



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL
MESTRADO ACADÊMICO EM MEDICINA TRANSLACIONAL**

LUIZ GUSTAVO ALMEIDA DE CARVALHO

**EXPRESSÃO DE ALVOS DA VIA UBIQUITINA-PROTEASSOMA (*UBE2T*, *UBE2O*,
USP7 E *USP15*) NA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES COM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

**FORTALEZA
2022**

LUIZ GUSTAVO ALMEIDA DE CARVALHO

EXPRESSÃO DE ALVOS DA VIA UBIQUITINA-PROTEASSOMA (*UBE2T*, *UBE2O*,
USP7 E *USP15*) NA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES COM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior.

FORTALEZA
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C325e Carvalho, Luiz Gustavo Almeida de.
Expressão de alvos da via ubiquitina-proteassoma (UBE2T, UBE2O, USP7 e USP15) na estratificação prognóstica de pacientes com síndrome mielodisplásica / Luiz Gustavo Almeida de Carvalho. – 2022.
103 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior.
1. Ubiquitina. 2. Ubiquitinação. 3. Expressão Gênica. 4. Síndromes Mielodisplásicas. I. Título.
CDD 610
-

LUIZ GUSTAVO ALMEIDA DE CARVALHO

EXPRESSÃO DE ALVOS DA VIA UBIQUITINA-PROTEASSOMA (*UBE2T*, *UBE2O*,
USP7 E *USP15*) NA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES COM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Translacional.

Aprovada em: 10/10/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luiz Ivando Pires Ferreira Filho (Avaliador)
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Profa. Dra. Tatiana Takahasi Komoto (Avaliadora)
Hospital de Câncer de Barretos

Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado (Avaliadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho a minha família, em especial a minha mãe Veralúcia e meu pai José, que sempre incentivaram e contribuíram com a minha formação.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro fundamental no desenvolvimento da pesquisa, através dos recursos providos da Chamada MCTIC/CNPq N°28/2018.

Ao meu orientador Howard, que me acolheu, me ensinou o pensamento crítico, me incentivou a crescer cada vez mais, me apoiou em todas as etapas da minha pós-graduação, até mesmo nos momentos de conflitos pessoais, sendo compreensivo e amigo. A você deixo meus sinceros agradecimentos!

Ao Dr. Ronald Pinheiro, pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Citogenômica do Câncer, o qual foi porta de entrada na pós-graduação e por transmitir riquíssimos conhecimentos e aprendizados em Hematologia, Genética e Citogenética.

Aos pacientes diagnosticados com Síndrome Mielodisplásica, que contribuem para o avanço do conhecimento da doença ao doarem suas amostras para nossos estudos e pesquisas, ajudando outras pessoas no futuro.

Ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, com todo o suporte estrutural e tecnológico de fundamental importância no desenvolvimento desse projeto, em especial ao Laboratório de Citogenômica do Câncer, lugar onde fui bem recebido, adquirir conhecimento e apoio na execução deste trabalho.

Aos alunos e funcionários que passaram pelo laboratório e marcaram positivamente minha trajetória (João Vitor, Roberta, Mayara, Manu, Letícia, Lara, Ramon, Dani, Vitor, Marília, Cris, Matheus, Thayres, Vanessa, Izabelle, Gabriel, Sharlene e outros), obrigado por todo apoio e ajuda. Minha gratidão a todos!

Aos professores e colegas da Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará, por contribuírem com seus conhecimentos na formação do senso crítico e científico.

À Ludilene, pelos inúmeros auxílios e esclarecimentos junto a secretaria do programa.

Aos membros da banca de qualificação do mestrado (Daniel Moreno e Orleânio de Azevedo) e de defesa (Luiz Ivando Ferreira Filho, Tatiana Komoto e Cristiana Furtado) por sua contribuição científica, com sugestões importantes quanto ao desenvolvimento e melhoria desse trabalho.

À toda minha família, em especial a minha meus pais, Vera e Zequinha, que sempre me incentivaram a estudar e seguir os meus sonhos, me forneceram todas as condições necessárias

para que eu conseguisse chegar mais longe, mesmo com todas as dificuldades, e sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, mesmo que à distância.

Aos meus irmãos, Carlos Augusto e Luís Carlos, que de forma direta ou indireta contribuíram e apoiaram no processo da minha formação.

À minha amiga e companheira Mariela que esteve ao meu lado me incentivando, ouvindo, ajudando a pensar, compartilhando conhecimentos e muito além disso, me apoiando com paciência e amor.

Aos meus tios maternos, em especial minha tia Mariluce, que sempre me apoiou a buscar meus sonhos e continua torcendo pelas minhas conquistas.

In memoriam ao meu tio Zezinho, que sempre torceu por mim e tenho certeza que está aplaudindo essa conquista lá do céu.

Aos ex-colegas de trabalho do Laboratório Escola de Análises Clínicas da Unichristus - LEAC (Andressa, Nayara, Vlândia, Renata, André, Audrey, Tony, Cláudia e Thiany), que foram e são exemplos para mim e sempre incentivaram a buscar qualificação, continuar na academia e no caminho da docência.

Aos ex-colegas de trabalho do Núcleo Técnico Hospitalar do Ceará – NTHCE do Grupo Hermes Pardini, pelo apoio e incentivo a continuar, mesmo diante de todas as adversidades durante a Pandemia de COVID-19, em especial ao Marcelo, que muitas vezes em nossas conversas, segurou em meu ombro e deu incentivos para seguir em frente.

Enfim, a todos que fizeram parte dessa conquista de alguma forma, direta ou indiretamente, deixo registrado o meu profundo agradecimento!

“Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica esta informação.” (Carl Sagan)

RESUMO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) compreende um grupo de distúrbios hematológicos clonais intimamente associados à presença de instabilidade genômica em células-tronco progenitoras hematopoiéticas, comumente caracterizadas pela presença de alterações cromossômicas e risco aumentado de evolução para Leucemia Mieloide Aguda (LMA). O sistema ubiquitina-proteassoma é um importante sistema proteolítico com papel na regulação de várias funções celulares, como quebra de proteínas intracelulares, controle do ciclo celular, apoptose e reparo de DNA. O papel dos genes de ubiquitinação (*UBE2T* e *UBE2O*) e deubiquitinação (*USP7* e *USP15*) é desconhecido na fisiopatologia da SMD. Neste contexto, buscamos, neste estudo, avaliar o perfil de expressão dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* em relação à patogênese e estratificação clínico-laboratorial e prognóstica da Síndrome Mielodisplásica. Inicialmente, foi realizada uma avaliação *in silico* Pan-Cancer utilizando o banco de dados *Gene Expression Profiling Interactive Analysis* (GEPIA) para fins de predição do perfil de expressão diferencial dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15*, bem como seu papel na sobrevida dos pacientes diagnosticados com doenças onco-hematológicas, com foco na SMD. Posteriormente, validamos estes achados em uma coorte de 72 pacientes brasileiros com SMD e 4 indivíduos controles a fim de investigar o papel da expressão dos referidos genes na patogênese e estratificação prognóstica da SMD. A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (PROPESQ-UFC - nº 35871620.9.0000.5054 / HGF/SUS - nº 35871620.9.3001.5040). Como resultados, a partir do rastreamento Pan-Cancer em 30 tipos diferentes de cânceres no banco de dados GEPIA, identificamos o perfil de expressão diferencial dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* apenas em um tipo de doença onco-hematológica, a LMA, não sendo identificados dados sobre a expressão desses genes no GEPIA para SMD. Em LMA, foi identificado que o gene *UBE2T* teve uma expressão reduzida em pacientes com a doença em relação aos controles. Não foram identificadas diferenças quanto à expressão desses genes e sobrevida em pacientes com LMA. Na avaliação da expressão desses genes na SMD em pacientes brasileiros, identificamos que apenas o gene *USP15* teve expressão reduzida em relação aos indivíduos saudáveis ($p=0,03$). Em relação às variáveis clínicas e laboratoriais da SMD, foi identificado aumento da expressão do gene *UBE2T* em pacientes com anomalias cromossômicas em relação aos pacientes com cariótipo normal ($p=0,0321$). Os genes *USP7* e *USP15* foram positivos e fortemente correlacionados ($r=0,82$; $r^2=0,67$; $p<0,0001$), reforçando a participação destes genes em uma mesma via na SMD. Nossos resultados destacam que a expressão gênica diferencial do eixo *USP15-USP7* e *UBE2T* pode desempenhar um papel importante no controle da instabilidade genômica estabelecendo uma das características mais marcantes na SMD, as anormalidades cromossômicas.

Palavras-chave: Ubiquitina; Ubiquitinação; Expressão Gênica; Síndromes Mielodisplásicas.

ABSTRACT

Myelodysplastic Syndrome (MDS) comprises a group of clonal hematological disorders closely associated with the presence of genomic instability in hematopoietic progenitor stem cells, commonly characterized by the presence of chromosomal alterations and an increased risk of progression to Acute Myeloid Leukemia (AML). The ubiquitin-proteasome system is an important proteolytic system with a role in the regulation of various cellular functions, such as intracellular protein breakdown, cell cycle control, apoptosis and DNA repair. The role of ubiquitination (*UBE2T* and *UBE2O*) and deubiquitination (*USP7* and *USP15*) genes in the pathophysiology of MDS is unknown. In this context, we sought, in this study, to evaluate the expression profile of the *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* and *USP15* genes in relation to the pathogenesis and clinical-laboratory and prognostic stratification of the Myelodysplastic Syndrome. Initially, an in silico Pan-Cancer evaluation was performed using the Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) database to predict the differential expression profile of the *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* and *USP15* genes, as well as their role in the survival of the patients. patients diagnosed with onco-hematological diseases, with a focus on MDS. Subsequently, we validated these findings in a cohort of 72 Brazilian patients with MDS and 4 control subjects in order to investigate the role of the expression of these genes in the pathogenesis and prognostic stratification of MDS. The research was submitted and approved by the Ethics Committee for Research with Human Beings (PROPESQ-UFC - n° 35871620.9.0000.5054 / HGF/SUS - n° 35871620.9.3001.5040). As a result, from Pan-Cancer screening in 30 different types of cancers in the GEPIA database, we identified the differential expression profile of the *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* and *USP15* genes only in one type of onco-hematological disease, AML, data on the expression of these genes in GEPIA for MDS were not identified. In AML, it was identified that the *UBE2T* gene had a reduced expression in patients with the disease compared to controls. No differences were identified regarding the expression of these genes and survival in patients with AML. In evaluating the expression of these genes in MDS in Brazilian patients, we identified that only the *USP15* gene had reduced expression compared to healthy individuals ($p=0.03$). Regarding the clinical and laboratory variables of MDS, an increase in the expression of the *UBE2T* gene was identified in patients with chromosomal abnormalities compared to patients with normal karyotype ($p=0.0321$). The *USP7* and *USP15* genes were positive and strongly correlated ($r=0.82$; $r_2=0.67$; $p<0.0001$), reinforcing the participation of these genes in the same pathway in MDS. Our results highlight that the differential gene expression of the *USP15-USP7* and *UBE2T* axis may play an important role in the control of genomic instability, establishing one of the most striking features in MDS, chromosomal abnormalities.

Keywords: Ubiquitin; Ubiquitination; Gene Expression; Myelodysplastic Syndromes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do Sistema Ubiquitina-Proteassoma no processo de ubiquitinação	18
Figura 2 - Representação do Proteassoma 26S.....	19
Figura 3 - Representação do Sistema Ubiquitina-Proteassoma no mecanismo de desubiquitinação	23
Figura 4 - Representação esquemática do processo de patogênese da Síndrome Mielodisplásica	30
Figura 5 - Representação do desenho experimental do estudo.....	39
Figura 6 - Representação esquemática da Metodologia de Citogenética por Bandeamento-G41	
Figura 7 - Representação esquemática da Metodologia de qRT-PCR	44
Figura 8 - Resultado da análise da estabilidade dos endógenos pela ferramenta RefFinder....	46
Figura 9 - Níveis de expressão do gene UBE2T, UBE2O, USP7 e USP15 em diversos cânceres segundo a ferramenta online GEPIA	50
Figura 10 - Análise de sobrevida e níveis de expressão do gene UBE2T, UBE2O, USP7 e USP15 na LMA, segundo a ferramenta online GEPIA	52
Figura 11 - Representação dos resultados citogenéticos encontrados nos pacientes com SMS a partir de amostras de medula óssea	61
Figura 12 - Heatmap dos níveis de expressão relativa dos genes UBE2T, UBE2O, USP7 e USP15 em pacientes com SMD e indivíduos saudáveis	65
Figura 13 - Nível de expressão dos genes UBE2T, UBE2O, USP7 e USP15 em pacientes com SMD em relação aos controles saudáveis.....	66
Figura 14 - Heatmap da análise de correlação entre os genes UBE2T, UBE2O, USP7 e USP15 e seus níveis de expressão gênica	67
Figura 15 - Análise de correlação entre os genes USP7 e USP15 e seus níveis de expressão gênica por Regressão Linear.....	68
Figura 16 - Nível de expressão dos genes UBE2T, UBE2O, USP7 e USP15 em pacientes com SMD em relação a variável cariótipo normal e alterado	69
Figura 17 -Expressão dos genes UBE2T, UBE2O, USP7 e USP15 em pacientes com SMD em relação aos subtipos categorizados de acordo com a OMS 2016.....	71
Figura 18 - Expressão dos genes UBE2T, UBE2O, USP7 e USP15 em pacientes com SMD em relação aos subtipos categorizados de acordo com a OMS 2022	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da SMD segundo os critérios da OMS 2016.....	32
Tabela 2 - Classificação da SMD segundo os critérios da OMS 2022.....	33
Tabela 3 - Escores de variáveis prognósticas segundo o IPPS-R.....	34
Tabela 4 - Classificação dos subgrupos de prognóstico citogenético (IPPS-R).....	35
Tabela 5 - Categorias e pontuações de risco prognóstico segundo o IPSS-R	35
Tabela 6 - Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR	43
Tabela 7 - Caracterização descritiva das variáveis sociodemográficas dos controles saudáveis	54
Tabela 8 - Características citogenéticas dos controles saudáveis incluídos no estudo.....	54
Tabela 9 - Caracterização descritiva das variáveis sociodemográficas dos pacientes com SMD	55
Tabela 10 - Estratificação clínica dos pacientes com SMD segundo a classificação da OMS (2016)	55
Tabela 11 - Estratificação clínica dos pacientes com SMD segundo a classificação da OMS (2022)	56
Tabela 12 - Frequência das variáveis clínicas relacionadas aos achados da medula óssea em pacientes com SMD.....	57
Tabela 13 - Variáveis clínico-laboratoriais relacionadas aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD.....	58
Tabela 14 - Variáveis clínico-laboratoriais categorizada aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD.....	58
Tabela 15 - Classificação de risco de pacientes com SMD de acordo com o IPSS-R	59
Tabela 16 - Frequência dos resultados citogenéticos e seu impacto prognóstico em pacientes com SMD ao diagnóstico	60
Tabela 17 - Características citogenéticas e classificação clínica dos pacientes com SMD incluídos no estudo	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	Beta Actina
AF	Anemia de Fanconi
ANC	Contagem absoluta de neutrófilos
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
ATP	Adenosina trifosfato
BARD1	Proteína 1 do domínio RING associada ao BRCA1
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
Cq	Quantification cycle
DDR	Resposta ao dano do DNA
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNMT1	DNA-metiltransferase 1
DSBs	Quebras de fita dupla de DNA
DUB	Enzima desubiquitinante
FAB	Classificação de Leucemia do Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico
FUS	Fundido no sarcoma
FUS	Fundido no sarcoma
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GEPIA	Gene Expression Profiling Interactive Analysis
HAUSP	Protease associada ao vírus Herpes
HB	Hemoglobina
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1
HR	Recombinação homóloga
HSCs	Células-tronco hematopoiéticas
IPSS	Sistema Internacional de Pontuação Prognóstica
IPSS-M	Sistema Internacional de Pontuação Prognóstica Molecular
IPSS-R	Sistema Internacional de Pontuação Prognóstica Revisado
KCL	Cloreto de potássio
KEAP1	Proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLA-T	Leucemia Linfocítica de células T
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
MDM2	Murino duplo minuto 2
MLL	Leucemia de linhagem mista

MM	Mieloma múltiplo
MO	Medula óssea
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NOTCH1	Proteína homóloga de entalhe do locus neurogênico 1
NRF2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP	Polimerase poli ADP-ribose)
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina
RECQL4	DNA helicase dependente de ATP Q4
RH	Recombinação homóloga
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SF3B1	Fator de emenda 3B, subunidade 1
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SMD-AB	SMD com aumento de blastos
SMD-BB	SMD com baixos blastos
SMD-BB e SA	SMD com baixos blastos e sideroblastos em anel
SMD-DM	SMD com displasia multilinhagem
SMD-DU	SMD com displasia unilinhagem
SMD-EB	SMD com excesso de blastos
SMD-SA-DM	SMD com sideroblastos em anel e displasia multilinhagem
SMD-SA-DU	SMD com sideroblastos em anel e displasia unilinhagem
SUS	Sistema Único de Saúde Brasileiro
TCGA	The Cancer Genome Atlas Program
TCLE	Termos de Consentimento Livre e Esclarecido
TIFAB	Domínio B associado a forquilha
UBE2O	Enzima conjugadora de ubiquitina E2 O
UBE2T	Enzima conjugadora de ubiquitina E2T
UPS	Sistema ubiquitina-proteassoma
USP	Protease Específica de Ubiquitina
USP15	Protease ou peptidase 15 específica da ubiquitina
USP7	Protease 7 específica da ubiquitina humana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA	17
<i>1.1.1 Enzima conjugadora de ubiquitina E2T (UBE2T)</i>	<i>20</i>
<i>1.1.2 Enzima conjugadora de ubiquitina E2 O (UBE2O)</i>	<i>21</i>
1.2 MECANISMOS DE DESUBIQUITINAÇÃO	22
<i>1.2.1 Peptidase Específica de Ubiquitina 7 (USP7)</i>	<i>24</i>
<i>1.2.2 Peptidase Específica de Ubiquitina 15 (USP15)</i>	<i>25</i>
1.3 SÍNDROME MIELODISPLÁSICA: UMA DOENÇA DE INSTABILIDADE GENÔMICA	26
1.4 ETIOLOGIA	27
1.5 EPIDEMIOLOGIA	28
1.6 PATOGÊNESE DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA	29
1.7 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA	30
1.8 CLASSIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA	34
1.9 ALTERAÇÕES MOLECULARES E CITOGENÉTICAS	36
1.10 MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS EM PACIENTES COM SMD	37
2 OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3 MATERIAS E MÉTODOS	39
3.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	39
3.2 COLETA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	40
3.3 CARIÓTIPO POR BANDEAMENTO-G	41
3.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR	42
<i>3.4.1 Extração de RNA Total</i>	<i>42</i>
<i>3.4.2 Síntese de cDNA</i>	<i>42</i>
<i>3.4.3 RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)</i>	<i>43</i>
<i>3.4.4 Perfil de expressão gênica in silico usando o banco de dados online GEPIA</i>	<i>46</i>
3.5 VARIÁVEIS ANALISADAS	47
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
<i>3.6.1 Análises Estatísticas para avaliação dos dados de expressão gênica</i>	<i>48</i>
4 RESULTADOS	50

4.1 SCREENING PAN-CÂNCER DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES <i>UBE2T</i>, <i>UBE2O</i>, <i>USP7</i> E <i>USP15</i> UTILIZANDO A FERRAMENTA ONLINE GEPIA	50
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES DA COORTE EM ESTUDO E CONTROLES	53
4.3 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICA POR BANDEAMENTO G EM PACIENTES COM SMD.....	59
4.4 VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR QRT-PCR EM AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES BRASILEIROS COM SMD.....	65
4.4.1 Expressão gênica dos genes <i>UBE2T</i>, <i>UBE2O</i>, <i>USP7</i> e <i>USP15</i> em pacientes com SMD e indivíduos saudáveis	65
4.4.2 Achados Citogenéticos	68
4.4.3 Expressão gênica em relação às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD	70
4.4.3.1 Achados de sangue periférico	70
4.4.3.2 Achados na Medula Óssea	70
4.4.4 Expressão gênica em relação a classificação clínica e estratificação prognóstica dos pacientes com SMD.	70
4.4.4.1 Classificação OMS 2016	70
4.4.4.2 Classificação OMS 2022	72
4.4.4.3 Classificação dos Grupos de Risco de acordo com o IPSS-R.....	73
5 DISCUSSÃO	74
6 CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICES	92
APÊNDICE A – ESTRATIFICAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE AS EXPRESSÕES DA <i>UBE2T</i>, <i>UBE2O</i>, <i>USP7</i> E <i>USP15</i> FRENTE A ASSOCIAÇÃO CASO X CONTROLE E EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM SMD.	92
ANEXOS	97
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (UFC).	97
ANEXO B – PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO HOSPITAL GERAL DE FORTALEZA (HGF).....	98
ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).	99

ANEXO D – ARTIGO ROLE OF SIRTUINS IN THE PATHOBIOLOGY OF ONCO-HEMATOLOGICAL DISEASES: A PROSPERO-REGISTERED STUDY AND IN SILICO ANALYSIS – PUBLICADO NA REVISTA CANCERS.....	100
ANEXO E – ARTIGO CLINICAL COMPLICATIONS OF IRON OVERLOAD IN PATIENTS WITH MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME: A LITERATURE REVIEW – PUBLICADO NO PERIÓDICO BRAZILIAN JOURNAL OF CASE REPORTS..	101
ANEXO F – RESULTADO DA PESQUISA APRESENTADOS NO CONGRESSO INTERNACIONAL <i>NEXT FRONTIERS TO CURE CANCER</i> 2022 DO A.C. CAMARGO CANCER CENTER.....	102
ANEXO G – CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO NO CONGRESSO INTERNACIONAL <i>NEXT FRONTIERS TO CURE CANCER</i> 2022 DO A.C. CAMARGO CANCER CENTER.....	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Ubiquitina-Proteassoma

O sistema ubiquitina-proteassoma (da sigla em inglês, UPS) é um importante sistema proteolítico não lisossômico, que desempenha um papel importante na regulação das funções celulares de eucariotos de duas maneiras principais, atuando como componente de uma via catabólica que regula a quebra intracelular de proteínas, e também como uma via não proteolítica que regula a localização e atividade de diversas proteínas celulares, incluindo o ciclo celular, apoptose, diferenciação, reparo do DNA, modificação de histonas, dentre outras funções biológicas e epigenéticas (MA *et al.*, 2011; ULLAH *et al.*, 2019).

A ubiquitina é o membro fundador de uma família de proteínas estruturalmente conservadas, que regulam diversos processos nas células eucarióticas, exercendo funções por meio da ligação covalente a outras proteínas celulares, alterando sua estabilidade, localização ou atividade da proteína alvo. Os substratos proteicos são reconhecidos e degradados pelo componente catalítico hoje conhecido como proteassoma 26S (PICKART; EDDINS, 2004; ZHOU; CHEN; CHEN, 2014).

Em 1978, Aaron Ciechanover, Yaacov Hod e Avram Hershko, descobriram que algumas proteínas adicionadas a um extrato de reticulócitos tornavam-se covalentemente combinadas a uma proteína chamada ubiquitina, e que as proteínas ubiquitinadas foram destruídas por uma protease dependente de ATP (adenosina trifosfato) (CIECHANOVER; HOD; RERSHKOL, 1978). Logo mais tarde, o mesmo grupo identificou e caracterizou as enzimas E1, E2 e E3, que realizam a ativação, conjugação e ligação da ubiquitina a proteína, direcionando-a para a sua degradação ou modificação pós-traducional (CIECHANOVER *et al.*, 1982). Diversos avanços ocorreram desde o descobrimento do catabolismo de proteínas através da via da ubiquitina. Atualmente, o sistema ubiquitina-proteassoma é a principal via conhecida de degradação de proteínas intracelulares. Tal importância conferiu a equipe que trabalhou em sua descoberta e o Prêmio Nobel de Química de 2004, destacando a importância fundamental da via (HARRIGAN *et al.*, 2018).

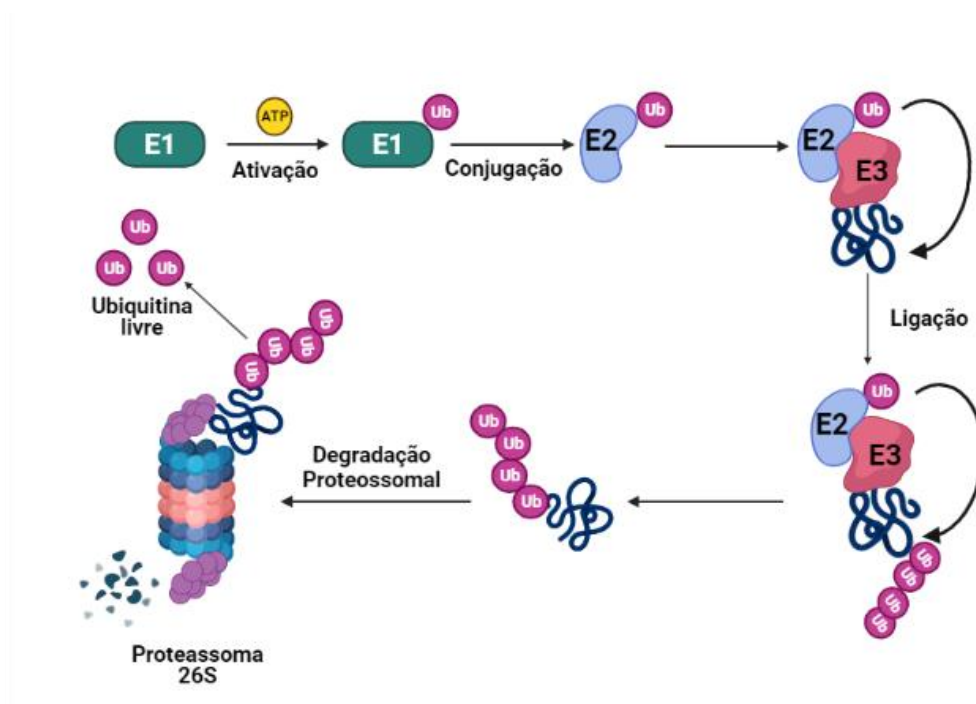
O processamento rápido e preciso de uma vasta extensão de proteínas celulares pelo UPS permite um fino controle das funções celulares críticas como o reparo do DNA, progressão do ciclo celular, apoptose, transcrição gênica, transdução de sinal, senescência, resposta imune, metabolismo e controle de qualidade da proteína. O mau funcionamento deste sistema, pode

resultar em graves alterações celulares e, se persistente, muitas vezes leva à morte celular (NANDI *et al.*, 2006).

A ubiquitina é um polipeptídeo composto por 76 aminoácidos pertencente a uma família de proteínas que exibem estruturas notavelmente semelhantes, mas sequências variáveis. A ubiquitina pode ser conjugada covalentemente com substratos proteicos através de um mecanismo envolvendo três enzimas: ativadora de ubiquitina (E1), conjugada com ubiquitina (E2) e ubiquitina ligase (E3), resultando em uma ligação isopeptídica entre o terminal C da ubiquitina e uma lisina específica em uma proteína alvo. A ubiquitinação de um substrato proteico específico requer o recrutamento seletivo de E1, E2 e E3 (PICKART; EDDINS, 2004; SUN *et al.*, 2019; ULLAH *et al.*, 2019).

Curiosamente, a ubiquitina só está presente nos seres eucariotos, já que procariontes não possuem molécula funcionalmente equivalente à ubiquitina. Ou seja, não existe uma proteína procariótica (conhecida) que atue como um sinal por meio da ligação covalente a outra proteína (PICKART; EDDINS, 2004).

Figura 1 - Representação do Sistema Ubiquitina-Proteassoma no processo de ubiquitinação



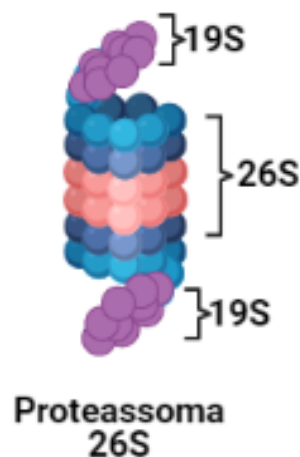
Fonte: Elaborada pelo autor através da ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

Legenda: E1 ativa o terminal C da ubiquitina de uma maneira dependente de ATP e carrega a ubiquitina em uma cisteína catalítica conservada dentro de E2. Posteriormente, E3 pode então se associar com E2 e Ub para catalisar a ubiquitinação de alvos de substrato, assim realizando a mono ou poliubiquitinação. Esse complexo será reconhecido pelo proteassoma 26S e o substrato proteico catabolizado e as enzimas e moléculas de Ub reciclados no final do ciclo.

As proteínas alvo degradadas e/ou modificadas estão envolvidas em vias importantes, como a regulação da endocitose, direcionamento lisossômico, remodelação da meiose e cromatina, direcionamento de proteínas modificadas para degradação proteassomal, sinalização imune e reparo de DNA, além de participar da regulação da proliferação celular (ZHOU; CHEN; CHEN, 2014). Além disso, proteínas danificadas, mal dobradas ou mal montadas, que podem ser danosas à célula, também são degradadas (CORN, 2007).

O proteassoma 26S é um complexo catalítico dependente de ATP, que degrada proteínas modificadas pela ubiquitina, e é composto por duas estruturas reguladoras 19S e um núcleo central 20S com três diferentes sítios ativos ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$), responsáveis pelas atividades enzimáticas do tipo caspase (Cas-L), tripsina (Tr-L) e quimotripsina (Ch-L), respectivamente, assim, essas enzimas são responsáveis pela digestão de proteínas marcadas para serem degradadas (Figura 2) (MA *et al.*, 2011; SAAVEDRA-GARCIA; MARTINI; AUNER, 2019).

Figura 2 - Representação do Proteassoma 26S



Fonte: Elaborada pelo autor através da ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

Legenda: Proteassoma 26S e suas três diferentes sítios ativos.

A ubiquitinação é um processo responsável pela modificação pós-tradução, onde regula várias funções celulares, principalmente o catabolismo de proteínas, possuindo um papel crucial no desenvolvimento de diversas doenças como o câncer, por exemplo (SUN *et al.*, 2019; VOITSADAKIS, 2013). As funções celulares da ubiquitinação compreendem uma gama de funções proteolíticas e não proteolíticas, como degradação proteassomal de proteínas, internalização e regulação negativa de receptor, montagem de complexos proteicos, trânsito intracelular, sinalização inflamatória, autofagia, reparo de DNA e regulação da atividade enzimática (POPOVIC; VUCIC; DIKIC, 2014). Assim, a sua desregulação pode acarretar em

múltiplas consequências, como a ativação ou desativação de vias importantes, envolvidas no metabolismo celular e até mesmo as vias relacionadas a oncogenes, sendo prejudicial ao funcionamento celular (POPOVIC; VUCIC; DIKIC, 2014).

Portanto, proteínas associadas ao câncer, incluindo supressores de tumores como P53 e P27, podem ser reguladas pelo sistema de ubiquitinação (ZHOU; CHEN; CHEN, 2014). De tal modo, a ubiquitinação é um procedimento de modificação pós-tradução que regula várias funções celulares e desempenha um papel crucial no desenvolvimento do câncer (SUN *et al.*, 2019; VOUSADAKIS, 2013). As proteínas alvo degradadas e/ou modificadas estão envolvidas em vias importantes, como a regulação da endocitose, direcionamento lisossômico, remodelação da meiose e cromatina, direcionamento de proteínas modificadas para degradação proteassomal, sinalização imune e reparo de DNA, além de participar da regulação da proliferação celular (ZHOU; CHEN; CHEN, 2014).

1.1.1 Enzima conjugadora de ubiquitina E2T (UBE2T)

As enzimas E2 estão presentes em todos os eucariotos e os genes que codificam as proteínas E2 estão espalhados por todo o genoma. Nos seres humanos 35 enzimas E2 são descritas, e a maioria são expressas de forma ubíqua, indicando um envolvimento geral dessas enzimas na conjugação da ubiquitina. Essas atuam via interações seletivas proteína-proteína com as enzimas E1 e E3 e conectam a ativação à modificação covalente aos substratos proteicos (WIJK; TIMMERS, 2010).

A Enzima conjugadora de ubiquitina E2T (*UBE2T*), também conhecida como *HSPC150*, pertence à família de enzimas de conjugação de ubiquitina (E2), identificada inicialmente como um importante elemento na via da anemia de Fanconi (AF), onde liga-se ao FANCL, uma E3 ubiquitina ligase, mediando a monoubiquitinação de FANCD2 (uma etapa fundamental na via de danos ao DNA), proteína que está envolvida no reparo de DNA na via da AF. A *UBE2T* participa da monoubiquitinação de FANCD2, processo fundamental para o reparo de danos ao DNA, conferindo a manutenção da estabilidade cromossômica, onde falhas nesse processo resulta em aberrações cromossômicas, característica conhecida nas células AF (MACHIDA *et al.*, 2006).

Os níveis de expressão de gênica e proteica de *UBE2T* são associados a diversos tipos de cânceres e doenças. Em pacientes com carcinoma hepatocelular, os níveis elevados de expressão de *UBE2T*, funciona como um oncogene, promovendo o desenvolvimento celular através do aumento da ubiquitinação de p53. Ainda foi observado que pacientes com aumento

na expressão de UBE2T, tiveram maior invasão tumoral (LIU *et al.*, 2017). Por outro lado, a supressão de UBE2T, resulta no aumento da fase G2/M e diminuição de células na fase G1, indicando parada do ciclo celular na fase G2/M (LIU *et al.*, 2019).

Também, no mieloma múltiplo (MM), quando expressa em elevados níveis, provoca o aumento da proliferação celular e o mau prognóstico, diminuição da sobrevida e recaídas dos pacientes (ZHANG *et al.*, 2019). No câncer de bexiga, o UBE2T encontra-se com elevada expressão, no entanto, o seu silenciamento suprime a proliferação celular, induzindo a parada do ciclo celular e a apoptose (GONG *et al.*, 2016). A expressão de UBE2T é aumentada em tecido de tumores gástricos, e a expressão do mRNA em células de câncer gástrico também é elevada e correlacionada positivamente com o grau de malignidade. A supressão do UBE2T levou a parada do ciclo celular em G2/M, desencadeando a apoptose nas células cancerosas, assim inibindo a progressão do tumor (LUO *et al.*, 2017). Entretanto, a sua expressão em células mononucleares do sangue periférico normais é indetectável a nível de RNA mensageiro e de proteína, porém, é altamente expressa em todas as linhagens de células MM examinadas, assim como 25% dos pacientes continham mais de 2 cópias do gene, associadas à baixa sobrevida dos pacientes (ALAGPULINSA *et al.*, 2019).

1.1.2 Enzima conjugadora de ubiquitina E2 O (UBE2O)

A enzima conjugadora de ubiquitina E2 O (UBE2O) é uma enzima híbrida, possuindo atividades E2 e E3, podendo realizar a ubiquitinação de proteínas de maneira independente de E3 (ULLAH *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2017). Desse modo, *UBE2O* possui um papel importante em diversos cancres. No mieloma múltiplo, a *UBE2O* aumentou a poliubiquitinação e a degradação de c-Maf (um fator de transcrição expresso em MM), inibindo o crescimento e promove a apoptose de células do MM. O *UBE2O* foi expresso em indivíduos saudáveis, porém, diminuiu significativamente nos pacientes com mieloma. Dessa forma sendo exposto como um supressor de tumor contra MM. Todavia, falhou em induzir apoptose de células MM sem c-Maf (XU *et al.*, 2017).

Além disso, o aumento de UBE2O induz à proliferação de células de câncer de mama e próstata, promovendo a ubiquitinação e degradação de AMPK α 2. Porém, sua inibição ou perda levou a redução do crescimento celular e a inativação de AMPK α 2, anulando o efeito positivo da sua perda, demonstrando a influência da ubiquitinação de AMPK α 2 mediada por UBE2O no crescimento de células tumorais (ULLAH *et al.*, 2019; VILA *et al.*, 2017). Ainda, pacientes

com alta expressão de UBE2O tendem a ter um alto risco de metástase e mau prognóstico no câncer de mama (LIU *et al.*, 2020).

Na leucemia de linhagem mista a depleção de UBE2O diminui a proliferação de células leucêmicas devido à reduzida ubiquitinação e degradação da proteína MLL do tipo selvagem e sua consequente maior estabilidade (LIANG *et al.*, 2017). Em modelo animal, camundongos com deficiência de UBE2O exibiram anemia hipocrômica e diminuição da ocupação de ribossomos dos genes da globina. Assim, como a perda de UBE2O melhorou consequentemente os fenótipos atribuíveis ao excesso de α -globina, como visto em um modelo de β -talassemia (NGUYEN *et al.*, 2017). Portanto, a UBE2O é, um potencial alvo terapêutico, para leucemia de linhagem mista e outros cânceres (LIANG *et al.*, 2017; VILA *et al.*, 2017), como também para a β -talassemia (NGUYEN *et al.*, 2017).

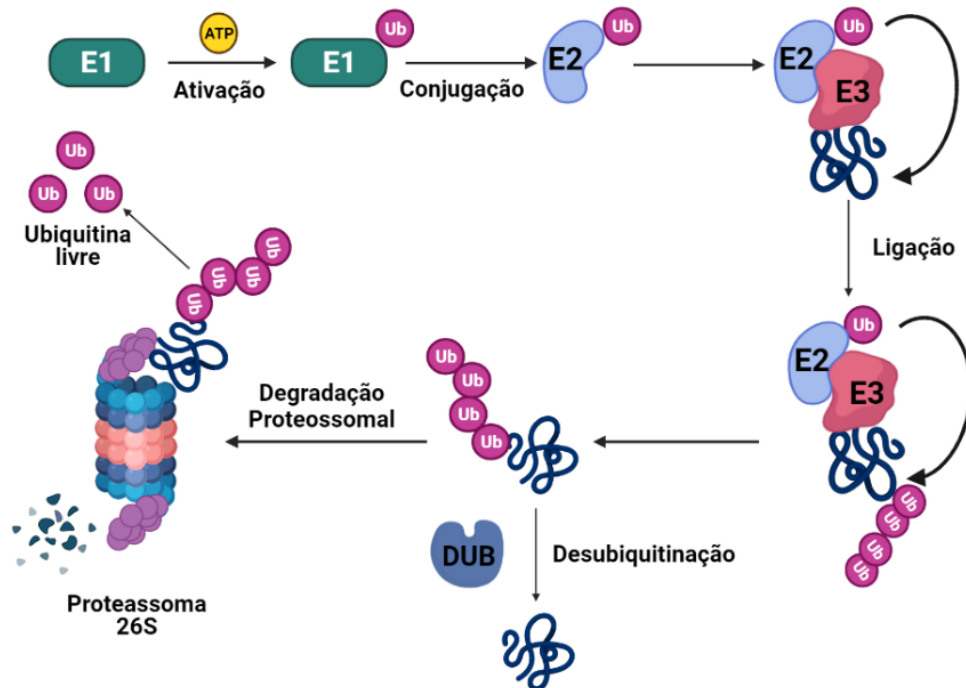
Recentemente, foi demonstrado que o *UBE2O* interage fisicamente com RECQL4 (DNA helicase dependente de ATP Q4) e medeia a sua multi-monoubiquitinação, posteriormente levando à sua degradação proteassomal. Desse modo, UBE2O inibe o reparo de quebras de fita dupla do DNA (DSBs) mediado por recombinação homóloga (HR), e essa inibição depende de sua atividade catalítica E2 e expressão de RECQL4 (HUANG *et al.*, 2022).

Ainda, UBE2O atenua a interação de RECQL4 e proteínas de reparo de danos no DNA. Ainda, além disso, *USP7* interage com UBE2O e RECQL4 e antagoniza a regulação mediada por UBE2O da estabilidade e função de RECQL4. A RECQL4 desempenha um papel fundamental na manutenção da estabilidade genômica, regulando a via de reparo das quebras de fita dupla do DNA e, portanto, está envolvida na regulação do envelhecimento e no aparecimento do câncer (HUANG *et al.*, 2022).

1.2 Mecanismos de desubiquitinação

Conforme reportado, os mecanismos de ubiquitinação são fundamentais para a homeostase dos organismos, bem como sua desregulação está envolvida com o desenvolvimento de cânceres. Porém, esse processo de marcação de proteínas para posterior modificação é reversível por reações catalisadas por várias famílias distintas de enzimas deubiquitinantes (da sigla em inglês, DUBs), que também possuem papel importante no desenvolvimento de neoplasias (SUN *et al.*, 2019).

Figura 3 - Representação do Sistema Ubiquitina-Proteassoma no mecanismo de desubiquitinação



Elaborada pelo autor através da ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

Legenda: E1 ativa o terminal C da ubiquitina de uma maneira dependente de ATP e carrega a ubiquitina em uma cisteína catalítica conservada dentro de E2. Posteriormente, E3 pode então se associar com E2 e Ub para catalisar a ubiquitinação de alvos de substrato, assim realizando a mono ou poliubiquitinação. Antes do complexo ser reconhecido pelo proteassoma 26S as enzimas DUBs (enzimas desubiquitinantes) clivam a ligação do complexo ubiquitina-proteína liberando a proteína alvo da degradação pelo proteassoma 26S.

As enzimas desubiquitinantes, são uma família de isopeptidases que desempenham um papel inverso da ubiquitinação, eliminando os marcadores ou cadeias de ubiquitina das proteínas alvo, processo importante na homeostase, estabilização e degradação de proteínas e nas vias de transdução de sinal, e nos seres humanos (ULLAH *et al.*, 2019). Existe um crescente reconhecimento de DUBs que são mutados em cânceres humanos, sugerindo seu papel como oncogenes e supressores de tumores (HUSSAIN; ZHANG; GALARDY, 2009).

Os processos relacionados a desubiquitinação também possui importante papel quando se fala em processos patológicos e neoplásicos. Sendo algumas desse enzimas consideradas necessárias para a atividade completa do ponto de verificação mitótico em células humanas, ao estabilizar os níveis de mRNA da quinase mitótica aurora B que é essencial para reparar ligações ineficazes entre os cromossomos e o fuso mitótico (HUSSAIN; ZHANG; GALARDY, 2009; VAN LEUKEN *et al.*, 2008).

Mutações genéticas evidenciaram que a regulação positiva de deubiquitinases da família USP em vários tipos de câncer, tornando-a alvo de estudos, e indicando USPs como alvos terapêuticos promissores (SUN *et al.*, 2019), já que possuem papéis fisiológicos importantes no

controle da estabilidade e a qualidade da proteína, manutenção e regulação da homeostase da ubiquitina e vários eventos celulares, como ciclo celular, resposta a danos no DNA, sinalização inflamatória e morte celular (PARK *et al.*, 2019).

1.2.1 Peptidase Específica de Ubiquitina 7 (USP7)

A protease 7 específica da ubiquitina humana (*USP7*) também conhecida como protease associada ao vírus Herpes (*HAUSP*) é uma cisteína peptidase que pertence à maior família de DUBs, a família USP. Possuindo sua localização principalmente no núcleo das células, a *USP7* regula a estabilidade de várias proteínas envolvidas em diversos processos celulares, incluindo resposta a danos no DNA, transcrição, controle epigenético da expressão gênica, resposta imune e infecção viral (POZHIDAEVA; BEZSONOVA, 2019). Visto o envolvimento de *USP7* em múltiplas vias celulares, sua expressão é frequentemente desregulada em malignidades humanas. A superexpressão de *USP7* contribui para a progressão do tumor por meio de alterações na resposta ao dano do DNA, apoptose e controle do ciclo celular. Em particular, *USP7* possui expressão aumentada na leucemia linfocítica crônica (CARRÀ *et al.*, 2017).

A *USP7* é uma enzima que medeia a desubiquitinação de diversas proteínas, incluindo supressores de tumores como, PTEN, p53 e modificadores epigenéticos como DNMT1, UHRF1, BMI1 e MEL18 (ELETR; WILKINSON, 2014). Portanto, é considerada um oncogene, promovendo o crescimento tumoral e afetando negativamente a resposta imune a tumores (WANG *et al.*, 2019). Bem como a deficiência de *USP7* prejudica a diferenciação eritroide humana devido à redução de proteína GATA1, interagindo diretamente e catalisando a remoção de cadeias de poliubiquitinação no GATA1, regulando a estabilidade da proteína GATA1, essencial na eritropoiese (LIANG *et al.*, 2019).

O fator epigenético c está sujeito à ubiquitinação por K351 e consequente degradação, porém, a interação com a enzima *USP7* gera sua estabilidade (INOUE *et al.*, 2015). Além disso, na Leucemia Linfocide Aguda (LLA), a depleção de *USP7* suprimiu a proliferação de células LLA-T in vitro e in vivo, seguida de regulação negativa do nível da proteína NOTCH1. Da mesma forma, a inibição farmacológica do *USP7* levou à apoptose das células LLA-T (SHAN *et al.*, 2018). Sugerindo que inibição da *USP7* pode ser uma estratégia terapêutica na leucemia agressiva (JIN *et al.*, 2019).

Um inibidor da enzima desubiquitilante *USP7*, denominado P5091 é apontado como um potencial tratamento do mieloma múltiplo, e segundo estudo preliminar supera a resistência ao bortezomibe (CHAUHAN *et al.*, 2012). Outros trabalhos mostram resultados promissores em

cânceres de ovário, provocando a morte celular mesmo com P53 normal e mutado, se mostrando como um estabilizador do P53 e supressor tumoral (WANG *et al.*, 2017).

Em suma, o USP7 desempenha um papel importante em uma variedade de patologias, sendo bom alvo do ponto de vista terapêutico e de inibidores, por seu papel nas vias celulares, reguladores de proteínas virais, resposta imune, oncogenes e danos ao DNA, bem como, devido a sua expressão aberrante em vários tipos de câncer (WANG *et al.*, 2019).

1.2.2 Peptidase Específica de Ubiquitina 15 (USP15)

A protease ou peptidase 15 específica da ubiquitina (*USP15*) é uma DUB membro da família *USP* que participa de diversos processos celulares biológicos e regula a tumorigênese, sendo relatada como envolvido na regulação de vários cânceres e doenças, sugerindo que *USP15* pode atuar como um oncogene e um supressor de tumor em diferentes contextos, sendo inclusive muito discutida como um alvo terapêutico atraente (LI *et al.*, 2022). Descoberta em 1999, possui 952 aminoácidos com uma massa molecular de 109,2 kDa e o gene *USP15* humano está localizado no cromossomo 12q14.1 (BAKER *et al.*, 1999). A *USP15* está envolvida em vários processos celulares, como proliferação celular, apoptose, autofagia, ciclo celular, invasão celular, integridade do genoma, regulação da transcrição, resposta imune, dentre outro (LI *et al.*, 2022).

Os DUBs são essenciais na preservação da hematopoiese normal, e *USP15* é altamente expresso em tecidos hematopoiéticos humanos e em leucemias e sua depleção em progenitores murinos e em células de leucemia prejudica a expansão *in vitro* e aumenta o estresse genotóxico. Nas células leucêmicas, o *USP15* interage e estabiliza o FUS (fundido no sarcoma), um fator de reparo de DNA conhecido e essencial na promoção do crescimento celular, ligando diretamente o *USP15* à resposta ao dano do DNA (DDR), assim *USP15* é relatado como um DUB crítico na proteção da integridade do genoma em células tronco hematopoiéticas e em células de leucemia, possuindo um importante papel da na preservação de todas as principais vias de diferenciação hematopoiética (VAN DEN BERK *et al.*, 2020).

Por outro lado, outros estudos relatam que *USP15* é dispensável para células hematopoiéticas normais de humanos e camundongos *in vitro* e *in vivo*. E por ser altamente expressão na leucemia mieloide aguda, *USP15* se tornou discussão de um possível alvo terapêutico. Um inibidor pré-clínico de pequenas moléculas de *USP15* induziu o eixo KEAP1-NRF2 e prejudicou a função das células LMA, sugerindo que o direcionamento da função catalítica *USP15* pode suprimir a LMA, desse modo a inibição da atividade de *USP15* com

inibidores de moléculas pequenas prejudicaria seletivamente as células progenitoras leucêmicas reativando as respostas oxirredução homeostáticas enquanto poupa a hematopoiese normal (NIEDERKORN *et al.*, 2022).

Ainda, a USP15 possui papel importante na resposta ao dano ao DNA, principalmente na recombinação homóloga. Em camundongos knockout *USP15* exibem instabilidade genômica *in vivo*. Além disso, mutações em *USP15* são associadas ao câncer, com interação USP15-BARD1 diminuída, aumentando a sensibilidade ao inibidor de PARP (Polimerase poli ADP-ribose) em células cancerosas. Assim, *USP15* é relatado como um novo regulador de RH, que é um potencial biomarcador para tratamento terapêutico usando inibidores de PARP em cânceres. *USP15* regula o reparo de recombinação homóloga e a resposta das células cancerígenas aos inibidores de PARP (PENG *et al.*, 2019).

A expressão de USP15 é regulada positivamente em uma variedade de cânceres, incluindo glioblastoma, câncer de mama (EICHHORN *et al.*, 2012), câncer de ovário (PADMANABHAN *et al.*, 2018), mieloma múltiplo (ZHOU *et al.*, 2018), leucemia mieloide crônica (VAN DEN BERK *et al.*, 2020), dentre outros. Desse modo, as funções biológicas complexas e diversas indicam que a *USP15* precisa ser estudado de forma mais abrangente. Não há relatos na literatura sobre a expressão de *USP15* na Síndrome Mielodisplásica (SMD).

1.3 Síndrome Mielodisplásica: uma doença de instabilidade genômica

A Síndrome Mielodisplásica consiste em um grupo heterogêneo de desordens hematológicas clonais caracterizadas pelo comprometimento da função da medula óssea (MO), hematopoese ineficaz causando citopenias periféricas crônica e progressiva, displasia celular e anormalidades funcionais das células sanguíneas, além do risco aumentado de progressão para Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (GATTERMANN; RACHMILEWITZ, 2011; OSCIER, 1997; STEENSMA, 2015).

Sua manifestação clínica cursa com o aparecimento de citopenias periféricas, e paralelamente pode apresentar complicações resultantes das mesmas, incluindo infecções e sangramentos. Além disso, a SMD também é caracterizada por um risco considerável de progressão para LMA (ARBER *et al.*, 2016), onde ocorre em cerca de 30% dos pacientes com SMD (MENSSEN; WALTER, 2020).

É uma enfermidade que apresenta uma grande heterogeneidade clínica, podendo se desenvolver como uma doença estável, levando de 10 ou mais anos até a morte, ou como em

alguns casos demorando somente alguns meses, devido a complicações relacionadas as citopenias ou transformação leucêmica (BELLI *et al.*, 2015).

Devido à presença marcante de citopenias periféricas, a maioria dos pacientes com SMD necessitam de suporte transfusional, sendo a anemia é a principal entre os pacientes com SMD, onde mais de 90% dos mesmos sofrem com essa citopenia e cerca de 50 a 60% dos pacientes apresentam anemia grave, assim, todos os pacientes com SMD provavelmente receberão transfusões de hemácias em algum momento de suas vidas e, em cerca de 40% dos casos, esta é a única opção terapêutica que pode ser oferecida (MALCOVATI, 2007). Desse modo, a anemia e a necessidade de transfusão estabelecem grandes problemas para os pacientes com SMD e estão associadas à redução da qualidade de vida e sobrevida e aumento do risco de transformação para LMA (HELLSTRÖM-LINDBERG; VAN DE LOOSDRECHT, 2013).

1.4 Etiologia

A etiologia da SMD pode ser primária, surgindo sem uma origem definida, que ocorre sem uma história conhecida de terapia citotóxica ou radioterapia, ou secundária, com a manifestação após exposições a terapias (SMD-t, ou SMD relaciona à terapia) com agentes quimioterápicos, radioterápicos ou transplantes autólogos. Cerca de 85% a 90% dos casos de SMD são idiopáticos e derivam de lesão nas células-tronco hematopoiéticas relacionadas ao envelhecimento. A SMD secundária representa 10% a 15% dos casos, embora seja mais grave, incluindo cariótipo complexo (3 anormalidades cromossômicas adquiridas), anormalidades nos cromossomos 5 e 7 e mutação no TP53 (QIAN *et al.*, 2010; STEENSMA, 2015).

Agentes exógenos lesivos ao DNA, como alquilantes de DNA, por exemplo a ciclofosfamida e melfalano, inibidores da topoisomerase II, como o etoposídeo, radiação ionizante e hidrocarbonetos voláteis, principalmente o benzeno, podem induzir a SMD (STEENSMA, 2015). Diversos estudos já demonstraram indícios de que a exposição a agentes químicos como derivados do benzeno, agrotóxicos e pesticidas podem estar diretamente relacionados ao desenvolvimento da SMD. Trabalhadores ruais expostos a esses agentes possuem uma alta taxa de anomalias cromossômicas e diminuição na expressão de genes de reparo de DNA, fatores críticos na manutenção do genoma. Portanto, a instabilidade no genoma é um fator crucial para o desenvolvimento do câncer e também da SMD (COSTA *et al.*, 2021).

1.5 Epidemiologia

A SMD caracteriza-se como uma doença predominantemente de idosos, embora possa ocorrer em qualquer idade. Cerca de 75% dos pacientes com SMD têm mais de 60 anos ao diagnóstico, e a taxa de incidência dobra a cada década após os 40 anos de idade (GREENBERG *et al.*, 2012; OSCIER, 1997). No Brasil a média de idade ao diagnóstico é de 68 anos (BELLI *et al.*, 2015).

Ocorre principalmente em pacientes idosos, com idade mediana de cerca de 70 anos, e sua incidência é de 4 a 5 casos por 100.000 pessoas ao ano, sendo que a verdadeira incidência tende a ser maior devido à avaliação incompleta de casos e subnotificação de MDS em registros de câncer, podendo esse número chegar próximo a 75 por 100.000 entre pessoas com idade acima de 70 anos (GARCIA-MANERO; CHIEN; MONTALBAN-BRAVO, 2020). Segundo um levantamento de dados, em 1973 haviam menos de 150 casos relatados de pacientes com diagnóstico de SMD no mundo (SAARNI; LINMAN, 1973).

Estima-se que anualmente haja uma incidência de 10.000 a 12.000 novos casos de SMD nos Estados Unidos, segundo o Programa de Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais do Instituto Nacional do Câncer dos EUA. Contudo, análises de reivindicações do Medicare (seguro de saúde gerido pelo governo) em conjunto com os dados mencionados acima, a incidência de casos de SMD pode chegar de 30.000 a 40.000 novos casos por ano, número bem maior que a incidência de LMA no país (STEENSMA, 2015).

O fato de existir a necessidade de uma avaliação da medula óssea para confirmar o diagnóstico de SMD tem sido historicamente um desafio, pois na visão de muitos se trata de um procedimento invasivo e às vezes improvável de alterar os planos terapêuticos em pacientes mais idosos e frágeis, deixando muita das vezes casos não classificados e até mesmo subnotificados, informações que podem ter impacto direto nos números (ZEIDAN *et al.*, 2019).

Dados mais recentes do programa SEER (do inglês *Surveillance, Epidemiology, and End Results*), demonstram que a incidência anual de SMD ajustada por idade nos Estados Unidos atingiu o pico de 5,6 casos por 100.000 em 2010, porém, essa taxa diminuiu para 4,1 casos por 100.000 em 2015, onde acredita-se que essa diminuição esteja relacionada à uma melhor classificação da doença (ZEIDAN *et al.*, 2019).

No Brasil, não existem muitos dados epidemiológicos unificados sobre a SMD. Um estudo na América do Sul, tentou retratar o cenário da doença no continente, onde o mesmo trouxe características demográficas, clínicas e evolução de pacientes com SMD, comparando pacientes da Argentina, Brasil e Chile, mas devido à falta de grandes estudos de base

populacional e registros de câncer apoiados por cada governo, a incidência da doença na América do Sul continua sem uma boa documentação (BELLI *et al.*, 2015).

1.6 Patogênese da Síndrome Mielodisplásica

A patogênese da SMD tem início nas células tronco hematopoiética, o qual sofrem várias mutações genéticas, gerando clones anormais. Esses clones anormais têm vantagens sobre as células tronco normais e realizam expansão clonal ao longo do tempo na medula óssea. As células hematopoiéticas geradas a partir de clones anormais são defeituosas em sua proliferação e capacidade de diferenciação, e muitas delas sofrem apoptose durante a diferenciação, tornando esse processo prejudicado (hematopoiese ineficaz), sendo essa uma das principais explicações para a citopenia periférica em pacientes com SMD (NAKAJIMA, 2021).

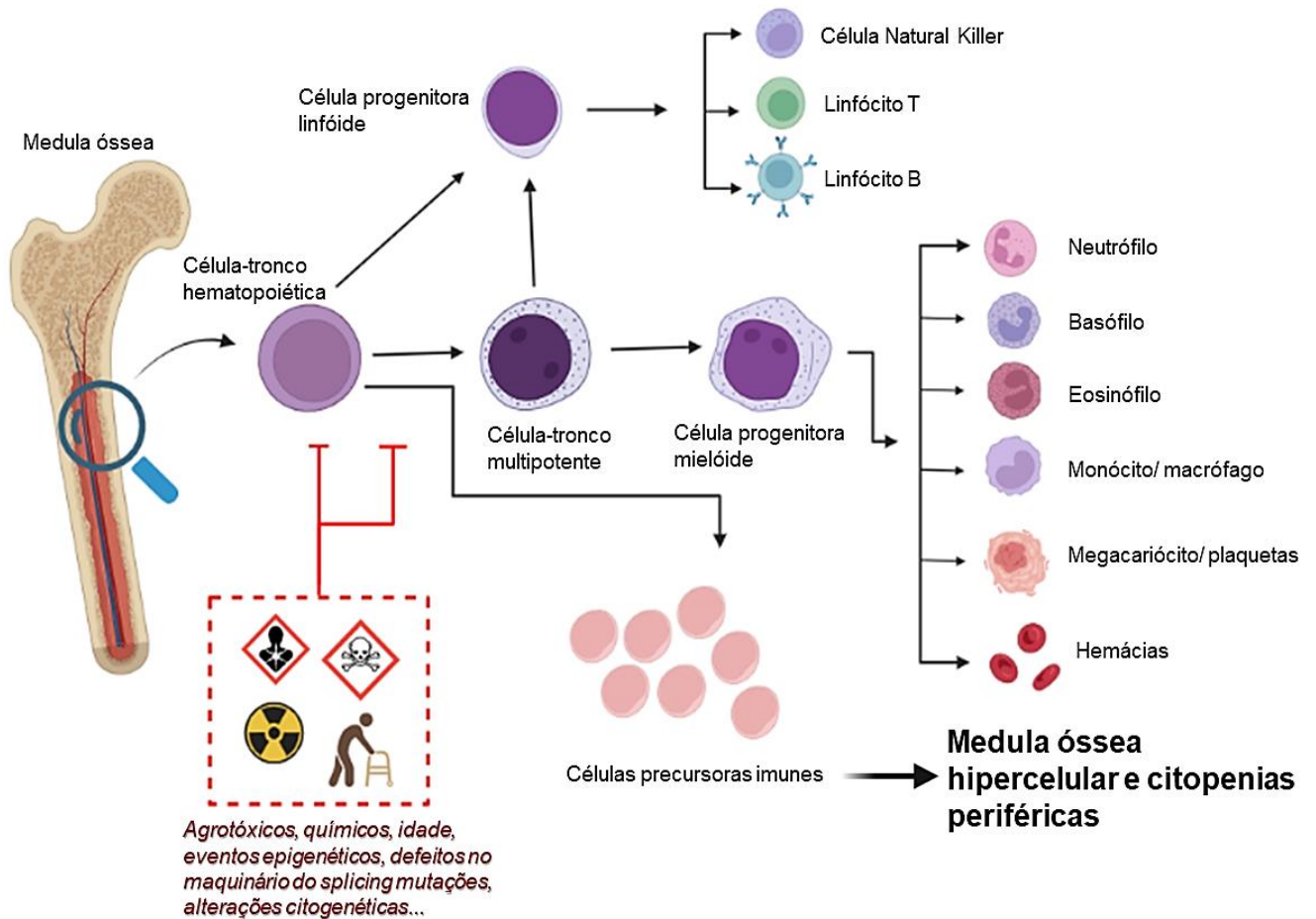
Da mesma forma, disfunção nos telômeros parecem potencializar danos ao DNA e o acúmulo de alterações moleculares na SMD, suprimindo a autorrenovação das células-tronco hematopoiéticas e a capacidade de diferenciação (ALESHIN; GREENBERG, 2018). Assim, a patogênese da SMD envolve várias etapas, levando ao acúmulo de lesões genéticas no DNA, condicionadas principalmente pela idade, modificando as funções celulares e gerando o surgimento de clones anômalos (ALESHIN; GREENBERG, 2018; CHAMSEDDINE *et al.*, 2016). As lesões de duplas fitas no DNA são as mais graves, podendo levar à instabilidade e o surgimento de anormalidades cromossômicas, quando não reparadas (ALESHIN; GREENBERG, 2018).

O envelhecimento é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da SMD, devido a erros na replicação do DNA e mutações espontâneas, que se acumulam nas células-tronco hematopoiéticas, gerando uma vantagem de sobrevivência celular, assim, surgindo a hematopoese clonal. Mutações associadas a genes que codificam vias biológicas para *splicing* de RNA mensageiro, metilação do DNA e remodelação da cromatina também são recorrentes (STEENSMA, 2015). Cerca de 80% dos pacientes diagnosticados com SMD apresentam pelo menos uma mutação somática e metade dos pacientes podem apresentar alterações cromossômicas (PAPAEMMANUIL *et al.*, 2013).

Ainda, novos panoramas genéticos estão surgindo nos últimos anos e algumas revelações foram trazidas com o auxílio de sequenciamento de próxima geração, mostrando que mutações de vários genes envolvidos na epigenética, sinalização, transcrição, apoptose, reparo de DNA e *splicing* de RNA, servem como condutores para o desenvolvimento da SMD,

do mesmo modo que o acúmulo de mutações genéticas está associado à evolução clonal e ao desenvolvimento de doença (OGAWA, 2019).

Figura 4 - Representação esquemática do processo de patogênese da Síndrome Mielodisplásica



Fonte: Elaborada pelo autor através da ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

1.7 Diagnóstico e classificação clínica da Síndrome Mielodisplásica

A suspeita de SMD surge através da presença de citopenia no sangue periférico, avaliada por meio de exames de rotina através do hemograma, gerando uma suspeita de alterações na produção sanguínea, induzindo assim a uma avaliação da morfologia das células da MO através do mielograma (aspirado medular) e da celularidade por meio da biópsia óssea. A contagem de blastos na MO é indispensável para a avaliação de risco e classificação da doença (GARCIA-MANERO; CHIEN; MONTALBAN-BRAVO, 2020).

A primeira Classificação de Leucemia do Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) foi estabelecida em 1976, e categorizou o que posteriormente seria chamada de SMD em duas categorias de “síndromes dismielopoéticas” (leucemia mielomonocítica crônica e anemia refratária com excesso de blastos) (BENNETT *et al.*, 1976).

O termo “mielodisplasia” foi usado em 1982 pelo grupo FAB para descrever as anormalidades morfológicas mieloides e hematopoiese em condições “pré-leucêmicas”, nessa ocasião as classificações foram expandidas em cinco categorias (anemia refratária, anemia refratária com sideroblastos em anel, anemia refratária com excesso de blastos, leucemia mielomonocítica crônica e anemia refratária com excesso de blastos em transformação), onde ficaram conhecidas por duas décadas como Síndromes Mielodisplásicas, pela Classificação de Síndromes Mielodisplásicas do Grupo FAB (BENNETT *et al.*, 1982).

Em 2001 a OMS (Organização Mundial da Saúde) refinou e reorganizou essas entidades e novamente, mais tarde em 2008, e posteriormente em 2016, cujas revisões se concentram em sete subtipos, e agrupam critérios moleculares (ARBER *et al.*, 2016; VARDIMAN *et al.*, 2009; VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002).

Segundo a Classificação da Organização Mundial de Saúde de 2016, para tumores de tecidos hematopoiéticos e linfoides, a classificação e diagnóstico da SMD baseia-se na avaliação do sangue periférico e morfologia da medula óssea, além da análise citogenética e molecular (ARBER *et al.*, 2016). Repetições de exames da medula óssea são imprescindíveis para estabelecer o diagnóstico e identificar rapidamente pacientes com a progressão da doença (MALCOVATI *et al.*, 2013).

Os subtipos de SMD são diagnosticados com base no número de displasias na medula óssea, presença ou ausência de sideroblastos em anel, porcentagem de blastos e tipo de anormalidade citogenética. Já a SMD hipoplásica e com presença acentuada de fibrose não estão incluídos nos subtipos da OMS, sendo consideradas entidades a parte das classificações padrões (CAZZOLA, 2020).

Atualmente, a síndrome é classificada de acordo com os critérios da OMS de 2016 como SMD com displasia de linhagem única, SMD com sideroblastos em anel (associada a mutações no gene *SF3B1*), SMD com displasia multilinhagem, SMD com excesso de blastos I e II, SMD com del (5q) isolado e SMD inclassificável (Tabela 1) (ARBER *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Classificação da SMD segundo os critérios da OMS 2016

Subtipo	Sangue Periférico	Medula Óssea
(SMD-DU)	≤1% de blastos; 1 ou 2 citopenias	Displasia em 1 linhagem; ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
(SMD-DM)	≤1% De Blastos; Citopenia Em 1 Ou Mais Linhagens	Displasia em 2 ou 3 linhagens; ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
SMD com Sideroblastos em Anel (SMD-SA)		
(SMD-SA-DU)	≤1% de blastos; 1 ou 2 citopenias	Displasia em 1 linhagem; ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
(SMD-SA-DM)	≤1% de blastos; citopenia em 1 ou mais linhagens	Displasia em 2 ou 3 linhagens; ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
SMD com del(5q) isolada		
SMD com del(5q) isolado	≤1% de blastos; 1 ou 2 citopenias	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% de blastos; del(5q) isolada ou com 1 alteração adicional, exceto del(7q)/-7
SMD com Excesso de Blastos (SMD-EB)		
(SMD-EB1)	2-4% de blastos; citopenia em 1 ou mais linhagens	Displasia em 1 ou mais linhagens; 5-9% de blastos
(SMD-EB2)	5-19% de blastos; citopenia em 1 ou mais linhagens	Displasia em 1 ou mais linhagens; 10-19% de blastos
SMD inclassificável (SMD-i)		
SMD-i com 1% de blastos	≤1%** de blastos; citopenia em 1 ou mais linhagens	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% de blastos
SMD-i com displasia em única linhagem e pancitopenia	≤1% de blastos; citopenia em 3 linhagens	Displasia em 1 linhagem; ≤5% de blastos
SMD-i baseada em alterações citogenéticas	≤1% de blastos; citopenia em 1 ou mais linhagens	Ausência de displasias; ≤15% de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos e anormalidade definidora de SMD

Fonte: Adaptado de Arber e colaboradores (2016).

Legenda: SMD-DU (SMD com displasia unilinhagem), SMD-DM (SMD com displasia multilinhagem), SMD-SA-DU (SMD com sideroblastos em anel e displasia unilinhagem), SMD-SA-DM (SMD com sideroblastos em anel e displasia multilinhagem), SMD-EB (SMD com excesso de blastos). * Se mutação no SF3B1 presente. ** ≤1% de blastos ser registrados em ≤2 ocasiões separadas.

Recentemente em 2022, na sua 5ª edição da Classificação de Tumores Hematolinfoides, a OMS lançou uma nova classificação para a SMD, onde foi introduzido o termo neoplasias mielodisplásicas como nova terminologia para substituir as síndromes mielodisplásicas, visando ressaltar a sua natureza neoplásica. Agora a SMD será agrupada em entidades que têm anormalidades genéticas definidoras e aquelas que são definidas morfológicamente (Tabela 2) (KHOURY *et al.*, 2022).

Tabela 2 - Classificação da SMD segundo os critérios da OMS 2022

	Blastos	Citogenética	Mutações
SMD definida por anormalidades genéticas			
SMD com baixos blastos e deleção 5q isolada (SMD-5q)	<5% na MO e <2% no SP	Deleção 5q sozinha ou com 1 outra anormalidade que não seja monossomia 7 ou deleção 7q	
SMD com blastos baixos e mutação ^a SF3B1 (SMD-SF3B1)		Ausência de deleção 5q, monossomia 7 ou cariótipo complexo	SF3B1
SMD com inativação bialélica de TP53 (SMD-biTP53)	<20% na MO e SP	Geralmente complexo	Duas ou mais mutações TP53, ou 1 mutação com evidência de perda do número de cópias TP53 ou cnLOH
SMD definida por morfologia			
SMD com blastos baixos (SMD-LB)	<5% na MO e <2% no SP		
SMD hipoplásica ^b (SMD-h)			
SMD com aumento de blastos (SMD-IB)			
SMD-IB1	5-9% na MO ou 2-4% no SP		
SMD-IB2	10-19% na MO ou 5-19% no SP ou bastonete de Auer		
SMD com fibrose (SMD-f)	5-19% na MO; 2-19% no SP		

Fonte: Adaptado de Khoury e colaboradores (2022).

Legenda: Medula óssea (MO), sangue periférico (SP), copia a perda neutra de heterozigosidade (cnLOH). ^aA detecção de $\geq 15\%$ de sideroblastos em anel pode substituir a mutação SF3B1. Terminologia relacionada aceitável: SMD com baixos blastos e sideroblastos em anel.

^bPor definição, celularidade da medula óssea $\leq 25\%$, ajustada para idade.

Vale ressaltar que, por ser tão recente, a nova classificação de 2022 ainda não está presente na prática clínica, porém, em breve esta será a classificação clínica aplicada no diagnóstico e classificação da SMD.

1.8 Classificação prognóstica da Síndrome Mielodisplásica

Paralelamente a classificação diagnóstica da doença, o *International Prognostic Scoring System* (da sigla em inglês, IPSS), criado em 1997 por um grupo colaborativo coordenado por Peter Greenberg (GREENBERG *et al.*, 1997) e sua revisão (IPSS-R) são importantes padrões para avaliar o prognóstico de pacientes adultos com SMD primária não tratados (GREENBERG *et al.*, 2012).

O IPSS-R se trata de uma ferramenta de classificação prognóstica para pacientes, possibilitando a realização de estratificação, avaliação do risco de evolução para LMA e presunção de sobrevida dos mesmos. Funciona como um sistema de escore (0 a 4 pontos), que classifica os pacientes em cinco categorias de risco em relação ao prognóstico: muito favorável, favorável, intermediário, desfavorável e muito desfavorável (Tabela 3) (GREENBERG *et al.*, 2012).

Tabela 3 - Escores de variáveis prognósticas segundo o IPSS-R

Variável	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Citogenética	Muito favorável	-	Favorável	-	Intermediário	Desfavorável	Muito desfavorável
% Blastos (MO)	≤ 2%	-	> 2 - >5%	-	5-10%	> 10%	-
Hemoglobina	≥ 10	-	8 - < 10	< 8	-	-	-
Plaquetas	≥ 100	50 – < 100	< 50	-	-	-	-
Contagem absoluta do neutrófilos	≥ 800	< 800	-	-	-	-	-

Fonte: Adaptado de Greenberg e colaboradores (2012).

Legenda: - Não se aplica.

Como observado acima, para se avaliar o risco dos pacientes, é necessário obter dados laboratoriais do hemograma (hemoglobina, contagem de plaquetas e neutrófilos), mielograma (percentual de blastos) e citogenética, sendo esse último valioso para o prognóstico e para refinar as características usadas no IPSS-R (Tabela 4) (GREENBERG *et al.*, 2012).

Tabela 4 - Classificação dos subgrupos de prognóstico citogenético (IPSS-R)

Score	Subgrupos	Anormalidades citogenéticas
0	Muito favorável	-Y, del(11q)
1	Favorável	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), duas alterações incluindo del(5q)
2	Intermediário	del(7q), +8, +19, i(17q), quaisquer outras alterações
3	Desfavorável	-7, inv(3)/ t(3q)/del(3q), duas alterações incluindo -7/del(7q), presença de cariótipo complexo: 3 alterações
4	Muito desfavorável	Complexo: > 3 alterações

Fonte: Adaptado de Greenberg e colaboradores (2012).

Baseado nos critérios acima apresentados, os valores obtidos nos sistemas de pontuações são somados e através do valor final se obtém a categorização de risco dos mesmos (Tabela 5). Vale ressaltar que a ausência de cariótipo impossibilita a realização da classificação de risco pelo IPSS-R.

Tabela 5 - Categorias e pontuações de risco prognóstico segundo o IPSS-R

Subgrupos prognósticos	Escore de risco
Muito favorável	≤ 1.5
Favorável	$> 1.5 - 3$
Intermediário	$> 3 - 4.5$
Desfavorável	$> 4.5 - 6$
Muito desfavorável	> 6

Fonte: Adaptado de Greenberg e colaboradores (2012).

Apesar da importância do IPSS-R, marcadores moleculares estão sendo cada vez mais importantes no acompanhamento dos pacientes com SMD e já fazem parte da clínica médica como ferramenta de auxílio e direcionamento diagnóstico e/ou terapêutico. Por exemplo, recentemente um estudo mostrou que pacientes que possuem mutações bialélicas no gene TP53 têm maiores associações com cariótipo complexo, alto risco e desfechos ruins, e esse estado mutacional foi capaz de prever o risco de morte e transformação leucêmica independentemente do IPSS-R (BERNARD *et al.*, 2020).

Ultimamente, em 2022 foi lançado o IPSS molecular (IPSS-M), ferramenta que avalia o risco dos pacientes baseado especificamente em testes genéticos. No IPSS-M, foi mapeado pelo menos uma alteração genômica oncogênica em 94% dos pacientes com SMD. Uma análise multivariável identificou *TP53 multihit*, mutações *FLT3* e *MLL*^{PTD} como os principais

preditores genéticos de resultados desfavoráveis na doença. Por outro lado, mutações no *SF3B1* foram associadas a resultados favoráveis (BERNARD *et al.*, 2022). Porém, vale ressaltar que pelo fato de o IPSS-M utilizar de testes genéticos mais específicos, o seu uso na prática clínica nem sempre é possível devido aos altos custos na realização dos exames, principalmente quando nos referimos ao Sistema Único de Saúde Brasileiro (SUS), onde o acesso a esses exames muitas vezes é precário, demorado e as vezes não é coberto pelo sistema, o que pode tornar o IPSS-M um pouco distante da prática clínica no Brasil.

1.9 Alterações moleculares e citogenéticas

A análise citogenética tem um papel essencial no diagnóstico, classificação e prognóstico da SMD, sendo a base dos sistemas de pontuação prognóstica na doença, como o IPSS e IPSS-R. A citogenética do aspirado de medula óssea deve ser realizada em todos os pacientes com suspeita de SMD, onde 20 metáfases devem ser analisadas e descritas de acordo com as recomendações do Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (WALL, 2017).

Alterações cromossômicas são observadas em cerca de 50% a 60% dos pacientes, a maioria delas são alterações que afetam o número de cópias genômicas, como deleção, monossomia ou trissomia, alterações estruturais, como translocações são raras mais raras na SMD. Podemos destacar a del (5q), monossomia 7 ou del (7q), trissomia 8 e del (20q) como as alterações mais frequentes. Portanto, a análise citogenética é importante para determinar a clonalidade em pacientes com suspeita de SMD (MALCOVATI *et al.*, 2013). Pacientes com isolado del (5q), são tratados com lenalidomida, que é um modulador da atividade do cereblon e da ubiquitina ligase (STEENSMA, 2015).

Como já relatado, cerca da metade dos pacientes possuem cariótipo normal, e mesmo assim apresentam a doença, sugerindo que as mutações genéticas desempenham papéis críticos na patogênese da SMD. Com o avanço das tecnologias de sequenciamento de DNA e o maior acesso a esses recursos, diversos genes importantes foram relacionados como mutados recorrentemente na SMD. Genes que codificam fatores de splicing de RNA, reguladores epigenéticos para metilação de DNA ou modificação de histonas, fatores de transcrição e reparo de DNA. Mutações envolvendo fatores de splicing de RNA e reguladores epigenéticos são particularmente altas na doença (NAKAJIMA, 2021).

1.10 Modificações Pós-traducionais em pacientes com SMD

Pacientes com SMD são conhecidos por apresentarem mutações e alterações na expressão de genes de reparo, aumento na metilação do DNA, e também por possuírem mutações em genes responsáveis pela modificação pós-transcricionais, como o *splicing* de RNA que é um processo complexo conduzido por um complexo de proteínas '*spliceossomo*'. Indivíduos com SMD apresentam valores elevados de mutações nos genes que desempenham o papel do *splicing*. Mutações recorrentes são encontradas nos genes SF3B1, SRSF2, U2AF1 e ZRSF2, dentre outras, e uma única mutação é suficiente para prejudicar a função do *spliceossomo* e conduzir o desenvolvimento de SMD, ou mutações em vários genes desse complexo podem ser prejudiciais aos clones de SMD (PAPAEMMANUIL *et al.*, 2011).

A mutação SF3B1 é altamente específica para SMD-SA e cerca de 70% dos pacientes desse subtipo apresentam positividade para a mutação SF3B1, sugerindo que ela possui uma grande significância diagnóstica. Mutações em SRSF2, U2AF1 e ZRSF2 são observadas em aproximadamente 20%, 10% e 10% dos pacientes com SMD, respectivamente. As mutações nos fatores de *splicing* geram regulação epigenética desordenada por meio de *splicing* anormal de RNA, e esse fator é considerado em parte como uma das causas da doença (NAKAJIMA, 2021)

Assim, baseando-se no contexto exposto, e entendendo que a SMD é uma doença de instabilidade genômica e modificações epigenéticas, a compreensão dos eventos moleculares pós-traducionais na modificação de proteínas, além da participação em eventos epigenéticos, pode levar ao desenvolvimento de abordagens clínicas relacionadas à prevenção dos tumores, bem como de terapias capazes de reverter esses eventos que conduzem a malignidade.

Nesta perspectiva, o presente estudo justifica-se por propor a investigação do papel via ubiquitina-proteassoma na ubiquitinação (*UBE2T* e *UBE2O*) e de desubiquitinação (*USP7* e *USP15*), a partir de uma abordagem de expressão gênica na patogênese das citopenias periféricas, características do paciente com Síndrome Mielodisplásica, buscando identificar novos alvos etiológicos e terapêuticos para esta doença. Ressaltando a pobreza de estudos relacionando a doença e os referidos alvos moleculares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o papel dos genes da via de ubiquitinação (*UBE2T* e *UBE2O*) e de desubiquitinação (*USP7* e *USP15*) na patogênese e na estratificação prognóstica da Síndrome Mielodisplásica.

2.2 Objetivos específicos

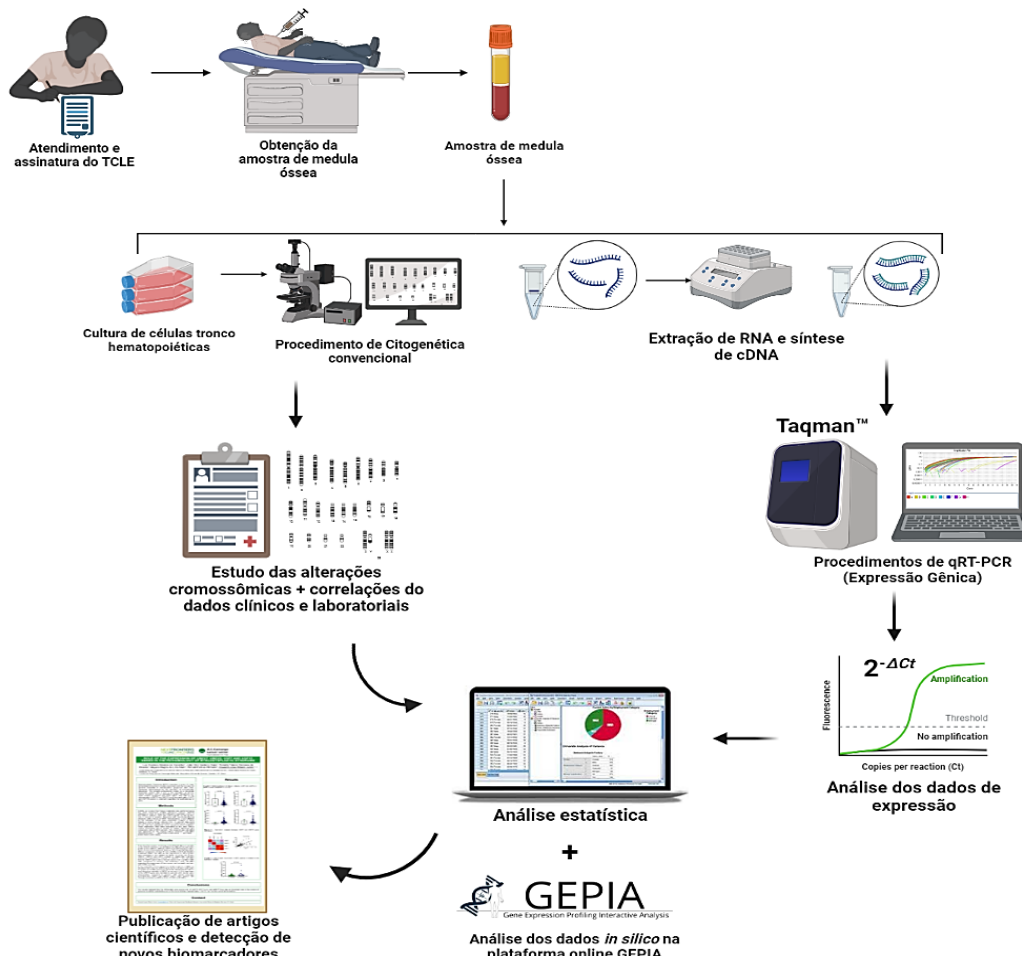
1. Caracterizar os aspectos clínico-laboratoriais dos pacientes com Síndrome Mielodisplásica;
2. Realizar um estudo de predição in silico Pan-Câncer a fim de investigar resultados prévios do papel dos genes de ubiquitinação (*UBE2T* e *UBE2O*) e de desubiquitinação (*USP7* e *USP15*) em pacientes onco-hematológicos, em especial na SMD.
3. Caracterizar o perfil de expressão dos genes das vias de ubiquitinação (*UBE2T* e *UBE2O*) e de desubiquitinação (*USP7* e *USP15*) em pacientes com Síndrome Mielodisplásica e em indivíduos saudáveis (grupo controle);
4. Correlacionar os achados moleculares com as demais variáveis clínico laboratoriais dos pacientes com Síndrome Mielodisplásica;
5. Detectar possíveis novos biomarcadores de patogênese ou de estratificação prognóstica que melhor caracterize a patobiologia da Síndrome Mielodisplásica.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos da Pesquisa

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará/PROPESQ-UFC (número de processo: 35871620.9.0000.5054) e Comitê de Ética do Hospital Geral de Fortaleza - HGF/SUS (número de processo: 35871620.9.3001.5040) através do sistema da Plataforma Brasil, utilizando-se de Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentados na sessão apêndice. A equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução n° 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. A representação esquemática das metodologias utilizadas neste estudo encontra-se apresentadas na figura 5.

Figura 5 - Representação do desenho experimental do estudo



Fonte: Elaborada pelo autor através da ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

3.2 Coleta e obtenção das amostras

Foram coletadas amostras de medula óssea (5mL) em tubos contendo Heparina sódica, de um total de 120 pacientes diagnosticados com SMD e 4 indivíduos saudáveis para os procedimentos de Citogenética Clássica e 3mL em tubos contendo EDTA para os procedimentos de extração de RNA e posterior realização dos experimentos de expressão gênica. Das 120 amostras de pacientes coletadas, somente 84 foram elegíveis para o procedimento de expressão gênica, devido principalmente a qualidade e concentração de RNA nas mesmas. Todavia, após o ensaio de expressão, foram excluídos do estudo 3 pacientes com SMD hipocelular, por se tratar de uma entidade ainda não muito bem caracterizada, 1 paciente jovem com 15 anos de idade, e 8 pacientes que suas amostras não expressaram algum dos genes de interesse, restando 72 amostras de pacientes e 4 voluntários saudáveis (controles). Trata-se de voluntários saudáveis, pacientes que inicialmente foram considerados como suspeitos de SMD, porém, durante a investigação clínica e laboratorial tiveram seus diagnósticos descartado para a doença como também para outras doenças onco-hematológicas. Em sua maioria eram pacientes que tinham deficiências nutricionais, o que acarretava em citopenias periféricas.

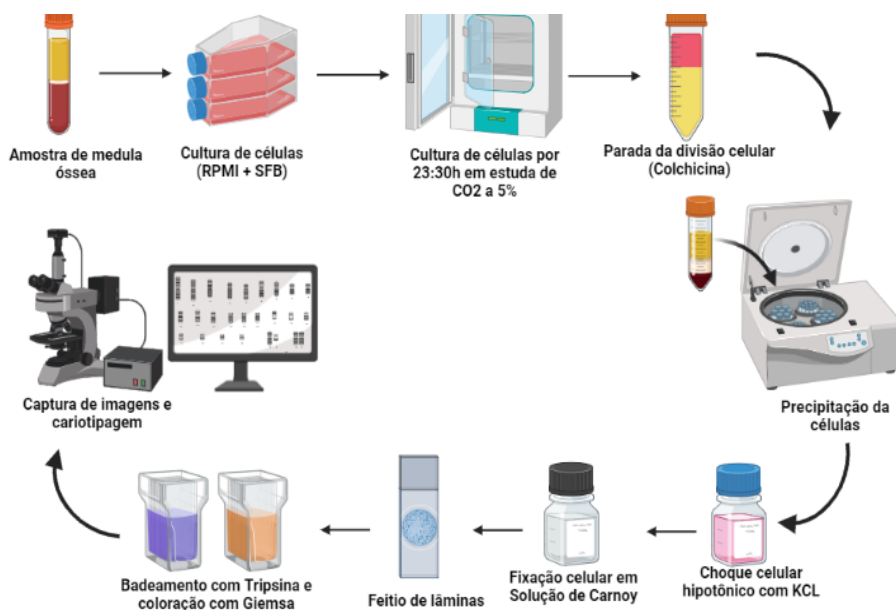
Foram analisados dados de expressão de mRNA de 4 genes em 72 amostras de *pool* celular de medula óssea de pacientes diagnosticados com SMD de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (ARBER *et al.*, 2016), atendidos em um hospital terciário de referência na cidade de Fortaleza - Ceará no período de 2008 a 2021. As amostras de medula óssea dos doadores saudáveis foram coletadas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Os dados de expressão gênica foram correlacionados com outras variáveis, dados citogenéticos e dados clínico-laboratoriais obtidos a partir de revisão de prontuário.

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

3.3 Cariótipo por bandeamento-G

A Citogenética foi realizada para todos os casos (n=72) e controles (n=4) incluídos no presente estudo de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceará, segundo a técnica descrita por Chauffaille e adaptada por Pinheiro (PINHEIRO et al, 2009). A medula óssea foi colhida em heparina e de forma estéril, 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 e 5% de CO₂. Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 50uL de colchicina (Colcemid®) por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspenso em solução hipotônica de KCl 0,075M e fixado em solução de ácido acético e metanol (proporção 3:1), por 4 vezes. Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia óptica que em seguida foram aquecidas em placa aquecedora por 10 minutos a 40 °C (secagem do material) e posteriormente mais 10 minutos a 90 °C. O bandeamento foi realizado pela técnica de tripsina e as bandas coradas com a coloração Giemsa. Foram analisadas pelo menos 20 metáfases de cada paciente, sendo capturadas e analisadas em sistema computadorizado com software para cariotipagem: CytoVision® (Figura 6). Os resultados das análises citogenéticas de medula óssea foram estabelecidos de acordo com os critérios do Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (SHAFFER E TOMMERUP, 2014).

Figura 6 - Representação esquemática da Metodologia de Citogenética por Bandeamento-G



Fonte: Elaborada pelo autor através da ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

3.4 Análise de Expressão Gênica por RT-qPCR

3.4.1 Extração de RNA Total

A extração de RNA das células do pool medular dos pacientes com SMD (n= 84) e dos controles (n=4) foi realizada a partir da utilização do Trizol LS Reagente® de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para cada 10⁶ células armazenadas em 1mL de Trizol Reagente® foram adicionados 200µL de Clorofórmio para desproteíntização e 10µL de glicogênio, foram homogeneizadas em vórtex e, em seguida, centrifugadas a 14.000rpm por 30 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 15 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 em Nanodrop® nos comprimentos de ondas de 230, 260 e 280nm, obtendo-se suas relações para posterior aferição de contaminação das amostras.

3.4.2 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada com a utilização do Kit para Transcrição Reversa (RT) da Applied Biosystems® (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada reação de transcrição reversa foram utilizados uma quantidade otimizada de RNA total para uma concentração final de 1000ng/µL. Para cada reação, utilizou-se de 2,0µL de buffer, 0,8µL de dNTP, 2,0µL de Random Primers e 1,0µL de Multiscribe Reverse Transcriptase™. A quantidade citada de cada reagente foi multiplicada pelo número de amostras de RNA total para a confecção de um “Mix” de reação. Posteriormente, 5,8µL deste Mix foi adicionado a cada microtubo de PCR de 0,2mL. Em seguida foram adicionadas as quantidades otimizadas de 1000ng/µL de RNA total para cada amostra nos microtubos devidamente identificados e preenchido o volume final de 20µL com água ultra pura livre de DNase e RNase. Por fim, o volume final de 20µL de cada reação foram submetidos ao termociclador onde foram realizados os seguintes ciclos de termociclagem para a síntese de cDNA: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 05 minutos,

com finalização a 4°C. Por fim, as amostras de cDNA foram armazenadas em um freezer a uma temperatura de -20°C.

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

A quantificação da expressão gênica dos quatro genes avaliados neste estudo (Tabela 6) foi realizada a partir da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) realizada no aparelho *7500 Real-Time PCR System®* (*Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*) disponível no Laboratório de Citogenômica do Câncer. As reações foram preparadas utilizando-se o Kit *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*) otimizado para reações com sonda *TaqMan assay®* (Tabela 6) e contendo a *AmpliTaq Gold DNA polimerase*.

Tabela 6 - Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR

Tipo	Símbolo	Nomenclatura	Cromossomo	Ensaio TaqMan®
Alvo	UBE2T	<i>Ubiquitin conjugating enzyme E2 T</i>	1q32.1	Hs00928040_m1
Alvo	UBE2O	<i>Ubiquitin conjugating enzyme E2 O</i>	17q25.1	Hs00222904_m1
Alvo	USP7	<i>Ubiquitin specific peptidase 7</i>	16p13.2	Hs00931763_m1
Alvo	USP15	<i>Ubiquitin specific peptidase 15</i>	12q14.1	Hs00246242_m1
Gene de referência	GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	12p13.31	Hs99999905_m1
Gene de referência	ACTB	<i>Actin beta</i>	7p22.1	Hs99999903_m1
Gene de referência	HPRT1	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>	Xq26.2-q26.3	Hs02800695_m1

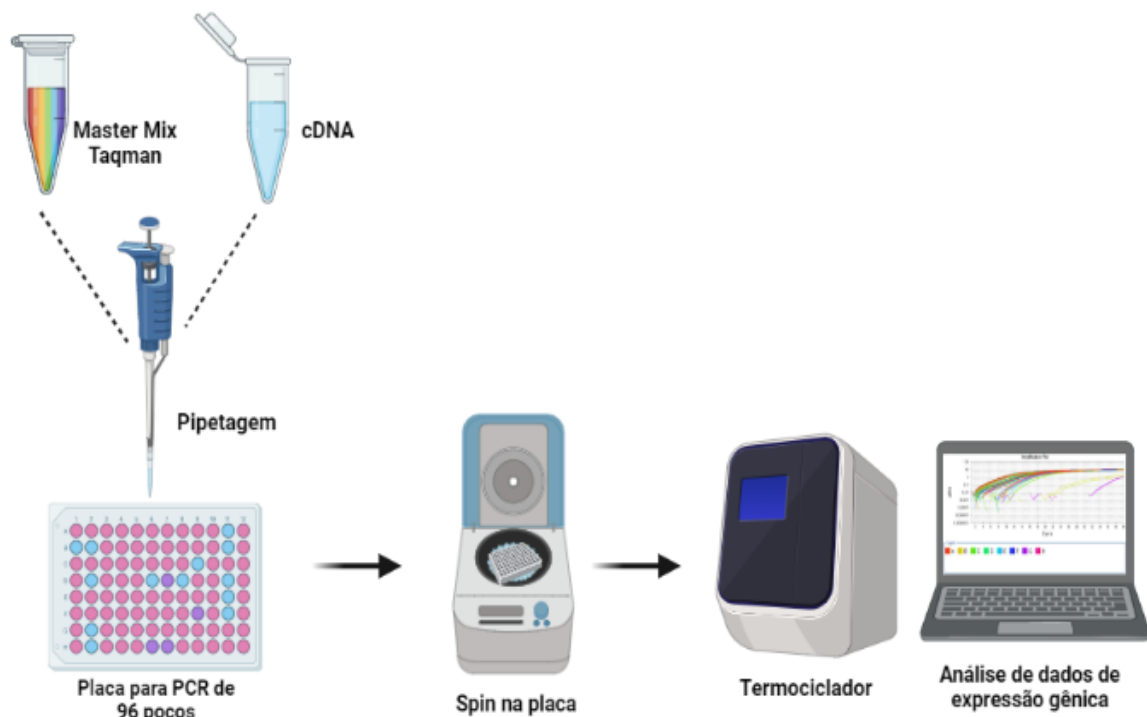
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Relação das sondas utilizadas no ensaio de expressão gênica.

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

Adhesive film, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). Todas as etapas do procedimento descrito foram realizadas com as amostras imersas em gelo com pouca exposição à luz (Figura 7). Cada amostra foi avaliada em duplicata e foram consideradas para análise somente as amostras cujas diferenças de amplificação não excederam a 0,8 ciclos ($\Delta Cq \leq 0,8$) de diferença entre as duplicatas (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). As duplicatas das amostras que apresentaram diferenças maiores que um ciclo e meio, mesmo após repetição do experimento, foram desconsideradas. Em todas as placas foram realizados controles negativos (NTC) das reações para todos os genes estudados sendo que, para estas reações, foram adicionados 2,5 μ L de água no lugar da amostra de cDNA. Todas as reações que mostraram amplificação para qualquer um dos controles negativos foram desconsideradas.

Figura 7 - Representação esquemática da Metodologia de qRT-PCR



Fonte: Elaborada pelo autor através da ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

Para validar a estabilidade dos níveis de expressão gênica foram utilizados três genes referência: Beta Actina (*ACTB*), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e Hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (*HPRT1*). Para a escolha do par de genes de referência mais estável, foi utilizado a ferramenta de bioinformática online RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>), que integra os principais programas computacionais

atualmente disponíveis (*geNorm*, *Normfinder*, *BestKeeper* e o método comparativo Delta-Ct) para comparar e classificar os genes de referência candidatos testados no estudo. Com base nas classificações de cada programa, o *RefFinder* atribui um peso apropriado a um gene individual e calcula a média geométrica de seus pesos para a classificação final geral (XIE *et al.*, 2012). Entende-se como gene de referência mais estável, aquele ou aqueles que obtiverem o menor valor de desvio padrão. Os genes de referência que apresentaram menor valor de desvio padrão e maior correlação entre si (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) foram considerados os mais estáveis.

Para este estudo, obtivemos que os genes mais estáveis nas amostras de cDNA utilizadas foram a *GAPDH* e o *HPRT1* (Figura 8). Os resultados foram avaliados através do software *Sequence Detection System v1.3* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) para obtenção dos valores de *quantitative cycle* (*Cq*). A partir do *threshold* estabelecido, os valores de *Cq* foram fornecidos pelo software do aparelho 7500 *Real-Time PCR System*® (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) para a realização das análises estatísticas. Ao final de cada corrida os dados foram exportados para planilhas do software Excel para o cálculo dos valores de ΔCq e de $2^{-\Delta Cq}$ tanto dos genes alvos quanto dos genes de referência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A nomenclatura padrão utilizada para os experimentos da PCR quantitativa em tempo real foi baseada no MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN *et al.*, 2009).

Sabe-se que a ocorrência de dados com valores em *outliers* frente as amostras avaliadas em um dado estudo podem interferir na precisão da estimativa correta das análises realizadas. Assim, inicialmente, antes de quaisquer avaliações dos dados para realização de análises estatísticas, a fim de determinar a qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras dos pacientes avaliadas, foram retirados do estudo todas as amostras que apresentaram elevados valores de desvio padrão. Neste sentido, iniciamos este estudo com um total de 84 amostras de cDNA de pacientes e 4 amostras de controle, mantendo-se, o total de 72 amostras de pacientes e 4 controles. Foram excluídos do estudo 3 pacientes com SMD hipocelular, por se tratar de uma entidade ainda não muito bem caracterizada e não está inserida na classificação da OMS 2016, 1 paciente jovem com 15 anos de idade, e 8 pacientes que suas amostras não expressaram algum dos genes de interesse.

Figura 8 - Resultado da análise da estabilidade dos endógenos pela ferramenta RefFinder

A

Ordem de classificação (melhor - boa - média)			
Método	1	2	3
Delta Cq	GAPDH	HPRT1	ACTB
BestKeeper	HPRT1	GAPDH	ACTB
Normfinder	GAPDH	HPRT1	ACTB
Genom	GAPDH HPRT1		ACTB
Classificação abrangente recomendada	GAPDH	HPRT1	ACTB

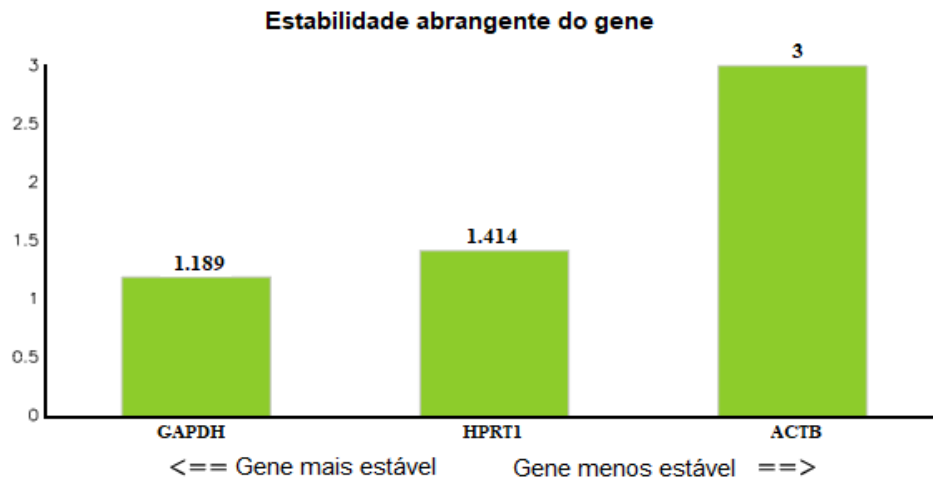
Gene Média geométrica dos valores de classificação

GAPDH 1.19

HPRT1 1.41

ACTB 3.00

B



Fonte: Elaborada pelo autor através da ferramenta online RefFinder (<http://www.heartcure.com.au/reffinder/>).

Legenda: (*geNorm*, *Normfinder*, *BestKeeper* e o método comparativo Delta-Cq) para comparar e classificar os genes de referência candidatos testados. No nosso estudo, ao entrar com os valores de Cq dos genes de referência testados, obtivemos que os genes *GAPDH* e *HPRT* são os mais estáveis na coorte em estudo em todos os métodos que a ferramenta utiliza, desse modo estes foram selecionados. **A.** Representa a classificação do melhor gene testado em todas as ferramentas agrupadas no RefFinder. **B.** Mostra um ranking dos melhores genes mostrando o desvio-padrão da média geométrica dos mesmos.

3.4.4 Perfil de expressão gênica in silico usando o banco de dados online GEPIA

O perfil de expressão gênica do banco de dados GEPIA (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis*) foi selecionado e níveis de expressão diferencial de tumor/normal para cada gene foi realizado por meio da ferramenta GEPIA. GEPIA é uma ferramenta baseada na web (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) de dados de sequenciamento de RNA baseados na TCGA

Research Network (*The Cancer Genome Atlas Program*) (<https://www.cancer.gov/tcga>) e GTEx (*The Bancos de dados Genotype-Tissue Expression*) (<https://gtexportal.org/home>).

3.5 Variáveis analisadas

- As variáveis analisadas neste estudo foram subdivididas da seguinte forma:
- Grupo: Caso e controle
- Sexo: masculino e feminino;
- Idade (categorização 1): ≤ 60 anos e > 60 anos;
- Idade (categorização 2): ≤ 60 anos, $> 60 - \leq 70$ anos, > 70 anos;
- Quanto à classificação da OMS (2016): SMD-DU (SMD com displasia unilinhagem), SMD-DM (SMD com displasia multilinhagem), SMD-SA-DU (SMD com sideroblastos em anel e displasia unilinhagem), SMD-SA-DM (SMD com sideroblastos em anel e displasia multilinhagem), SMD-EB (SMD com excesso de blastos).
- Forma da SMD: Iniciais (SMD-DU, SMD-DM, SMD-SA-DU e SMD-SA-DM) e avançadas (SMD-EB I e SMD-EB II);
- Celularidade da medula óssea: Hipocelular, Normocelular e Hiper celular;
- Fibrose na medula óssea: Presença e Ausência;
- Displasias na medula óssea: 1 displasia, 2 displasias e 3 displasias;
- Diseritropoiese: Presença e Ausência;
- Disgranulopoiese: Presença e Ausência;
- Dismegacariopoiese: Presença e Ausência;
- Sideroblastos em anel: Presença e ausência;
- Faixas de porcentagens de Sideroblastos em anel: 0, 1-14% e $> 15\%$;
- Porcentagens de Blastos categorizada: $< 10\%$ e $> 10\%$;
- Cariótipo - Quanto à alteração: normal e alterado;
- Cariótipo (Aneuploidia): normal, alterado não aneuplóide e alterado aneuplóide;
- Cariótipo (Alteração no cromossomo 5): normal, alterado com -5/5q e alterado sem -5/5q;
- Cariótipo (Alteração no cromossomo 7): normal, alterado com -7/7q e alterado sem -7/7q;
- Cariótipo (Número de alterações): normal, 1 alteração, 2 alterações e Complexo (3 ou mais alterações);

- Quanto ao prognóstico (IPSS-R): muito favorável, favorável, intermediário, desfavorável e muito desfavorável;
- Classificação dos valores de hemoglobina (Hb) (IPSS-R): $\geq 10\text{g/dL}$ e $< 10\text{g/dL}$;
- Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) (IPSS-R): ≥ 800 por mm^3 e < 800 por mm^3 ;
- Classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R): ≥ 100.000 por mm^3 , $50.000 - < 100.000$ por mm^3 e ≤ 50.000 por mm^3 ;
- Classificação do número de citopenias no sangue periférico: 0/1 citopenia e 2/3 citopenias;
- Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- 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);
- Óbito: sim e não;
- Evolução para LMA: sim e não.

3.6 Análises Estatísticas

3.6.1 Análises Estatísticas para avaliação dos dados de expressão gênica

Para realização das análises estatística foi utilizado o software IBM® SPSS® Statistics 25 e para confecção de gráficos utilizamos o software GraphPad Prism e a ferramenta online Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>). A ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>) foi utilizada para a elaboração de algumas figuras deste trabalho.

Os resultados referentes às análises do nível de expressão gênica foram analisados com base no valor de cada Cq (*quantitative cycle*), para cada amostra de cDNA (em duplicata). Para normalizar os valores de Cq , de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o Cq determinado para uma amostra foi subtraído da média geométrica dos Cq 's dos genes constitutivos utilizados (*GAPDH* e *HPRT1*) da mesma amostra, gerando assim os valores de ΔCq e, conseqüentemente, de $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Os testes de Shapiro-Wilk foram utilizados para verificar se os dados de cada variável analisada se apresentavam com distribuição normal. Os dados com distribuição normal foram

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

4 RESULTADOS

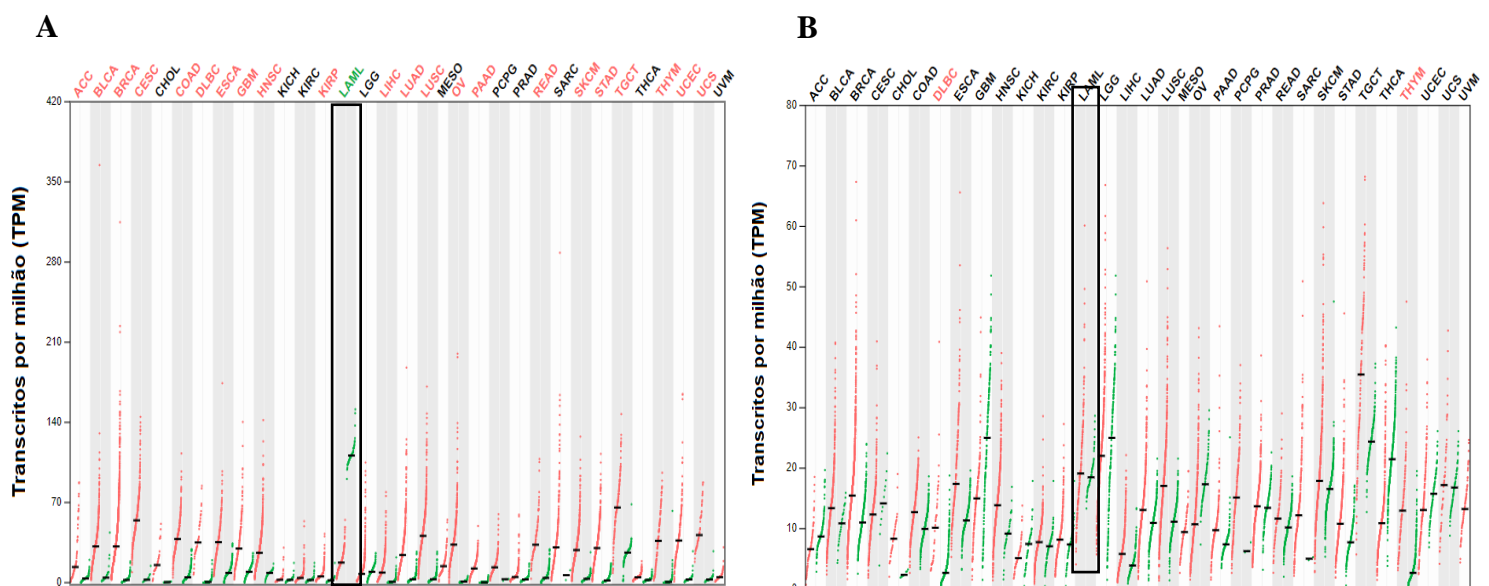
4.1 Screening Pan-câncer do perfil de expressão gênica dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* utilizando a ferramenta online GEPIA

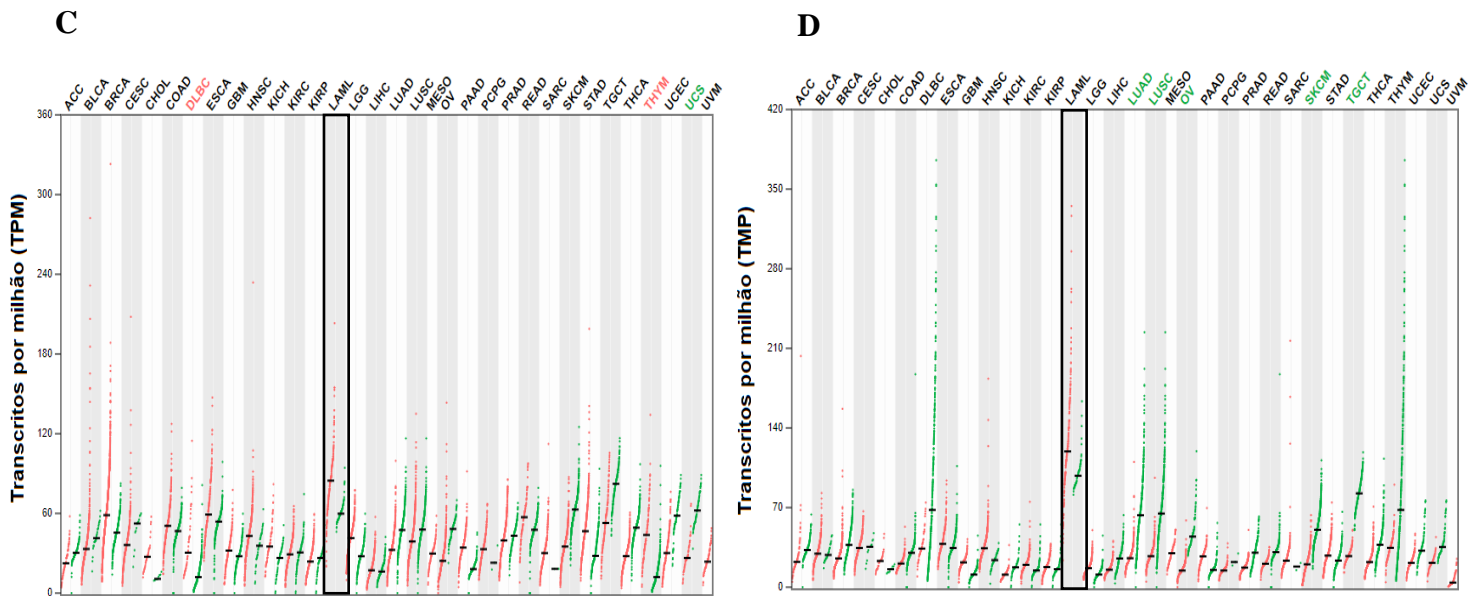
Realizamos uma *screening* em 30 tipos distintos de cânceres utilizando a ferramenta online GEPIA para avaliar os níveis de expressão dos genes em estudo. A partir disso observamos os níveis de expressão dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* nas neoplasias hematológicas presentes na plataforma. Por não haver dados diretos sobre Síndrome Mielodisplásica, escolhemos a doença hematológica com etiologia mais próxima da SMD, no caso Leucemia Mieloide Aguda (LMA).

Constatamos que a expressão do gene *UBE2T* se encontra significativamente diminuída nos pacientes que possuem Leucemia Mieloide Aguda em comparação com o controle (Figura 9A). Quando analisados os níveis de expressão do gene *UBE2O*, observamos que na LMA não há diferença nos níveis de expressão gênica na doença e nos indivíduos saudáveis (Figura 9B).

Ainda, ao avaliamos os níveis de expressão gênica de *USP7* na LMA, apesar de apresentar uma tendência no aumento de expressão comparado ao controle, não possui diferenças significativas (Figura 9C). Por último, ao plotarmos os dados de expressão gênica de *USP15*, constatamos que o mesmo não apresenta expressão gênica diferencial na LMA, quando comparados aos indivíduos saudáveis (Figura 9D).

Figura 9 - Níveis de expressão do gene *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* em diversos cânceres segundo a ferramenta online GEPIA





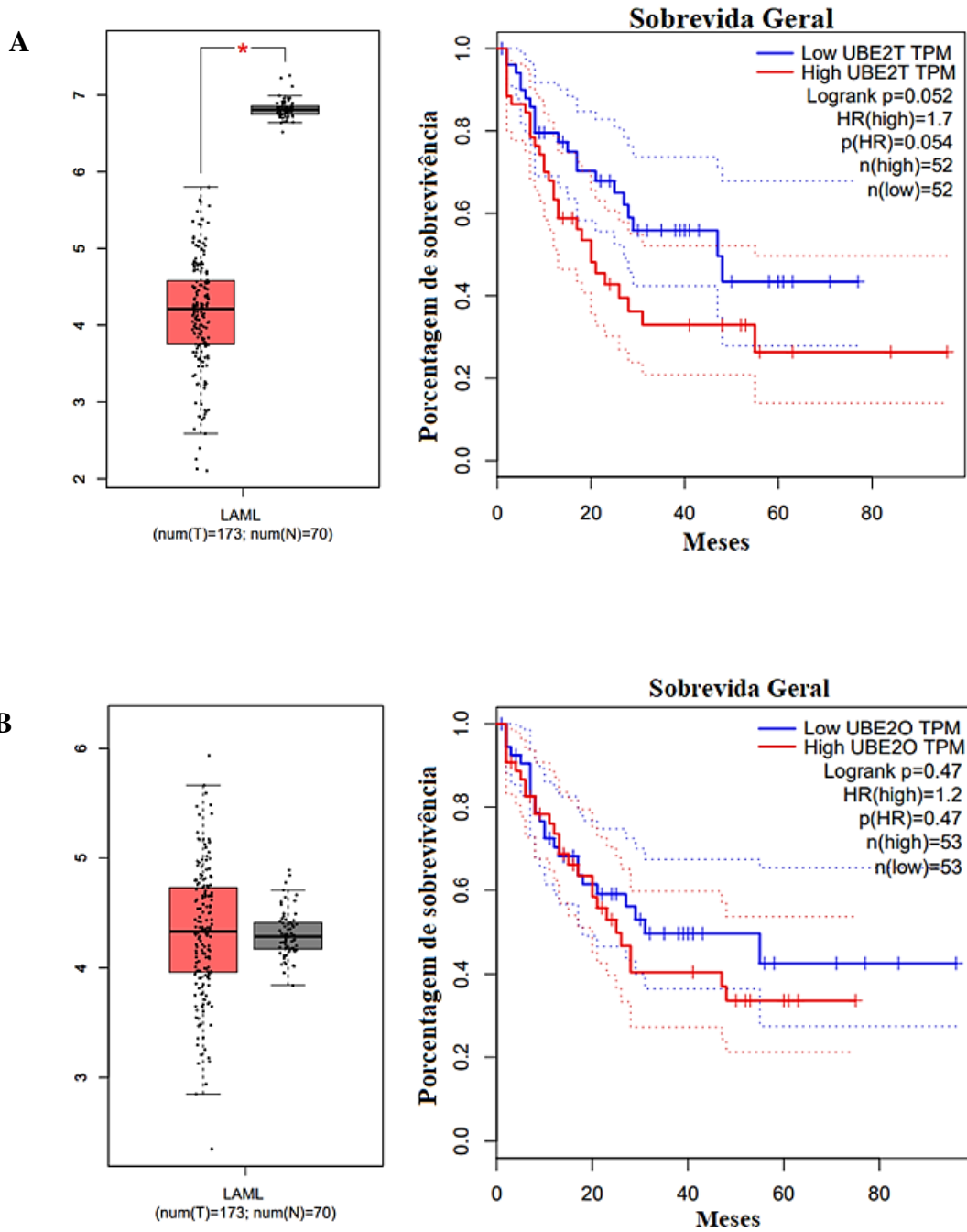
Fonte: Elaborada pelo autor através da ferramenta online GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>).

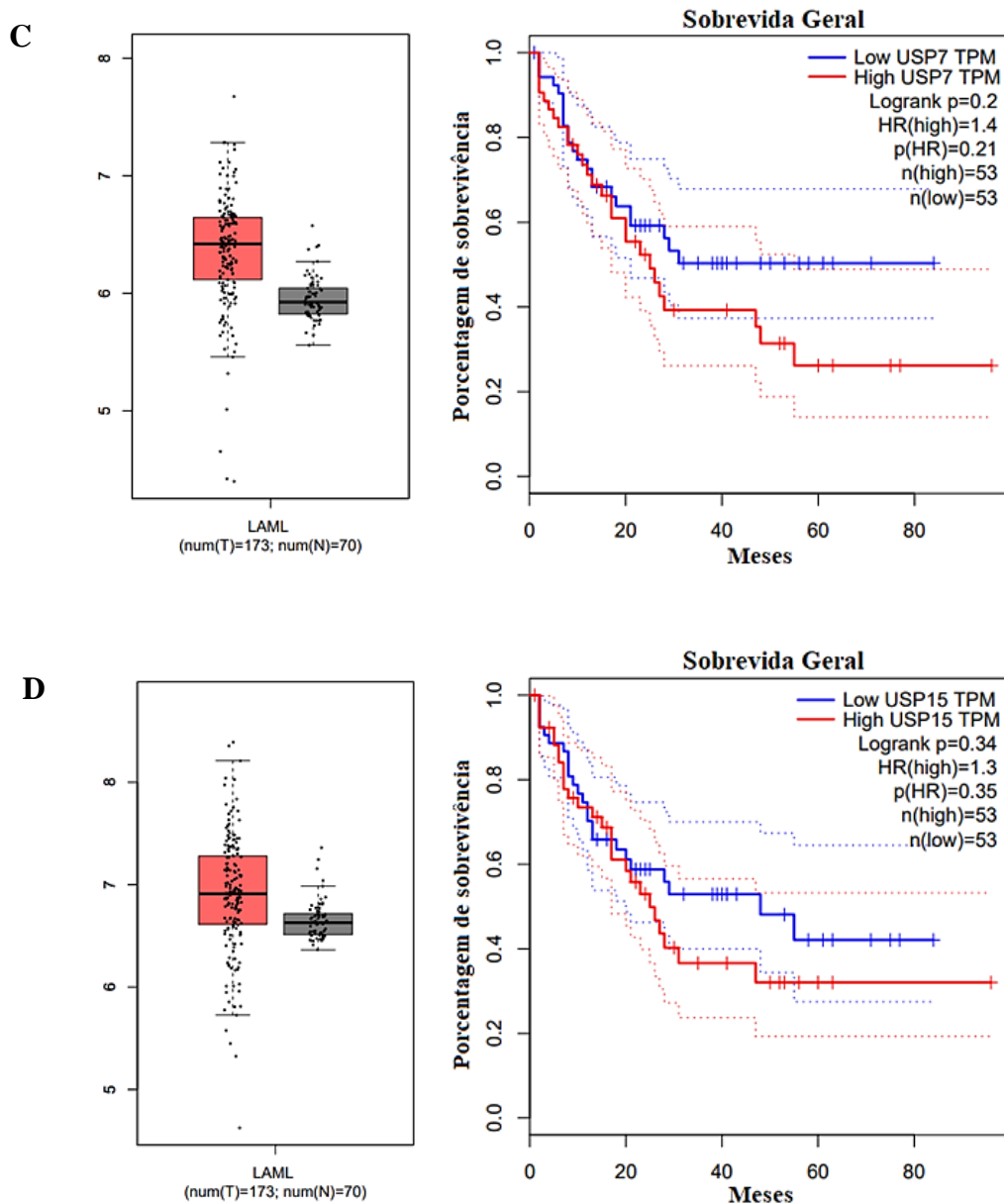
Legenda: Níveis de expressão gênica em transcritos por milhão (TPM) em cânceres da base de dados GEPIA. Pontos vermelhos representam os dados do câncer/tumor e pontos verdes são dados do grupo controle normal; siglas do câncer/tumor em vermelho e dos controles em verde representam expressão diferencialmente significativa com p-Valor <0.05, já a sigla em preto não possui expressão diferencial significativa p-Valor > 0.05 **A.** Expressão de *UBE2T*; **B.** Expressão de *UBE2O*; **C.** Expressão de *USP7*; **D.** Expressão de *USP15*. ACC: Carcinoma adrenocortical; BLCA: Carcinoma Urotelial de Bexiga; BRCA: Carcinoma invasivo da mama; CESC: Carcinoma de células escamosas do colo do útero e adenocarcinoma endocervical; CHOL: Carcinoma de colangio; COAD: Adenocarcinoma do cólon; DLBC: Neoplasia linfoide Linfoma difuso de grandes células B; ESCA: Carcinoma de esôfago; GBM: Glioblastoma multiforme; HNSC: Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço; KICH: Rim Cromóforo; KIRC: Carcinoma renal de células claras; KIRP: Carcinoma de células papilares renais; **LAML**: Leucemia mieloide aguda; LGG: Glioma de Grau Inferior do Cérebro; LIHC: Carcinoma hepatocelular; LUAD: Adenocarcinoma de pulmão; LUSC: Carcinoma de células escamosas de pulmão; MESO: Mesotelioma; OV: Cistadenocarcinoma seroso ovariano; PAAD: Adenocarcinoma de pâncreas; PCPG: Feocromocitoma e Paraganglioma; PRAD: Adenocarcinoma da próstata; READ: Adenocarcinoma de reto; SARC: Sarcoma; SKCM: Melanoma cutâneo da pele; STAD: Adenocarcinoma de estômago; TGCT: Tumores de células germinativas testiculares; THCA: Carcinoma de tireoide; THYM: Timoma; UCEC: Carcinoma do endométrio do corpo uterino; UCS: Carcinossarcoma Uterino; UVM: Melanoma Uveal

Adicionalmente, realizamos uma análise de sobrevida baseada nos níveis de expressão gênica de *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* de portadores de LMA, o qual observamos diferenças significativas (em *boderline*) em relação ao gene *UBE2T*, quanto a sobrevida dos pacientes com LMA, onde indivíduos com maiores níveis de expressão de *UBE2T* tiveram menor sobrevida geral, comparado com aqueles com menores níveis de expressão gênica na doença (p=0.052) (Figura 10).

Em relação aos genes *UBE2O*, *USP7* e *USP15*, não observamos diferenças significativas quanto a sobrevida dos pacientes com LMA em função dos níveis de expressão gênica, mesmo havendo uma tendência onde pacientes com maiores níveis de expressão gênica demonstram possuir uma menor sobrevida que aqueles com níveis de expressão menores (Figura 10).

Figura 10 - Análise de sobrevida e níveis de expressão do gene *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* na LMA, segundo a ferramenta online GEPIA





Fonte: Elaborada pelo autor através da ferramenta online GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>).

Legenda: *Boxplot* vermelho representa a LMA e o cinza representa o controle. **A.** Análise de sobrevida baseada na expressão gênica de *UBE2T* na LMA; **B.** Análise de sobrevida baseada na expressão gênica de *UBE2O* na LMA; **D.** Análise de sobrevida baseada na expressão gênica de *USP7* na LMA; **D.** Análise de sobrevida baseada na expressão gênica de *USP15* na LMA.

4.2 Caracterização dos pacientes da coorte em estudo e controles

Foram incluídos no estudo 84 pacientes com diagnóstico de SMD entre os anos 2008 e 2021. Todavia, foram excluídos do estudo 3 pacientes com SMD hipocelular, por se tratar de uma entidade ainda não muito bem caracterizada, 1 paciente jovem com 15 anos de idade, e 8 pacientes que suas amostras não expressaram algum dos genes de interesse. Sendo assim, o número amostral final do estudo (n) foi de 72 pacientes para o grupo SMD e 4 voluntários

saudáveis para o grupo controle. Vale ressaltar que os pacientes desta coorte são classificados somente como SMD primária, não possuindo pacientes com SMD secundária.

O grupo controle foi composto de 4 indivíduos idosos não portadores de SMD ou outra doença onco-hematológica. Sendo 3 (75%) do sexo feminino e 1 (25%) do sexo masculino, possuindo uma média de 76,5 anos de idade (Tabela 7).

Tabela 7 - Caracterização descritiva das variáveis sociodemográficas dos controles saudáveis

Características	N	Frequência (%)
Gênero Biológico	Feminino	3 75,0
	Masculino	1 25,0
Idade	76,5 ± 11,09 (60-84) *	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: As características são apresentadas em valor absoluto (N) e frequência dentro da população em estudo (%). *As características relacionadas a idade são apresentadas em média, desvio padrão (DP) e valor mínimo e máximo.

Do mesmo modo que os pacientes com SMD, os indivíduos controle foram submetidos a análise citogenética da medula óssea para melhor compreensão do grupo de estudo. Sendo assim, observamos que todos os 4 controles saudáveis possuíam cariótipo normal, como demonstrados na tabela 8.

Tabela 8 - Características citogenéticas dos controles saudáveis incluídos no estudo

Controle	Sexo	Idade	Cariótipo
1	M	81	46,XY[5]
2	F	60	46,XX[20]
3	F	84	46,XX[20]
4	F	81	46,XX[20]

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Características citogenéticas dos indivíduos controles incluídos no estudo. M – Masculino e F – Feminino.

Quanto às variáveis sociodemográficas dos pacientes com SMD, frente à variável gênero, foram incluídos 40 (55,6%) indivíduos do sexo feminino e 32 (44,4%) do sexo masculino. A variável idade foi estratificada de duas formas: idade categorizada (≤ 60 anos, > 60 anos) e idade categorizada de acordo com o IPSS-R (GREENBERG et al, 2012) (≤ 60 anos, $> 60 - 70$ anos, $> 70 - 80$ anos e > 80 anos). Para o grupo SMD, a média de idade foi de 71 anos (mediana = 74, desvio padrão = 14,26, mínimo de 31 anos e máximo de 93 anos) (Tabela 9).

Tabela 9 - Caracterização descritiva das variáveis sociodemográficas dos pacientes com SMD

Características		N	Frequência (%)
Grupo	Caso	72	94,4
	Controle	4	5,6
Dados sociodemográficos de pacientes com SMD			
Gênero Biológico	Feminino	40	55,6
	Masculino	32	44,4
Idade	71 ± 14,26 (31-93)*		
Idade (categorizada)	≤60	17	23,6
	>60	55	76,4
Idade (Categorizada de acordo com o IPSS 2012)	≤60 anos	17	23,6
	>60 a 70 anos	8	11,1
	>70 a 80 anos	25	34,7
	>80 anos	22	30,6

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: As características são apresentadas em valor absoluto (N) e frequência dentro da população em estudo (%). *As características relacionadas a idade são apresentadas em média, desvio padrão (DP) e valor mínimo e máximo.

Em relação classificação clínica, segundo a OMS (2016), os pacientes foram categorizados da seguinte forma: 10 (13,9%) pacientes como SMD-DU e 20 (27,8%) com SMD-DM. Já para a classificação de SMD com Sideroblastos em Anel, 5 (6,9%) pacientes com SMD-SA-DU e 9 (12,58%) com SMD-SA-DM. Não houve indivíduos com SMD com Del(5q) isolado. Finalmente, para a classificação de SMD com excesso de Blastos, obteve-se 18 (25,0%) pacientes com SMD-EB1 e 10 (13,9%) com SMD-EB2 (Tabela 10).

Tabela 10 - Estratificação clínica dos pacientes com SMD segundo a classificação da OMS (2016)

Subtipo	N	Frequência (%)
(SMD-DU)	10	13,9
(SMD-DM)	20	27,8
<i>SMD com Sideroblastos em Anel (SMD-SA)</i>		
(SMD-SA-DU)	5	6,9
(SMD-SA-DM)	9	12,5
<i>SMD com Excesso de Blastos (SMD-EB)</i>		
(SMD-EB1)	18	25,0
(SMD-EB2)	10	13,9
SMD com del(5q) isolado	0	0,0
<i>Total</i>	72	100,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

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

Ainda, realizamos a reclassificação dos pacientes segundo a nova classificação da OMS lançada em 2022 (OMS 2022), utilizando os critérios morfológicos, assim os pacientes foram categorizados da seguinte forma: 24 (33,3%) pacientes como SMD-BB, 17 (23,6%) com SMD-BB e SA e 3 (4,2%) pacientes com SMD-h. Já os pacientes com aumento blastos, obteve-se 18 (25,0%) pacientes com SMD-AB1 e 10 (13,9%) com SMD-AB2 (Tabela 11).

Tabela 11 - Estratificação clínica dos pacientes com SMD segundo a classificação da OMS (2022)

Subtipo	N	Frequência (%)
(SMD-BB)	24	33.3
(SMD-BB e SA)	17	23.6
(SMD-h)	3	4.2
(SMD-AB1)	18	25.0
(SMD-AB2)	10	13.9
<i>Total</i>	72	100.0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: SMD-BB (SMD com baixos blastos), SMD-BB e SA (SMD com baixos blastos e sideroblastos em anel), SMD-h (SMD hipoplásica), SMD-AB1 (SMD com aumento de blastos 1) e SMD-AB2 (SMD com aumento de blastos 2).

Quanto à variável celularidade da medula óssea, avaliada através da biópsia de medula óssea, 42 pacientes realizaram o exame de biópsia e observamos que 4 (5,6%) pacientes apresentaram medula óssea hipocelular, seguidos de 6 (8,3%) com medula óssea normocelular e 32 (44,4%) com medula hipercelular. Para os pacientes que não houve acesso a biópsia de medula óssea e conseqüentemente não há essas informações, destaca-se na tabela 12 como não informado, sendo um total de 30 (41,7%) pacientes (Tabela 12).

Também, foi avaliada a presença de displasias na medula óssea analisada principalmente através do exame de mielograma. Desse modo classificamos os pacientes de acordo com a quantidade de displasias apresentada nas linhagens celulares (1, 2 e 3 displasias, sendo este último a mais grave). A maioria dos casos desta coorte tiveram 2 tipos de displasias, sendo estes 27 (37,5%) casos, seguido de 25 (34,7%) casos com 1 displasia e 20 (27,8%) casos com 3 displasias na medula óssea. Observou-se que houve um predomínio de displasias na linhagem eritroide (diseritropoiese), em 62 (86,1%) casos, seguidos de displasias na linhagem megacariocítica (dismegacariopoiese) com 42 (58,3%) casos, e, por último, displasias na linhagem granulocítica (disgranulopoiese) onde se teve 35 (48,6%) casos (Tabela 12).

Quanto à presença de Sideroblastos em anel, 46 (63,9%) pacientes não apresentaram sideroblastos em anel na análise do mielograma ao diagnóstico. Por outro lado, observou-se

que 4 (5,6 %) pacientes foram incluídos na faixa de 1% - 14%, seguidos de 20 (27,8%) pacientes incluídos na faixa de $\geq 15\%$ (Tabela 12).

No que se refere a porcentagem de blastos na medula óssea, foi observado que 34 (47,2%) pacientes estavam incluídos na faixa de $\leq 2\%$ de blastos, seguido de 11 (15,3%) na faixa de $>2\%$ e $<5\%$, 17 (23,6%) na faixa de $>5\%$ a 10% e 10 (13,9%) incluídos na faixa $>10\%$ de blastos na medula óssea (Tabela 12).

Tabela 12 - Frequência das variáveis clínicas relacionadas aos achados da medula óssea em pacientes com SMD

Exame	Variáveis Clínicas	Nº	Frequência (%)	
Biópsia	Celularidade da medula óssea	Hipocelular	4	5,6
		Normocelular	6	8,3
		Hipercelular	32	44,4
		Não informado	30	41,7
Mielograma	Displasias na medula óssea	1	25	34,7
		2	27	37,5
		3	20	27,8
	Diseritropoiese	Presença	62	86,1
		Ausência	10	13,9
	Disgranulopoiese	Presença	35	48,6
		Ausência	37	51,4
	Dismegacariopoiese	Presença	42	58,3
		Ausência	30	41,7
	Presença de Sideroblastos em anel	0%	46	63,9
		$\geq 1\% - \leq 14\%$	4	5,6
		$>15\%$	20	27,8
		Não informado	2	2,8
	Faixas das porcentagens de blastos	$\leq 2\%$	34	47,2
		>2 a $<5\%$	11	15,3
		$>5\%$ a 10%	17	23,6
$>10\%$		10	13,9	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: As características são apresentadas em valor absoluto (N) e frequência dentro da população em estudo (%).

Os achados clínico-laboratoriais observados no sangue periférico dos pacientes encontram-se destacados na Tabela 13, com a média e uma medida de dispersão (desvio padrão), valor mínimo e máximo. No entanto, para melhor visualização da heterogeneidade da nossa coorte assim como é característica da SMD, categorizamos os resultados laboratoriais por intervalos.

Tabela 13 - Variáveis clínico-laboratoriais relacionadas aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD

Variáveis	Média (desvio padrão)	Min.	Máx.
Hemoglobina (HB)	8,29 (\pm 2,32) g/dL	3,8 g/dL	14,20 g/dL
Neutrófilos (ANC)	2069,61 (\pm 1998,25) /mm ³	144/mm ³	10.374/mm ³
Plaquetas	150.967 (\pm 134.343) /mm ³	9.982/mm ³	556.100/mm ³

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: As variáveis são apresentadas em média, desvio padrão (DP), valor mínimo e máximo.

Foi observado, ao hemograma, que 33 (45,8%) pacientes apresentaram hemoglobina inferior a 8g/dL, 17 (23,6%) pacientes apresentaram contagem absoluta de neutrófilos (ANC) inferior a 800 por mm³ e, por fim, 15 (20,8%) pacientes com contagem de plaquetas inferior ou igual a 100.000/mm³ (Tabela 14). Em relação ao número de citopenias identificadas no sangue periférico, de acordo com os pontos estabelecidos por Greenberg et al. (2012), foi observado um predomínio de pacientes com a presença de apenas 1 (uma) citopenia em 33 (45,8%) casos avaliados.

Tabela 14 - Variáveis clínico-laboratoriais categorizada aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD

Variáveis	Nº	%	
Classificação dos valores de hemoglobina (HB)	> 10g/dL	18	25,0
	\geq 8 a \leq 10g/dL	21	29,2
	<8 g/dL	33	45,8
Classificação dos valores de neutrófilos (ANC)	\geq 800/mm ³	55	76,4
	<800/mm ³	17	23,6
Classificação dos valores de plaquetas	\geq 100.000/mm ³	39	54,2
	\geq 50.000 -		
	<100.000/mm ³	15	20,8
	<50.000/mm ³	18	25,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: As características são apresentadas em valor absoluto (N) e frequência dentro da população em estudo (%).

Os pacientes com SMD são classificados quanto ao risco de a doença evoluir para LMA. Com relação a classificação de risco baseada no IPSS-R, 10 (13,89%) dos pacientes apresentam IPSS-R de muito baixo risco, 18 (25,0%) baixo risco, 12 (16,67%) risco intermediário, 10 (13,89%) alto risco e 9 (12,50%) muito alto risco. Há uma limitação quanto a classificação de risco quando os pacientes que não possuem cariótipo, nesses casos não é possível obter o score

classificatório e conseqüentemente esses pacientes não possuem classificação de risco baseada no IPSS-R, portanto, esses casos estão listados na tabela 15 como não se aplica.

Tabela 15 - Classificação de risco de pacientes com SMD de acordo com o IPSS-R

Variáveis	Nº	%	
Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R	Muito baixo (≤ 1.5)	10	13,89
	Baixo ($>1.5-3$)	18	25,00
	Intermediário ($>3-4.5$)	12	16,67
	Alto ($>4.5-6$)	10	13,89
	Muito alto (>6)	9	12,50
	Não se aplica	13	18,06

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: As características são apresentadas em valor absoluto (N) e frequência dentro da população em estudo (%). Não se aplica se refere a pacientes que não possuem cariótipo (ausência de metáfase), esses não possuem classificação de risco baseada no IPSS-R, devido a limitação do próprio score.

4.3 Análise das alterações Citogenética por bandeamento G em pacientes com SMD

A avaliação citogenética é essencial para o diagnóstico e prognóstico de indivíduos com suspeita e/ou com diagnóstico de SMD. Portanto, foi realizado a análise do cariótipo com Banda G de amostras de medula óssea de todos os 72 pacientes com SMD incluídos neste estudo. A partir disso, observou-se que 59 (81,9%) deles apresentaram resultados sólidos e conclusivos e 13 (18,1%) apresentaram ausência de metáfase no exame ao diagnóstico (Tabela 16).

Após a análise dos casos, identificou-se que 41 (56,9%) pacientes possuíam cariótipo normal e 18 (25,0%) apresentaram cariótipo alterado. Dentre as alterações do cariótipo destaca-se as de origem aneuplóide que envolvem perda ou adição de cromossomos, nesta coorte há 12 (16,7%) casos com esse tipo de alteração, e 6 (8,3%) casos com alterações não aneuplóides. Alterações citogenéticas são frequentes em pacientes com SMD, e nesta coorte, as alterações mais comuns são aquelas relacionada ao cromossomo 5 (-5/5q-), onde 6 (8,3%) pacientes apresentaram alterações relacionadas a esse cromossomo. Seguido daqueles com alterações relacionadas ao cromossomo 7 (-7/7q-), com 4 (5,6%) pacientes com algum tipo de alteração (Tabela 16).

Realizamos também a classificação prognóstica frente ao cariótipo, estabelecida pelo IPSS-R (GREENBERG et al., 2012) e verificamos que houve um predomínio de pacientes com prognóstico favorável em 18 (25,0%) casos. Vale ressaltar que os pacientes que não possuem resultado conclusivo do cariótipo, ou seja, aqueles que não houve crescimento celular e o resultado foi ausência de metáfase, estão representados na tabela como não se aplica (Tabela 16).

Tabela 16 - Frequência dos resultados citogenéticos e seu impacto prognóstico em pacientes com SMD ao diagnóstico

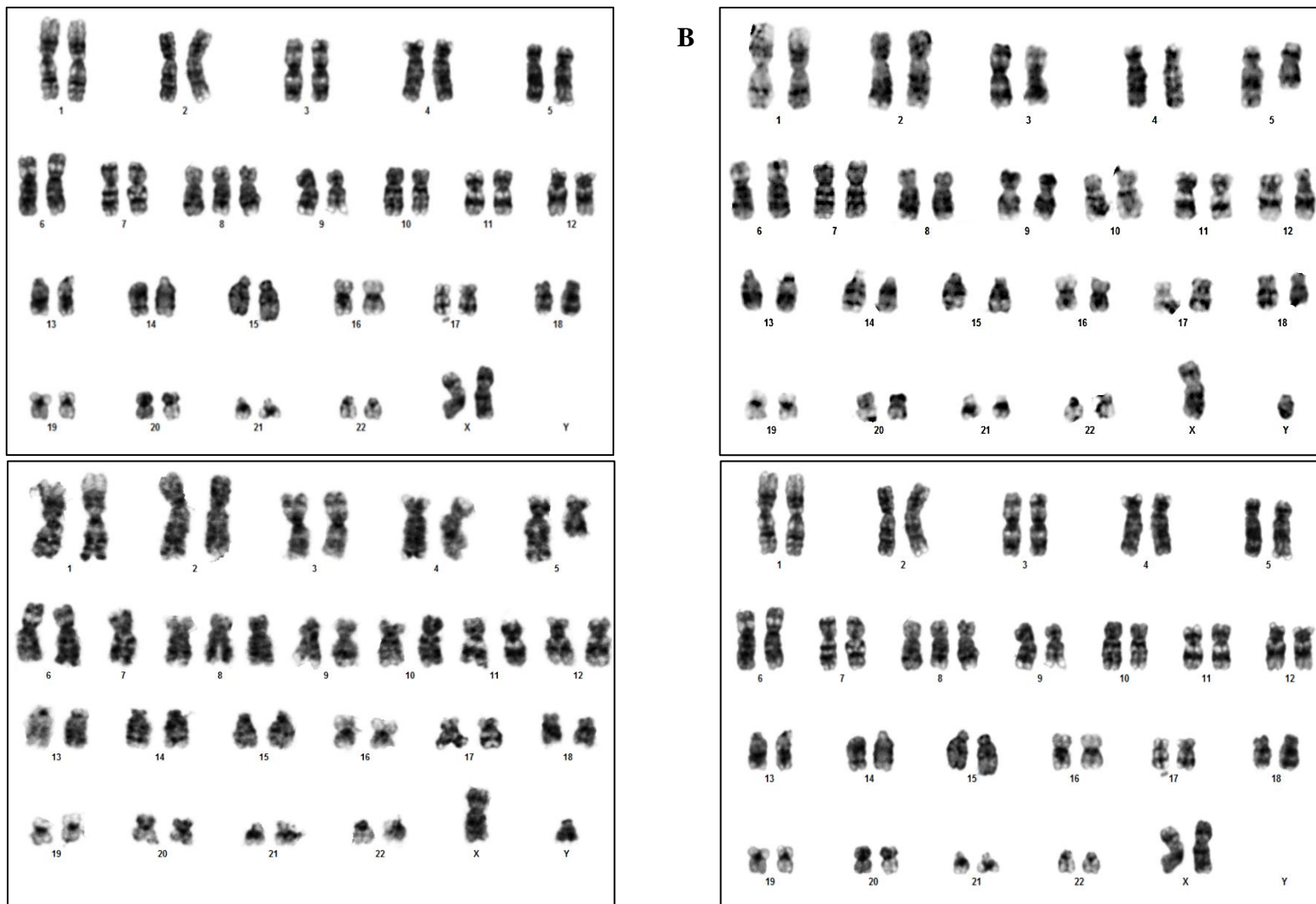
Variáveis		Nº	Frequência (%)
Cariótipo	Normal	41	56,9
	Alterado	18	25,0
	Ausência de metáfase	13	18,1
Aneuploidia	Normal	41	56,9
	Alterado não Aneuplóide	6	8,3
	Aneuplóide	12	16,7
	Não se aplica	13	18,1
Alterações no cromossomo 5	Normal	41	56,9
	Alterado com 5q-	6	8,3
	Alterado sem 5q-	12	16,7
	Não se aplica	13	18,1
Alterações no cromossomo 7	Normal	41	56,9
	Alterado com 7q-	4	5,6
	Alterado sem 7q-	14	19,4
	Não se aplica	13	18,1
Classificação do cariótipo de acordo com o IPSS-R	Muito favorável	10	13,9
	Favorável	18	25,0
	Intermediário	12	16,7
	Desfavorável	10	13,9
	Muito desfavorável	9	12,5
	Não se aplica	13	18,1

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: As características são apresentadas em valor absoluto (N) e frequência dentro da população em estudo (%). Não se aplica se refere aos pacientes que possuem resultado do cariótipo com ausência de metáfase.

Para melhor compreensão das alterações, abaixo estão representadas as principais alterações encontradas nos pacientes da coorte, bem como a representação do cariótipo normal de pacientes masculinos e femininos (Figura 11).

Figura 11 - Representação dos resultados citogenéticos encontrados nos pacientes com SMS a partir de amostras de medula óssea



Os dados complementares relacionados aos achados citogenéticos e clínicos dos pacientes com SMD incluídos nessa coorte, estão representados abaixo na tabela 17.

Tabela 17 - Características citogenéticas e classificação clínica dos pacientes com SMD incluídos no estudo

Pacientes	Sexo	Idade	Celularidade	Cariótipo - ISCN 2016	OMS 2016	IPSS-R	Dependência Transfusional	Evolução LMA
1	M	62	Hiperclular	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2]	SMD-EB2	Risco Muito Alto	Sim	Não
2	M	74	Normocelular	46,XY[11]	SMD-DM	Baixo Risco	Sim	Não
3	F	52	Hiperclular	46,XX[8]	SMD-DU	Muito Baixo	Sim	Sim
4	M	82	Hiperclular	Ausência de metáfase	SMD-SA-DM	-	Sim	Não
5	F	66	Hiperclular	46,XX[7]	SMD-DM	Baixo Risco	Sim	Não
6	F	81	Hiperclular	46,XX[5]	SMD-SA-DM	Muito Baixo	Sim	Não
7	M	47	Normocelular	47,XY,+mar[5]/46,XY,del(5)(q31)[5]/46,XY[15]	SMD-DM	Risco Intermediário	Sim	Não
8	M	81	Hiperclular	46 XY [20]	SMD-DU	Alto Risco	Não	Sim
9	M	88	Normocelular	46 XY [6]	SMD-DM	Risco Intermediário	Não	Não
10	M	71	Hiperclular	46,XY[17]	SMD-SA-DU	Muito Baixo	Não	Não
11	M	68	Hiperclular	Ausência de metáfase	SMD-EB2	-	Sim	Sim
12	M	79	Hiperclular	46,XY[7]	SMD-DM	Muito Baixo	Sim	Não
13	F	61	-	46,XX[20]	SMD-DU	Risco Intermediário	Sim	Não
14	M	82	-	Ausência de metáfase	SMD-DM	-	Sim	Não
15	F	70	Hiperclular	Ausência de metáfase	SMD-SA-DM	-	Sim	Não
16	F	87	Hiperclular	Ausência de metáfase	SMD-DU	-	Não	Não
17	F	77	Hiperclular	46,XX[27]	SMD-EB1	Alto Risco	Sim	Não
18	F	58	-	Ausência de metáfase	SMD-DU	-	Sim	Sim
19	F	84	Hiperclular	Ausência de metáfase	SMD-SA-DU	-	Não	Não
20	F	72	-	Ausência de metáfase	SMD-EB2	-	Sim	Não
21	F	71	Hiperclular	46 XX [10]	SMD-DM	Risco Intermediário	Sim	Não
22	F	77	-	Ausência de metáfase	SMD-DU	-	Sim	Não
23	M	31	-	46,XY[24]	SMD-DM	Baixo Risco	Não	Não
24	M	60	Hiperclular	47,XY,+15[10]/46,XY[10]	SMD-SA-DM	Baixo Risco	Sim	Não
25	F	71	Hiperclular	46,XX[5]	SMD-DU	Muito Baixo	-	-
26	M	43	Hiperclular	46,XY[5]	SMD-DM	Baixo Risco	Sim	Não
27	F	60	Normocelular	Ausência de metáfase	SMD-DM	-	-	Não

28	F	45	-	46,XX[20]	SMD-EB2	Alto Risco	Sim	Não
29	M	80	-	Ausência de metáfase	SMD-EB1	-	-	Não
30	F	45	Normocelular	46,XX[7]	SMD-DM	Muito Baixo	Não	Não
31	M	79	-	46,XY,del(5)(q34),del(11)(q23)[7]/46,XY[5]	SMD-DU	Alto Risco	Sim	Não
32	F	76	-	46,XX[15]	SMD-SA-DU	Baixo Risco	Não	Não
33	F	86	Hipocelular	Ausência de metáfase	SMD-EB1	-	Sim	Não
34	F	53	Hiper celular	46 XX [20]	SMD-DM	Baixo Risco	Não	Não
35	F	62	Hipocelular	46 XX [10]	SMD-DM	Baixo Risco	Não	Não
36	M	74	Hiper celular	Ausência de metáfase	SMD-DM	-	Não	Não
37	M	81	Hipocelular	46,XY[18]	SMD-DM	Baixo Risco	Não	Sim
38	F	86	-	46,XX[20]	SMD-SA-DM	Risco Intermediário	Não	Não
39	M	58	Hiper celular	46,XY,del(5)(q32)[3]/46,XY,del(5)(q32),del(7)(q36)[3]/46,XY,5,+mar[9]/46,XY[7]	SMD-EB1	Risco Muito Alto	-	Não
40	M	92	-	46,XY,del(5)(q32)[13]/46,XY[17]	SMD-SA-DM	Baixo Risco	Não	Não
41	F	48	-	46,XY[4]	SMD-DU	Muito Baixo	Não	-
42	M	71	Normocelular	46,XY[20]	SMD-EB1	Alto Risco	Sim	Não
43	F	76	-	46,XX[20]	SMD-SA-DU	Baixo Risco	Não	Não
44	M	75	Hiper celular	92,XXYY<4n>[4]/46,XY[8]	SMD-EB1	Risco Muito Alto	Não	Sim
45	M	82	Hiper celular	92,XXYY<4n>[5]/46,XY[15]	SMD-DM	Risco Intermediário	Não	Não
46	F	77	-	46,XX[20]	SMD-EB1	Baixo Risco	Não	Não
47	F	63	-	92,XXXX<4n>[3]/46,XX[17]	SMD-DM	Baixo Risco	Não	Não
48	M	79	-	46,XY[20]	SMD-EB1	Risco Intermediário	Sim	-
49	F	82	-	47,XX,+8[9]/47,XX,+8,del(20)(q12)[5]/46,XX[6]	SMD-SA-DM	Risco Intermediário	Sim	Não
50	F	45	-	47,XX,+6[3]/46,XX[17]	SMD-DM	Baixo Risco	-	Não
51	F	43	-	46,XX[20]	SMD-EB1	Risco Intermediário	Não	Não
52	F	79	-	46,XX[12]	SMD-EB2	Alto Risco	Sim	Não
53	F	81	Hiper celular	46,XY[20]	SMD-EB2	Alto Risco	Não	-
54	M	55	Hiper celular	45,XY,-7[15]/46,XY,-7,+mar[5]	SMD-EB2	Risco Muito Alto	Sim	Sim
55	M	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	Risco Muito Alto	Sim	Não
56	F	46	Hiper celular	46,XX[20]	SMD-DM	Baixo Risco	Sim	Não
57	F	93	-	46,XX,+8[12]/46,XX[8]	SMD-EB1	Risco Muito Alto	-	-
58	M	84	-	46,XY[20]	SMD-EB1	Alto Risco	Sim	Não
59	F	80	Hiper celular	46,XY[20]	SMD-SA-DU	Baixo Risco	Não	Não
60	M	87	-	46,XY[20]	SMD-DU	Muito Baixo	-	Não

61	F	73	Hipocelular		46, XX[20]	SMD-DM	Muito Baixo	Não	Não
62	M	71	Hiper celular		46,XY[15]	SMD-SA-DM	Muito Baixo	Não	Não
63	M	76	Hiper celular	46, XY, del (5)(q31)[2]/46,XY, del(5)(q31)-7,+8[16]		SMD-EB2	Risco Muito Alto	Não	Não
64	M	58	Hiper celular		46,XX[20]	SMD-EB1	Risco Intermediário	Sim	Sim
65	F	84	-		46,XX[20]	SMD-EB1	Alto Risco	Não	Não
66	F	72	-	46,XX,inv(3)(q21q26.2)[16]/46,XX[4]		SMD-EB1	Risco Muito Alto	Sim	Não
67	F	71	-		46,XX[20]	SMD-EB1	Baixo Risco	Não	Não
68	M	72	Hiper celular		46,XY[20]	SMD-EB1	Risco Intermediário	Não	Não
69	F	91	-		46,XX[20]	SMD-EB1	Alto Risco	Não	Sim
70	M	64	Hiper celular		46,XY[20]	SMD-EB1	Risco Intermediário	Não	Não
71	F	87	Hiper celular	46, XX, del(11)(q21)[16]/46,XX[4]		SMD-SA-DM	Baixo Risco	Não	Não
72	F	86	-		46,XX,del(5)(q14)[5]/46,XX[15]	SMD-EB2	Risco Muito Alto	Sim	-

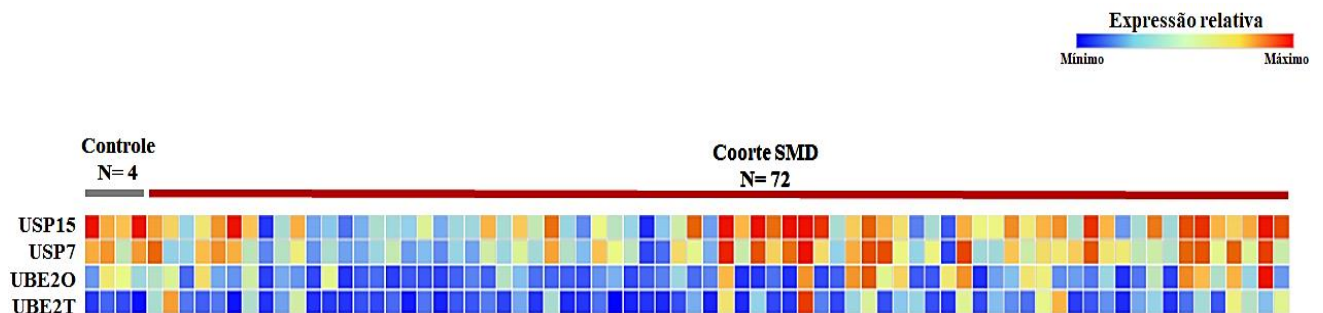
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: M (Masculino), F (Feminino), SMD-DU (SMD com displasia unilinhagem), SMD-DM (SMD com displasia multilinhagem), SMD-SA-DU (SMD com sideroblastos em anel e displasia unilinhagem), SMD-SA-DM (SMD com sideroblastos em anel e displasia multilinhagem), SMD-EB1 (SMD com excesso de blastos 1), SMD-EB2 (SMD com excesso de blastos 2), - (não se aplica/dados não informados).

4.4 Validação da expressão gênica por qRT-PCR em amostras de medula óssea de pacientes brasileiros com SMD

Realizamos um ensaio de expressão gênica de medula óssea numa coorte de pacientes brasileiros com SMD e controles saudáveis, onde podemos observar que para os genes em estudo não há um padrão de expressão na doença, evidenciando de forma visual, a marcante característica heterogênea da SMD. O mesmo não se dá em relação aos controles, o qual apresentam um perfil de expressão semelhante (Figura 12).

Figura 12 - Heatmap dos níveis de expressão relativa dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* em pacientes com SMD e indivíduos saudáveis



Fonte: Elaborada pelo autor através da ferramenta online Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

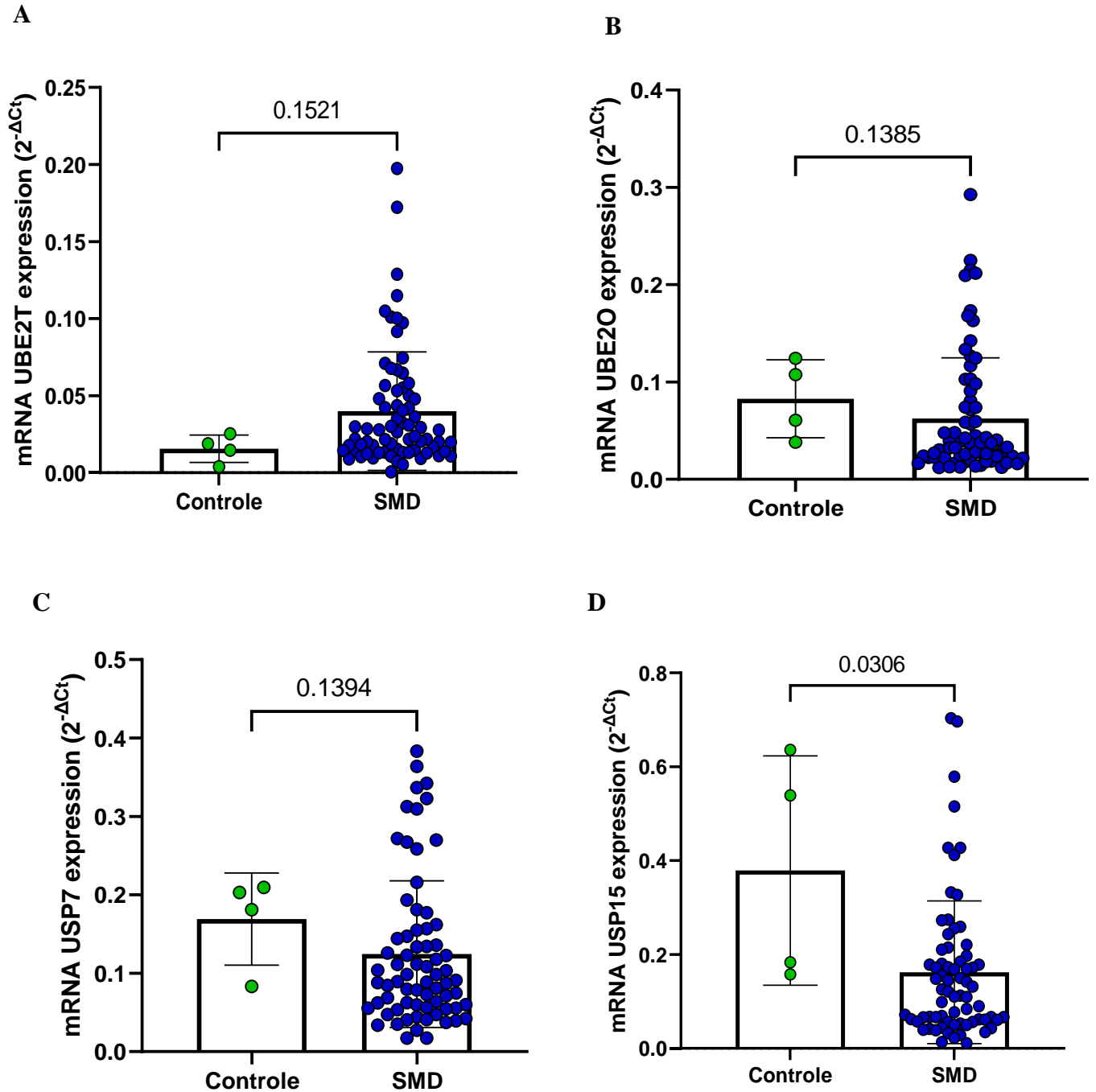
Legenda: Representação dos níveis de expressão relativa dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* nos pacientes com SMD e indivíduos saudáveis (controle).

As associações entre os níveis de expressão dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* e as variáveis clínico-laboratoriais, bem como a associação com o grupo controle (indivíduos saudáveis) serão apresentados a seguir. Os resultados serão apresentados por variável analisada, para melhor compreensão.

4.4.1 Expressão gênica dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* em pacientes com SMD e indivíduos saudáveis

Ao avaliar os níveis de expressão gênica em pacientes com SMD (n=72) e indivíduos saudáveis (controle) (n= 4), verificamos que houve uma significativa diminuição do nível de expressão da *USP15* nos pacientes em relação aos controles (p= 0,030) (Figura 13D). Não foram identificadas associações significativas nas expressões dos genes *UBE2T* (p=0,152) (Figura 13A), *UBE2O* (p=0,138) (Figura 13B) e *USP7* (p=0,139) (Figura 13C) na associação caso x controle no presente estudo.

Figura 13 - Nível de expressão dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* em pacientes com SMD em relação aos controles saudáveis

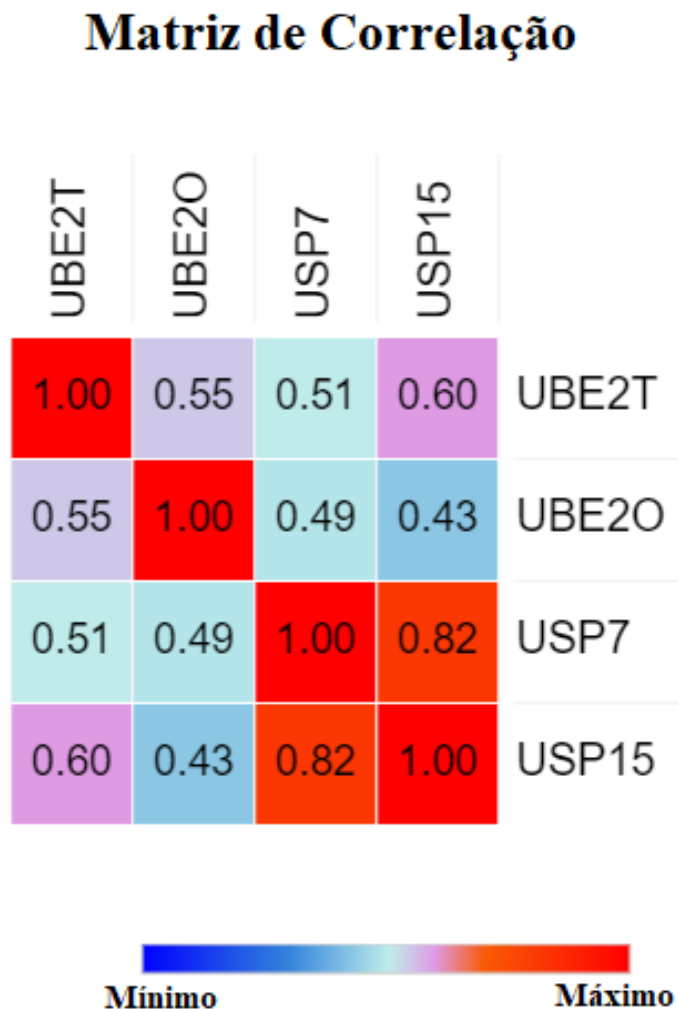


Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: **A.** Análise de caso versus controle em relação a expressão do gene *UBE2T*. **B.** Análise de caso versus controle em relação a expressão do gene *UBE2O*. **C.** Análise de caso versus controle em relação a expressão do gene *USP7*. **D.** Análise de caso versus controle em relação a expressão do gene *USP15*.

Posteriormente, realizamos uma análise de correlação entre os níveis de expressão dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15*, sendo observado uma correlação positiva moderada entre os genes *UBE2T*, *USP7* e *USP15* ($r=0,51$; $r^2=0,60$; $p<0,0001$). Além disso, foi observada uma correlação positiva forte entre os genes *USP7* e *USP15* ($r=0,82$; $p<0,0001$). Entretanto, o gene *UBE2O* demonstrou apenas uma correlação positiva moderada com *UBE2T* ($r=0,55$; $p<0,0001$) e positiva fraca com o gene *USP7* e *USP15* ($r=0,49$; $r^2=0,43$; $p<0,0001$), como demonstrado abaixo (Figura 14).

Figura 14 - Heatmap da análise de correlação entre os genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* e seus níveis de expressão gênica

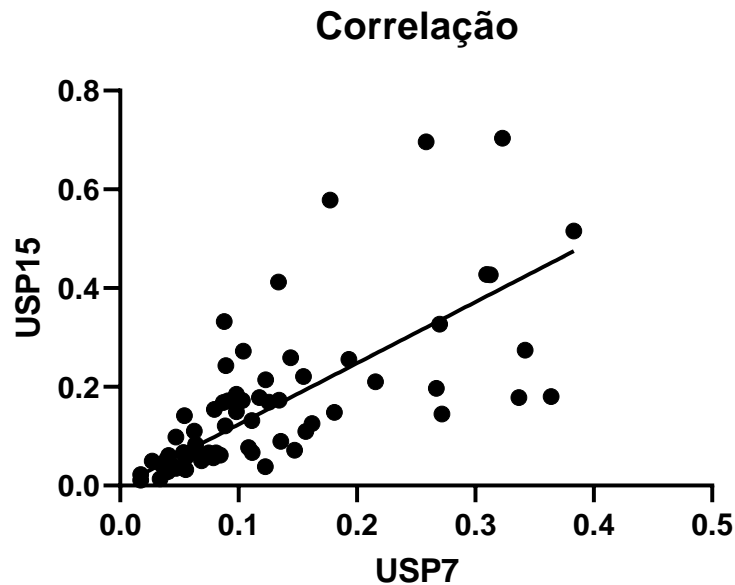


Fonte: Elaborada pelo autor através da ferramenta online Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>) e análises realizadas no software SPSS.

Legenda: Representação das análises de correlação de Spearman entre os genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* frente a seus níveis de expressão gênica dos pacientes com SMD.

Realizamos teste de regressão linear para visualizar melhor as correlações entre os genes com maior correlação. Abaixo demonstramos a correlação positiva forte de *USP7* e *USP15* relacionada a expressão gênica ($r=0,80$; $p<0,0001$) (Figura 15).

Figura 15 - Análise de correlação entre os genes *USP7* e *USP15* e seus níveis de expressão gênica por Regressão Linear



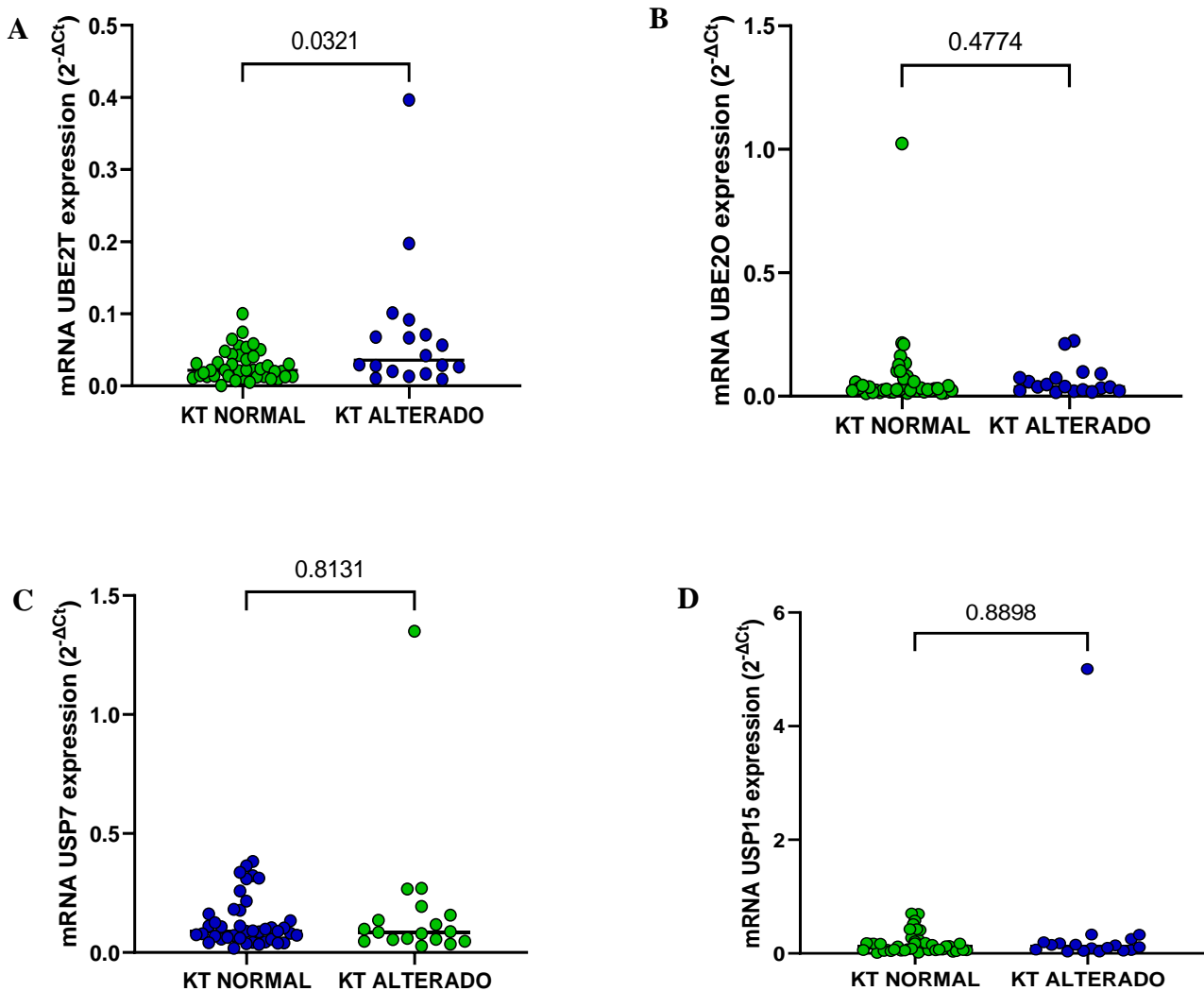
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Representação das análises de correlação por regressão linear entre os genes *USP7* e *USP15* frente a seus níveis de expressão gênica dos pacientes com SMD.

4.4.2 Achados Citogenéticos

Na análise do nível de expressão gênica associada ao perfil citogenético dos pacientes com SMD, identificamos que pacientes com cariótipo alterado apresentaram maior expressão do gene *UBE2T* em relação à pacientes com resultado de cariótipo normal ($p=0,0321$) (Figura 16). Não observamos diferenças significativas entre a associação de paciente com cariótipo normal *versus* cariótipo alterado e a expressão de *UBE2O*, *USP7* e *USP15* ($p>0,05$).

Figura 16 - Nível de expressão dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* em pacientes com SMD em relação a variável cariótipo normal e alterado



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: **A.** Análise da expressão do gene *UBE2T* frente a variável cariótipo normal versus alterado. **B.** Análise da expressão do gene *UBE2O* frente a variável cariótipo normal versus alterado. **C.** Análise da expressão do gene *USP7* frente a variável cariótipo normal versus alterado. **D.** Análise da expressão do gene *USP15* frente a variável cariótipo normal versus alterado.

Do mesmo modo, não encontramos associações significantes com relação ao nível de expressão dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* e as demais variáveis relacionadas a análise do cariótipo: cariótipo com aneuploidias ou cariótipo complexo, cariótipo com presença de deleção no cromossomo 5 e cariótipo com presença de deleção no cromossomo 7 ($p > 0,05$).

4.4.3 Expressão gênica em relação às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD

4.4.3.1 Achados de sangue periférico

Avaliamos se havia diferenças entre os níveis de expressão gênica quanto a variável Hemoglobina (Hb) nos pacientes com SMD, porém, não obtivemos valores significantes ($p > 0,05$) de expressão dos genes *UBE2T* ($p=0,269$), *UBE2O* ($p=0,576$), *USP7* ($p=0,948$) e *USP15* ($p=0,735$) em pacientes que apresentaram $Hb \leq 10g/dL$ em comparação com os pacientes que apresentaram $Hb > 10g/dL$, dados categorizados de acordo com o IPSS-R. Não observamos outras diferenças significativas entre a associação das demais características observadas no sangue periférico e a expressão de *UBE2O*, *USP7* e *USP15* ($p > 0,05$).

4.4.3.2 Achados na Medula Óssea

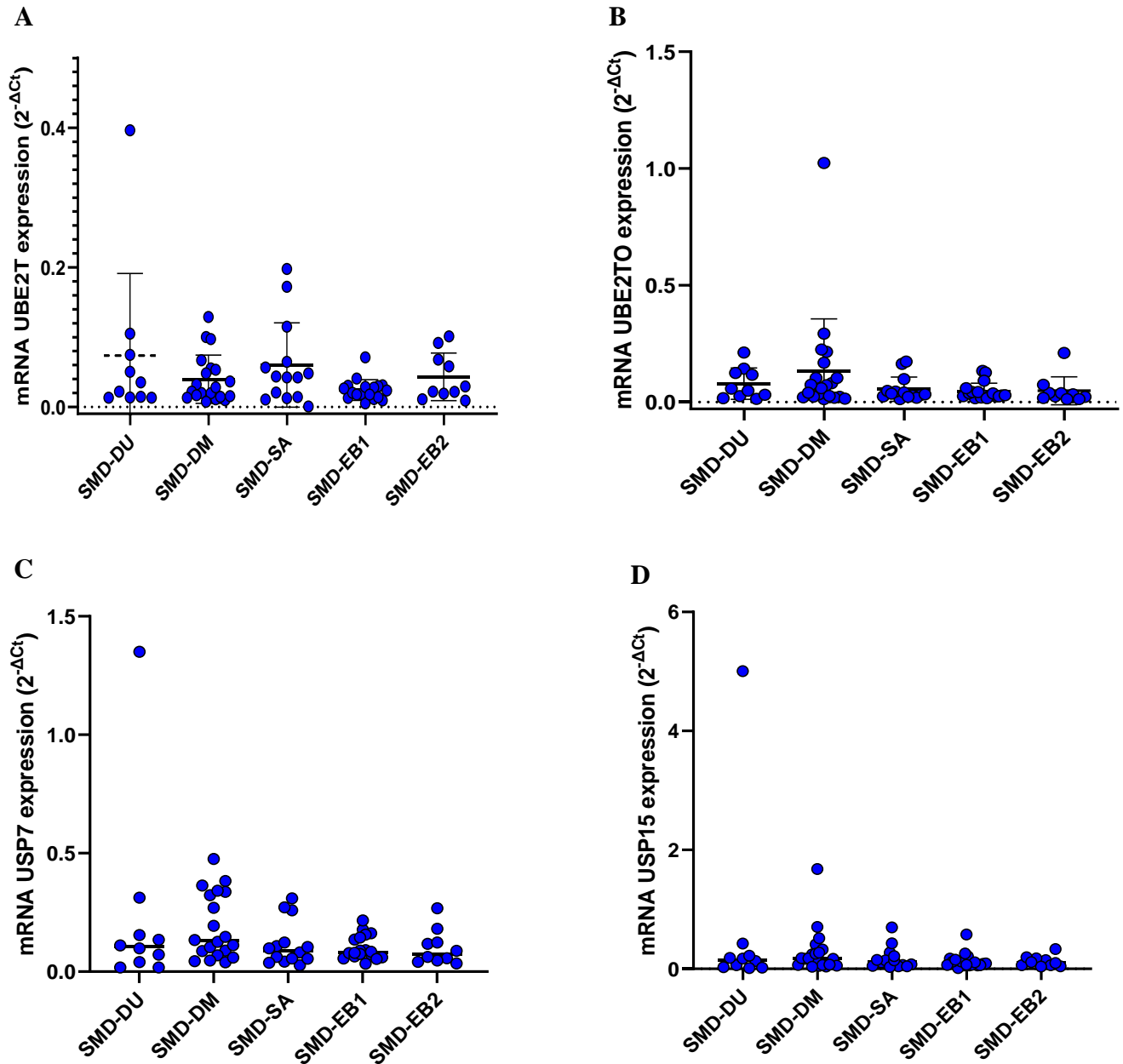
Para os genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão gênica e as variáveis relacionadas aos achados medulares, como celularidade, fibrose, número e tipo de displasias na medula óssea (diseritropoiese, disgranulopoiese e dismegacariopoiese) e percentual de blastos ($p > 0,05$).

4.4.4 Expressão gênica em relação a classificação clínica e estratificação prognóstica dos pacientes com SMD.

4.4.4.1 Classificação OMS 2016

Quanto a classificação dos pacientes com SMD de acordo com os subtipos estabelecidos pela OMS (ARBER *et al.*, 2016), verificamos que não existe expressão diferencial significativa entre os genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* entre os subtipos de SMD categorizados de acordo com a OMS 2016 ($p > 0,05$), demonstrados na Figura 17.

Figura 17 - Expressão dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* em pacientes com SMD em relação aos subtipos categorizados de acordo com a OMS 2016



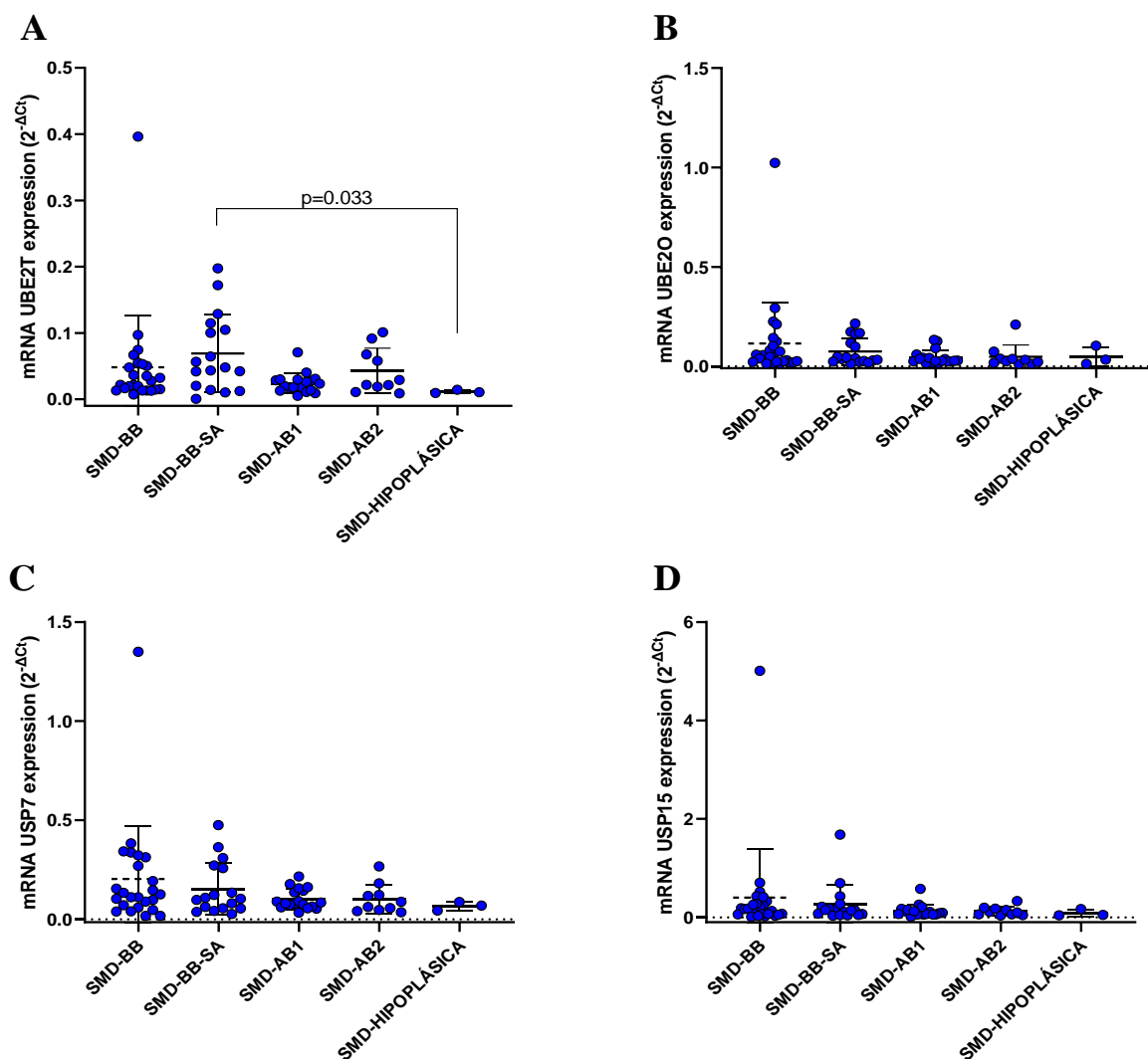
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: **A.** Análise da expressão do gene *UBE2T* em relação aos subtipos da SMD. **B.** Análise da expressão do gene *UBE2O* em relação aos subtipos da SMD. **C.** Análise da expressão do gene *USP7* em relação aos subtipos da SMD. **D.** Análise da expressão do gene *USP15* em relação aos subtipos da SMD. SMD-DU (SMD com displasia unilinhagem), SMD-DM (SMD com displasia multilinhagem), SMD-SA (SMD com sideroblastos em anel), SMD-EB1 (SMD com excesso de blastos 1) e SMD-EB2 (SMD com excesso de blastos 2).

4.4.4.2 Classificação OMS 2022

Apesar dos pacientes desta coorte terem sido classificados segundo critérios estabelecidos pela OMS 2016 (ARBER *et al.*, 2016), no decorrer deste estudo a nova classificação da OMS 2022 (KHOURY *et al.*, 2022) foi publicada. Assim, realizamos uma reclassificação dos casos segundo os critérios morfológicos da nova classificação e verificamos que existe uma expressão diferencial significativa do gene *UBE2T* entre os subtipos SMD-BB-SA E SMD hipoplásica ($p=0,033$), assim, ressaltando a importância da nova classificação. Para os demais genes e subtipos da doença não apresentaram expressão diferencial significativa ($p>0,05$) (Figura 18).

Figura 18 - Expressão dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* em pacientes com SMD em relação aos subtipos categorizados de acordo com a OMS 2022



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: **A.** Análise da expressão do gene *UBE2T* em relação aos subtipos da SMD. **B.** Análise da expressão do gene *UBE2O* em relação aos subtipos da SMD. **C.** Análise da expressão do gene *USP7* em relação aos subtipos da SMD. **D.** Análise da expressão do gene *USP15* em relação aos subtipos da SMD. SMD-BB (SMD com baixos blastos), SMD-BB-SA (SMD com baixos blastos e sideroblastos em anel), SMD-h (SMD hipoplásica), SMD-AB1 (SMD com aumento de blastos 1) e SMD-AB2 (SMD com aumento de blastos 2).

4.4.4.3 *Classificação dos Grupos de Risco de acordo com o IPSS-R*

Quanto à classificação de risco segundo o IPSS-R dos pacientes com SMD, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas expressões dos genes *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* e *USP15* dentre os grupos de risco do IPSS-R (muito baixo risco, baixo, intermediário, alto e muito alto).

5 DISCUSSÃO

A ubiquitinação é uma modificação enzimática pós-traducional, onde as proteínas ubiquitinadas são degradadas pelo sistema ubiquitina-proteassoma, o qual controla a degradação da maioria das proteínas intracelulares e desempenha papéis importantes em muitos processos celulares. A ubiquitinação é um processo dinâmico e reversível, uma vez que as deubiquitilases são capazes de remover a ubiquitina de seus substratos proteicos, permitindo que as proteínas sejam recuperadas da degradação proteassômica (LIANG *et al.*, 2019).

Por controlar a estabilidade da maioria das proteínas celulares, a ubiquitinação tem um papel essencial nos mecanismos das células, e por isso a sua desregulação pode contribuir para desenvolvimento de doenças humanas, incluindo o câncer (TURNBULL *et al.*, 2017). Do mesmo modo que a ubiquitinação possui um papel chave nas funções celulares, a desubiquitinação é essencial e sua disfunção ou desregulação está relacionada a uma série de patologias e doenças, incluindo neoplasias hematológicas (SAHASRABUDDHE; ELENITOBA-JOHNSON, 2015).

Nesta pesquisa, realizamos o primeiro estudo de análise da expressão dos genes de ubiquitinação (*UBE2T* e *UBE2O*) e de deubiquitinação (*USP7* e *USP15*) em relação à patogênese e quanto a associação com variáveis clínicas em pacientes com SMD. Os resultados deste estudo serão discutidos de acordo com a categorização dos níveis de expressão dos genes avaliados de acordo com o agrupamento das associações clínicas significantes apresentadas.

Inicialmente identificamos que os pacientes com SMD que possuem cariótipo alterado apresentaram de modo significativo uma maior expressão de *UBE2T* em comparação com aqueles que possuíam cariótipo normal. É válido ressaltar que a SMD é uma doença de instabilidade genômica, e os paciente são frequentemente associados a alterações cromossômicas (STEENSMA, 2015). A Enzima conjugadora de ubiquitina E2T (*UBE2T*) pertence à família de enzimas de conjugação de ubiquitina, identificada inicialmente como um importante elemento na via da anemia de Fanconi (AF). Nesta via, a *UBE2T* liga-se ao FANCL, uma E3 ubiquitina ligase, mediando a monoubiquitinação de FANCD2, proteína que está envolvida no reparo de DNA na via da AF (MACHIDA *et al.*, 2006; RICKMAN *et al.*, 2015).

A participação da *UBE2T* na monoubiquitinação de FANCD2/FANCI é um processo fundamental para o reparo de danos ao DNA, conferindo a manutenção da estabilidade cromossômica, onde falhas nesse processo resulta em aberrações cromossômicas, característica conhecida nas células da Anemia de Fanconi (ZHANG; ZHOU; HUANG, 2007). Além disso, (UEKI *et al.*, 2009) também reforçaram o papel da *UBE2T* no controle do mecanismo de reparo

do DNA quando reportaram que esse alvo interage e colocaliza o complexo de proteínas de domínio RING associado a BRCA1/BRCA1 (BARD1). No referido estudo, diversos ensaios demonstraram o efeito da UBE2T no controle da expressão da proteína BRCA1. Por exemplo, ensaios de ubiquitinação *in vivo* indicaram que a proteína BRCA1 não sofre poliubiquitinação quando incubada com a proteína UBE2T inativada. Além disso, o *knock down* da proteína UBE2T induziu a regulação positiva da proteína BRCA1 em células de câncer de mama, enquanto sua superexpressão causou a diminuição da proteína BRCA1 (UEKI *et al.*, 2009).

Sobre este tópico, nosso grupo de pesquisa tem feito esforços quanto a avaliação do papel de genes de reparo de DNA na patobiologia da SMD. A partir de análises de expressão gênica em células-tronco hematopoiéticas CD34+ de pacientes com SMD, foi identificado que o gene BRCA1 esteve com expressão diminuída em pacientes com >5% de blastos e em pacientes que foram a óbito (RIBEIRO *et al.*, 2018). De um modo interessante, os pacientes com cariótipo alterado associados ao aumento de expressão de *UBE2T* identificados no presente estudo também foram associados ao aumento de blastos na medula óssea.

Além disto, pacientes com diminuição da expressão de BRCA1 (<0.009285) foram associados com uma pior sobrevida global (RIBEIRO *et al.*, 2018), reforçando e o gene *BRCA1* está desregulado na SMD. Frente a isto, hipotetizamos que o aumento da expressão de *UBE2T* em pacientes com cariótipo alterado pode estar desencadeando a diminuição de *BRCA1*, desativando o mecanismo de recombinação homóloga que viria a reverter as alterações citogenéticas identificadas nestes pacientes. Estudos futuros de correlação de *BRCA1* e *UBE2T* são necessários para a validação desta hipótese.

Ainda, aos realizamos uma reclassificação dos pacientes de acordo com os critérios da OMS 2022, observamos que os pacientes com SMD-h possuem níveis mais baixos de expressão gênica que os paciente com SMD-BB-SA (p=0,033), diferentemente dos resultados obtidos na classificação OMS 2016, onde não observamos valores significativos de expressão do gene *UBE2T* quanto a classificação clínica da doença. Desse modo, podemos ressaltar a importância da nova classificação, porém, também é importante ressaltar que a mesma possui limitações e ainda não se faz muito presente na prática clínica, tanto por ser muito nova e recém publicada, como por necessitar de exames mais complexos e de custo elevado, tornando o acesso, principalmente no SUS mais limitado.

Por fim avaliamos a expressão de *UBE2O*, uma enzima híbrida, que possui atividades E2 e E3, podendo ubiquitinar proteínas de maneira independente de E3 (ULLAH *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2017). Alguns estudos apontam que *UBE2O* possui um papel importante em diversos canceres, como no mieloma múltiplo (MM), onde *UBE2O* leva a degradação de c-Maf (um

fator de transcrição expresso em MM), inibindo o crescimento celular levando a apoptose de células do MM, sendo considerado um supressor tumoral (XU *et al.*, 2017). No câncer de mama e próstata seu aumento de expressão induz à proliferação de células cancerígenas, promovendo a ubiquitinação e degradação de AMPK α 2 (ULLAH *et al.*, 2019; VILA *et al.*, 2017). Ainda, pacientes com alta expressão de *UBE2O* tendem a ter um alto risco de metástase e mau prognóstico no câncer de mama (LIU *et al.*, 2020).

Na leucemia de linhagem mista (do inglês, *Mixed-lineage leucemia* - MLL) a depleção de *UBE2O* diminui a proliferação de células leucêmicas devido à reduzida ubiquitinação e degradação da proteína MLL do tipo selvagem e sua consequente maior estabilidade (LIANG *et al.*, 2017). Em nosso estudo não identificamos diferenças patogênicas e prognóstica da expressão de *UBE2O* na SMD.

Vale ressaltar que *UBE2O* é frequentemente amplificado ou mutado em múltiplos cânceres, e sua alta expressão está associada à baixa taxa de sobrevivência de pacientes com câncer gástrico, pulmão, mama e próstata. Portanto, nossos resultados não afastam a hipótese de que alterações genômicas (por exemplo a presença de mutações) no gene *UBE2O* possam ser identificadas na SMD e estar associada com a patogênese da doença. Estudos futuros são necessários para afirmarmos esta hipótese (ULLAH *et al.*, 2019).

Um importante gene relacionado aos mecanismos de ubiquitinação celular é a protease 7 específica da ubiquitina (*USP7*), um membro enzimático essencial da família USP DUB definida como protease de cisteína de ~128 kDa com um papel significativo na estabilidade do genoma, onde a *USP7* regula o eixo de sinalização p53/Mdm2 (VALLES *et al.*, 2020).

O gene *USP7* é conhecido pelo seu envolvimento em múltiplas vias celulares, e sua expressão é frequentemente desregulada em malignidades humanas. O aumento de sua expressão contribui para a progressão de tumores por meio de alterações na resposta ao dano do DNA, apoptose e controle do ciclo celular (CARRÀ *et al.*, 2017). No presente estudo, a partir de uma análise *in silico*, identificamos que o gene *USP7* está discretamente aumentado na LMA. Nas nossas análises em amostras de medula óssea de pacientes com SMD, identificamos que o gene *USP7* não apresentou perfil de expressão diferenciado frente ao grupo controle, como também não identificamos associações com variáveis clínicas e prognósticas da doença. Estes dados reforçam que não há um consenso do real impacto da *USP7* na patogênese de doenças onco-hematológicas, principalmente na SMD, foco deste estudo.

Alguns autores descrevem que o aumento da expressão de *USP7* está associado a uma variedade de malignidades humanas, tais como câncer de próstata, mama, pulmão, colo do útero

e no mieloma múltiplo, regulando a atividade de proteínas promotoras ou supressoras tumorais (HE *et al.*, 2020; NIAZI; PUROHIT; NIAZI, 2018; VEGGIANI *et al.*, 2019).

O papel da USP7 é também descrito em alguns tipos de doenças onco-hematológicas. Agathangelou *et al.* (2017) descreveram que na Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) há um aumento de expressão de USP7 em comparação com indivíduos saudáveis. Foi demonstrado também que a perda ou inibição da USP7 interrompe parcialmente o reparo do DNA por recombinação homóloga e, conseqüentemente, induz a morte significativa de células tumorais independentemente de ATM e p53, através do acúmulo de níveis genotóxicos de danos ao DNA (AGATHANGGELOU *et al.*, 2017). Cartel e colaboradores (2021) demonstraram que a inibição de USP7 reduz significativamente a proliferação celular *in vitro e in vivo*, como também bloqueia a progressão da replicação do DNA e aumenta a morte celular na LMA. Em SMD há somente um estudo que descreve a expressão de USP7 em uma coorte de 28 pacientes asiáticos. (DENG *et al.*, 2020) identificaram que a expressão de USP7 está aumentada em pacientes com SMD, mas exclusivamente naqueles de alto risco (SMD-EB-1 e SMD-EB-2). Destaca-se que os autores não avaliaram o perfil de expressão de USP7 em pacientes com os demais subtipos clínicos da doença. Portanto, o nosso estudo é o primeiro a avaliar a expressão gênica de USP7 em uma ampla coorte de pacientes com SMD estratificados pela nova classificação clínica estabelecida pela OMS 2016.

Destaca-se que a SMD é uma doença que comumente cursa com citopenias periféricas, e a principal delas é a anemia. Um estudo relativamente recente mostrou que a estabilidade de USP7 é fundamental para a eritropoiese, trazendo à tona que a deficiência de USP7 prejudica a diferenciação eritroide humana devido a diminuição do nível de proteína GATA1 em linhagens celulares HEK293T, considerado o regulador mestre da eritropoiese. Além disso, observou-se que a USP7 interage diretamente com GATA1 e catalisa a remoção de cadeias de poliubiquitilação ligadas a K48 conjugadas em GATA1, estabilizando, assim, a proteína essencial na eritropoiese (LIANG *et al.*, 2019). Portanto, devido à escassez de dados que validem o papel da USP7 na patobiologia da SMD, sugere-se a necessidade de ampliar os estudos sobre este gene a partir de uma casuística mais ampla de pacientes, buscando inferir sua participação na via de deubiquitinação do proteossoma celular nessa doença principalmente sua atuação junto a USP15, os quais foram fortemente correlacionados neste estudo.

A protease 15 específica da ubiquitina (USP15) é uma enzima deubiquitinante implicada em processos celulares e oncogênicos críticos, cuja expressão é desregulada em diversos tipos de cânceres. Alguns autores relatam que a expressão aumentada de USP15 está relacionada com o desenvolvimento de diversos tipos de cânceres entre eles se destacam o Carcinoma

Hepatocelular (YAO *et al.*, 2020), Mieloma Múltiplo (ZHOU *et al.*, 2018) e câncer gástrico, onde o nível de expressão foi positivamente correlacionado com as características clínicas, como tamanho do tumor, profundidade de invasão, metástase, invasão vascular e outros, sendo sua expressão relacionada a um pior prognóstico (ZHONG *et al.*, 2021).

Especificamente para doenças onco-hematológicas, segundo (VAN DEN BERK *et al.*, 2020), o gene *USP15* é altamente expresso em tecidos hematopoiéticos humanos e leucemias e a sua depleção em progenitores murinos e células de leucemia prejudica a expansão celular *in vitro* e aumenta o estresse genotóxico. Nas células leucêmicas, o gene *USP15* interage e estabiliza o FUS (fundido no sarcoma), um fator de reparo de DNA, ligando diretamente a *USP15* à resposta ao dano do DNA, demonstrando a importância das DUBs na preservação da hematopoiese normal. Desse modo, vê-se que a *USP15* atua como uma DUB crítica na proteção da integridade do genoma em células-tronco hematopoiéticas e células leucêmicas.

Na LMA, verifica-se que a *USP15* possui um aumento de expressão em comparação com as células progenitoras hematopoiéticas normais e sua inibição e a ativação seguinte de NRF2 (fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2) levam a perturbações redox (oxidação-redução) nas células leucêmicas. Por outro lado, curiosamente, *USP15* é dispensável para células hematopoiéticas normais de humanos e camundongos *in vitro* e *in vivo* (NIEDERKORN *et al.*, 2022). Ainda, Niederkorn e colaboradores (2020) descobriram que o TIFAB (domínio B associado a forquilha), proteína comumente envolvida em malignidades mieloides com deleção do cromossomo 5q, regula a sinalização de *USP15* para substratos em células hematopoiéticas. Vê-se que a expressão de TIFAB em HSCs permite a sinalização de *USP15* para distintos substratos, incluindo MDM2 e KEAP1, levando a diminuição da expressão de p53, podendo consequentemente promover a transformação leucêmica (NIEDERKORN *et al.*, 2020).

Sobre este ponto, em nosso estudo, identificamos que o gene *USP15* está com a expressão significativamente reduzida em pacientes com SMD em comparação com indivíduos saudáveis. Não foram identificadas diferenças entre o perfil de expressão deste gene em variáveis clínico-laboratoriais na doença, principalmente em relação a presença de anormalidades cromossômicas. É importante ressaltar que o gene *TIFAB* está localizado no cromossomo 5 na região 5q31.1 e este gene é comumente deletado nas doenças hematológicas, inclusive na SMD com del(5q). Destaca-se também que, no nosso estudo foram identificadas somente 6 (8,33%) pacientes com presença de deleção no cromossomo 5, mesmo que de forma não isolada, ou seja, não houve prevalência de casos de síndrome do 5q na presente pesquisa.

Compreendendo que a casuística de pacientes com SMD avaliada neste estudo não está associada a presença de deleção no cromossomo 5, entende-se que o gene *TIFAB* está ativo e

recrutando efetivamente a *USP15* para a deubiquitinação dos seus alvos. Porém, ao identificarmos que *USP15* está com expressão diminuída nos casos avaliados, hipotetizamos que este evento molecular, ou seja, a diminuição da expressão de *USP15*, mantenha a expressão de *TP53* suficiente para manter o controle do ciclo celular, impedindo uma evolução clonal da doença para LMA. Assim, verificamos que a *USP15* pode ser considerada um possível novo marcador de controle de instabilidade genômica para a SMD. São necessários estudos futuros que validem o papel do TIFAB e sua correlação com *USP15* na SMD.

Uma importante limitação deste estudo está associada a necessidade de validação funcional do perfil e do impacto da expressão dos genes *USP7*, *USP15*, *UBE2T* e *UBE2O* avaliados neste estudo em uma casuística mais ampla de casos, seja, por exemplo, por análises de sequenciamento de última geração quanto à avaliação de novas mutações passíveis de impactarem o correto funcionamento desses genes em pacientes com SMD.

Em síntese, demonstramos pela primeira vez que os genes *USP7*, *USP15* e *UBE2T* podem estar relacionados a patogênese ou variáveis prognósticas da SMD suportando a importância desses genes para um melhor entendimento da etiologia e estratificação prognóstica da Síndrome Mielodisplásica.

6 CONCLUSÕES

A partir do desenvolvimento deste estudo, podemos concluir que:

1. Nossos dados demonstraram uma significativa diminuição da expressão do gene *USP15* na SMD, podendo corresponder a um novo marcador molecular de patogênese para essa doença;
2. Identificamos uma forte correlação entre os genes *USP7* e *USP15* na SMD, reforçando o papel dos mecanismos de deubiquitinação na patogênese da SMD;
3. Verificamos que o gene *UBE2T* apresentou-se com aumento de expressão em pacientes com a presença de anormalidades cromossômicas ao cariótipo, podendo ser considerado um novo marcador de agressividade da doença;

Portanto, nossos resultados destacam que a expressão gênica diferencial do eixo *USP15-USP7* e *UBE2T* pode desempenhar um papel importante no controle da instabilidade genômica estabelecendo uma das características mais marcantes na SMD, as anormalidades cromossômicas.

REFERÊNCIAS

- AGATHANGGELOU, A.; SMITH, E.; DAVIES, N. J.; KWOK, M.; ZLATANOU, A.; OLDREIVE, C. E.; MAO, J.; DA COSTA, D.; YADOLLAHI, S.; PERRY, T.; KEARNS, P.; SKOWRONSKA, A.; YATES, E.; PARRY, H.; HILLMEN, P.; REVERDY, C.; DELANSORNE, R.; PANEESHA, S.; PRATT, G.; MOSS, P.; TAYLOR, A. M. R.; STEWART, G. S.; STANKOVIC, T. USP7 Inhibition Alters Homologous Recombination Repair and Targets CLL Cells Independently of ATM/P53 Functional Status. **Blood**, v. 130, n. 2, p. 156–166, 13 jul. 2017.
- ALAGPULINSA, D. A.; KUMAR, S.; TALLURI, S.; NANJAPPA, P.; BUON, L.; CHAKRABORTY, C.; SAMUR, M. K.; SZALAT, R.; SHAMMAS, M. A.; MUNSHI, N. C. Amplification and Overexpression of E2 Ubiquitin Conjugase UBE2T Promotes Homologous Recombination in Multiple Myeloma. **Blood Advances**, v. 3, n. 23, p. 3968–3972, 10 dez. 2019.
- ALESHIN, A.; GREENBERG, P. L. Molecular Pathophysiology of the Myelodysplastic Syndromes: Insights for Targeted Therapy. **Blood Advances**, v. 2, n. 20, p. 2787–2797, 23 out. 2018.
- ARBER, D. A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; THIELE, J.; BOROWITZ, M. J.; LE BEAU, M. M.; BLOOMFIELD, C. D.; CAZZOLA, M.; VARDIMAN, J. W. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 19 maio 2016.
- BAKER, R. T.; WANG, X.-W.; WOOLLATT, E.; WHITE, J. A.; SUTHERLAND, G. R. Identification, Functional Characterization, and Chromosomal Localization of USP15, a Novel Human Ubiquitin-Specific Protease Related to the UNP Oncoprotein, and a Systematic Nomenclature for Human Ubiquitin-Specific Proteases. **Genomics**, v. 59, n. 3, p. 264–274, ago. 1999.
- BELLI, C. B.; PINHEIRO, R. F.; BESTACH, Y.; LARRIPA, I. B.; DA SILVA TANIZAWA, R. S.; ALFONSO, G.; GONZALEZ, J.; ROSENHAIN, M.; WATMAN, N.; CAVALCANTE DE ANDRADE SILVA, M.; NEGRI ARANGUREN, P.; GARCÍA RIVELLO, H.; MAGALHAES, S. M. M.; VALLADARES, X.; UNDURRAGA, M. S.; VELLOSO, E. R. P. Myelodysplastic Syndromes in South America: A Multinational Study of 1080 Patients: Myelodysplastic Syndromes in South America. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 10, p. 851–858, out. 2015.
- BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.-T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A. G.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-Operative Group. **British Journal of Haematology**, v. 33, n. 4, p. 451–458, ago. 1976.
- BENNETT, J. M.; CATOVSKYM, D.; FLANDRIN, G.; SULTAN, C. Proposals for the Classification of the Myelodysplastic Syndromes. **Myelodysplastic Syndromes**, p. 11, 1982.
- BERNARD, E.; NANNYA, Y.; HASSERJIAN, R. P.; DEVLIN, S. M.; TUECHLER, H.; MEDINA-MARTINEZ, J. S.; YOSHIZATO, T.; SHIOZAWA, Y.; SAIKI, R.; MALCOVATI, L.; LEVINE, M. F.; ARANGO, J. E.; ZHOU, Y.; SOLÉ, F.; CARGO, C. A.;

HAASE, D.; CREIGNOU, M.; GERMING, U.; ZHANG, Y.; GUNDEM, G.; SARIAN, A.; VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; JÄDERSTEN, M.; TOBIASSON, M.; KOSMIDER, O.; FOLLO, M. Y.; THOL, F.; PINHEIRO, R. F.; SANTINI, V.; KOTSIANIDIS, I.; BOULTWOOD, J.; SANTOS, F. P. S.; SCHANZ, J.; KASAHARA, S.; ISHIKAWA, T.; TSURUMI, H.; TAKAORI-KONDO, A.; KIGUCHI, T.; POLPRASERT, C.; BENNETT, J. M.; KLIMEK, V. M.; SAVONA, M. R.; BELICKOVA, M.; GANSTER, C.; PALOMO, L.; SANZ, G.; ADES, L.; DELLA PORTA, M. G.; ELIAS, H. K.; SMITH, A. G.; WERNER, Y.; PATEL, M.; VIALE, A.; VANNESS, K.; NEUBERG, D. S.; STEVENSON, K. E.; MENGHRAJANI, K.; BOLTON, K. L.; FENAUX, P.; PELLAGATTI, A.; PLATZBECKER, U.; HEUSER, M.; VALENT, P.; CHIBA, S.; MIYAZAKI, Y.; FINELLI, C.; VOSO, M. T.; SHIH, L.-Y.; FONTENAY, M.; JANSEN, J. H.; CERVERA, J.; ATSUTA, Y.; GATTERMANN, N.; EBERT, B. L.; BEJAR, R.; GREENBERG, P. L.; CAZZOLA, M.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; OGAWA, S.; PAPAEMMANUIL, E. 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.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. 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.

CARRÀ, G.; PANUZZO, C.; TORTI, D.; PARVIS, G.; CRIVELLARO, S.; FAMILIARI, U.; VOLANTE, M.; MORENA, D.; LINGUA, M. F.; BRANCACCIO, M.; GUERRASIO, A.; PANDOLFI, P. P.; SAGLIO, G.; TAULLI, R.; MOROTTI, A. Therapeutic Inhibition of USP7-PTEN Network in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Strategy to Overcome TP53 Mutated/Deleted Clones. **Oncotarget**, v. 8, n. 22, p. 35508–35522, 30 maio 2017.

CARTEL, M.; MOUCHEL, P.-L.; GOTANÈGRE, M.; DAVID, L.; BERTOLI, S.; MANSAT-DE MAS, V.; BESSON, A.; SARRY, J.-E.; MANENTI, S.; DIDIER, C. Inhibition of Ubiquitin-Specific Protease 7 Sensitizes Acute Myeloid Leukemia to Chemotherapy. **Leukemia**, v. 35, n. 2, p. 417–432, fev. 2021.

CAZZOLA, M. Myelodysplastic Syndromes. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 14, p. 1358–1374, 1 out. 2020.

CHAMSEDDINE, A. N.; JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. M.; BOHANNAN, Z. S.; GARCIA-MANERO, G. Unraveling Myelodysplastic Syndromes: Current Knowledge and Future Directions. **Current Oncology Reports**, v. 18, n. 1, p. 4, jan. 2016.

CHAUHAN, D.; TIAN, Z.; NICHOLSON, B.; KUMAR, K. G. S.; ZHOU, B.; CARRASCO, R.; MCDERMOTT, J. L.; LEACH, C. A.; FULCINNITI, M.; KODRASOV, M. P.; WEINSTOCK, J.; KINGSBURY, W. D.; HIDESHIMA, T.; SHAH, P. K.; MINVIELLE, S.; ALTUN, M.; KESSLER, B. M.; ORLOWSKI, R.; RICHARDSON, P.; MUNSHI, N.; ANDERSON, K. C. A Small Molecule Inhibitor of Ubiquitin-Specific Protease-7 Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells and Overcomes Bortezomib Resistance. **Cancer Cell**, v. 22, n. 3, p. 345–358, set. 2012.

CIECHANOVER, A.; ELIAS, S.; HELLER, H.; HERSHKO, A. “Covalent Affinity” Purification of Ubiquitin-Activating Enzyme. p. 7, 10 mar. 1982.

CIEHANOVER, A.; HOD, Y.; RERSHKOL, A. A HEAT-STABLE POLYPEPTIDE COMPONENT OF AN ATP-DEPENDENT PROTEOLYTIC SYSTEM FROM RETICULOCYTES. **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**, v. 81, n. 4, p. 6, 1978.

CORN, P. G. Role of the Ubiquitin Proteasome System in Renal Cell Carcinoma. **BMC Biochemistry**, v. 8, n. Suppl 1, p. S4, 2007.

COSTA, M. B.; FARIAS, I. R.; DA SILVA MONTE, C.; FILHO, L. I. P. F.; DE PAULA BORGES, D.; DE OLIVEIRA, R. T. G.; RIBEIRO-JUNIOR, H. L.; MAGALHÃES, S. M. M.; PINHEIRO, R. F. Chromosomal Abnormalities and Dysregulated DNA Repair Gene Expression in Farmers Exposed to Pesticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 103564, fev. 2021.

DENG, J.; LIANG, L.; YI, H.; SU, T.; YANG, Z.; NIE, L.; LIU, J. USP7 Inhibition Inhibits Proliferation and Induces Megakaryocytic Differentiation in MDS Cells by Upregulating Gelsolin. **British Journal of Haematology**, v. 190, n. 3, p. 418–429, ago. 2020.

EICHHORN, P. J. A.; RODÓN, L.; GONZÁLEZ-JUNCÀ, A.; DIRAC, A.; GILI, M.; MARTÍNEZ-SÁEZ, E.; AURA, C.; BARBA, I.; PEG, V.; PRAT, A.; CUARTAS, I.; JIMENEZ, J.; GARCÍA-DORADO, D.; SAHUQUILLO, J.; BERNARDS, R.; BASELGA, J.; SEOANE, J. USP15 Stabilizes TGF- β Receptor I and Promotes Oncogenesis through the Activation of TGF- β Signaling in Glioblastoma. **Nature Medicine**, v. 18, n. 3, p. 429–435, mar. 2012.

ELETR, Z. M.; WILKINSON, K. D. Regulation of Proteolysis by Human Deubiquitinating Enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 1, p. 114–128, jan. 2014.

GARCIA-MANERO, G.; CHIEN, K. S.; MONTALBAN-BRAVO, G. Myelodysplastic Syndromes: 2021 Update on Diagnosis, Risk Stratification and Management. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 11, p. 1399–1420, nov. 2020.

GATTERMANN, N.; RACHMILEWITZ, E. A. Iron Overload in MDS—Pathophysiology, Diagnosis, and Complications. **Annals of Hematology**, v. 90, n. 1, p. 1–10, jan. 2011.

GONG, Y. Q.; PENG, D.; NING, X. H.; YANG, X. Y.; LI, X. S.; ZHOU, L. Q.; GUO, Y. L. UBE2T Silencing Suppresses Proliferation and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Bladder Cancer Cells. **Oncology Letters**, v. 12, n. 6, p. 4485–4492, dez. 2016.

GREENBERG, P.; COX, C.; LEBEAU, M. M.; FENAUX, P.; MOREL, P.; SANZ, G.; SANZ, M.; VALLESPI, T.; HAMBLIN, T.; OSCIER, D.; OHYASHIKI, K.; TOYAMA, K.; AUL, C.; MUFTI, G.; BENNETT, J. International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 2079–2088, 15 mar. 1997.

GREENBERG, P. L.; TUECHLER, H.; SCHANZ, J.; SANZ, G.; GARCIA-MANERO, G.; SOLÉ, F.; BENNETT, J. M.; BOWEN, D.; FENAUX, P.; DREYFUS, F.; KANTARJIAN, H.; KUENDGEN, A.; LEVIS, A.; MALCOVATI, L.; CAZZOLA, M.; CERMAK, J.; FONATSCH, C.; LE BEAU, M. M.; SLOVAK, M. L.; KRIEGER, O.; LUEBBERT, M.;

MACIEJEWSKI, J.; MAGALHAES, S. M. M.; MIYAZAKI, Y.; PFEILSTÖCKER, M.; SEKERES, M.; SPERR, W. R.; STAUDER, R.; TAURO, S.; VALENT, P.; VALLESPI, T.; VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; GERMING, U.; HAASE, D. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454–2465, 20 set. 2012.

HARRIGAN, J. A.; JACQ, X.; MARTIN, N. M.; JACKSON, S. P. Deubiquitylating Enzymes and Drug Discovery: Emerging Opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 1, p. 57–78, jan. 2018.

HE, Y.; WANG, S.; TONG, J.; JIANG, S.; YANG, Y.; ZHANG, Z.; XU, Y.; ZENG, Y.; CAO, B.; MORAN, M. F.; MAO, X. The Deubiquitinase USP7 Stabilizes Maf Proteins to Promote Myeloma Cell Survival. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 7, p. 2084–2096, fev. 2020.

HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; VAN DE LOOSDRECHT, A. Erythropoiesis Stimulating Agents and Other Growth Factors in Low-Risk MDS. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 26, n. 4, p. 401–410, dez. 2013.

HUANG, Q.; QIN, D.; PEI, D.; VERMEULEN, M.; ZHANG, X. UBE2O and USP7 co-regulate RECQL4 ubiquitylation and homologous recombination-mediated DNA repair. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, jan. 2022.

HUSSAIN, S.; ZHANG, Y.; GALARDY, P. DUBs and Cancer: The Role of Deubiquitinating Enzymes as Oncogenes, Non-Oncogenes and Tumor Suppressors. **Cell Cycle**, v. 8, n. 11, p. 1688–1697, jun. 2009.

INOUE, D.; NISHIMURA, K.; KOZUKA-HATA, H.; OYAMA, M.; KITAMURA, T. The Stability of Epigenetic Factor ASXL1 Is Regulated through Ubiquitination and USP7-Mediated Deubiquitination. **Leukemia**, v. 29, n. 11, p. 2257–2260, nov. 2015.

JIN, Q.; MARTINEZ, C. A.; ARCIPOWSKI, K. M.; ZHU, Y.; GUTIERREZ-DIAZ, B. T.; WANG, K. K.; JOHNSON, M. R.; VOLK, A. G.; WANG, F.; WU, J.; GROVE, C.; WANG, H.; SOKIRNIY, I.; THOMAS, P. M.; GOO, Y. A.; ABSHIRU, N. A.; HIJIYA, N.; PEIRS, S.; VANDAMME, N.; BERX, G.; GOOSENS, S.; MARSHALL, S. A.; RENDLEMAN, E. J.; TAKAHASHI, Y.; WANG, L.; RAWAT, R.; BARTOM, E. T.; COLLINGS, C. K.; VAN VLIERBERGHE, P.; STRIKOUDIS, A.; KELLY, S.; UEBERHEIDE, B.; MANTIS, C.; KANDELA, I.; BOURQUIN, J.-P.; BORNHAUSER, B.; SERAFIN, V.; BRESOLIN, S.; PAGANIN, M.; ACCORDI, B.; BASSO, G.; KELLEHER, N. L.; WEINSTOCK, J.; KUMAR, S.; CRISPINO, J. D.; SHILATIFARD, A.; NTZIACHRISTOS, P. USP7 Cooperates with NOTCH1 to Drive the Oncogenic Transcriptional Program in T-Cell Leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 1, p. 222–239, 1 jan. 2019.

KHOURY, J. D.; SOLARY, E.; ABLA, O.; AKKARI, Y.; ALAGGIO, R.; APPERLEY, J. F.; BEJAR, R.; BERTI, E.; BUSQUE, L.; CHAN, J. K. C.; CHEN, W.; CHEN, X.; CHNG, W.-J.; CHOI, J. K.; COLMENERO, I.; COUPLAND, S. E.; CROSS, N. C. P.; DE JONG, D.; ELGHETANY, M. T.; TAKAHASHI, E.; EMILE, J.-F.; FERRY, J.; FOGELSTRAND, L.; FONTENAY, M.; GERMING, U.; GUJRAL, S.; HAFERLACH, T.; HARRISON, C.; HODGE, J. C.; HU, S.; JANSSEN, J. H.; KANAGAL-SHAMANNA, R.; KANTARJIAN, H.

M.; KRATZ, C. P.; LI, X.-Q.; LIM, M. S.; LOEB, K.; LOGHAVI, S.; MARCOGLIESE, A.; MESHINCHI, S.; MICHAELS, P.; NARESH, K. N.; NATKUNAM, Y.; NEJATI, R.; OTT, G.; PADRON, E.; PATEL, K. P.; PATKAR, N.; PICARSIC, J.; PLATZBECKER, U.; ROBERTS, I.; SCHUH, A.; SEWELL, W.; SIEBERT, R.; TEMBHARE, P.; TYNER, J.; VERSTOVSEK, S.; WANG, W.; WOOD, B.; XIAO, W.; YEUNG, C.; HOCHHAUS, A. The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. **Leukemia**, v. 36, n. 7, p. 1703–1719, jul. 2022.

LI, Y.-C.; CAI, S.-W.; SHU, Y.-B.; CHEN, M.-W.; SHI, Z. USP15 in Cancer and Other Diseases: From Diverse Functions to Therapeutic Targets. **Biomedicines**, v. 10, n. 2, p. 474, 17 fev. 2022.

LIANG, K.; VOLK, A. G.; HAUG, J. S.; MARSHALL, S. A.; WOODFIN, A. R.; BARTOM, E. T.; GILMORE, J. M.; FLORENS, L.; WASHBURN, M. P.; SULLIVAN, K. D.; ESPINOSA, J. M.; CANNOVA, J.; ZHANG, J.; SMITH, E. R.; CRISPINO, J. D.; SHILATIFARD, A. Therapeutic Targeting of MLL Degradation Pathways in MLL-Rearranged Leukemia. **Cell**, v. 168, n. 1–2, p. 59–72.e13, jan. 2017.

LIANG, L.; PENG, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; ROY, M.; HAN, X.; XIAO, X.; SUN, S.; LIU, H.; NIE, L.; KUANG, Y.; ZHU, Z.; DENG, J.; XIA, Y.; SANKARAN, V. G.; HILLYER, C. D.; MOHANDAS, N.; YE, M.; AN, X.; LIU, J. Deubiquitylase USP7 Regulates Human Terminal Erythroid Differentiation by Stabilizing GATA1. **Haematologica**, v. 104, n. 11, p. 2178–2188, nov. 2019.

LIU, L.; YANG, M.; PENG, Q.; LI, M.; ZHANG, Y.; GUO, Y.; CHEN, Y.; BAO, S. UBE2T Promotes Hepatocellular Carcinoma Cell Growth via Ubiquitination of P53. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 493, n. 1, p. 20–27, nov. 2017.

LIU, L.-L.; ZHU, J.-M.; YU, X.-N.; ZHU, H.-R.; SHI, X.; BILEGSAIKHAN, E.; GUO, H.-Y.; WU, J.; SHEN, X.-Z. UBE2T Promotes Proliferation via G2/M Checkpoint in Hepatocellular Carcinoma. **Cancer Management and Research**, v. Volume 11, p. 8359–8370, set. 2019.

LIU, X.; MA, F.; LIU, C.; ZHU, K.; LI, W.; XU, Y.; LI, G.; NIU, Z.; LIU, J.; CHEN, D.; LI, Z.; FU, Y.; QIAN, C. UBE2O Promotes the Proliferation, EMT and Stemness Properties of Breast Cancer Cells through the UBE2O/AMPK α 2/MTORC1-MYC Positive Feedback Loop. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 1, p. 10, jan. 2020.

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.

LUO, C.; YAO, Y.; YU, Z.; ZHOU, H.; GUO, L.; CAO, H.; ZHANG, G.; LI, Y.; JIAO, Z. UBE2T Knockdown Inhibits Gastric Cancer Progression. p. 16, 2017.

MA, W.; KANTARJIAN, H.; ZHANG, X.; WANG, X.; ESTROV, Z.; O'BRIEN, S.; ALBITAR, M. Ubiquitin-Proteasome System Profiling in Acute Leukemias and Its Clinical Relevance. **Leukemia Research**, v. 35, n. 4, p. 526–533, abr. 2011.

MACHIDA, Y. J.; MACHIDA, Y.; CHEN, Y.; GURTAN, A. M.; KUPFER, G. M.; D'ANDREA, A. D.; DUTTA, A. UBE2T Is the E2 in the Fanconi Anemia Pathway and Undergoes Negative Autoregulation. **Molecular Cell**, v. 23, n. 4, p. 589–596, ago. 2006.

MALCOVATI, L. Impact of Transfusion Dependency and Secondary Iron Overload on the Survival of Patients with Myelodysplastic Syndromes. **Leukemia Research**, v. 31, p. S2–S6, dez. 2007.

MALCOVATI, L.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; BOWEN, D.; ADÈS, L.; CERMAK, J.; DEL CAÑIZO, C.; DELLA PORTA, M. G.; FENAUX, P.; GATTERMANN, N.; GERMING, U.; JANSEN, J. H.; MITTELMAN, M.; MUFTI, G.; PLATZBECKER, U.; SANZ, G. F.; SELLESLAG, D.; SKOV-HOLM, M.; STAUDER, R.; SYMEONIDIS, A.; VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; DE WITTE, T.; CAZZOLA, M. Diagnosis and Treatment of Primary Myelodysplastic Syndromes in Adults: Recommendations from the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 122, n. 17, p. 2943–2964, 24 out. 2013.

MENSSEN, A. J.; WALTER, M. J. Genetics of Progression from MDS to Secondary Leukemia. **Blood**, v. 136, n. 1, p. 50–60, 2 jul. 2020.

NAKAJIMA, H. Molecular Pathogenesis and Treatment of Myelodysplastic Syndromes. **Internal Medicine**, v. 60, n. 1, p. 15–23, 1 jan. 2021.

NANDI, D.; TAHILIANI, P.; KUMAR, A.; CHANDU, D. The Ubiquitin-Proteasome System. **J. Biosci.**, p. 19, 2006.

NGUYEN, A. T.; PRADO, M. A.; SCHMIDT, P. J.; SENDAMARAI, A. K.; WILSON-GRADY, J. T.; MIN, M.; CAMPAGNA, D. R.; TIAN, G.; SHI, Y.; DEDERER, V.; KAWAN, M.; KUEHNLE, N.; PAULO, J. A.; YAO, Y.; WEISS, M. J.; JUSTICE, M. J.; GYGI, S. P.; FLEMING, M. D.; FINLEY, D. UBE2O Remodels the Proteome during Terminal Erythroid Differentiation. **Science**, v. 357, n. 6350, p. eaan0218, 4 ago. 2017.

NIAZI, S.; PUROHIT, M.; NIAZI, J. H. Role of P53 Circuitry in Tumorigenesis: A Brief Review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 158, p. 7–24, out. 2018.

NIEDERKORN, M.; HUENEMAN, K.; CHOI, K.; VARNEY, M. E.; ROMANO, L.; PUJATO, M. A.; GREIS, K. D.; INOUE, J.; MEETEI, R.; STARCZYNOWSKI, D. T. TIFAB Regulates USP15-Mediated P53 Signaling during Stressed and Malignant Hematopoiesis. **Cell Reports**, v. 30, n. 8, p. 2776–2790.e6, fev. 2020.

NIEDERKORN, M.; ISHIKAWA, C.; HUENEMAN, K.; BARTRAM, J.; STEPANCHICK, E.; BENNETT, J.; CULVER-COCHRAN, A.; BOLANOS, L. C.; UIBLE, E.; CHOI, K.; WUNDERLICH, M.; PERENTESIS, J. P.; CHLON, T.; FILIPPI, M.-D.; STARCZYNOWSKI, D. T. The Deubiquitinase USP15 Modulates Cellular Redox and Is a Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia. **Leukemia**, v. 36, n. 2, p. 438–451, fev. 2022.

OGAWA, S. Genetics of MDS. **Blood**, v. 133, n. 10, p. 1049–1059, 7 mar. 2019.

OSCIER, D. G. ABC of Clinical Haematology: The Myelodysplastic Syndromes. **BMJ**, v. 314, n. 7084, p. 883–883, 22 mar. 1997.

PADMANABHAN, A.; CANDELARIA, N.; WONG, K.-K.; NIKOLAI, B. C.; LONARD, D. M.; O'MALLEY, B. W.; RICHARDS, J. S. USP15-Dependent Lysosomal Pathway Controls P53-R175H Turnover in Ovarian Cancer Cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1270, dez. 2018.

PAPAEMMANUIL, E.; CAZZOLA, M.; BOULTWOOD, J.; MALCOVATI, L.; VYAS, P.; BOWEN, D.; PELLAGATTI, A.; WAINSCOT, J. S.; HELLSTROM-LINDBERG, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; GODFREY, A. L.; RAPADO, I.; CVEJIC, A.; RANCE, R.; MCGEE, C.; ELLIS, P.; MUDIE, L. J.; STEPHENS, P. J.; MCLAREN, S.; MASSIE, C. E.; TARPEY, P. S.; VARELA, I.; NIK-ZAINAL, S.; DAVIES, H. R.; SHLIEN, A.; JONES, D.; RAINE, K.; HINTON, J.; BUTLER, A. P.; TEAGUE, J. W.; BAXTER, E. J.; SCORE, J.; GALLI, A.; DELLA PORTA, M. G.; TRAVAGLINO, E.; GROVES, M.; TAURO, S.; MUNSHI, N. C.; ANDERSON, K. C.; EL-NAGGAR, A.; FISCHER, A.; MUSTONEN, V.; WARREN, A. J.; CROSS, N. C. P.; GREEN, A. R.; FUTREAL, P. A.; STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J. Somatic *SF3B1* Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 15, p. 1384–1395, 13 out. 2011.

PAPAEMMANUIL, E.; GERSTUNG, M.; MALCOVATI, L.; TAURO, S.; GUNDEM, G.; VAN LOO, P.; YOON, C. J.; ELLIS, P.; WEDGE, D. C.; PELLAGATTI, A.; SHLIEN, A.; GROVES, M. J.; FORBES, S. A.; RAINE, K.; HINTON, J.; MUDIE, L. J.; MCLAREN, S.; HARDY, C.; LATIMER, C.; DELLA PORTA, M. G.; O'MEARA, S.; AMBAGLIO, I.; GALLI, A.; BUTLER, A. P.; WALLDIN, G.; TEAGUE, J. W.; QUEK, L.; STERNBERG, A.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; CROSS, N. C. P.; GREEN, A. R.; BOULTWOOD, J.; VYAS, P.; HELLSTROM-LINDBERG, E.; BOWEN, D.; CAZZOLA, M.; STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J. Clinical and Biological Implications of Driver Mutations in Myelodysplastic Syndromes. **Blood**, v. 122, n. 22, p. 3616–3627, 21 nov. 2013.

PARK, J.; CHO, J.; KIM, E. E.; SONG, E. J. Deubiquitinating Enzymes: A Critical Regulator of Mitosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 5997, 28 nov. 2019.

PENG, Y.; LIAO, Q.; TAN, W.; PENG, C.; HU, Z.; CHEN, Y.; LI, Z.; LI, J.; ZHEN, B.; ZHU, W.; LI, X.; YAO, Y.; SONG, Q.; LIU, C.; QI, X.; HE, F.; PEI, H. The Deubiquitylating Enzyme USP15 Regulates Homologous Recombination Repair and Cancer Cell Response to PARP Inhibitors. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1224, dez. 2019.

PICKART, C. M.; EDDINS, M. J. Ubiquitin: Structures, Functions, Mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1695, n. 1–3, p. 55–72, nov. 2004. POPOVIC, D.; VUCIC, D.; DIKIC, I. Ubiquitination in Disease Pathogenesis and Treatment. **Nature Medicine**, v. 20, n. 11, p. 1242–1253, nov. 2014.

POZHIDAEVA, A.; BEZSONOVA, I. USP7: Structure, Substrate Specificity, and Inhibition. **DNA Repair**, v. 76, p. 30–39, abr. 2019.

QIAN, Z.; JOSLIN, J. M.; TENNANT, T. R.; RESHMI, S. C.; YOUNG, D. J.; STODDART, A.; LARSON, R. A.; LE BEAU, M. M. Cytogenetic and Genetic Pathways in Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, n. 1–2, p. 50–57, mar. 2010.

RIBEIRO, H. L.; MAIA, A. R. S.; DE OLIVEIRA, R. T. G.; DOS SANTOS, A. W. A.; COSTA, M. B.; FARIAS, I. R.; BORGES, D. de P.; MAGALHÃES, S. M. M.; PINHEIRO, R. F. Expression of DNA Repair Genes Is Important Molecular Findings in CD34 + Stem Cells of Myelodysplastic Syndrome. **European Journal of Haematology**, v. 100, n. 1, p. 108–109, jan. 2018.

RICKMAN, K. A.; LACH, F. P.; ABHYANKAR, A.; DONOVAN, F. X.; SANBORN, E. M.; KENNEDY, J. A.; SOUGNEZ, C.; GABRIEL, S. B.; ELEMENTO, O.; CHANDRASEKHARAPPA, S. C.; SCHINDLER, D.; AUERBACH, A. D.; SMOGORZEWSKA, A. Deficiency of UBE2T, the E2 Ubiquitin Ligase Necessary for FANCD2 and FANCI Ubiquitination, Causes FA-T Subtype of Fanconi Anemia. **Cell Reports**, v. 12, n. 1, p. 35–41, jul. 2015.

SAARNI, I.; LINMAN, W. The Hematologic Syndrome Preceding Acute Leukemia. v. 55, p. 11, 1973.

SAAVEDRA-GARCIA, P.; MARTINI, F.; AUNER, H. W. Proteasome Inhibition in Multiple Myeloma - Lessons for Other Cancers. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, p. ajpcell.00286.2019, 25 dez. 2019.

SAHASRABUDDHE, A. A.; ELENITIBA-JOHNSON, K. S. J. Role of the Ubiquitin Proteasome System in Hematologic Malignancies. **Immunological Reviews**, v. 263, n. 1, p. 224–239, jan. 2015.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, jun. 2008.

SHAN, H.; LI, X.; XIAO, X.; DAI, Y.; HUANG, J.; SONG, J.; LIU, M.; YANG, L.; LEI, H.; TONG, Y.; ZHOU, L.; XU, H.; WU, Y. USP7 Deubiquitinates and Stabilizes NOTCH1 in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 3, n. 1, p. 29, dez. 2018.

STEENSMA, D. P. Myelodysplastic Syndromes. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 7, p. 969–983, jul. 2015.

SUN, J.; SHI, X.; MAMUN, M. a. a.; GAO, Y. The Role of Deubiquitinating Enzymes in Gastric Cancer (Review). **Oncology Letters**, 7 nov. 2019. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2019.11062>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

TURNBULL, A. P.; IOANNIDIS, S.; KRAJEWSKI, W. W.; PINTO-FERNANDEZ, A.; HERIDE, C.; MARTIN, A. C. L.; TONKIN, L. M.; TOWNSEND, E. C.; BUKER, S. M.; LANCIA, D. R.; CARAVELLA, J. A.; TOMS, A. V.; CHARLTON, T. M.; LAHDENRANTA, J.; WILKER, E.; FOLLOWS, B. C.; EVANS, N. J.; STEAD, L.; ALLI, C.; ZARAYSKIY, V. V.; TALBOT, A. C.; BUCKMELTER, A. J.; WANG, M.; MCKINNON, C. L.; SAAB, F.; MCGOURAN, J. F.; CENTURY, H.; GERSCH, M.; PITTMAN, M. S.; MARSHALL, C. G.; RAYNHAM, T. M.; SIMCOX, M.; STEWART, L. M. D.; MCLOUGHLIN, S. B.; ESCOBEDO, J. A.; BAIR, K. W.; DINSMORE, C. J.; HAMMONDS, T. R.; KIM, S.; URBÉ, S.; CLAGUE, M. J.; KESSLER, B. M.; KOMANDER, D. Molecular Basis of USP7 Inhibition by Selective Small-Molecule Inhibitors. **Nature**, v. 550, n. 7677, p. 481–486, out. 2017.

- UEKI, T.; PARK, J.-H.; NISHIDATE, T.; KIJIMA, K.; HIRATA, K.; NAKAMURA, Y.; KATAGIRI, T. Ubiquitination and Downregulation of BRCA1 by Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2T Overexpression in Human Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 69, n. 22, p. 8752–8760, 15 nov. 2009.
- ULLAH, K.; ZUBIA, E.; NARAYAN, M.; YANG, J.; XU, G. Diverse Roles of the E2/E3 Hybrid Enzyme UBE 2O in the Regulation of Protein Ubiquitination, Cellular Functions, and Disease Onset. **The FEBS Journal**, v. 286, n. 11, p. 2018–2034, jun. 2019.
- VALLES, G. J.; BEZSONOVA, I.; WOODGATE, R.; ASHTON, N. W. USP7 Is a Master Regulator of Genome Stability. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 717, 5 ago. 2020.
- VAN DEN BERK, P.; LANCINI, C.; COMPANY, C.; SERRESI, M.; SANCHEZ-BAILON, M. P.; HULSMAN, D.; PRITCHARD, C.; SONG, J.-Y.; SCHMITT, M. J.; TANGER, E.; POPP, O.; MERTINS, P.; HUIJBERS, I. J.; JACOBS, H.; VAN LOHUIZEN, M.; GARGIULO, G.; CITTERIO, E. USP15 Deubiquitinase Safeguards Hematopoiesis and Genome Integrity in Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells. **Cell Reports**, v. 33, n. 13, p. 108533, dez. 2020.
- VAN LEUKEN, R. J.; LUNA-VARGAS, M. P.; SIXMA, T. K.; WOLTHUIS, R. M. F.; MEDEMA, R. H. Usp39 Is Essential for Mitotic Spindle Checkpoint Integrity and Controls MRNA-Levels of Aurora B. **Cell Cycle**, v. 7, n. 17, p. 2710–2719, set. 2008.
- VANDESOMPELE, J.; PRETER, K. D.; ROY, N. V.; PAEPE, A. D. Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. p. 12, 2002.
- VARDIMAN, J. W.; HARRIS, N. L.; BRUNNING, R. D. The World Health Organization (WHO) Classification of the Myeloid Neoplasms. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2292–2302, 1 out. 2002.
- VARDIMAN, J. W.; THIELE, J.; ARBER, D. A.; BRUNNING, R. D.; BOROWITZ, M. J.; PORWIT, A.; HARRIS, N. L.; LE BEAU, M. M.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; TEFFERI, A.; BLOOMFIELD, C. D. 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.
- VEGGIANI, G.; GERPE, M. C. R.; SIDHU, S. S.; ZHANG, W. Emerging Drug Development Technologies Targeting Ubiquitination for Cancer Therapeutics. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 199, p. 139–154, jul. 2019.
- VILA, I. K.; YAO, Y.; KIM, G.; XIA, W.; KIM, H.; KIM, S.-J.; PARK, M.-K.; HWANG, J. P.; GONZÁLEZ-BILLALABEITIA, E.; HUNG, M.-C.; SONG, S. J.; SONG, M. S. A UBE2O-AMPK α 2 Axis That Promotes Tumor Initiation and Progression Offers Opportunities for Therapy. **Cancer Cell**, v. 31, n. 2, p. 208–224, fev. 2017.
- VOUTSADAKIS, I. A. Ubiquitin- and Ubiquitin-like Proteins-Conjugating Enzymes (E2s) in Breast Cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 2, p. 2019–2034, fev. 2013.

WALL, M. Recurrent Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes. *Em: WAN, T. S. K. Cancer Cytogenetics*. New York, NY: Springer New York, 2017. p. 209–222.

WANG, M.; ZHANG, Y.; WANG, T.; ZHANG, J.; ZHOU, Z.; SUN, Y.; WANG, S.; SHI, Y.; LUAN, X.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; WANG, Y.; ZOU, Z.; KANG, L.; LIU, H. The USP7 Inhibitor P5091 Induces Cell Death in Ovarian Cancers with Different P53 Status. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1755–1766, 2017.

WANG, Z.; KANG, W.; YOU, Y.; PANG, J.; REN, H.; SUO, Z.; LIU, H.; ZHENG, Y. USP7: Novel Drug Target in Cancer Therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 427, 30 abr. 2019.

WIJK, S. J. L.; TIMMERS, H. T. M. The Family of Ubiquitin-conjugating Enzymes (E2s): Deciding between Life and Death of Proteins. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 4, p. 981–993, abr. 2010.

XIE, F.; XIAO, P.; CHEN, D.; XU, L.; ZHANG, B. MiRDeepFinder: A MiRNA Analysis Tool for Deep Sequencing of Plant Small RNAs. **Plant Molecular Biology**, v. 80, n. 1, p. 75–84, set. 2012.

XU, Y.; ZHANG, Z.; LI, J.; TONG, J.; CAO, B.; TAYLOR, P.; TANG, X.; WU, D.; MORAN, M. F.; ZENG, Y.; MAO, X. The Ubiquitin-Conjugating Enzyme UBE2O Modulates c-Maf Stability and Induces Myeloma Cell Apoptosis. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 132, dez. 2017.

YAO, X.-Q.; LI, L.; PIAO, L.-Z.; ZHANG, G.-J.; HUANG, X.-Z.; WANG, Y.; LIANG, Z.-L. Overexpression of Ubiquitin-Specific Protease15 (USP15) Promotes Tumor Growth and Inhibits Apoptosis and Correlated With Poor Disease-Free Survival in Hepatocellular Carcinoma. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 19, p. 153303382096745, 1 jan. 2020.

ZEIDAN, A. M.; SHALLIS, R. M.; WANG, R.; DAVIDOFF, A.; MA, X. Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes: Why Characterizing the Beast Is a Prerequisite to Taming It. **Blood Reviews**, v. 34, p. 1–15, mar. 2019.

ZHANG, W.; ZHANG, Y.; YANG, Z.; LIU, X.; YANG, P.; WANG, J.; HU, K.; HE, X.; ZHANG, X.; JING, H. High Expression of UBE2T Predicts Poor Prognosis and Survival in Multiple Myeloma. **Cancer Gene Therapy**, v. 26, n. 11–12, p. 347–355, nov. 2019.

ZHANG, Y.; ZHOU, X.; HUANG, P. Fanconi Anemia and Ubiquitination. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 34, n. 7, p. 573–580, jul. 2007.

ZHONG, M.; ZHOU, L.; FANG, Z.; YAO, Y.-Y.; ZOU, J.-P.; XIONG, J.-P.; XIANG, X.-J.; DENG, J. Ubiquitin-Specific Protease 15 Contributes to Gastric Cancer Progression by Regulating the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 26, p. 4221–4235, 14 jul. 2021.

ZHOU, L.; JIANG, H.; DU, J.; LI, L.; LI, R.; LU, J.; FU, W.; HOU, J. USP15 Inhibits Multiple Myeloma Cell Apoptosis through Activating a Feedback Loop with the

Transcription Factor NF- κ Bp65. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 11, p. 1–12, nov. 2018.

ZHOU, M.; CHEN, F.; CHEN, H. Ubiquitination Involved Enzymes and Cancer. **Medical Oncology**, v. 31, n. 8, p. 93, ago. 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ESTRATIFICAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE AS EXPRESSÕES DA UBE2T, UBE2O, USP7 E USP15 FRENTE A ASSOCIAÇÃO CASO X CONTROLE E EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM SMD.

Análise realizada		mRNA_Expression_UBE2T		mRNA_Expression_UBE2O		mRNA_Expression_USP7		mRNA_Expression_USP15	
		Média±DP	p-Valor	Média±DP	p-Valor	Média±DP	p-Valor	Média±DP	p-Valor
ANÁLISE DE CASO X CONTROLE	CASO	0.0449±0.057	0.152	0.0759±0.129	0.138	0.1463±0.176	0.139	0.2503±0.614	0.030
	CONTROLE	0.0156±0.009		0.0827±0.040		0.1691±0.059		0.3790±0.244	
SEXO	FEMININO	0.0438±0.043	0.434	0.0684±0.065	0.511	0.1315±0.095	0.626	0.1941±0.171	0.094
	MASCULINO	0.0463±0.071		0.0851±0.181		0.1647±0.242		0.3205±0.905	
IDADE CATEGORIZADA 1	<=60	0.0360±0.025	0.550	0.0751±0.085	0.845	0.1447±0.109	0.594	0.1794±0.176	0.603
	>60	0.0477±0.063		0.0761±0.141		0.1468±0.193		0.2722±0.697	
IDADE CATEGORIZADA 2	<=60 ANOS	0.0360±0.025	0.912	0.0751±0.085	0.470	0.1447±0.109	0.534	0.1794±0.176	0.569
	>60-70 ANOS	0.0544±0.057		0.0317±0.019		0.1356±0.082		0.2081±0.131	
	>70-80 ANOS	0.0490±0.079		0.1074±0.201		0.1852±0.270		0.4188±1.017	
	>80 ANOS	0.0438±0.045		0.0566±0.050		0.1071±0.082		0.1289±0.101	
ORIGEM	Urbano	0.0514±0.085	0.828	0.0666±0.074	0.206	0.1666±0.288	0.303	0.3944±1.094	0.149
	Rural	0.0420±0.047		0.0397±0.029		0.0887±0.065		0.0948±0.064	
CELULARIDADE	HIPOCELULAR	0.0131±0.004	0.056	0.0443±0.040	0.326	0.0860±0.043	0.179	0.1294±0.104	0.070
	NORMOCELULAR	0.0450±0.030		0.2764±0.383		0.2161±0.133		0.3047±0.157	
	HIPERCELULAR	0.0551±0.048		0.0648±0.056		0.1379±0.113		0.1954±0.302	

FIBROSE	AUSENCIA	0.0532±0.049	0.314	0.1057±0.184	0.059	0.1428±0.115	0.765	0.2124±0.305	0.562
	PRESENÇA	0.0322±0.023		0.0362±0.030		0.1505±0.114		0.2091±0.213	
PRESENÇA DE SIDEROBLASTO	PRESENÇA	0.0554±0.054	0.138	0.0757±0.068	0.380	0.1408±0.120	0.931	0.2324±0.347	0.921
	AUSENCIA	0.0393±0.059		0.0769±0.154		0.1519±0.203		0.2658±0.730	
NÚMERO DE SIDEROBLASTOS	0	0.0393±0.059	0.170	0.0769±0.154	0.401	0.1519±0.203	0.962	0.2658±0.730	0.985
	1-14%	0.0223±0.009		0.1176±0.085		0.1224±0.109		0.2029±0.196	
	>15%	0.0620±0.056		0.0673±0.064		0.1445±0.125		0.2383±0.373	
% DE BLASTOS CATEGORIZADO IPSS-R	<=2%	0.0563±0.073	0.318	0.0752±0.071	0.318	0.1878±0.238	0.596	0.3578±0.878	0.659
	>2%<5%	0.0450±0.053		0.1514±0.296		0.1249±0.106		0.2092±0.160	
	5%-10%	0.0232±0.015		0.0448±0.037		0.1032±0.052		0.1345±0.131	
	>10%	0.0430±0.034		0.0479±0.060		0.1018±0.074		0.1270±0.091	
% DE BLASTOS CATEGORIZADO	<10%	0.0452±0.060	0.708	0.0804±0.137	0.177	0.1534±0.187	0.329	0.2702±0.660	0.536
	>10%	0.0430±0.034		0.0479±0.060		0.1018±0.074		0.1270±0.091	
NÚMERO DE DISPLASIAS	1	0.0469±0.077	0.714	0.0605±0.058	0.474	0.1561±0.257	0.106	0.3489±0.984	0.214
	2	0.0523±0.052		0.1062±0.197		0.1680±0.128		0.2430±0.318	
	3	0.0325±0.024		0.0541±0.054		0.1047±0.085		0.1369±0.155	
PRESENÇA DE DISERITROPOIESE	NAO	0.0711±0.117	0.591	0.0866±0.088	0.558	0.2671±0.393	0.177	0.6377±1.540	0.602
	SIM	0.0407±0.040		0.0741±0.135		0.1268±0.102		0.1878±0.247	
PRESENÇA DE DISGRANOPOIESE	NAO	0.0494±0.070	0.783	0.0631±0.064	0.853	0.1721±0.224	0.151	0.3508±0.838	0.108
	SIM	0.0402±0.039		0.0894±0.174		0.1189±0.099		0.1441±0.148	
PRESENÇA DE DISMEGACARIOCITOPOIESE	NAO	0.0406±0.040	0.900	0.0897±0.184	0.715	0.1100±0.084	0.213	0.1550±0.165	0.273
	SIM	0.0480±0.066		0.0659±0.069		0.1722±0.217		0.3184±0.789	
QUANTIDADE HEMOGLOBINA CATEGORIZADA IPSS-R	>10	0.0324±0.029	0.269	0.0678±0.080	0.576	0.1202±0.084	0.948	0.1803±0.151	0.735
	<=10	0.0491±0.063		0.0785±0.142		0.1550±0.197		0.2737±0.704	
	<0,8	0.0463±0.048		0.1276±0.241		0.257		0.1387±0.108	

CONTAGEM DE NEUTRÓFILOS CATEGORIZADA IPSS-R	>=0,8	0.0445±0.060		0.0599±0.060		0.1486±0.193		0.2722±0.699	
CONTAGEM DE PLAQUETAS CATEGORIZADA IPSS-R	>=100	0.0453±0.045		0.0666±0.062		0.1303±0.097		0.1681±0.147	
	50-<100	0.0319±0.032	0.583	0.0570±0.064	0.373	0.1192±0.122	0.387	0.2306±0.421	0.469
	<50	0.0549±0.088		0.1117±0.236		0.2034±0.302		0.4449±1.152	
PLAQUETAS CATEGORIZADA	<=100	0.0444±0.069		0.0868±0.179		0.1652±0.238		0.3475±0.891	
	>100	0.0453±0.045	0.799	0.0666±0.062	0.166	0.1303±0.097	0.870	0.1681±0.147	0.545
NÚMERO DE CITOPENIAS	1	0.0411±0.041		0.0636±0.068		0.1339±0.106		0.1671±0.162	
	2	0.0433±0.043	0.869	0.0611±0.062	0.704	0.1225±0.098	0.982	0.2165±0.327	0.857
	3	0.0581±0.097		0.1241±0.255		0.2165±0.332		0.4951±1.264	
KT NUMERO DE ALTERAÇÕES	KT NORMAL	0.0284±0.021		0.0780±0.160		0.1281±0.102		0.1781±0.183	
	1 ALTERAÇÃO	0.0555±0.055	0.099	0.0491±0.032	0.601	0.1025±0.078	0.565	0.1104±0.076	0.312
	DUAS ALTERAÇÕES OU MAIS	0.0897±0.128		0.0823±0.085		0.2677±0.443		0.7782±1.712	
KT NORMAL X KT ALTERADO	NORMAL	0.0284±0.021		0.0780±0.160		0.1281±0.102		0.1781±0.183	
	ALTERADO	0.0707±0.093	0.032	0.0639±0.062	0.469	0.1759±0.302	0.805	0.4072±1.152	0.882
KT COMPLEXO	PRESENÇA	0.0488±0.038		0.0370±0.016		0.0869±0.039		0.1486±0.102	
	AUSENCIA	0.0405±0.059	0.410	0.0778±0.144	0.835	0.1490±0.194	0.633	0.2593±0.685	0.816
KT NORMAL X KT COM 7 ALTERADO	NORMAL	0.0284±0.021		0.0780±0.160		0.1281±0.102		0.1781±0.183	
	7 ALTERADO	0.0554±0.048	0.452	0.0381±0.017	0.893	0.0941±0.044	0.923	0.1609±0.127	0.863
KT NORMAL X KT COM 7 ALTERADO X KT ALTERADO EXCETO 7	NORMAL	0.0284±0.021		0.0780±0.160		0.1281±0.102		0.1781±0.183	
	ALTERADO SEM 7q	0.0750±0.104	0.096	0.0712±0.068	0.722	0.1993±0.341	0.970	0.4776±1.306	0.976
	ALTERADO COM 7q	0.0554±0.048		0.0381±0.017		0.0941±0.044		0.1609±0.127	
KT COMPLEXO X KT ALTERADO NÃO COMPLEXO	KT COMPLEXO	0.0488±0.038		0.0370±0.016		0.0869±0.039		0.1486±0.102	
	KT ALTER NAO COMPLEXO	0.0816±0.111	1000	0.0773±0.072	0.437	0.2204±0.366	0.616	0.5365±1.411	0.892

KT NORMAL X KT ALTERADO SEM COMPLEXO X KT ALTERADO COM COMPLEXO	KT NORMAL	0.0284±0.021		0.0780±0.160		0.1281±0.102		0.1781±0.183	
	KT ALTER SEM COMPLEXO	0.0816±0.111	0.098	0.0773±0.072	0.607	0.2204±0.366	0.882	0.5365±1.411	0.969
	KT ALTERADO COM COMPLEXO	0.0488±0.038		0.0370±0.016		0.0869±0.039		0.1486±0.102	
KT NORMAL X KT ALTERADO COM COM -5q X KT ALTERADO SEM -5q	NORMAL	0.0284±0.021		0.0780±0.160		0.1281±0.102		0.1781±0.183	
	ALTERADO COM 5q	0.1024±0.147	0.100	0.1067±0.088	0.106	0.3613±0.493	0.108	0.9748±1.978	0.358
	ALTERADO SEM 5q	0.0548±0.053		0.0425±0.029		0.0833±0.048		0.1234±0.092	
KT COM ANEUPLOIDIA X KT NORMAL X KT ALTERADO SEM ANEUPLOIDIA	NORMAL	0.0284±0.021		0.0780±0.160		0.1281±0.102		0.1781±0.183	
	ALTERADO SEM ANEUPLOIDIA	0.1287±0.147	0.052	0.0882±0.068	0.360	0.3042±0.520	0.893	0.9414±1.992	0.710
	ALTERADO COM ANEUPLOIDIA	0.0417±0.031		0.0517±0.057		0.1118±0.069		0.1401±.110	
PROGNÓSTICO IPSS-R	MUITO FAVORAVEL	0.0353±0.023		0.0628±0.055		0.1023±0.083		0.1523±0.153	
	FAVORAVEL	0.0328±0.045		0.0943±0.234		0.1376±0.114		0.2165±0.235	
	INTERMEDIARIO	0.0374±0.023	0.165	0.0676±0.073	0.855	0.1488±0.111	0.839	0.1853±0.119	0.584
	DESFAVORAVEL	0.0602±0.119		0.0817±0.081		0.2123±0.403		0.5725±1.559	
	MUITO DESFAVORAVEL	0.0494±0.034		0.0435±0.026		0.1124±0.070		0.1406±0.088	
GRUPO RISCO IPSS-R	MUITO BAIXO	0.0353±0.023		0.0628±0.055		0.1023±0.083		0.1523±0.153	
	BAIXO RISCO	0.0328±0.045		0.0943±0.234		0.1376±0.114		0.2165±0.235	
	RISCO INTERMEDIARIO	0.0374±0.023	0.165	0.0676±0.073	0.855	0.1488±0.111	0.839	0.1853±0.119	0.584
	ALTO RISCO	0.0602±0.119		0.0817±0.081		0.2123±0.403		0.5725±1.559	
	RISCO MUITO ALTO	0.0494±0.034		0.0435±0.026		0.1124±0.070		0.1406±0.088	
OMS 2016	SMD com DU	0.0737±0.118	0.302	0.0786±0.067	0.415	0.2307±0.403	0.421	0.6269±1.544	0.661
	SMD com DM	0.0397±0.035		0.1311±0.225		0.1872±0.137		0.2830±0.372	

	SMD com SA-DU	0.0251±0.020		0.0302±0.013		0.1106±0.086		0.1989±0.279	
	SMD-SA com DM	0.0793±0.068		0.0688±0.061		0.1201±0.102		0.1639±0.128	
	SMD com EB I	0.0241±0.015		0.0447±0.036		0.1016±0.051		0.1307±0.128	
	SMD com EB II	0.0430±0.034		0.0479±0.060		0.1018±0.074		0.1270±0.091	
OMS 2022	SMD com BB	0.0484±0.078		0.1150±0.207		0.2032±0.269		0.4017±0.996	
	SMD com BB e SA	0.0690±0.058		0.0747±0.067		0.1534±0.133		0.2648±0.401	
	SMD com AB-I	0.0241±0.015	0.033	0.0447±0.036	0.468	0.1016±0.051	0.410	0.1307±0.128	0.401
	SMD com AB-II	0.0430±0.034		0.0479±0.060		0.1018±0.074		0.1270±0.091	
	SMD Hipoplásica	0.0116±0.003		0.0497±0.047		0.0666±0.022		0.0861±0.072	
FORMAS DE SMD	FORMAS INICIAIS	0.0539±0.069		0.0950±0.159		0.1747±0.216		0.3273±0.774	
	FORMAS AVANÇADAS	0.0309±0.025	0.221	0.0458±0.045	0.094	0.1017±0.059	0.230	0.1294±0.114	0.192
DEPENDÊNCIA TRANSFUSIONAL	SIM	0.0540±0.072		0.1046±0.178		0.1816±0.235		0.3133±0.851	
	NAO	0.0378±0.042	0.189	0.0433±0.039	0.017	0.1160±0.096	0.203	0.2176±0.324	0.372
EVOLUÇÃO PARA LMA	SIM	0.0272±0.021		0.0441±0.037		0.1022±0.049		0.0990±0.067	
	NAO	0.0491±0.062	0.258	0.0834±0.143	0.519	0.1581±0.194	0.702	0.2909±0.685	0.119
ÓBITO	SIM	0.0330±0.024		0.0441±0.033		0.0971±0.046		0.1166±0.055	
	NAO	0.0461±0.064	0.645	0.0446±0.027	0.916	0.1098±0.095	0.804	0.1663±0.180	0.860

Fonte: Elaborada pelo autor.

ANEXOS

**ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (UFC).**

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO MOLECULAR DE ALVOS DA VIA UBIQUITINA-PROTEASSOMA (UBE2T, UBE2O, Triad1, USP7 e USP39) NA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Pesquisador: Luiz Gustavo Almeida de Carvalho

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 35871620.9.0000.5054

Instituição Proponente: Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.505.901

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo prospectivo, onde serão utilizadas alíquotas de células de linhagens medulares (10⁶ células/mm³) estocadas em solução de Trizol Reagente® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a -80°C provenientes de 100 amostras de medula óssea (2mL), de ambos os sexos, de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica, diagnosticados segundo os critérios da OMS, entre os anos de 2021 a 2022, que serão armazenadas no Laboratório de Citogenômica do Câncer – NPDM/UFC, oriundas do Ambulatório de Síndrome Mielodisplásica do Hospital Geral de Fortaleza – HGF. Também serão utilizadas amostras de 15 pacientes idosos (grupo controle), que não possuem neoplasia hematológica, com diagnóstico descartado para Síndrome Mielodisplásica durante a investigação da doença em estudo, oriundos do mesmo ambulatório, sob autorização do Dr. Rodrigo Monteiro Ribeiro, chefe do Serviço de Hematologia do HGF. As amostras serão encaminhadas pelo próprio pesquisador ao Laboratório de Citogenômica do Câncer – NPDM/UFC, logo após a coleta, onde serão processadas e utilizadas para o propósito da pesquisa em questão, de acordo com a metodologia descrita, e armazenadas em freezer a -80°C no próprio laboratório, pelo período de duração da pesquisa, e posteriormente descartadas como material biológico, no próprio laboratório, e assim, sendo destinadas corretamente pela empresa que faz a gestão dos resíduos do NPDM, para tratamento e descarte. A presente pesquisa será submetida ao Comitê de

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

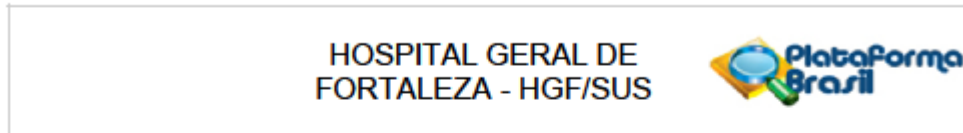
CEP: 60.430-275

UF: CE **Município:** FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

ANEXO B – PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO HOSPITAL GERAL DE FORTALEZA (HGF).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO MOLECULAR DE ALVOS DA VIA UBIQUITINA-PROTEASSOMA (UBE2T, UBE2O, Triad1, USP7 e USP39) NA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Pesquisador: Luiz Gustavo Almeida de Carvalho

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 35871620.9.3001.5040

Instituição Proponente: Hospital Geral de Fortaleza/SUS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.862.241

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO COM JUSTIFICATIVA PARA O TEMA ESCOLHIDO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é um grupo de doenças clonais de células progenitoras hematopoéticas, caracterizada por citopenia periférica, displasias celulares e aumento do risco de desenvolvimento de leucemia mieloide aguda (LMA) (GATTERMANN; RACHMILEWITZ, 2011; OSCIER, 1997; STEENSMA, 2015). Sendo a neoplasia primária de medula óssea mais comum no mundo ocidental em indivíduos com idade superior a 60 anos (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014).

Desse modo, o envelhecimento é o principal fator de risco, devido a erros na replicação do DNA, mutações espontâneas nas células-tronco hematopoéticas, gerando a hematopoese clonal, mutações de genes responsáveis por vias biológicas, splicing de RNA mensageiro, metilação do DNA e remodelação da cromatina (STEENSMA, 2015).

O sistema ubiquitina-proteassoma desempenha um papel importante na regulação das funções celulares, incluindo o ciclo celular, apoptose, diferenciação, reparo do DNA e dentre outras funções biológicas e epigenéticas (MA et al., 2011; ULLAH et al., 2019). De tal modo, a ubiquitinação é responsável pela modificação pós-tradução, regula várias funções celulares, possuindo um papel crucial no desenvolvimento do câncer (SUN et al., 2019; VOUTSADAKIS, 2013), bem como a desubiquitinação também possui papel importante no desenvolvimento de

Endereço: Rua Avila Goulart, nº 900 Sala localizada e identificada, piso térreo do HGF, entrada pela portaria lateral do	
Bairro: Papicu	CEP: 60.191-070
UF: CE	Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3101-7078	E-mail: cephgf.ce@gmail.com

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (a) senhor (a) está sendo convidado (a) para participar, de forma voluntária, da pesquisa intitulada: EXPRESSÃO MOLECULAR DE ALVOS DA VIA UBIQUITINA-PROTEASSOMA (UBE2T, UBE2O, Triad1, USP7 e USP39) NA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA, que está sob a responsabilidade do pesquisador: LUIZ GUSTAVO ALMEIDA DE CARVALHO e tem como objetivos: Investigar o papel das vias de ubiquinação (UBE2T, UBE2O e Triad1) e de desubiquinação (USP7, e USP39) na patogênese e na estratificação prognóstica da Síndrome Mielodisplásica.

Para isso precisamos que o senhor (a), responda algumas perguntas contidas na nossa (entrevista, formulário, questionário, que serão gravadas) Suas respostas serão tratadas de forma anônima e confidencial, isto é, em nenhum momento será divulgado o seu nome em qualquer fase do estudo. Os dados coletados serão utilizados apenas nesta pesquisa e os resultados divulgados em eventos e/ou revistas científicas.

Esta pesquisa poderá trazer (o desenvolvimento de novas estratégias para desvendar a complexidade patogênica dessa doença, caracterizando os sistemas biológicos, suas vias regulatórias e os potenciais biomarcadores moleculares de interesse científico e clínico.) podendo o Sr. (a) interromper o procedimento se assim desejar. A sua participação é de caráter voluntário, isto é, a qualquer momento o (a) Sr. (a) pode recusar-se a responder qualquer pergunta ou desistir de participa e retirar seu consentimento, entrando em contato com o responsável pela pesquisa pelo telefone (85) 98125.4992. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é formado de um grupo de profissionais de diversas áreas, cuja função é avaliar as pesquisas com seres humanos. O CEP foi criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa e também, dos pesquisadores. Qualquer dúvida ética o Sr. (Sra.) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral de Fortaleza, fone: 3101 7078. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é feito em duas vias, no qual o Sr. (Sra.) terá uma via e não terá nenhum custo ou quaisquer compensações financeiras.

Fortaleza, ____ de ____ de _____



Participante da pesquisa
Digitais caso não assine

Pesquisador responsável pela coleta dos dados

Rubrica:

ANEXO D – ARTIGO ROLE OF SIRTUINS IN THE PATHOBIOLOGY OF ONCO-HEMATOLOGICAL DISEASES: A PROSPERO-REGISTERED STUDY AND IN SILICO ANALYSIS – PUBLICADO NA REVISTA CANCERS.



Review

Role of Sirtuins in the Pathobiology of Onco-Hematological Diseases: A PROSPERO-Registered Study and In Silico Analysis

João Vitor Caetano Goes ^{1,2,†}, Luiz Gustavo Carvalho ^{1,3,†}, Roberta Taiane Germano de Oliveira ^{1,4}, Mayara Magna de Lima Melo ^{1,4}, Lázaro Antônio Campanha Novaes ⁵, Daniel Antunes Moreno ⁵, Paola Gyuliane Gonçalves ⁵, Carlos Victor Montefusco-Pereira ⁶, Ronald Feitosa Pinheiro ^{1,4} and Howard Lopes Ribeiro Junior ^{1,5,*}

¹ Center for Research and Drug Development (NPDM), Federal University of Ceará, Fortaleza 60020-181, Ceará, Brazil

² Post-Graduate Program of Pathology, Federal University of Ceará, Fortaleza 60020-181, Ceará, Brazil

³ Post-Graduate Program in Translational Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza 60020-181, Ceará, Brazil

⁴ Post-Graduate Program in Medical Science, Federal University of Ceará, Fortaleza 60020-181, Ceará, Brazil

⁵ Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos 14784-400, São Paulo, Brazil

⁶ Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Pharmaceutical Development Biologicals, 88400 Biberach an der Riss, Germany

* Correspondence: howard@ufc.br; Tel: +55-859-873-96142

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Goes, J.V.C.; Carvalho, L.G.; de Oliveira, R.T.G.; Melo, M.M.d.L.; Novaes, L.A.C.; Moreno, D.A.; Gonçalves, P.G.; Montefusco-Pereira, C.V.; Pinheiro, R.F.; Ribeiro Junior, H.L. Role of Sirtuins in the Pathobiology of Onco-Hematological Diseases: A PROSPERO-Registered Study and In Silico Analysis. *Cancers* **2022**, *14*, 4611. <https://doi.org/10.3390/cancers14194611>

Academic Editor: Bianca Schrijen

Received: 3 June 2022

Accepted: 11 July 2022

Published: 23 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: The aging of the hematological system can cause physiological disorders such as anemia, reduced immunity, and the increased incidence of blood cancer. Patients diagnosed with hematologic malignancies comprise nearly 10% of all cancer deaths identified in international epidemiologic studies. Therefore, it is considered a public health problem worldwide. Scientific evidence demonstrates the important involvement of sirtuins (SIRT) in the pathogenesis of several types of solid tumors. However, the role of SIRT in the pathobiology of malignant hematological diseases has not yet been systematically reviewed. In this systematic review, we highlight the role of different SIRT in the pathogenesis of acute and chronic leukemias, lymphoma and myeloma. Also, we performed a bioinformatic analysis to identify whether the expression of SIRT is altered in onco-hematological diseases, such as lymphomas and leukemias. The advent of new applicability of SIRT in the process of aging and hematological carcinogenesis may allow the development of new diagnostic and therapeutic approaches for these diseases.

Abstract: The sirtuins (SIRT) gene family (SIRT1 to SIRT7) contains the targets implicated in cellular and organismal aging. The role of SIRT expression in the pathogenesis and overall survival of patients diagnosed with solid tumors has been widely discussed. However, studies that seek to explain the role of these pathways in the hematopoietic aging process and the consequences of their instability in the pathogenesis of different onco-hematological diseases are still scarce. Therefore, we performed a systematic review (registered in PROSPERO database #CRD42022310079) and in silico analysis (based on GEPIA database) to discuss the role of SIRT in the advancement of pathogenesis and/or prognosis for different hematological cancer types. In summary, given recent available scientific evidence and in silico gene expression analysis that supports the role of SIRT in pathobiology of hematological malignancies, such as leukemias, lymphomas and myeloma, it is clear the need for further high-quality research and clinical trials that expands the SIRT inhibition knowledge and its effect on controlling clonal progression caused by genomic instability characteristics of these diseases. Finally, SIRT represent potential molecular targets in the control of the effects caused by aging on the failures of the hematopoietic system that can lead to the involvement of hematological neoplasms.

ANEXO E – ARTIGO CLINICAL COMPLICATIONS OF IRON OVERLOAD IN PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME: A LITERATURE REVIEW – PUBLICADO NO PERIÓDICO BRAZILIAN JOURNAL OF CASE REPORTS

Health Review

Brazilian Journal of Case Reports

Clinical Complications of Iron Overload in Patients with Myelodysplastic Syndromes: a literature review

Luiz Gustavo Almeida de Carvalho 1,2^{*}, Andressa Hellen de Morais Batista 1, Isabelle Cerqueira Sousa 1

¹ Centro Universitário Christus - Unichristus, Fortaleza, CE, Brasil.

² Post-Graduation Program in Translational Medicine, Federal University of Ceará, Ceará, CE, Brazil.

^{*}Corresponding author: Luiz Gustavo Almeida de Carvalho. Rua Fiscal Vieira, nº 3330, Apto 18 – Joaquim Távora. Zip Code: 60120-170 - Ceará, CE, Brazil. Phone: +55 (85) 9 8125-4992. E-mail: lgcarvalho.biomed@hotmail.com

Received on: May 31, 2021. Accepted on: Jun 10, 2021. Available online: Jun 18, 2021.

Resumo

Myelodysplastic Syndromes (MDS) are a group of heterogeneous hematologic disorders characterized by bone marrow involvement. Iron overload is the result of multiple transfusions and high levels of apoptosis. Based on a literature review, ferritin was identified as an important marker of iron accumulation in organs such as liver, heart and pancreas in patients with MDS. Some studies also demonstrated that iron overload caused cell cycle arrest causing apoptosis and progression to leukemia, high levels of reactive oxygen species and low levels of HIF-1a, causing apoptosis, being related to the presence of cytopenia in MDS.

Keywords: Myelodysplastic syndrome; Iron overload; Clinical complications.

Introduction

Myelodysplastic Syndromes (MDS) are a group of heterogeneous hematologic disorders characterized by compromised bone marrow function, ineffective hematopoiesis, cytopenias and increased risk of progression to Acute Myeloid Leukemia (AML). It is a disease that predominantly affects the elderly, although it can occur at any age [1,2].

MDS can be primary, that is, when it appears without a defined etiology, affecting mainly individuals over 60 years of age, or secondary with the appearance after exposure to

chemotherapy agents, radiotherapy agents or autologous transplants [3]. According to the 2016 World Health Organization (WHO) Classification for hematopoietic and lymphoid tissue tumors, the categorization of MDS is based on the assessment of peripheral blood and bone marrow morphology, in addition to cytogenetic and molecular analysis. Its categories include MDS with single-lineage dysplasia, MDS with ringed sideroblasts, MDS with multilineage dysplasia, SMD with excess blasts, MDS with isolated del (5q), and unclassifiable SMD [4].

The International Prognostic Scoring System (IPSS), its revision (IPSS-

**ANEXO F – RESULTADO DA PESQUISA APRESENTADOS NO CONGRESSO
INTERNACIONAL *NEXT FRONTIERS TO CURE CANCER* 2022 DO A.C.
CAMARGO CANCER CENTER.**



ROLE OF THE EXPRESSION OF *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* AND *USP15* GENES IN THE PATHOBIOLOGY OF MYELODYSPLASTIC SYNDROME

Luiz Gustavo Almeida de Carvalho¹; João Vítor Caetano Goes¹; Roberta Taiane Germano de Oliveira¹; Mayara Magna de Lima Melo¹; Ronald Feitosa Pinheiro¹; Howard Lopes Ribeiro Junior^{1,2}

¹ Laboratório de Citogenômica do Câncer. Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

² Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular. Hospital de Câncer de Barretos, Barretos, SP, Brasil.

Introduction

Myelodysplastic Syndrome (MDS) comprises a group of clonal hematological disorders closely associated with the presence of genomic instability in hematopoietic progenitor stem cells, commonly characterized by the presence of chromosomal alterations. The ubiquitin-proteasome system is an important proteolytic system with a role in the regulation of several cellular functions such as intracellular protein breakdown, cell cycle control, apoptosis and DNA repair. The role of the ubiquitination (*UBE2T* and *UBE2O*) and deubiquitination (*USP7* and *USP15*) genes is unknown regarding the pathobiology of MDS.

Methods

Initially, an *In silico* Pan-Cancer evaluation was performed using the Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) database in order to verify the differential expression profile of the *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* and *USP15* genes, as well as their role in survival of patients diagnosed with onco-hematological diseases, with a focus on MDS. Subsequently, it was followed by the validation of the gene expression findings of these targets in bone marrow samples from 72 patients diagnosed with MDS and 04 healthy individuals to control group, matched by sex, age and cytogenetic result, based on qPCR analyses. Gene expression data were evaluated in the case versus control association and in relation to clinical, laboratory and cytogenetic data of MDS patients. The research was submitted and approved by the Human Ethics Research Committee (PROPEQ-UFC - #35871620.9.0000.5054 / HGF/SUS - #35871620.9.3001.5040).

Results

From the Pan-Cancer screening in 30 different types of cancers in the GEPIA database, we identified the differential expression profile of the *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* and *USP15* genes only in types of onco-hematological diseases, the Lymphoid Neoplasm Diffuse Lymphoma of large B cells (DLBC) and Acute Myeloid Leukemia (AML). No data on the expression of these genes were identified in the GEPIA for MDS. In DLBC, the genes *UBE2T*, *UBE2O* and *USP7* showed a significantly increased expression compared to controls. In addition, it was identified that the *UBE2T* gene had a reduced expression in patients with AML compared to controls. No differences were identified regarding the expression of these genes and survival in patients with DLBC and AML.

In the evaluation of the expression of these genes in MDS, we identified that only the *USP15* gene had a reduced expression in relation to healthy individuals ($p=0.03$). Regarding the clinical and laboratory variables of MDS, an increase in the expression of the *UBE2T* gene was identified in patients with chromosomal abnormalities compared to patients with normal karyotype ($p=0.032$). The *USP7* and *USP15* genes were positive and strongly correlated in MDS ($r=0.62$; $r^2=0.67$; $p<0.0001$).

Results

Figure 1 - Gene expression of *UBE2T*, *UBE2O*, *USP7* and *USP15* in MDS patients compared to controls.

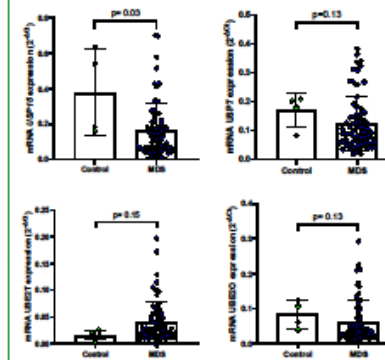


Figure 2 - Correlation analysis between *USP7* and *USP15* gene expression.

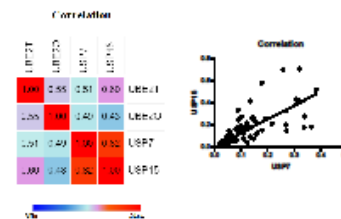
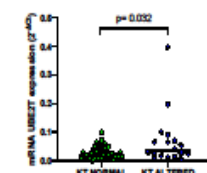


Figure 3 - *UBE2T* gene expression in MDS patients in relation to the karyotype variable.



Conclusions

Our results highlight that the differential gene expression of *USP15-USP7* axis and *UBE2T* may play an important role in the control of genomic instability establishing one of the most striking characteristics in MDS, the chromosomal abnormalities.

Contact

Howard Lopes Ribeiro Junior (howard@ufc.br), Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, Hospital de Câncer de Barretos, Barretos, SP, Brasil.

**ANEXO G – CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO NO CONGRESSO
INTERNACIONAL *NEXT FRONTIERS TO CURE CANCER* 2022 DO A.C.
CAMARGO CANCER CENTER.**

