observado predomínio do genótipo heterozigoto (C/T) em 39,5% dos pacientes com SMD avaliados (15/38), seguido do genótipo homozigoto selvagem (C/C) com 36,8% (14/38) e homozigoto mutante (T/T) com 23,7% (9/38). Ao analisar a frequência genotípica entre os grupos estudados, foi identificado um predomínio de homozigoto selvagem (C/C) nos pacientes com SMD-SA com 43,8% (7/16), já nos pacientes com SMD-EB o predomínio foi do genótipo heterozigoto (C/T) em 50% dos casos (11/22). Nos pacientes com LMA, o predomínio foi do genótipo heterozigoto (C/T) com 77,8% dos casos (7/9), seguido do genótipo homozigoto selvagem (C/C) com 22,3% (2/9) (Tabela 5).

Com relação ao polimorfismo rs2071094, houve um predomínio do genótipo heterozigoto (G/T) em 50% dos pacientes com SMD (19/38), seguido do genótipo homozigoto selvagem (G/G) com 36,8% (14/38) e homozigoto mutante (T/T) com 13,2% (5/38). Ao analisar a frequência genotípica entre os grupos estudados, foi identificado um predomínio de homozigoto selvagem (G/G) nos pacientes com SMD-SA com 43,8% (7/16), já nos pacientes com SMD-EB o predomínio foi do genótipo heterozigoto (G/T) em 59,1% dos casos (13/22). Nos pacientes com LMA sec, o predomínio foi do genótipo heterozigoto (C/T) com 66,7% dos casos (6/9), seguido do genótipo homozigoto mutante (T/T) com 22,2% (2/9) e homozigoto selvagem (G/G) com 11,1% (1/9) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Distribuição genotípica dos SNPs rs2107425 e rs2071094

Grupo	Frequência genotípica rs2107425			Frequência genotípica rs2071094		
	C/C	C/T	T/T	G/G	G/T	T/T
SMD-SA	7 (43,8%)	4 (25%)	5 (31,2%)	7 (43,8%)	6 (37,5%)	3 (18,7%)
SMD-EB	7 (31,8%)	11 (50%)	4 (18,2%)	7 (31,8%)	13 (59,1%)	2 (9,1%)
LMA sec	-	7 (77,8%)	2 (22,3%)	1 (11,1%)	6 (66,7%)	2 (22,2%)

**Legenda:** SMD-SA – SMD com sideroblastos em anel; SMD-EB – SMD com excesso de blastos; LMA sec – Leucemia Mielóide Aguda secundária a SMD.

Foi realizada análise de regressão logística multinomial para avaliar as associações entre os polimorfismos e as variáveis clínicas e laboratoriais dos pacientes com SMD, todas as análises foram realizadas utilizando o genótipo homocigoto selvagem como referência de normalidade.

Para o polimorfismo rs2107425, foi identificada uma associação significativa entre os genótipos do SNP e o cariótipo. O genótipo heterocigoto C/T está associado a 88% de probabilidade de o paciente ter cariótipo normal ( $p=0,038$ ;  $OR=8,000$ ). Com relação ao polimorfismo rs2071094, o genótipo homocigoto mutado (T/T) está associado a 99% de chance de o paciente ser classificado como prognóstico favorável ou muito favorável ( $p<0,001$ ;  $OR=575394546,3$ ) e a uma probabilidade de 94% de ocorrer em pacientes com idade igual ou inferior a 60 anos ( $p=0,037$ ;  $OR=18,000$ ) (Tabela 6). Não foram observadas associações significativas entre a distribuição genotípica e os valores de expressão gênica e metilação da H19DMR.

**Tabela 6:** Associação dos SNPs com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD

Variável	Genótipo	Exp(B) - OR	Probabilidade	p-valor	IC Exp(B) inferior	IC Exp(B) superior	
<b>rs2107425</b>							
Cariótipo	Normal	C/T	8,000	88%	0,038	1,127	56,793
		T/T	6,000	-	0,079	0,812	44,351
	Alterado	C/T	-	-	-	-	-
		T/T	-	-	-	-	-
Grupo	SMD-SA	C/T	0,107	0,90%	0,033	0,014	0,838
		T/T	6E+07	99%	<0,001	11052880	3,23E+08
	SMD-EB	C/T	0,524	-	0,496	0,082	3,364
		T/T	6,4E+07	-	-	-	-
	LMA sec	C/T	-	-	-	-	-
		T/T	-	-	-	-	-
Prognóstico	MF+F	C/T	2,000	-	0,513	0,250	15,991
		T/T	5,8E+08	99%	<0,001	46660219,02	7095527858
	INT	C/T	-	-	-	-	-
		T/T	-	-	-	-	-
	D+MD	C/T	-	-	-	-	-
		T/T	-	-	-	-	-
	<b>rs2071094</b>						
	Idade	≤60 anos	G/T	2,250	-	0,505	0,207
T/T			18,000	94%	0,034	1,194	271,461
>60 anos		G/T	-	-	-	-	-
		T/T	-	-	-	-	-

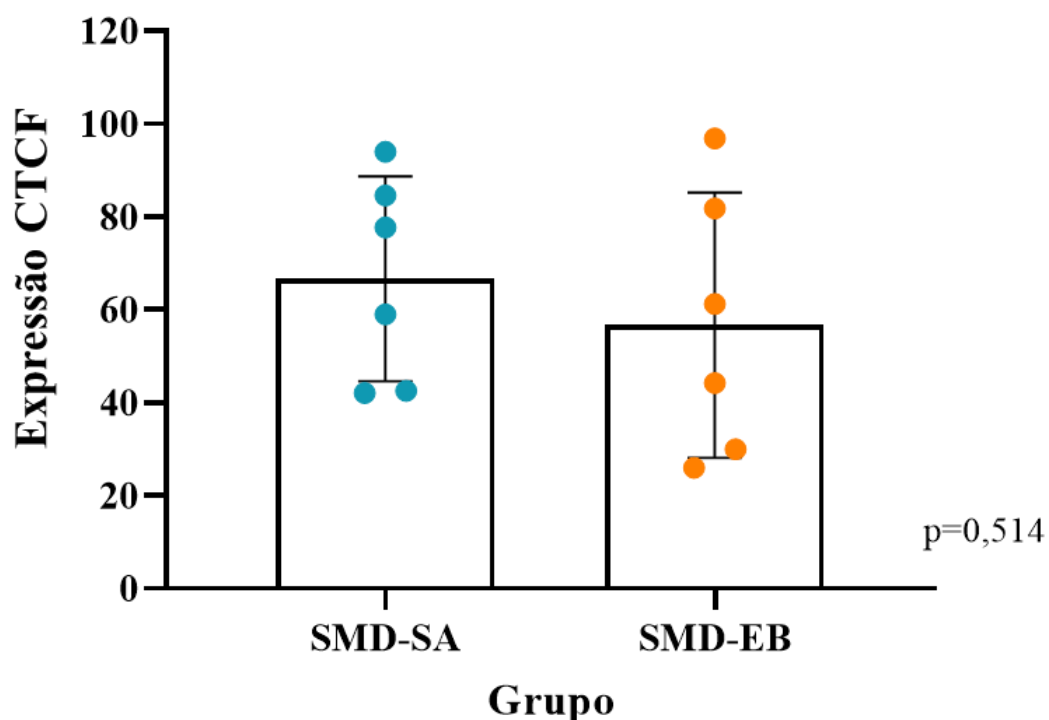
**Legenda:** SMD-SA – SMD com sideroblastos em anel; SMD-EB – SMD com excesso de blastos; LMA sec – Leucemia Mielóide Aguda secundária a SMD; OR – Razão de chance (*Odds ratio*); IC – Intervalo de confiança; MF+F – Muito favorável + Favorável; INT – Intermediário; D+MD – Desfavorável + Muito desfavorável.

#### 4.5. Análise da expressão proteica por imunohistoquímica (IHQ)

Como o *H19* não codifica proteína, foi realizada a avaliação da expressão proteica da CTCF de 12 pacientes (seis do grupo SMD-SA e seis com SMD-EB) a fim de complementar a compreensão sobre o comportamento da *H19* na SMD. Todas as análises foram realizadas de forma semiautomatizada no *software* de diagnósticos patológicos QuPath (BANKHEAD et al., 2017), após avaliação por um patologista experiente.

Com relação a avaliação da expressão da proteína CTCF entre os dois grupos de pacientes, foi observada uma diferença entre as médias dos valores de expressão, evidenciando um aumento da sua expressão em pacientes pertencentes ao grupo SMD-SA (média de 66,66% de positividade), em relação aos pacientes classificados como SMD-EB (média de 56,70% de positividade), esses resultados podem ajudar a compreender o aumento da expressão do *H19* identificado na SMD-SA, apesar de não ter apresentado significância estatística ( $p=0,514$ ) (Figura 23).

**Figura 23:** Níveis de expressão proteica da CTCF entre os grupos de pacientes com SMD

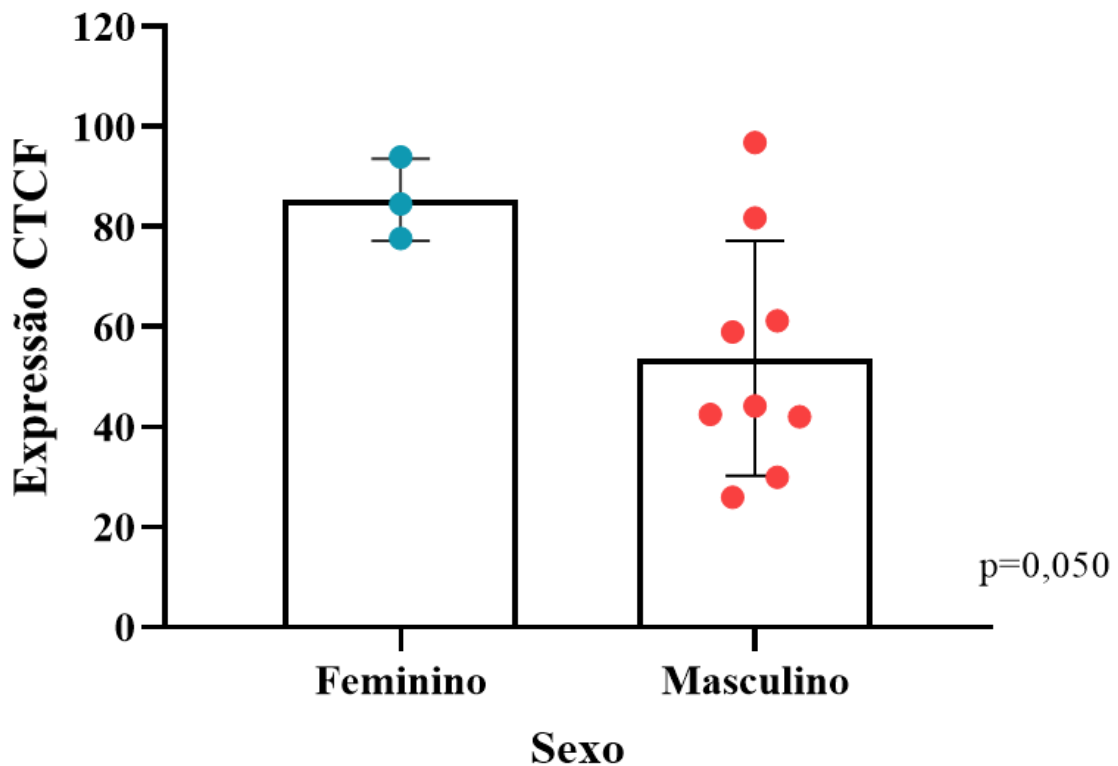


Variável	Expressão CTCF						
Grupo	N	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	Teste de Levene	p-valor
SMD-SA	6	66,66	22,05	43,52	89,81	0,479	0,514
SMD-EB	6	56,70	28,56	26,72	86,67		

**Legenda:** N – número de casos; IC – Intervalo de confiança.

Com relação ao sexo dos pacientes, foi identificado um aumento nos níveis de expressão da CTCF nos pacientes do sexo feminino, comparado aos níveis de expressão nos pacientes do sexo masculino ( $p=0,050$ ) (Figura 24).

**Figura 24:** Níveis de expressão proteica da CTCF em relação ao sexo dos pacientes com SMD



Variável	Expressão CTCF						
Sexo	N	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	Teste de Levene	p-valor
Feminino	3	85,43	8,18	65,10	105,75	0,122	0,050
Masculino	9	53,76	23,50	35,70	71,83		

**Legenda:** N – número de casos; IC – Intervalo de confiança.

Não foram observadas associações significantes com relação aos níveis de expressão da proteína *CTCF* e as variáveis, celularidade da medula óssea, porcentagens de blastos (IPSS-R), cariótipo, prognóstico (IPSS-R), classificação dos valores de hemoglobina (IPSS-R), neutrófilos (IPSS-R), plaquetas (IPSS-R), dependência transfusional e óbito ( $p>0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

O processo de patogênese das neoplasias está diretamente relacionado ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, que levam ao desenvolvimento do clone maligno, com capacidade de alterar as funções celulares. No caso das neoplasias mieloides, as células clonais possuem características semelhantes às células progenitoras hematopoiéticas (CPH) normais, como a capacidade de auto renovação e proliferação, o que favorece a resistência a terapias citotóxicas (DEXHEIMER et al., 2017; ELIAS et al., 2014; ITZYKSON E FENAUX, 2014; REILLY et al., 2019). Apesar da patogênese da SMD ainda não ser totalmente compreendida, sabe-se que desregulações nos processos epigenéticos possuem um papel fundamental no desenvolvimento e progressão da doença, sendo observado um aumento da metilação global (5mC) em pacientes com SMD, bem como a diminuição dos níveis de desmetilação global (5hmC) (CAVALCANTE et al., 2020; CHANDRA et al., 2017; MAEGAWA et al., 2014; POLONI et al., 2013).

O estudo do padrão de metilação do DNA é um mecanismo importante, pois pode indicar biomarcadores moleculares de novas terapias alvo específicas. O estudo dos ncRNAs, por participarem ativamente da regulação da expressão gênica e processos epigenéticos, podem trazer novas informações com relação ao processo de transformação leucêmica na SMD. O lncRNA *H19* tem sido estudado nas mais diversas neoplasias como possível alvo terapêutico e possui habilidade de interação com diversos mecanismos relacionados ao desenvolvimento neoplásico, como diferenciação celular e processos inflamatórios e hipotetizamos que ele possa ter relação com o processo de desenvolvimento e progressão da SMD.

No presente estudo, realizamos a avaliação dos níveis de expressão gênica do *H19* e os níveis de metilação da região H19DMR em pacientes portadores de SMD, associando a variáveis clínico-laboratoriais e à pacientes com LMA sec, a fim de avaliar seu possível papel como biomarcador de transformação leucêmica. Esse é o primeiro estudo a avaliar o padrão de metilação da região H19DMR em pacientes portadores de SMD.

Os pacientes com SMD com idade superior a 60 anos apresentaram um maior padrão de metilação da região H19DMR, bem como menor nível de expressão do *H19*, quando comparados com pacientes com idade inferior a 60 anos. A idade avançada é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da SMD, que ocorre, prioritariamente, em



indivíduos com idade superior a 60 anos e está relacionada a uma pior sobrevida, de acordo com os dados do IPSS-R (ARBER et al., 2016a; GREENBERG et al., 1997, 2012). O processo natural de envelhecimento envolve o acúmulo de mutações em diversos tipos de tecidos, incluindo o tecido hematopoiético. Genes envolvidos na regulação de processos epigenéticos estão entre os frequentemente mutados durante o envelhecimento das células hematopoiéticas, como os genes *DNMT3A* e *TET2*, atuantes na metilação e desmetilação do DNA, o que favorece o aumento da metilação global do DNA em idades mais avançadas (BUSQUE et al., 2012; CHAN et al., 2022; GONDEK E DEZERN, 2020; SKALSKA-BUGALA et al., 2022; SUNDARAVEL et al., 2021; YAMASHITA E IWAMA, 2022).

Em um estudo recente do nosso grupo, identificamos uma diminuição da desmetilação do DNA (níveis de 5hmC) em pacientes com SMD com idade inferior a 60 anos (CAVALCANTE et al., 2020). Um estudo realizado por Maegawa e colaboradores (2014) avaliou os padrões de metilação global em dois modelos animais de SMD e em pacientes, encontrando um aumento gradativo dos níveis de metilação global de acordo com o aumento da idade, além do aumento da metilação de 41 genes nos modelos animais (MAEGAWA et al., 2014). O aumento da metilação global do DNA observada em pacientes com SMD com idade acima de 60 anos, pode levar a desregulação do controle de regiões dependentes de metilação, como as DMR, ter um impacto direto no seu nível de metilação e, conseqüentemente, expressão dos seus transcritos.

Identificamos uma diminuição da expressão do *H19* em pacientes com SMD e LMA sec em relação aos grupo controle, com diminuição gradativa da sua expressão conforme avanço da doença, estando com níveis mais elevados na SMD-SA e níveis mais baixos na LMA sec. Além disso, pacientes do grupo LMA sec apresentaram maiores porcentagens de metilação da região H19DMR do que os pacientes com SMD-SA e SMD-EB. Os achados com relação a expressão do *H19* em neoplasias hematológicas têm sido conflitantes. No estudo de Tessema e colaboradores (2004), a expressão do *H19* foi avaliada em pacientes portadores de LMA, Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC) e Leucemia Mieloide Crônica (LMC), apresentando baixa expressão nos três tipos de leucemias quando comparados com controles saudáveis (TESSEMA et al., 2005). Em contrapartida, Zhao e Liu (2019) identificaram um aumento na expressão do *H19* em pacientes com LMA em relação ao grupo controle, bem como na linhagem KASUMI-1. Esse mesmo estudo associou a hiperexpressão do H19 com a supressão da apoptose, através de experimentos de transfecção na linhagem KASUMI-1 (ZHAO E LIU, 2018). Zhang e colaboradores (2018) também

encontraram um aumento da expressão do *H19* em pacientes com LMA em relação aos controles saudáveis e a um prognóstico desfavorável, mas não conseguiu associar os dados de expressão com a metilação da região H19DMR, pois o padrão de metilação não apresentou diferença entre pacientes com LMA e controles saudáveis (ZHANG et al., 2018). Nosso estudo é o primeiro a encontrar associações significativas com relação a expressão do *H19* entre pacientes com SMD comparados a pacientes com LMA sec.

A expressão dos lncRNAs é estritamente regulada pela metilação nas ICRs e a expressão do *H19* ocorre apenas mediante desmetilação da ICR1. É importante ressaltar que a H19DMR, região que controla o *imprinting* do cluster *H19/IGF2*, está localizada a 2kb *upstream* do promotor do gene *H19* (CALLE et al., 2018; LIN et al., 2020; MACDONALD E MANN, 2020). O processo de metilação do DNA geralmente ocorre próximo às regiões promotoras dos genes, levando a um bloqueio da ligação com fatores de transcrição, o que pode levar a regulação de sua transcrição (no caso de genes de *imprinting*) ou ao processo de silenciamento gênico. Acredita-se que um dos mecanismos de iniciação do processo neoplásico seja o silenciamento, através da metilação das regiões promotoras, de genes supressores tumorais e/ou genes que controlam mecanismos como ciclo celular e reparo do DNA (DEXHEIMER et al., 2017; HÉBERLÉ E BARDET, 2019; RASMUSSEN E HELIN, 2016; THOMSON E MEEHAN, 2017).

Na SMD ocorre um aumento dos níveis de metilação global do DNA (CALVO et al., 2014; CAVALCANTE et al., 2020; CHANDRA et al., 2017; LIU et al., 2013; MAEGAWA et al., 2014; POLONI et al., 2013). Estudos avaliando a metilação de genes alvo na SMD também mostraram que os níveis de metilação nos promotores dos genes está aumentada em pacientes de subgrupos mais agressivos, como as SMD-EB, e após evolução para LMA (SHARIFI et al., 2020; XU et al., 2022; YE E LI, 2019; ZAKER et al., 2016; ZHOU et al., 2020). Corroborando com os achados na associação entre os grupos, identificamos um aumento dos níveis de expressão do *H19* em pacientes classificados como muito baixo ou baixo risco, de acordo com o IPSS-R. Da mesma forma, pacientes classificados como alto ou muito alto risco apresentaram aumento da metilação da região H19DMR. Esses resultados sugerem que o *H19* funciona como um possível supressor tumoral na SMD, uma doença bastante heterogênea.

Dentre as principais funções do lncRNA *H19*, se destaca sua participação no processo de diferenciação e na repressão do crescimento celular, através da sua capacidade de

modulação de fatores de transcrição e miRNAs. Durante o processo de formação do embrião, o *H19* se encontra hiperexpresso, o que possibilita a diferenciação celular das células embrionárias. Apesar da diminuição dos seus níveis de expressão após o nascimento, o *H19* permanece com alta expressão em alguns tecidos, como o muscular e esquelético. A hiperexpressão do *H19* nesses tecido é responsável pela diferenciação das células tronco mesenquimais, principalmente através da ação dos miRNAs miR-675-3p e miR-675-5p, e pelo processo de regeneração de músculos, ossos e tendões (DEY et al., 2014; LIU et al., 2017; LU et al., 2017). Com relação ao tecido hematopoiético, Venkatraman e colaboradores (2013), após identificarem aumento da expressão do *H19* em células progenitoras hematopoiéticas (CPH) de longo prazo (com maior capacidade de auto renovação e diferenciação celular), realizaram experimento de *knockout* da região H19DMR em modelo murino. A deleção da H19DMR levou a diminuição das CPH de longo termo e comprometimento das funções das CPHs, mostrando que a regulação dessa região é essencial para o processo de hematopoiese (VENKATRAMAN et al., 2013).

Consideramos que nossos achados de diminuição da expressão do *H19* e aumento da metilação da região H19DMR de formas iniciais para formas mais avançadas da SMD, isto é, das SMD-SAs para as SMD-EBs e para as LMAs sec, sugerem que o *H19* esteja atuando como um supressor de tumor na SMD. Hipotetizamos que o aumento da metilação na região H19DMR possa ser um reflexo do aumento da metilação global observado na SMD e no processo de evolução para LMA. Considerando que a hiperexpressão do *H19* favorece o processo de diferenciação celular na fase embrionária e nos tecidos musculares e esqueléticos, o aumento da metilação com conseqüente diminuição dos níveis de expressão gênica do *H19* em pacientes de alto risco, pode estar relacionada ao acúmulo de mutações durante a progressão da doença e pode estar colaborando para o bloqueio de diferenciação e vantagem proliferativa encontrados nas LMAs.

A presença de alterações cromossômicas é observada em cerca de 50% dos pacientes com SMD *de novo* e representam um dos principais marcadores de prognóstico, de acordo com o IPSS. No presente estudo, encontramos um aumento na expressão do *H19* em pacientes com cariótipo normal, quando comparado com os pacientes com cariótipo alterado. Com relação a metilação da região H19DMR, não foram identificadas diferenças nos níveis de metilação entre os grupos. As alterações cromossômicas são um reflexo das alterações genômicas que ocorrem nas CPH e levam ao desencadeamento da SMD e a presença de alterações cromossômicas também foi associada ao aumento da metilação global do DNA em

pacientes com SMD (CAVALCANTE et al., 2020; ELIAS et al., 2014). Em um estudo recente do nosso grupo, foi desenvolvida uma linhagem celular não neoplásica de células de mioblasto de camundongos com silenciamento do *H19* através da técnica de CRISPR/Cas9. O silenciamento do *H19* nessas células levou ao aumento da proliferação celular e presença de alterações cromossômicas (DA SILVA SANTOS et al., 2021). Esse achado corrobora com os dados encontrados no presente estudo, pois os pacientes que apresentam maior porcentagem de alterações citogenéticas são os dos grupos SMD-EB e LMA sec, que possuem maior índice de proliferação celular e ambos apresentam diminuição dos níveis de expressão do *H19*.

O aumento da expressão do *H19* também foi observado em pacientes com SMD do sexo feminino, contagem de plaquetas superior a 100.000/mm<sup>3</sup> e pacientes que não apresentavam dependência de transfusão, ambos relacionados a um prognóstico favorável. A contagem de plaquetas é uma das variáveis de maior peso prognóstico na SMD, juntamente com contagem de blastos, citogenética, contagem de hemoglobina e neutrófilos (GREENBERG et al., 1997, 2012; SWERDLOW et al., 2017). Pacientes mais graves tendem a apresentar citopenias severas, com baixa contagem de plaquetas e maior risco de sangramentos. A trombocitopenia severa na SMD também pode estar associada a desregulações no controle do ciclo celular (BORGES et al., 2018; GENGA et al., 2015).

As associações encontradas entre o aumento da expressão do *H19* em variáveis de prognóstico favorável, bem como o aumento da metilação da região H19DMR nos grupos de pior prognóstico, sugerem que o *H19* esteja exercendo um papel de supressor de tumor na SMD e sua desregulação pode estar associada ao processo de progressão da doença. Para melhor elucidar e caracterizar o papel da região H19DMR na SMD, a inclusão de estudos envolvendo o *IGF2*, controlado pela mesma DMR, possa ajudar na completa compreensão dos mecanismos envolvidos.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados sugerem que o *H19* esteja exercendo um papel de supressor de tumor na SMD e sua desregulação pode estar associada ao processo de progressão da doença.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALHARBI, A. B. et al. CTCF as a regulator of alternative splicing: new tricks for an old player. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 14, p. 7825–7838, 20 ago. 2021.
- ANGELONI, A.; BOGDANOVIC, O. Enhancer DNA methylation: implications for gene regulation. **Essays in Biochemistry**, v. 63, n. 6, p. 707–715, 20 dez. 2019.
- ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 2016.
- AYKROYD, B. R. L.; TUNSTER, S. J.; SFERRUZZI-PERRI, A. N. Loss of imprinting of the *Igf2-H19* ICR1 enhances placental endocrine capacity via sex-specific alterations in signalling pathways in the mouse. **Development**, v. 149, n. 1, p. dev199811, 1 jan. 2022.
- BANKHEAD, P. et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16878, dez. 2017.
- BEJAR, R. et al. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2496–2506, 30 jun. 2011.
- BERGMAN, D. et al. Insulin-Like Growth Factor 2 in Development and Disease: A Mini-Review. **Gerontology**, v. 59, n. 3, p. 240–249, 2013.
- BERNARD, E. et al. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. **Nature Medicine**, v. 26, n. 10, p. 1549–1556, 1 out. 2020.
- BISHOP, K.; FERGUSON, L. The Interaction between Epigenetics, Nutrition and the Development of Cancer. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 922–947, 30 jan. 2015.
- BORGES, D.P. et al. Prognostic importance of Aurora Kinases and mitotic spindle genes transcript levels in Myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**, v. 64, p. 61–70, jan. 2018.
- BROUWER-VISSER, J.; HUANG, G. S. IGF2 signaling and regulation in cancer. v. 26, n. 3, p. 371–377, 2015.
- BUDCZIES, J. et al. Cutoff Finder: A Comprehensive and Straightforward Web Application Enabling Rapid Biomarker Cutoff Optimization. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51862, 14 dez. 2012.
- BUSQUE, L. et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. **Nature Genetics**, v. 44, n. 11, p. 1179–1181, nov. 2012.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.
- CALLE, A. S. et al. Emerging roles of long non-coding RNA in cancer. **Cancer Science**, v. 109, n. 7, p. 2093–2100, jul. 2018.

CALVO, X. et al. High levels of global DNA methylation are an independent adverse prognostic factor in a series of 90 patients with de novo myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**, v. 38, n. 8, p. 874–881, ago. 2014.

CAVALCANTE, G. M. et al. Tissue methylation and demethylation influence translesion synthesis DNA polymerases (TLS) contributing to the genesis of chromosomal abnormalities in myelodysplastic syndrome. **Journal of Clinical Pathology**, p. jclinpath-2020-207131, 24 nov. 2020.

CAVALLI, G.; HEARD, E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. **Nature**, v. 571, n. 7766, p. 489–499, jul. 2019.

CHAMSEDDINE, A. N. et al. Unraveling Myelodysplastic Syndromes: Current Knowledge and Future Directions. **Current Oncology Reports**, v. 18, n. 1, p. 4, jan. 2016.

CHAN, I. C. C.; WILEY, B. J.; BOLTON, K. L. What Clonal Hematopoiesis Can Teach Us About MDS. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 794021, 8 fev. 2022.

CHANDRA, D. et al. Utility of 5-Methylcytosine Immunohistochemical Staining to Assess Global DNA Methylation and Its Prognostic Impact in MDS Patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 12, dez. 2017.

CHEN, X.-S. et al. Advancements in the Underlying Pathogenesis of Schizophrenia: Implications of DNA Methylation in Glial Cells. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, 2 dez. 2015.

CHI et al. Long Non-Coding RNA in the Pathogenesis of Cancers. **Cells**, v. 8, n. 9, p. 1015, 1 set. 2019.

COSTA, M. B. et al. Chromosomal abnormalities and dysregulated DNA repair gene expression in farmers exposed to pesticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 103564, fev. 2021.

CUMBO, C. et al. TP53 in Myelodysplastic Syndromes: Recent Biological and Clinical Findings. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3432, 13 maio 2020.

DA SILVA SANTOS, R. et al. CRISPR/Cas9 small promoter deletion in H19 lncRNA is associated with altered cell morphology and proliferation. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 18380, dez. 2021.

DEBAUGNY, R. E.; SKOK, J. A. CTCF and CTCFL in cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 61, p. 44–52, abr. 2020.

DEXHEIMER, G. M. et al. DNA Methylation Events as Markers for Diagnosis and Management of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. **Disease Markers**, v. 2017, p. 1–14, 2017.

DEY, B. K.; PFEIFER, K.; DUTTA, A. The *H19* long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675-3p and miR-675-5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration. **Genes & Development**, v. 28, n. 5, p. 491–501, 1 mar. 2014.

DI AGOSTINO, S. The Impact of Mutant p53 in the Non-Coding RNA World. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 472, 19 mar. 2020.

DYKES, I. M.; EMANUELI, C. Transcriptional and Post-transcriptional Gene Regulation by Long Non-coding RNA. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 15, n. 3, p. 177–186, jun. 2017.

EL BAHHAJ, F. et al. Delivery of epidrugs. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 9, p. 1337–1352, set. 2014.

ELHAMAMSY, A. R. Role of DNA methylation in imprinting disorders: an updated review. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 5, p. 549–562, maio 2017.

ELIAS, H. K. et al. Stem cell origin of myelodysplastic syndromes. **Oncogene**, v. 33, n. 44, p. 5139–5150, 30 out. 2014.

ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 861–874, dez. 2011.

FANG, C. et al. Cancer-specific CTCF binding facilitates oncogenic transcriptional dysregulation. **Genome Biology**, v. 21, n. 1, p. 247, dez. 2020.

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

GHAFOURI-FARD, S. et al. The role of H19 lncRNA in conferring chemoresistance in cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 138, p. 111447, jun. 2021.

GONDEK, L. P.; DEZERN, A. E. Assessing clonal haematopoiesis: clinical burdens and benefits of diagnosing myelodysplastic syndrome precursor states. **The Lancet Haematology**, v. 7, n. 1, p. e73–e81, jan. 2020.

GREENBERG, P. et al. International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 2079–2088, 15 mar. 1997.

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

GUO, Y. et al. The efficacy and adverse events of venetoclax in combination with hypomethylating agents treatment for patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Hematology**, v. 25, n. 1, p. 414–423, 1 jan. 2020.

GUTSCHNER, T.; DIEDERICHS, S. The hallmarks of cancer: A long non-coding RNA point of view. **RNA Biology**, v. 9, n. 6, p. 703–719, jun. 2012.

HAFERLACH, T. et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 28, n. 2, p. 241–247, fev. 2014.

HAFERLACH, T. The Molecular Pathology of Myelodysplastic Syndrome. **Pathobiology**, v. 86, n. 1, p. 24–29, 2019.



HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, jan. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HANNA, C. W. Placental imprinting: Emerging mechanisms and functions. **PLOS Genetics**, v. 16, n. 4, p. e1008709, 23 abr. 2020.

HARVEY, Z. H.; CHEN, Y.; JAROSZ, D. F. Protein-Based Inheritance: Epigenetics beyond the Chromosome. **Molecular Cell**, v. 69, n. 2, p. 195–202, jan. 2018.

HASSERJIAN, R. P. Myelodysplastic Syndrome Updated. **Pathobiology**, v. 86, n. 1, p. 7–13, 2019.

HÉBERLÉ, É.; BARDET, A. F. Sensitivity of transcription factors to DNA methylation. **Essays in Biochemistry**, v. 63, n. 6, p. 727–741, 20 dez. 2019.

HERMAN, J. G. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 18, p. 9821–9826, 3 set. 1996.

HOERMANN, G. et al. Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential: A Multidisciplinary Challenge in Personalized Hematology. **Journal of Personalized Medicine**, v. 10, n. 3, p. 94, 20 ago. 2020.

HOLČÁKOVÁ, J. Effect of DNA Methylation on the Development of Cancer. **Klinicka onkologie**, v. 31, n. Suppl2, 15 out. 2018.

HUANG, Y. et al. Long Non-coding RNA H19 Inhibits Adipocyte Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells through Epigenetic Modulation of Histone Deacetylases. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28897, set. 2016.

ITZYKSON, R.; FENAUX, P. Epigenetics of myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 28, n. 3, p. 497–506, mar. 2014.

JAN, M.; SPERLING, A. S.; EBERT, B. L. Cancer therapies based on targeted protein degradation — lessons learned with lenalidomide. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 18, n. 7, p. 401–417, jul. 2021.

JIA, L. et al. The silencing of LncRNA-H19 decreases chemoresistance of human glioma cells to temozolomide by suppressing epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway. **Oncotargets and Therapy**, v. Volume 11, p. 313–321, jan. 2018.

JIANG, X. et al. H19/miR-152-3p/TCF4 axis increases chemosensitivity of gastric cancer cells through suppression of epithelial-mesenchymal transition. **Translational Cancer Research**, v. 9, n. 6, p. 3915–3925, jun. 2020.

- JIANG, X.; NING, Q. The mechanism of lncRNA H19 in fibrosis and its potential as novel therapeutic target. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 188, p. 111243, jun. 2020.
- KENNEDY, J. A.; EBERT, B. L. Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 9, p. 968–974, 20 mar. 2017.
- KIM, S.; YU, N.-K.; KAANG, B.-K. CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 47, n. 6, p. e166–e166, jun. 2015.
- KIM, T. H. et al. Analysis of the Vertebrate Insulator Protein CTCF-Binding Sites in the Human Genome. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1231–1245, mar. 2007.
- KOMROKJI, R. S. et al. Luspatercept for myelodysplastic syndromes/myeloproliferative neoplasm with ring sideroblasts and thrombocytosis. **Leukemia**, 26 fev. 2022.
- KRUEGER, F.; ANDREWS, S. R. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. **Bioinformatics**, v. 27, n. 11, p. 1571–1572, 1 jun. 2011.
- LECERF, C. et al. Propagation and Maintenance of Cancer Stem Cells: A Major Influence of the Long Non-Coding RNA H19. **Cells**, v. 9, n. 12, p. 2613, 5 dez. 2020.
- LI, L.-C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, v. 18, n. 11, p. 1427–1431, 1 nov. 2002.
- LIN, J. et al. Emerging Roles of Long Non-Coding RNAs in Renal Fibrosis. **Life**, v. 10, n. 8, p. 131, 1 ago. 2020.
- LIU, C. et al. H19-derived miR-675 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating p53 activation. **Tumor Biology**, v. 37, n. 1, p. 263–270, jan. 2016.
- LIU, L. et al. Homing and Long-Term Engraftment of Long- and Short-Term Renewal Hematopoietic Stem Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31300, 9 fev. 2012.
- LIU, X. et al. Decreased 5-hydroxymethylcytosine levels are associated with *TET2* mutation and unfavorable overall survival in myelodysplastic syndromes. **Leukemia & Lymphoma**, v. 54, n. 11, p. 2466–2473, nov. 2013.
- LIU, Y.; LI, G.; ZHANG, J. The role of long non-coding RNA H19 in musculoskeletal system: A new player in an old game. **Experimental Cell Research**, v. 360, n. 2, p. 61–65, nov. 2017.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LIVINGSTONE, C. IGF2 and cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 20, n. 6, p. R321–R339, dez. 2013.

- LU, Y.-F. et al. Long noncoding RNA H19 accelerates tenogenic differentiation and promotes tendon healing through targeting miR-29b-3p and activating TGF- $\beta$ 1 signaling. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 3, p. 954–964, mar. 2017.
- MACDONALD, W. A.; MANN, M. R. W. Long noncoding RNA functionality in imprinted domain regulation. **PLOS Genetics**, v. 16, n. 8, p. e1008930, 2020.
- MAEGAWA, S. et al. Age-related epigenetic drift in the pathogenesis of MDS and AML. **Genome Research**, v. 24, n. 4, p. 580–591, abr. 2014.
- MALCOVATI, L. et al. Prognostic Factors and Life Expectancy in Myelodysplastic Syndromes Classified According to WHO Criteria: A Basis for Clinical Decision Making. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 30, p. 7594–7603, 20 out. 2005.
- MANCARELLA, C.; MORRIONE, A.; SCOTLANDI, K. Novel Regulators of the IGF System in Cancer. **Biomolecules**, v. 11, n. 2, p. 273, 12 fev. 2021.
- MATOUK, I. J. et al. The oncofetal H19 RNA connection: Hypoxia, p53 and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 4, p. 443–451, abr. 2010.
- MAUPETIT-MÉHOUS, S. et al. Imprinting control regions (ICRs) are marked by mono-allelic bivalent chromatin when transcriptionally inactive. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 2, p. 621–635, 29 jan. 2016.
- MCGOWAN-JORDAN, J.; HASTINGS, R. J.; MOORE, S. **Iscn 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020)**. [s.l.] McGowan-Jordan Jean, 2020.
- MIRANDA FURTADO, C. L. et al. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. **Epigenetics**, v. 14, n. 12, p. 1164–1176, 2 dez. 2019.
- NEBBIOSO, A. et al. Cancer epigenetics: Moving forward. **PLOS Genetics**, v. 14, n. 6, p. e1007362, 7 jun. 2018.
- NORDIN, M. et al. Epigenetic regulation of the *Igf2/H19* gene cluster. **Cell Proliferation**, v. 47, n. 3, p. 189–199, jun. 2014.
- PAN, Y. et al. LncRNA H19 overexpression induces bortezomib resistance in multiple myeloma by targeting MCL-1 via miR-29b-3p. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 2, p. 106, fev. 2019.
- PANNI, S. et al. Non-coding RNA regulatory networks. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1863, n. 6, p. 194417, jun. 2020.
- PAPAEMMANUIL, E. et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 122, n. 22, p. 3616–3627, 21 nov. 2013.
- PINHEIRO, R. F.; CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 11, p. 1110–1112, nov. 2009.

POLONI, A. et al. Prognostic role of immunohistochemical analysis of 5 mc in myelodysplastic syndromes. **European Journal of Haematology**, v. 91, n. 3, p. 219–227, set. 2013.

QIN, Y.; KUANG, P.; LIU, T. Venetoclax combined with hypomethylating agents or low-dose cytarabine as induction chemotherapy for patients with untreated acute myeloid leukemia ineligible for intensive chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. **Clinical and Experimental Medicine**, 23 jan. 2022.

QUINN, J. J.; CHANG, H. Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 1, p. 47–62, jan. 2016.

RASMUSSEN, K. D.; HELIN, K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. **Genes & Development**, v. 30, n. 7, p. 733–750, 1 abr. 2016.

RATAJCZAK, M. Z. Igf2-H19, an imprinted tandem gene, is an important regulator of embryonic development, a guardian of proliferation of adult pluripotent stem cells, a regulator of longevity, and a ‘passkey’ to cancerogenesis. **Folia Histochem Cytobiol.**, p. 9, 2012.

RAVEH, E. et al. The H19 Long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis – a proposed unifying theory. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 184, dez. 2015.

RAVID, O. et al. Relative genomic stability of adipose tissue derived mesenchymal stem cells: analysis of ploidy, H19 long non-coding RNA and p53 activity. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 6, p. 139, dez. 2014.

REILLY, B. et al. DNA methylation identifies genetically and prognostically distinct subtypes of myelodysplastic syndromes. **Blood Advances**, v. 3, n. 19, p. 2845–2858, 8 out. 2019.

SCHULTHEISS, C. S. et al. The long non-coding RNA H19 suppresses carcinogenesis and chemoresistance in hepatocellular carcinoma. **Cell Stress**, v. 1, n. 1, p. 37–54, 1 out. 2017.

SHAHRABI, S. et al. Genetics and epigenetics of myelodysplastic syndromes and response to drug therapy: new insights. **Oncology Reviews**, 14 dez. 2016.

SHARIFI, M. J. et al. Epigenetic changes in FOXO3 and CHEK2 genes and their correlation with clinicopathological findings in myelodysplastic syndromes. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 13, n. 4, p. 214–219, dez. 2020.

SHERMANE LIM, Y. W. et al. The double-edged sword of H19 lncRNA: Insights into cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 500, p. 253–262, mar. 2021.

ŠIMONIČOVÁ, K. et al. Different mechanisms of drug resistance to hypomethylating agents in the treatment of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **Drug Resistance Updates**, v. 61, p. 100805, mar. 2022.

SKALSKA-BUGALA, A. et al. Diagnostic and Prognostic Power of Active DNA Demethylation Pathway Intermediates in Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. **Cells**, v. 11, n. 5, p. 888, 4 mar. 2022.

SKVORTSOVA, K. et al. Comprehensive evaluation of genome-wide 5-hydroxymethylcytosine profiling approaches in human DNA. **Epigenetics & Chromatin**, v. 10, n. 1, p. 16, dez. 2017.

SODIR, N. M.; EVAN, G. I. Finding cancer's weakest link. **Oncotarget**, v. 2, n. 12, p. 1307–1313, 31 dez. 2011.

SRIRAMAN, A. et al. Making it or breaking it: DNA methylation and genome integrity. **Essays in Biochemistry**, v. 64, n. 5, p. 687–703, 26 out. 2020.

SUNDARAVEL, S.; STEIDL, U.; WICKREMA, A. Epigenetic modifiers in normal and aberrant erythropoiesis. **Seminars in Hematology**, v. 58, n. 1, p. 15–26, jan. 2021.

SWERDLOW, S. H. H. EDT et al. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. 4. ed. Lyon: 2017.

SZIKSZAI, K. et al. LncRNA Profiling Reveals That the Deregulation of H19, WT1-AS, TCL6, and LEF1-AS1 Is Associated with Higher-Risk Myelodysplastic Syndrome. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 2726, 23 set. 2020.

TESSEMA, M. et al. Down-regulation of the IGF-2/H19 locus during normal and malignant hematopoiesis is independent of the imprinting pattern. **International Journal of Oncology**, 1 fev. 2005.

THAMBAN, T.; AGARWAAL, V.; KHOSLA, S. Role of genomic imprinting in mammalian development. **Journal of Biosciences**, v. 45, n. 1, p. 20, dez. 2020.

THOMSON, J. P.; MEEHAN, R. R. The application of genome-wide 5-hydroxymethylcytosine studies in cancer research. **Epigenomics**, v. 9, n. 1, p. 77–91, jan. 2017.

TIAN, X. et al. LncRNA-H19 regulates chemoresistance to carboplatin in epithelial ovarian cancer through microRNA-29b-3p and STAT3. **Journal of Cancer**, v. 12, n. 19, p. 5712–5722, 2021.

TOH, T. B.; LIM, J. J.; CHOW, E. K.-H. Epigenetics in cancer stem cells. **Molecular Cancer**, v. 16, n. 1, p. 29, dez. 2017.

TUCCI, V. et al. Genomic Imprinting and Physiological Processes in Mammals. **Cell**, v. 176, n. 5, p. 952–965, fev. 2019.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. p. 12, [s.d.].

VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937–951, 30 jul. 2009.

VENKATRAMAN, A. et al. Maternal imprinting at the H19–Igf2 locus maintains adult haematopoietic stem cell quiescence. **Nature**, v. 500, n. 7462, p. 345–349, ago. 2013.

VILLOTA-SALAZAR, N. A.; MENDOZA-MENDOZA, A.; GONZÁLEZ-PRIETO, J. M. Epigenetics: from the past to the present. **Frontiers in Life Science**, v. 9, n. 4, p. 347–370, out. 2016.

WADDINGTON, C. H. The Epigenotype. **International Journal of Epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 10–13, fev. 2012.

WANG, B. et al. The Roles of H19 in Regulating Inflammation and Aging. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 579687, 26 out. 2020a.

WANG, J.; LEI, K.; HAN, F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. **Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments.**, v. 22, n. 12, p. 3855–3864, 2018.

WANG, J.; SUN, J.; YANG, F. The role of long non-coding RNA H19 in breast cancer (Review). **Oncology Letters**, 14 nov. 2019.

WANG, Y. et al. Long non-coding RNA H19 regulates proliferation and doxorubicin resistance in MCF-7 cells by targeting PARP1. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p. 536–546, 1 jan. 2020b.

WEIDLE, U. H. et al. Long Non-coding RNAs and their Role in Metastasis. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 14, n. 3, p. 143–160, 26 abr. 2017.

WU, B. et al. Long Noncoding RNA H19: A Novel Therapeutic Target Emerging in Oncology Via Regulating Oncogenic Signaling Pathways. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 796740, 16 dez. 2021.

WU, Y.; SARKISSYAN, M.; VADGAMA, J. V. Epigenetics in Breast and Prostate Cancer. Em: VERMA, M. (Ed.). . **Cancer Epigenetics**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2015. v. 1238p. 425–466.

XU, Q. et al. DNA demethylation affects imprinted gene expression in maize endosperm. **Genome Biology**, v. 23, n. 1, p. 77, dez. 2022.

YAMASHITA, M.; IWAMA, A. Aging and Clonal Behavior of Hematopoietic Stem Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, p. 1948, 9 fev. 2022.

YANG, F. et al. Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells. v. 279, n. 17, p. 3159–65, 2012.

YANG, J. et al. LncRNA H19: A novel oncogene in multiple cancers. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 12, p. 3188–3208, 2021.

YE, F.; LI, N. Role of p15(INK4B) Methylation in Patients With Myelodysplastic Syndromes: A Systematic Meta-Analysis. **Role of p15(INK4B) Methylation in Patients With Myelodysplastic Syndromes: A Systematic Meta-Analysis.**, v. 19, n. 6, p. e259–e265, 2019.

YOSHIMIZU, T. et al. The *H19* locus acts *in vivo* as a tumor suppressor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 34, p. 12417–12422, 26 ago. 2008.

ZAKER, F. et al. Aberrant Methylation-Mediated Suppression of APAF1 in Myelodysplastic Syndrome. . **Volume**, v. 11, n. 2, p. 7, 2016.

ZAMORA, D. I. et al. Myelodysplastic Syndromes and Modalities of Treatment: An Updated Literature Review. **Cureus**, 2 dez. 2021.

ZHANG, P. et al. Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. **Journal of Integrative Bioinformatics**, v. 16, n. 3, 13 jul. 2019.

ZHANG, T. et al. H19 overexpression promotes leukemogenesis and predicts unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia. **Clinical Epigenetics**, v. 10, n. 1, p. 47, dez. 2018.

ZHAO, T. T.; LIU, X. LncRNA-H19 inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells via targeting miR-29a-3p. v. 23, n. 3, p. 224–231, 2018.

ZHOU, J. et al. Combined Single-Cell Profiling of lncRNAs and Functional Screening Reveals that H19 Is Pivotal for Embryonic Hematopoietic Stem Cell Development. **Cell Stem Cell**, v. 24, n. 2, p. 285- 298.e5, fev. 2019.

ZHOU, J. et al. Genome-wide methylation sequencing identifies progression-related epigenetic drivers in myelodysplastic syndromes. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 11, p. 997, nov. 2020.

## 8. ANEXOS

### Anexo I: Descrição clínica dos pacientes.

ID Paciente	Sexo	Idade	Celularidade	Cariótipo	OMS	IPSS-R	Óbito	NGS	RT-qPCR	IHQ
1	F	41	Normocelular	Ausência de metáfases	SMD-SA-DM	-	Sim	Não	Sim	Não
2	M	91	-	46,X-Y[4]/46,XY[16]	SMD-SA-DU	Muito Baixo	Sim	Sim	Sim	Sim
3	M	58	Hipocelular	46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12]	SMD-SA-DU	Baixo Risco	Sim	Não	Sim	Não
4	M	28	-	46,XX[20]	SMD-SA-DU	Baixo Risco	Sim	Sim	Sim	Sim
5	M	82	Hiper celular	46,XX[20]	SMD-SA-DU	Baixo Risco	Sim	Sim	Sim	Não
6	F	81	Hiper celular	46,XX[5]	SMD-SA-DM	Baixo Risco	Sim	Sim	Sim	Não
7	M	74	Hiper celular	46,XY[6]	SMD-SA-DM	Baixo Risco	Não	Sim	Sim	Sim
8	F	73	-	46,XX[12]	SMD-SA-DM	Baixo Risco	Sim	Não	Sim	Sim
9	M	70	Hiper celular	46,XY[17]	SMD-SA-DM	Baixo Risco	Sim	Sim	Sim	Não
10	F	70	Hiper celular	Ausência de metáfases	SMD-SA-DM	-	Sim	Sim	Sim	Não
11	F	87	Hiper celular	Ausência de metáfases	SMD-SA-DU	-	Sim	Sim	Sim	Não
12	F	66	Hiper celular	Ausência de metáfases	SMD-SA-DM	-	-	Sim	Sim	Não
13	F	57	Hiper celular	46,XX[10]	SMD-SA-DM	Baixo Risco	Não	Sim	Sim	Sim
14	M	62	Hiper celular	47,XY,+15[10]/46,XY[10]	SMD-SA-DM	Intermediário	Sim	Sim	Sim	Não
15	F	85	Hiper celular	46,XY[15]	SMD-SA-DM	Baixo Risco	Sim	Não	Sim	Não
16	F	67	-	Ausência de metáfases	SMD-SA-DM	-	Sim	Não	Sim	Não
17	F	76	-	46,XX[15]	SMD-SA-DU	Baixo Risco	Sim	Sim	Sim	Não
18	F	66	Hiper celular	46,XX[26]	SMD-SA-DU	Baixo Risco	Não	Não	Sim	Não
19	M	92	-	46,XY,del(5)(q32)[13]/46,XY[17]	SMD-SA-DM	Baixo Risco	Não	Não	Sim	Não
20	F	46	Hiper celular	46,XX[20]	SMD-SA-DM	Baixo Risco	Sim	Sim	Sim	Não
21	M	94	-	46,XX[20]	SMD-SA-DM	Muito Baixo	Não	Sim	Sim	Não
22	F	76	Hiper celular	46,XX[20]	SMD-SA-DU	Baixo Risco	Não	Não	Sim	Não
23	F	82	-	47,XX,+8[9]/47,XX,+8,del(20)(q12)[5]/46,XX[6]	SMD-SA-DM	Intermediário	Sim	Sim	Sim	Não
24	F	81	Hiper celular	46,XX[20]	SMD-SA-DM	Baixo Risco	Não	Não	Sim	Não



25	M	70	Hipercelular	46,XX[15]	SMD-SA-DM	Muito Baixo	-	Não	Sim	Não
26	F	87		46,XX,del(11)(q21)[16]/46,XX[4]	SMD-SA-DM	Baixo Risco	Não	Sim	Sim	Sim
27	M	62	-	Ausência de metáfases	SMD-SA-DM	-	Sim	Não	Sim	Não
28	F	61	-	46,XX,del(11)(q14.22)[18]/46,XX[2]	SMD-SA-DM	Baixo Risco	Não	Não	Sim	Não
29	M	62	Hipercelular	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2]	SMD-EB2	Muito Alto	Sim	Não	Sim	Não
30	M	72	-	Ausência de metáfases	SMD-EB2	-	Sim	Não	Sim	Não
31	M	67	Hipercelular	Ausência de metáfases	SMD-EB1	-	Sim	Sim	Sim	Sim
32	M	67	Hipercelular	46,XY[20]	SMD-EB1	Alto Risco	Sim	Não	Sim	Sim
33	M	64	Hipercelular	37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/46,XY,del(5)(q15q33)[5]/46,XY[6]	SMD-EB2	Muito Alto	Sim	Sim	Sim	Sim
34	M	66	Hipercelular	Ausência de metáfases	SMD-EB2	-	Sim	Não	Sim	Não
35	M	78	Hipercelular	Ausência de metáfases	SMD-EB1	-	Sim	Sim	Sim	Não
36	F	72	-	Ausência de metáfases	SMD-EB2	-	Sim	Sim	Sim	Não
37	M	84	Normocelular	Ausência de metáfases	SMD-EB1	-	Sim	Não	Sim	Não
38	F	67	Normocelular	Ausência de metáfases	SMD-EB2	-	Sim	Não	Sim	Não
39	F	74	Hipocelular	46,XY[20]	SMD-EB2	Intermediário	Sim	Não	Sim	Não
40	F	86	-	46,XX[8]	SMD-EB2	Alto Risco	Sim	Não	Sim	Não
41	M	80	-	47,XY,+8[12]/46,XY[8]	SMD-EB1	Intermediário	Sim	Não	Sim	Não
42	M	85	Normocelular	46,XY[20]	SMD-EB1	Intermediário	Sim	Não	Sim	Não
43	M	61	-	Ausência de metáfases	SMD-EB1	-	Sim	Não	Sim	Não
44	M	79	-	Ausência de metáfases	SMD-EB2	-	Sim	Sim	Sim	Não
45	M	55	-	45,X,-Y[15]/45,X,-Y,del(5)(q32)[3]/46,XY[2]	SMD-EB2	Muito Alto	Sim	Não	Sim	Não
46	M	70	Hipercelular	46,XY,add(17)(p13)[8]/46,XY,del(9)(q15),add(17)(p13)[10]/46,XY[2]	SMD-EB2	Muito Alto	Sim	Não	Sim	Não
47	M	71	Normocelular	46,XY[20]	SMD-EB1	Intermediário	-	Sim	Sim	Sim
48	M	75	Hipercelular	92,XXYY[4]/46,XY[8]	SMD-EB1	Muito Alto	Sim	Sim	Sim	Não
49	M	78		46,XY[20]	SMD-EB1	Intermediário	Sim	Sim	Sim	Não
50	F	42	-	46,XX[20]	SMD-EB1	Intermediário	Sim	Sim	Sim	Não
51	F	79	-	46,XX[12]	SMD-EB2	Alto Risco	Sim	Sim	Sim	Não
52	F	81	Hipercelular	46,XX[4]	SMD-EB2	Alto Risco	-	Sim	Sim	Não

53	M	55	Hipercelular	45,XY,-7[15]/46,XY,-7,+mar[5]	SMD-EB2	Muito Alto	Sim	Sim	Sim	Não
54	F	89	-	46,XY,t[5;19](q13.2;q13.4)[3]/46,XY,t[5;19](q13.2;q13.4),t(8,21)(q21.3;q22.12)[3]/46,XY,del(X)(q21),t(5;19)(q13.2;q13.4),t(8;21)(q21.3;q22.12)[5]/46,XY[9]	SMD-EB2	Muito Alto	Sim	Sim	Sim	Não
55	M	58	Hipercelular	46,XY,del(5)(q32)[3]/46,XY,del(5)(q32),del(7)(q36)[3]/46,XY,-5,+mar[9]/46,XY[7]	SMD-EB1	Alto Risco	Não	Não	Sim	Não
56	M	93	-	46,XX,+8[12]/46,XX[8]	SMD-EB1	Alto Risco	-	Sim	Sim	Não
57	M	84	-	46,XY[20]	SMD-EB1	Alto Risco	Sim	Não	Sim	Não
58	M	76	Hipercelular	46,XY,del(5)(q31)[2]/46,XY,del(5)(q31),-7,+8[16]	SMD-EB2	Muito Alto	Sim	Sim	Sim	Não
59	M	58	Hipercelular	46,XY[20]	SMD-EB2	Muito Alto	-	Sim	Sim	Não
60	F	72	Hipercelular	46,XX,inv(3)(q21q26)[16]/46,XX[4]	SMD-EB1	Alto Risco	Sim	Não	Sim	Não
61	M	72	Hipercelular	46,XY[20]	SMD-EB1	Alto Risco	Não	Sim	Sim	Não
62	F	91	-	46,XX[20]	SMD-EB1	Alto Risco	Sim	Não	Sim	Não
63	M	64	Normocelular	46,XY[20]	SMD-EB1	Intermediário	Não	Sim	Sim	Sim
64	M	25	Hipercelular	45,XY,del(6)(q22),-7,add(9)(q12),del(12)(p11.2),del(17)(p13),del(20)(q12),add(21)(p13)[17]/46,XY[3]	SMD-EB2	Muito Alto	Sim	Sim	Sim	Não
65	F	86	-	46,XX,del(5)(q14)[5]/46,XX[15]	SMD-EB2	Muito Alto	Sim	Sim	Sim	Não
66	F	30	Hipocelular	90,XXXX,-6,-7,-8,-11,+21,+22[5]/46,XX,del(7)(q23),del(20)(q13.1)[3]/45,XX,-7[5]/45~46,XX,-7,del(7)(q32),del(11)(q32),-17,del(17)(p11.2),del(20)(q13.1)[cp11]	SMD-EB2	Muito Alto	Sim	Não	Sim	Não
67	F	87	-	46,XX[20]	SMD-EB1	Intermediário	Sim	Não	Sim	Não
68	M	66	-	Ausência de metáfases	SMD-EB1	-	Sim	Não	Sim	Não
69	F	77	-	Ausência de metáfases	SMD-EB2	-	Sim	Não	Sim	Não
70	M	72	Hipercelular	46,XY[20]	SMD-EB2	Alto Risco	Não	Sim	Sim	Sim
71	F	44	-	Ausência de metáfases	LMA sec	-	Sim	Sim	Não	Não
72	F	87	-	46,XX[8]	LMA sec	-	Sim	Sim	Sim	Não
73	M	86	-	46,XY,del(17)(q22)[3]/47,XY,+mar[4]/46,XY[20]	LMA sec	-	Sim	Não	Sim	Não
74	M	78	-	46,XY,del(11)(q23)[4]/46,XY[16]	LMA sec	-	Sim	Não	Sim	Não
75	M	73	-	46,XY,i(17)(q10)[18]/46,XY,del(9)(q13),i(17)(q10)[2]	LMA sec	-	Não	Sim	Sim	Não
76	F	76	-	45,X,-7[13]/46,XX[7]	LMA sec	-	Sim	Sim	Sim	Não

77	F	67	-	46,XX[19]	LMA sec	-	Sim	Sim	Sim	Não
78	M	69	-	46,XY[20]	LMA sec	-	Sim	Não	Sim	Não
79	F	81	-	49,XX,del(3)(q21),- 5,+6,+8,i(11)(q10),+i(11)(q10),add(16)(p13.3),add(17)(p13), +mar[20]	LMA sec	-	Sim	Sim	Sim	Não
80	F	91	-	Ausência de metáfases	LMA sec	-	Sim	Sim	Sim	Não
81	F	60	-	Ausência de metáfases	LMA sec	-	Sim	Não	Sim	Não

**Legenda:** ID – Identificação; M - Masculino; F -Feminino; OMS - Organização Mundial de Saúde; IPSS-R - Sistema Internacional de Score Prognóstico Revisado; NGS – Pacientes com resultado de sequenciamento após modificação por bissulfito; RT-qPCR – pacientes com resultado de expressão por RT-qPCR; IHQ – pacientes com resultado de imunohistoquímica; SMD-SA-DU - SMD com Sideroblastos em Anel e Displasia em Única linhagem; SMD-SA-DM - SMD com Sideroblastos em Anel e Displasia em Múltiplas linhagens; SMD-EB1 - SMD com Excesso de Blastos tipo I; SMD-EB2 - SMD com Excesso de Blastos tipo II; LMA sec - Leucemia Mielóide Aguda secundária à SMD