



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

JOÃO VITOR CAETANO GOES

**PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DE DEACETILAÇÃO DE
HISTONAS MEDIADA POR SIRTUINAS (SIRTS) NA ESTRATIFICAÇÃO
PROGNÓSTICA DA NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA**

**FORTALEZA
2023**

JOÃO VITOR CAETANO GOES

PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DE DEACETILAÇÃO DE HISTONAS
MEDIADA POR SIRTUINAS (SIRTS) NA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DA
NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito final para a obtenção do título de mestre em Patologia.

Área de concentração: Medicina II.

Orientador: Prof. Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior

FORTALEZA
2023

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)

-
- G543p Goes, João Vitor Caetano.
Perfil de expressão gênica da via de deacetilação de histonas mediada por sirtuinas (SIRTs) na
estratificação prognóstica da Neoplasia Mielodisplásica /
João Vitor Caetano Goes. – 2023.
113 f. : il. color.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de
PósGraduação em Patologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior.
1. Neoplasia Mielodisplásica. 2. Envelhecimento,. 3. Senescência celular. 4. Expressão gênica. 5.
Sirtuinas. I. Título.

CDD 571.9

PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DE DEACETILAÇÃO DE HISTONAS
MEDIADA POR SIRTUINAS (SIRTS) NA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DA
NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Patologia.

Aprovada em: 01/12/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Dr. Daniel Antunes Moreno
Hospital do Amor (Barretos)

*A Deus e ao maior presente que Ele me deu:
Minha Mãe, Maria.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por todo cuidado e pela vida.

À minha mãe, **Maria José Caetano Xavier**, e meu irmão, **Mateus Caetano Goes**, pela paciência, carinho, amor e por todo o companheirismo e apoio nessa jornada.

Ao meu orientador e amigo, **Howard Lopes Ribeiro Junior**, por todo o apoio e auxílio neste percurso profissional e acadêmico. Por todos os conselhos, pelos momentos divertidos e por todo o carinho que teve comigo nestes dois anos.

Ao **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro**, por me conceder a maior experiência da vida, poder acompanhar de perto a vida de cada paciente, poder ajudá-los e caminhar juntos ao longo do processo de tratamento e cura da SMD.

Ao meu grande amigo e irmão, **Mateus de Aguiar Viana**, pelos momentos mais divertidos e inesquecíveis ao longo desses dois anos de pós-graduação.

À minha amiga, **Roberta Taiane Germano de Oliveira**, por todo apoio, por me auxiliar nesse crescimento intelectual e por cada ensinamento de bancada e de caminhada profissional.

À melhor equipe de citogenética do mundo, Mayara Magna de Lima Melo e **Sharlene Monteiro**, por todo o ensinamento e todo o carinho para me ensinar nesta linda jornada (e principalmente, pela paciência em me ensinar a classificar cromossomos).

Aos meus amigos e companheiros de pós-graduação do Laboratório de Citogenômica do Câncer, **Ricardo Dyllan Barbosa Dias** e **Leticia Rodrigues Sampaio**, por todo o carinho e companheirismo no laboratório e por todos os momentos de alegria e descontração.

A um dos mais novos membros do laboratório, **Hermano Vinnicius Gomes Dos Santos**, que em pouco tempo adquiriu um espaço especial nessa família. Hoje faz parte de um grupo de pessoas que modificam e alegam completamente o meu dia.

À minha amiga e aluna de Iniciação Científica, **Clarissa Brenda Alves Cavalcante**, que por sua dedicação e compromisso esteve sempre junto de mim em todo o processo experimental, em toda a construção científica deste projeto.

Pelos meus companheiros de pós-graduação, **Francisca Janaina Damasceno Moraes**, **Camylla Nathallia Almeida**, **Thiago Pinto Brasil** e **Thiago Nobre Gomes**, por todo o companheirismo ao longo desse processo de crescimento acadêmico.

Pela minha equipe de atendimento ambulatorial, **Natalia Feitosa Arrais Minete**, **Fabiana de Jesus Aguiar Belini Ribeiro** e **Renato Mendes Martins**, por cada vitória e conquista junto aos pacientes pelos quais nos dedicamos a trabalhar neste último ano de serviços junto ao HGF.

Ao **CNPq** e à **CAPES**, pelo auxílio financeiro ao longo desta minha vida acadêmico-científica.

A todos os pacientes participantes desta pesquisa, fundamentais neste novo passo na minha formação como pesquisador. Deus abençoe cada um de vocês.

A **Vida**, por me ensinar que a cada dia posso ser melhor, cuidando de mim mesmo e do próximo como um ciclo que não se encerra.

A todos do laboratório de Citogenômica do Câncer que nesses últimos dois anos me ensinaram que muito mais do que o conhecimento adquirido, são as pessoas ao nosso redor que nos tornam pessoas melhores

“Ora, em nosso país”, disse Alice, ainda um pouco sem fôlego, “geralmente a gente chega a outro lugar quando a gente corre rápido durante muito tempo, como estamos fazendo.”

“País lento, esse!”, disse a rainha. “Aqui é preciso que se corra o máximo possível para ficar no mesmo lugar. Se quiser ir para outro lugar, tem de correr pelo menos duas vezes mais rápido!”

- Lewis Carroll, *Alice através do espelho*.

RESUMO

As Sirtuínas (SIRT) são um grupo de proteínas que desempenham um papel crucial em diversos processos celulares, incluindo reparo do DNA, metabolismo e envelhecimento. As SIRT têm sido implicadas na promoção da progressão do câncer, inibindo vias de morte celular e facilitando a sobrevivência das células cancerosas. Além disso, alguns estudos têm relacionado a atividade de expressão gênica aumentada da família SIRT (*SIRT1* a *SIRT7*) ao desenvolvimento de resistência a medicamentos em células cancerosas, tornando o tratamento mais desafiador. Recentemente, em uma revisão sistemática, nosso grupo destacou a escassez de estudos que estabelecem o papel dos genes *SIRT*s na patobiologia da Neoplasia Mielodisplásica (SMD). Avaliamos o perfil de expressão gênica das SIRTs (*SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7*) em relação à patogênese e progressão prognóstica da SMD. Esta análise incluiu uma coorte de 80 pacientes idosos diagnosticados com SMD e amostras de medula óssea de 10 indivíduos saudáveis. Os pacientes com SMD foram diagnosticados com base nos critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) e estratificados de acordo com os critérios prognósticos estabelecidos pelo Sistema Internacional de Pontuação Prognóstica - Revisado (IPSS-R). Avaliamos os níveis de expressão gênica das SIRTs usando o método de PCR em tempo real (RT-qPCR). Resultados: Observamos baixa expressão de *SIRT2* ($p=0,009$), *SIRT3* ($p=0,048$), *SIRT4* ($p=0,049$), *SIRT5* ($p=0,046$), *SIRT6* ($p=0,043$) e *SIRT7* ($p=0,047$) em pacientes com SMD em comparação com o grupo de controle. Além disso, encontramos aumento na expressão de *SIRT4* ($p=0,029$) em pacientes com 60 anos ou mais. Além disso, identificamos aumento na expressão de *SIRT2* ($p=0,016$) e *SIRT3* ($p=0,036$) em pacientes com níveis de hemoglobina abaixo de 8g/dL, aumento de *SIRT4* ($p=0,036$) em pacientes com diseritropoiese, diminuição da expressão de *SIRT2* ($p=0,035$), *SIRT4* ($p=0,035$) e *SIRT7* ($p=0,037$) em pacientes com disgranulopoeise, aumento de *SIRT1* ($p=0,027$) em pacientes com dismegacariopoeise e aumento de *SIRT4* ($p=0,043$) em pacientes com a presença de sideroblastos em anel. Também observamos alta expressão de *SIRT2* ($p=0,045$) e *SIRT3* ($p=0,033$) em pacientes com alterações citogenéticas e aumento da expressão de *SIRT2* ($p=0,004$), *SIRT3* ($p=0,005$) e *SIRT4* ($p=0,033$) em pacientes saudáveis em comparação com aqueles com cariótipo normal. Em resumo, identificamos uma expressão gênica significativamente diferencial dos membros das SIRTs na SMD. Identificamos variações na expressão das SIRTs em displasias celulares nas três linhagens celulares presentes na medula óssea, bem como variações das SIRTs em pacientes com níveis muito baixos de hemoglobina, demonstrando a relação desses genes com a doença. Essas disfunções levam a características displásicas e oncogênicas capazes de desencadear a doença e suas características prognósticas. Nossos resultados revelaram associações clínicas significativas em relação à expressão dos genes *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7*, demonstrando seu potencial envolvimento na patogênese e progressão da SMD.

Palavras-chave: Neoplasia Mielodisplásica, Envelhecimento, Senescência celular, Expressão gênica e Sirtuínas.

ABSTRACT

Sirtuins (SIRT) are a group of proteins that play a crucial role in various cellular processes, including DNA repair, metabolism, and aging. They have been the subject of significant research interest, particularly in relation to cancer. SIRT have been implicated in promoting cancer progression by inhibiting cell death pathways and facilitating cancer cell survival. Additionally, some studies have linked increased SIRT family (*SIRT1* to *SIRT7*) gene expression activity to developing drug resistance in cancer cells, making treatment more challenging. Recently, in a systematic review, our group highlighted the scarcity of studies that establish the role of SIRTs genes in the pathobiology of Myelodysplastic neoplasm (MDS). To assess the gene expression profile of SIRTs (*SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6*, and *SIRT7*) in relation to the pathogenesis and prognostic progression of MDS. This analysis included a cohort of 80 elderly patients diagnosed with MDS and bone marrow samples from 10 healthy individuals. MDS patients were diagnosed based on the World Health Organization (WHO) criteria and stratified according to the prognostic criteria established by the International Prognostic Scoring System-Revised (IPSS-R). We assessed the gene expression levels of SIRTs using the Real-Time PCR Gene Expression (RT-qPCR) method. We observed low expression of *SIRT2* ($p=0.009$), *SIRT3* ($p=0.048$), *SIRT4* ($p=0.049$), *SIRT5* ($p=0.046$), *SIRT6* ($p=0.043$), and *SIRT7* ($p=0.047$) in MDS patients compared to the control group. Additionally, we found increased expression of *SIRT4* ($p=0.029$) in patients aged 60 or above. Furthermore, we identified increased expression of *SIRT2* ($p=0.016$) and *SIRT3* ($p=0.036$) in patients with hemoglobin levels below 8g/dL, increased *SIRT4* ($p=0.036$) in patients with dyserythropoiesis, decreased expression of *SIRT2* ($p=0.035$), *SIRT4* ($p=0.035$), and *SIRT7* ($p=0.037$) in patients with dysgranulopoiesis, increased *SIRT1* ($p=0.027$) in patients with dysmegakaryopoiesis, and increased *SIRT4* ($p=0.043$) in patients with the presence of ring sideroblasts. We also observed high expression of *SIRT2* ($p=0.045$) and *SIRT3* ($p=0.033$) in patients with cytogenetic alterations and increased expression of *SIRT2* ($p=0.004$), *SIRT3* ($p=0.005$), and *SIRT4* ($p=0.033$) in healthy patients compared to those with a normal karyotype. In summary, we identified significantly differential gene expression of SIRTs members in MDS. We identified variations in the expression of SIRTs in cell dysplasias in all 3 cell lines present in BM, as well as variations of SIRTs in patients with very low hemoglobin levels, demonstrating the relationship of these genes with the disease. These defuncions lead to dysplastic and oncogenic characteristics capable of triggering the disease and its prognostic characteristics. Our results revealed significant clinical associations regarding the expression of *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6*, and *SIRT7* genes, demonstrating their potential involvement in the pathogenesis and progression of MDS.

Keywords: Myelodysplastic Neoplasm, Aging, Cell Senescence, Gene Expression, Sirtuins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Atividade das enzimas de regulação de histonas.....	16
Figura 2 - Síntese de NAD ⁺ e processo de deacetilação proteica dependente.....	18
Figura 3 - Feedback de estresse celular e manutenção tumoral induzida por inibição de SIRT1.	20
Figura 4 - Representação esquemática do processo de patogênese da SMD.	29
Figura 5 - Desenho experimental do estudo.....	37
Figura 6 - Representação esquemática da Metodologia de Citogenética por Bandeamento-G.	39
Figura 7 - Representação esquemática da Metodologia de qRT-PCR.	42
Figura 8 - Expressão de <i>SIRT1</i> , <i>SIRT2</i> , <i>SIRT4</i> e <i>SIRT7</i> em células mononucleadas de medula óssea de pacientes com SMD com base na análise de microarray.	46
Figura 9 - Resultado da análise da estabilidade dos endógenos pela ferramenta RefFinder.....	53
Figura 10 - Nível de expressão dos genes <i>SIRTs</i> em pacientes SMD versus controle..	54
Figura 11 - Expressão de <i>SIRT4</i> na variável idade.....	55
Figura 12 - Nível de expressão dos genes, <i>SIRT2</i> e <i>SIRT3</i> em pacientes com SMD frente à hemoglobina categorizada pelo IPSS-R.	56
Figura 13 - Nível de expressão do gene <i>SIRT4</i> frente a presença de Diseritropoese em pacientes com SMD.....	57
Figura 14 - Nível de expressão dos genes <i>SIRT2</i> , <i>SIRT4</i> e <i>SIRT7</i> frente a presença de Disgranulopoese em pacientes com SMD.	58
Figura 15 - Nível de expressão do gene <i>SIRT1</i> frente a presença de Dismegacariopoese em pacientes com SMD.....	59
Figura 16 - Nível de expressão do gene <i>SIRT4</i> frente a presença de sideroblastos em anel em pacientes com SMD.	59
Figura 17 - Nível de expressão dos genes <i>SIRT2</i> e <i>SIRT3</i> em pacientes com SMD frente a variável cariótipo normal e alterado.	60
Figura 18 - Nível de expressão dos genes <i>SIRT2</i> , <i>SIRT3</i> e <i>SIRT4</i> em pacientes com SMD frente a variável cariótipo normal, alterado e o grupo controle.....	61
Figura 19 - Nível de expressão dos genes <i>SIRT2</i> , <i>SIRT3</i> , <i>SIRT4</i> , <i>SIRT6</i> e <i>SIRT7</i> em pacientes com SMD-BB e o grupo controle.....	62

Figura 20 - Nível de expressão dos genes SIRT2, SIRT3, SIRT4 e SIRT5 em pacientes com SMD-EB e o grupo controle.	63
Figura 21 - Análise de correlação entre os genes SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 e SIRT7 e seus níveis de expressão gênica na SMD.	64
Figura 22 - Heatmap da análise de correlação entre os genes SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 e SIRT7 e seus níveis de expressão gênica em subtipos da SMD (A= SMD-BB; B= SMD-SA-BB; C= SMD-EB; D= SMD-h).....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pontos de modificação de histonas por sirtuinas e seus efeitos.....	16
Tabela 2 - Classificação da SMD segundo os critérios da OMS 2022	30
Tabela 3 - Escores de variáveis prognósticas segundo o IPPS-R.....	31
Tabela 4 - Classificação dos subgrupos de prognóstico citogenético (IPPS-R).....	31
Tabela 5 - Categorias e pontuações de risco prognóstico segundo o IPSS-R	32
Tabela 6 - Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR.	41
Tabela 7 - Caracterização descritiva das variáveis sociodemográficas dos controles saudáveis.....	47
Tabela 8 - Características citogenéticas dos controles saudáveis incluídos no estudo..	47
Tabela 9 - Análise descritiva das variáveis sociodemográficas dos pacientes com SMD.	48
Tabela 10 - Estratificação clínica dos pacientes com SMD segundo a classificação da OMS (2022).....	49
Tabela 11 - Frequência das variáveis clínicas relacionadas aos achados da medula óssea em pacientes com SMD.....	50
Tabela 12 - Variáveis clínico-laboratoriais relacionadas aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD.	50
Tabela 13 - Variáveis clínico-laboratoriais categorizada aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD.	51
Tabela 14 - Classificação de risco de pacientes com SMD de acordo com o IPSS-R. .	51
Tabela 15 - Frequência dos resultados citogenéticos e seu impacto prognóstico em pacientes com SMD ao diagnóstico.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

CTH	<i>Células Tronco Hematopoiéticas</i>
CTL	<i>Células Tronco Leucêmicas</i>
DNA	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
DNR	<i>Daunorubicina</i>
DSB	<i>Quebras de Fita dupla</i>
EROS	<i>Espécies Reativas de Oxigênio</i>
HAT	<i>Histona acetiltransferase</i>
HC	<i>Hematopoiese Clonal</i>
HDAC	<i>Histona Deacetilase</i>
HH	<i>Hedgehog</i>
IDH2	<i>Isocitrato Dismutase</i>
IPSS	<i>International Prognostic Scoring System</i>
IPSS-R	<i>Revised International Prognostic Scoring System</i>
iRNA	<i>RNA de Interferência</i>
ISCN	<i>Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana</i>
LLA	<i>Leucemia Linfocítica Aguda</i>
LLC	<i>Leucemia Linfocítica Crônica</i>
LMA	<i>Leucemia Mielóide Aguda</i>
LMC	<i>Leucemia Mielóide Crônica</i>
LPS	<i>Lipopolissacarídeos.</i>
LTA	<i>Leucemia de Células T do Adulto</i>
MM	<i>Mieloma Múltiplo</i>
MO	<i>Medula Óssea.</i>
mRNA	<i>RNA mensageiro</i>
NAD	<i>Dinucleotídeo de Nicotinamida e adenina</i>
NAM	<i>Nicotinamida Livre</i>
NAMPT	<i>Nicotinamida Fosforibosiltransferase</i>
NHEJ	<i>Junção de extremidades não homologas</i>
NMN	<i>Nicotinamida</i>
NMNAT	<i>Nicotinamida Adeniltransferase</i>

NR	<i>Nicotinamida Ribosídeo</i>
NRK	<i>Nicotinamida Ribosídeo Kinase</i>
RE	<i>Reticulo endoplasmático</i>
RNA	<i>Ácido Ribonucleico</i>
RNAi	<i>RNA de interferência</i>
rRNA	<i>RNA ribossômico</i>
sh-RNA	<i>RNA Hairpin Curto</i>
SIR2	<i>Silent Information Regulator 2</i>
SIRT	<i>Sirtuina.</i>
SIRT1	<i>Sirtuina 1</i>
SIRT2	<i>Sirtuina 2</i>
SIRT3	<i>Sirtuina 3</i>
SIRT4	<i>Sirtuina 4</i>
SIRT5	<i>Sirtuina 5</i>
SIRT6	<i>Sirtuina 6</i>
SIRT7	<i>Sirtuina 7</i>
SMD	<i>Neoplasia Mielodisplásica</i>
SMDt	<i>SMD relacionada a quimioterapia</i>
SOD2	<i>Superóxido Dismutase</i>
STAT5	<i>Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 5</i>
TKI	<i>Inibidor de Tirosina Kinase</i>
TLR4	<i>Receptor Toll-like 4</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1Sirtuinas, modificação de histonas e controle epigenético	15
<i>1.1.1 Sirtuina 1 (SIRT1)</i>	<i>18</i>
<i>1.1.2 Sirtuina 2 (SIRT2)</i>	<i>21</i>
<i>1.1.3 Sirtuina 3 (SIRT3)</i>	<i>22</i>
<i>1.1.4 Sirtuina 4 (SIRT4)</i>	<i>23</i>
<i>1.1.5 Sirtuina 5 (SIRT5)</i>	<i>23</i>
<i>1.1.6 Sirtuina 6 (SIRT6)</i>	<i>24</i>
<i>1.1.7 Sirtuina 7 (SIRT7)</i>	<i>25</i>
1.2Aspectos gerais da neoplasia mielodisplásica.....	25
<i>1.2.1 Etiologia</i>	<i>26</i>
<i>1.2.2 Epidemiologia</i>	<i>27</i>
<i>1.2.3 Patogênese da Neoplasia Mielodisplásica.....</i>	<i>28</i>
<i>1.2.4 Diagnóstico e classificação clínica da Neoplasia Mielodisplásica</i>	<i>29</i>
<i>1.2.5 Classificação prognóstica da Neoplasia Mielodisplásica</i>	<i>31</i>
<i>1.2.6 Alterações moleculares e citogenéticas na SMD</i>	<i>32</i>
<i>1.2.7 Alterações do perfil de expressão de HDACs em pacientes com SMD</i>	<i>33</i>
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	36
3.1Validação da expressão de sirt1-sirt7 em uma coorte de pacientes brasileiros com SMD	36
3.2 Aspectos éticos da pesquisa	36
3.3 Coleta e obtenção das amostras	37
3.4 Cariótipo por bandeamento-G.....	38
3.5 Análise de expressão gênica por RT-qPCR	39
<i>3.5.1 Extração de RNA Total</i>	<i>39</i>
<i>3.5.2 Síntese de cDNA</i>	<i>40</i>
<i>3.5.3 RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)</i>	<i>40</i>
3.6 Variáveis analisadas.....	43
3.7 Análises estatísticas	44
4 RESULTADOS	46

4.1	Análise <i>in silico</i> do nível de expressão gênica da família de sirtuinas (<i>SIRT1</i> , <i>SIRT2</i> , <i>SIRT3</i> , <i>SIRT4</i> , <i>SIRT5</i> , <i>SIRT6</i> E <i>SIRT7</i>).....	46
4.2	Caracterização dos pacientes da coorte brasileira em estudo de caso e controle	47
4.3	Análise das alterações citogenética por banda-g em pacientes com SMD	51
4.4	Análise de expressão gênica dos genes de referência em amostras de estudo	52
4.5	Análise de expressão gênica por RT-qPCR em amostras de medula óssea de pacientes com SMD	53
4.5.1	<i>Expressão gênica dos genes SIRTs em pacientes com SMD e indivíduos saudáveis</i>	53
4.5.2	<i>Expressão gênica das SIRTs em pacientes com SMD e variáveis clínicas.</i> ..	55
4.5.3	<i>Expressão gênica das SIRTs frente às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD</i>	55
4.6	Expressão gênica das SIRTs frente às variáveis de classificação clínica e estratificação prognóstica	61
4.7	Análise de correlação entre os níveis de expressão dos genes relacionados ao controle do maquinário de histonas e senescência celular	64
4.7.1	<i>Análise de correlação entre os genes SIRTs na SMD de novo</i>	64
4.7.2	<i>Análise de correlação entre os genes SIRTs nos subtipos da SMD pela WHO 2022</i>	65
5.	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICES	81
	ANEXOS	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sirtuinas, modificação de histonas e controle epigenético

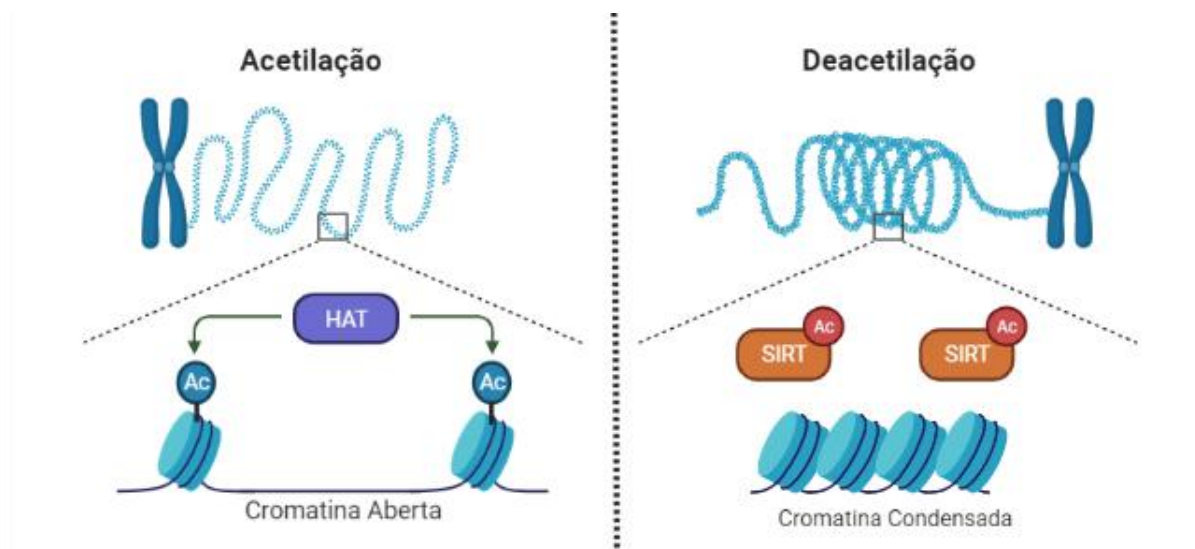
Em termos gerais, a regulação epigenética consiste em alterações moleculares capazes de modificar a estrutura da cromatina e regular a expressão gênica sem necessariamente alterar a sequência do DNA (COSTA; PACHECO, 2013). A metilação do DNA e as modificações das histonas são considerados os principais mecanismos de regulação epigenética conhecidos (GEIMAN; MUEGGE, 2010; MÜLLER et al., 2014). Estes processos regulam atividades biológicas como transcrição e mecanismos pós-traducionais (BARTH; IMHOF, 2010; ROBERTSON, 2001). Recentemente, a reprogramação epigenética não mutacional foi adicionada como uma das principais responsáveis pelo surgimento do câncer, dessa forma, a regulação epigenética abre espaço para o questionamento da evolução tumoral por mecanismos epigenéticos não regulados (HANAHAHAN, 2022).

As modificações das lisinas nas caudas n-terminais das histonas foram identificadas pela primeira vez em meados de 1960, contudo, até o início dos anos de 1990, as enzimas capazes de modificar essas lisinas ainda não haviam sido identificadas (YANG; SETO, 2007). HAT (histona acetiltransferase) e HDAC (histona deacetilase) são famílias de enzimas de classes opostas que apresentam respectivamente, a função de abrir a cromatina e permitir a transcrição gênica, enquanto as HDACs possuem um efeito reverso ao deacetilar resíduos de lisina nas caudas n-terminais das histonas (Figura 1) (WANG; WANG; LIU, 2020). Dentre as diversas enzimas de HDACs existentes, destacam-se as Sirtuinas (*SIRT*s), uma família de enzimas de classe III dependentes do cofator NAD^+ , além disso, possuem sete membros (*SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7*) sendo responsáveis por diversas atividades como regulação de transcrição, metabolismo e manutenção do genoma (DAI; FALLER, 2008).

Conhecidas como homólogos do gene *Sir2* (*Silent information regulator-2*), as *SIRT*s fazem parte de uma família extremamente conservada tanto em eucariotos como em procariotos e sua hiper expressão está associada ao aumento da sobrevivência celular, além de serem capazes de prevenir doenças e reverter os efeitos do envelhecimento celular e do câncer (LEE et al., 2019; ZHAO et al., 2019). As enzimas codificadas pelos genes *SIRT*s se encontram atuantes em diversos compartimentos celulares: *SIRT1*, *SIRT6* e *SIRT7* apresentam atividades nucleares, *SIRT2* se encontra majoritariamente presente no citoplasma enquanto, *SIRT3*, *SIRT4* e *SIRT5* possuem

atividades mitocondriais (BEDOLLA et al., 2020; O'CALLAGHAN; VASSILOPOULOS, 2017).

Figura 1 - Atividade das enzimas de regulação de histonas.



*As enzimas HATs (Histonas acetiltransferases) são capazes de introduzir um grupamento acetil nas lisinas das caudas n-terminais das histonas, modificando sua carga original e permitindo a abertura da cromatina e consequente liberação da transcrição gênica. Em contrapartida, as enzimas HDACs (Histonas deacetilases), aqui demonstradas por SIRTs, quebram a ligação entre o grupo acetil e as histonas, retornando as proteínas a sua carga normal e consequente condensação da cromatina, impedindo a transcrição gênica.

Fonte: Resumo gráfico adaptado de P. Wang et al., 2020 através da ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

As *SIRT*s não são redundantes entre si, ou seja, ainda que apresentem as mesmas características funcionais, as enzimas apresentam características de deacetilação distintas entre as proteínas do maquinário celular, entretanto, possuem um domínio de deacetilação conservado: as lisinas das caudas n-terminais de histonas (Tabela 1) (WAȚTROBA et al., 2017).

Tabela 1 - Pontos de modificação de histonas por sirtuinas e seus efeitos.

Sirtuina	Modificação de histona	Efeitos	Deficiência
SIRT1	H4-K16dac H3-K9dac H1-K26dac	Silenciamento transcricional, estabilidade do g00enoma	Instabilidade genômica, acúmulo de danos ao DNA no caso do estresse genotóxico coexistente
	H3-K14dac H-K16dac	Silenciamento transcricional	
	H3-K56dac	Regulação do ciclo celular, reparo do DNA	

	H3-K79me3 H3-K27me3	Estabilidade genômica	Envelhecimento celular acelerado
SIRT2	H3-K56dac H4-K16dac	Condensação da cromatina, mitose e reparo do DNA	Inibição do ciclo celular em G2/M, perda de histonas em regiões subteloméricas
	H4K20me1	Estabilidade do genoma e progressão da fase S	Instabilidade genômica e aberrações cromossômica, tumorigênese
SIRT3	H4-K16dac	Silenciamento de cromatina, silenciamento transcricional de genes de estresse, reparo do DNA	Danos ao DNA
SIRT6	H3-K9dac H3-K56dac	Proteção subtelomérica da cromatina, promoção do reparo do DNA e da estabilidade do genoma, prevenção do envelhecimento e doenças neurodegenerativas por silenciando os locais do promotor NF-kB	Doença degenerativa associada ao envelhecimento, inflamações, apoptose celular excessiva, hipoglicemia letal
SIRT7	H3-K18dac	Facilitação do reparo de DSB por meio de NHEJ, promoção da estabilidade genômica, indução da transcrição de rRNA	Parada de proliferação, acelerado envelhecimento do organismo, danos no DNA, metabolismo de glicose e lipídios prejudicado.

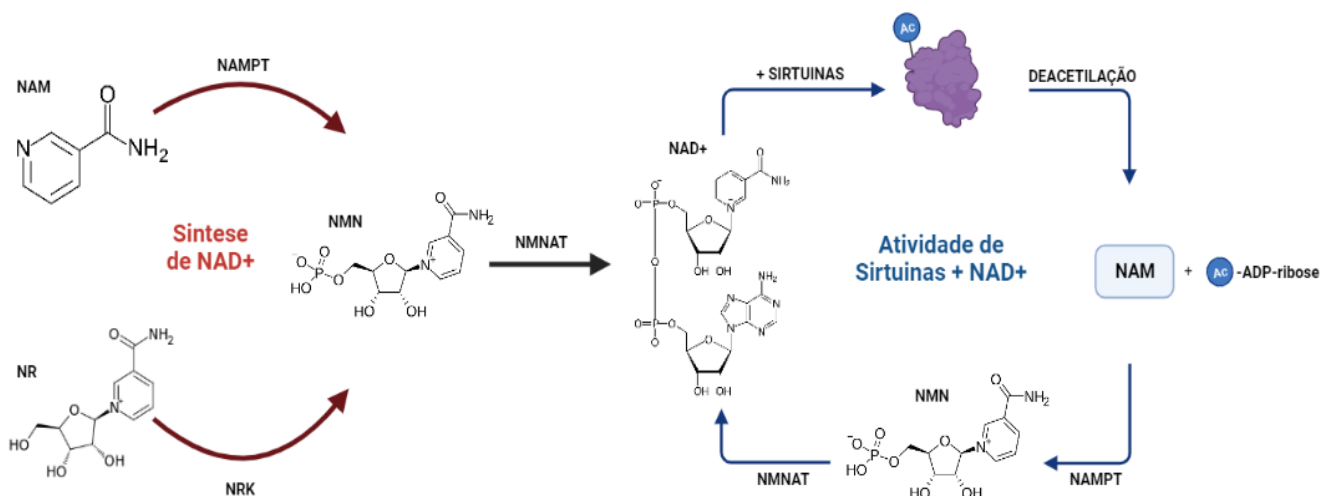
Fonte: Adaptado de Wątroba et al., 2017.

Ao atuar na manutenção da cromatina e em resposta aos danos sofridos pelo DNA e seu consequente reparo, as *SIRT*s auxiliam na manutenção da integridade do genoma, dessa forma, são capazes de suprimir os processos de senescência celular, envelhecimento e o câncer. Além disso, a atividade das *SIRT*s também se encontra relacionada a manutenção e auto renovação de células tronco (LEE et al., 2019). Arelado aos efeitos do envelhecimento, a produção de NAD^+ tende a diminuir e, como consequência, os ciclos dependentes de NAD^+ se tornam escassos. Estudos identificaram que os precursores de NAD^+ podem atuar restaurando os efeitos das *SIRT*s em organismos envelhecidos (Figura 2) (MARTENS et al., 2018; MENDELSON; LARRICK, 2019; MOON; KIM; SHIN, 2018).

No processo de formação do NAD^+ , a Nicotinamida Livre (NAM) é convertida em Nicotinamida (NMN) pela ação da enzima Nicotinamida Fosforibosiltransferase (NAMPT), o mesmo resultado é obtido quando o suplemento de Nicotinamida Ribosideo (NR) é convertido em NMN pela enzima Nicotinamida Ribosideo Kinase (NRK). A NMN é convertida para NAD^+ pela enzima NMN

Adeniltransferase (NMNAT). Após a ligação com as *SIRT*s, o NAD^+ é hidrolisado, o grupo acetil ligado à proteína é removido, deacetilando a proteína e como resultado, NAM e 2'-O-acetil-ADP-ribose são liberados. Finalmente, NAM retorna ao ciclo de formação do NAD^+ , reiniciando os ciclos (MENDELSON; LARRICK, 2019; SULTANI et al., 2017). A figura 2 descreve o processo bioquímico que norteia a síntese de NAD^+ e sua atividade no processo de deacetilase proteica mediada por *SIRT*s.

Figura 2 - Síntese de NAD^+ e processo de deacetilação proteica dependente.



Fonte: Resumo gráfico adaptado de Mendelsohn & Larrick, 2019 e Sultani et al., 2017 através da ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

1.1.1 Sirtuina 1 (*SIRT1*)

Entre os genes que compõem a família de sirtuinas, a *SIRT1* (posição 10q21.3) é a mais estudada, possuindo uma função esclarecida na supressão ou progressão de diversos tumores (HUANG et al., 2019). Dentro desta família de genes, este é o principal gene estudado em diversas doenças oncohematológicas, destacam-se as: leucemias de linhagem mielóide e linfóide, mieloma múltiplo, linfomas e Neoplasia Mielodisplásica (GOES et al., 2022).

Diversos estudos evidenciaram o papel do controle da expressão de *SIRT1* como possível marcador de agressividade da doença. O aumento da expressão proteica de *SIRT1* foi identificado em células CD34^+ e CD38^- na Leucemia Mielóide Aguda (LMA) (SASCA et al., 2014). Quando comparado com amostras de pacientes saudáveis, a mesma análise identificou que a expressão de *SIRT1* foi aumentada em amostras de

sangue periférico de pacientes de alto risco e risco intermediário, quando comparado com pacientes de baixo risco (SASCA et al., 2014).

Na Leucemia Mielóide Crônica (LMC), *SIRT1* se encontra altamente expresso. Este gene está estritamente relacionado à manutenção das células-tronco leucêmicas na LMC (LMC-CTL) (ABRAHAM et al., 2019). A redução de sua expressão por RNAi leva ao aumento da indução de apoptose, à parada do ciclo celular, ao aumento da sensibilidade aos danos por etoposídeos e redução da capacidade de tumorigênese na linhagem celular leucêmica (ZHANG et al., 2015). *SIRT1* é ativado com a transformação BCR-ABL e este aumento na transcrição está ligado ao transdutor de sinal e ativador da transcrição 5 (STAT5), em contraste, o nocaute de *SIRT1* levou à diminuição do crescimento de células LMC e doenças similares em camundongos (YUAN et al., 2012). A redução de *SIRT1* em LMC por shRNA reduz os níveis de LMC-CTLs em camundongos enquanto isso, aumenta a sensibilidade aos inibidores de tirosina quinase (TKI), além disso, a redução dos níveis de *SIRT1* reduz a respiração mitocondrial nestas células (ABRAHAM et al., 2019; LI et al., 2012). Estudos com inibidores de proteína Hsp90 e inibidores de *SIRT1* identificaram que ambos têm um efeito terapêutico característico, permitindo maior sensibilidade a terapias recorrentes para células LMC que possuem resistência a múltiplas drogas (KIM et al., 2015). Níveis elevados de *SIRT1* podem reduzir o nível de inflamação causada por lipopolissacarídeos (LPS) em células LMC k562, reduzindo os sensores do receptor Toll-like 4 (TLR4) relevantes para a inflamação, assim como a redução de NF- κ B e p65, provocando uma diminuição das espécies reativas de oxigênio (EROs) (WANG et al., 2020).

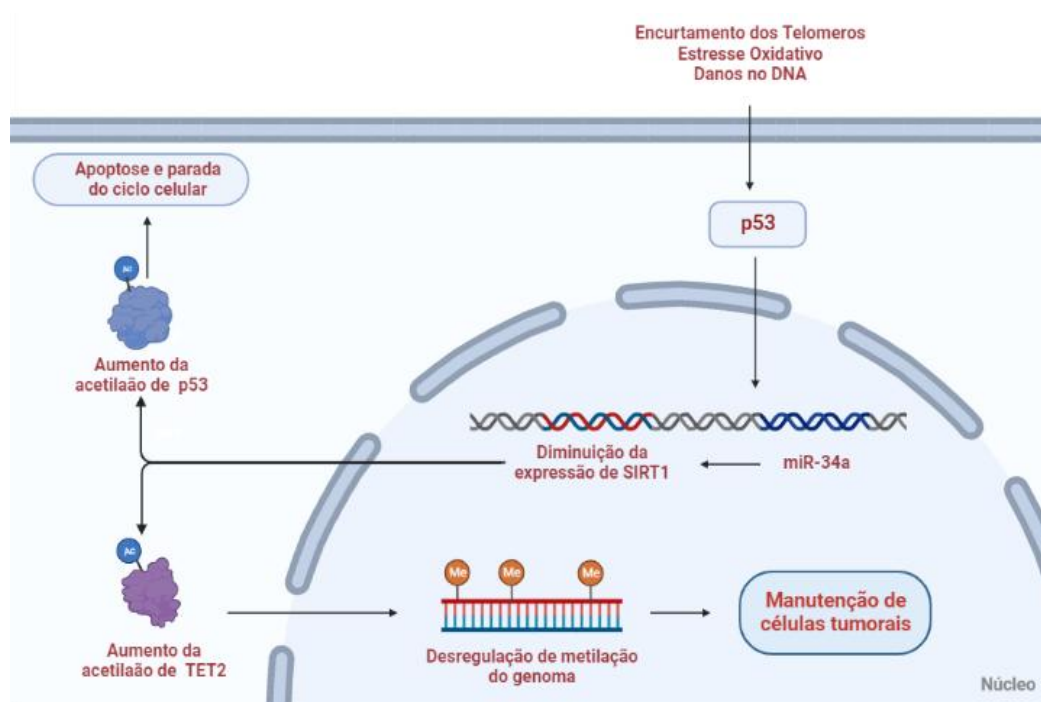
SIRT1 mostrou alta expressão nuclear em amostras de pacientes com linfoma de Hodgkin, e quando analisado junto com FOXP3, também foi evidenciado que a sua inibição pode suprimir as ações das células T reguladoras (QUESADA et al., 2015). Nas células L-428, derivadas da linhagem celular do linfoma de Hodgkin, o uso do Resveratrol levou a uma diminuição do *SIRT1*, causando um aumento da acetilação p53 e do FoxO3a, causando um aumento dos níveis de apoptose (FRAZZI et al., 2013).

SIRT1 é altamente expressa em linhagens de células de Mieloma-Múltiplo (MM) quando comparada com as outras sirtuínas e seus níveis estão associados à resistência ao bortezomib. A ativação anormal do caminho de Hedgehog (HH) demonstrou ser crítica para as células da linhagem MM. Foi demonstrado que *SIRT1* interage com a proteína GLI2, deacetilando a lisina 757 e ativando a via HH, assim, a interação SIRT1-GLI2 demonstrou ser um alvo eficiente no processo de sinalização de

HH, demonstrando um papel crítico na resistência química em MM através da inibição do proteossoma (XIE et al., 2019). Os inibidores SIRT1 se mostraram eficientes no controle da quimiorresistência em pacientes com MM. SRT-1720 provou ser eficiente como inibidor específico para SIRT1, e foi capaz de prevenir o crescimento de células MM gerando citotoxicidade em células da mesma linhagem. Além disso, verificou-se que o inibidor de *SIRT1* foi capaz de ativar a via Caspases 8 e 9, desencadeando a clivagem da Caspase 3, aumentando os níveis de apoptose nestas células (CHAUHAN et al., 2011).

Estudos utilizando as sirtuínas como biomarcadores para Neoplasia Mielodisplásica (SMD) são escassos. Um estudo publicado em 2018 quebrou o paradigma que existia entre as *SIRT*s e a SMD. Ao analisar a expressão de *SIRT1* em 18 amostras de SMD-CTHs (Células tronco hematopoiéticas de SMD), foi observado que, perante o aumento da expressão de dois microRNAs (*miR-9* e *miR-34a*), ocorre o bloqueio do mRNA de *SIRT1*, aumentando os níveis de acetilação da proteína TET2. Este aumento de acetilação diminui o controle de metilação do DNA e, consequentemente, contribui para o crescimento e manutenção de SMD-CTHs (Figura 3) (SUN et al., 2018).

Figura 3 - Feedback de estresse celular e manutenção tumoral induzida por inibição de SIRT1.



Fonte: Resumo gráfico adaptado de Sun et al., 2018 através da ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

Ainda em 2009, já era estudada a relação entre *miR-34a* e *SIRT1* (YAMAKUCHI; LOWENSTEIN, 2009). A partir de eventos como encurtamento dos telômeros, estresse oxidativo e danos ao DNA, um loop de feedback positivo entre a ativação de p53 e aumento de expressão do *miR-34a* ocasionava diminuição de *SIRT1* e consequente aumento de acetilação de p53, levando a aumento da apoptose e parada do ciclo celular (Figura 3) (YAMAKUCHI; LOWENSTEIN, 2009). Ambos os estudos demonstram a relação do aumento de expressão de *miR-34a* e a diminuição de *SIRT1*, sugerindo que a ativação p53 seja um dos fatores para tal decaimento em SMD.

1.1.2 Sirtuina 2 (*SIRT2*)

Da família de sirtuinas, *SIRT2* (19q13.2) é o único gene que codifica para uma proteína com atividade citoplasmática, podendo, em segunda instância, apresentar atividades mitocôndrias ou mesmo nucleares (Y. Wang et al., 2019). Estudos demonstraram o papel de *SIRT2* nos processos de controle mitótico e manutenção da normalidade de processos no controle de reparo e manutenção do maquinário citoplasmático (Hiratsuka et al., 2003). Minten e colaboradores relataram a capacidade da *SIRT2* de gerar heterodimerização de BRCA1 com BARD1 e, por consequência, a manutenção da via de reparo do DNA, permitindo a recombinação homóloga e consequente reparo de lesões de fita dupla no DNA (MINTEN et al., 2021).

Foram identificadas diversas vias mediadas por *SIRT2* na regulação do maquinário celular e em doenças oncohematológicas (GOES et al., 2022). Na Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), a leucemogênese parece ser dependente da ativação de LMO2 desencadeada pela desativação de *SIRT2*/NAMPT, um mecanismo que gera aumento da hematopoiese clonal na doença. Em contraste, a inibição de *SIRT2* e NAMPT suprimiu o crescimento de células LLA tanto in vitro quanto em enxertos (MORISHIMA et al., 2019).

SIRT2 é regulado positivamente na LMA, além disso, seu nível de expressão é maior em recidivas quando comparado a pacientes recém-diagnosticados, portanto, este gene é apresentado como desfavorável no prognóstico da doença (DENG et al., 2016). *SIRT2* está intimamente relacionado ao NAMPT. Esta enzima aumenta a atividade de *SIRT2* através do aumento da síntese de NAD⁺. Dan et al. demonstraram que a inibição de *SIRT2* ou NAMPT aumentou a apoptose de blastos na LMA e reduz a proliferação dessas células (DAN et al., 2012). A expressão de *SIRT2* é reduzida no

Mieloma-Múltiplo quando comparada aos controles saudáveis. Sua baixa expressão está correlacionada com estágios clínicos mais avançados da doença e desequilíbrio redox, sugerindo que este gene é um excelente biomarcador na estratificação prognóstica da doença (ALLEGRA et al., 2021).

Ainda não foram identificadas a relação de *SIRT2* com a Neoplasia Mielodisplásica (SMD) e suas variáveis clínicas.

1.1.3 Sirtuina 3 (*SIRT3*)

Dentre as *SIRT*s com atividade mitocondrial, *SIRT3* (11p15) possui a atividade mais robusta de deacetilase reversível dependente de NAD⁺ sendo atuante principalmente em tecidos metabolicamente ativos, além disso, possui alta ligação com a mitocôndria, atuando no controle de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CHEN; WANG; CHEN, 2017; LOMBARD; ZWAANS, 2014). Dessa forma, *SIRT3* se apresenta como alvo de estudos em diversas doenças, principalmente com foco em metabolismo e controle energético (GOES et al., 2022).

A expressão proteica de *SIRT3* é diminuída em pacientes com LLC-B. Estudos demonstraram que existe uma correlação entre os níveis desta sirtuina com a atividade de Superóxido Dismutase 2 (SOD2) e isocitrato desidrogenase 2 (IDH2). O *SIRT3* diminui a produção de EROs por deacetilação destas enzimas antioxidantes, e pode ser um marcador crucial para o processo de leucemogênese em pacientes com LLC. A baixa expressão de *SIRT3* em células B quando comparado com células B saudáveis aumenta a acetilação IDH2 em K413, diminuindo sua atividade, com consequente aumento de EORs nesta linha celular (YU et al., 2016).

As *SIRT*s são pouco exploradas entre os Linfomas e no MM. Yu e colaboradores demonstraram que *SIRT3* apresenta-se diminuída em amostras de linfomas de manto, estando correlacionada a um pior tempo de sobrevida global. Além disso, a diminuição de *SIRT3* se correlaciona a uma hiperacetilação de IDH2 e SOD2, diminuindo a atividade destas enzimas e consequentemente, aumentando os níveis de EROs. Esse estudo demonstrou que esta *SIRT* atua como excelente biomarcador e sua superexpressão apresenta-se como supressor tumoral em malignidades de células B (YU et al., 2016). Assim como *SIRT2*, *SIRT3* é reduzida nas células MM quando comparada aos controles saudáveis sendo considerado um excelente biomarcador na estratificação da doença (ALLEGRA et al., 2021).

Na LMA, SIRT3 diminui a produção de ROS ao deacetilar SOD2 e IDH2, pode ser um marcador crucial para o processo de leucemogênese (MA et al., 2019). Ainda não foram identificadas a relação de *SIRT3* e seu controle energético e metabolismo com a Neoplasia Mielodisplásica (SMD) e suas variáveis clínicas.

1.1.4 Sirtuina 4 (*SIRT4*)

SIRT4 (12q24.31) é a SIRT menos estudada entre todas as sirtuinas mitocondriais dentro das doenças oncohematológicas. Sendo relacionado a diversas atividades enzimáticas, este gene codifica para uma enzima que se encontra presente na regulação do envelhecimento e do câncer a partir do controle de atividades metabólicas do organismo (TOMASELLI et al., 2020). Jeong e colaboradores (2016) demonstraram que o aumento de SIRT4 é induzido pelos danos ao DNA, estresse oxidativo ou por estresse no Reticulo Endoplasmático (RE), levando ao aumento da sobrevivência de células cancerosas, além disso, o aumento de expressão de SIRT4 protege as células cancerígenas contra danos no DNA ou estresse RE, em contrapartida, a baixa expressão de SIRT4 sensibiliza as células após tratamentos medicamentosos (JEONG; HWANG; SEONG, 2016).

Um estudo demonstrou a diferença de expressão de SIRT4 em alguns tipos de leucemias. A leucemia de células T do adulto (LTA) é uma neoplasia de células T CD4⁺ que está etiológicamente associada à infecção pelo vírus da leucemia de células T humanas. A SIRT4 apresenta uma expressão reduzida em LTA em comparação a LMA e LMC, além disso, sua baixa expressão estava correlacionada com menor tempo de sobrevida para a doença (CHOI et al., 2006). Em comparação com controles saudáveis, a expressão de SIRT4 na LMA é reduzida indicando um papel de supressão tumoral para a doença (BRADBURY et al., 2005).

Não existem estudos que relacionem a atividade de SIRT4 e seu controle metabólico dentro da SMD. O que se sabe atualmente sobre suas atividades dentro das doenças ainda é escasso para o campo de visão hematológico.

1.1.5 Sirtuina 5 (*SIRT5*)

A SIRT5 (6p23) é considerada a mais fraca sirtuina em termos de deacetilação proteica dentre as sirtuinas mitocondriais, entretanto, sua eficácia é comprovada em outras atividades como desuccinilase, demalonilase e deglutarilase (succinil, malonil e fração glutaril, respectivamente). Além disso, SIRT5 possui relação

direta com características fisiopatológicas de diversas doenças como o câncer, doença de Alzheimer, e doença de Parkinson (YANG et al., 2017)

Yan e colegas demonstraram que as células na LMA são dependentes de SIRT5 (YAN et al., 2021). A apoptose de células LMA por decorrência da inibição de SIRT5 ocorre devido a reduções na fosforilação oxidativa, na utilização de glutamina e no aumento no superóxido mitocondrial, características essas que se mostraram necessárias para a manutenção de células leucêmicas (YAN et al., 2021). Ainda não existem estudos que comprovem a relação de SIRT5 com doenças como a Neoplasia Mielodisplásica.

1.1.6 Sirtuina 6 (SIRT6)

O gene que codifica para a enzima SIRT6 (19p13.3) possui sua atividade elucidada na homeostase do colesterol, glicólise, gliconeogênese, reparação do DNA e proteção dos telômeros e estabilização do genoma (BEDOLLA et al., 2020). Estudos em animais comprovam sua eficácia no processo de longevidade e envelhecimento, entretanto, sua interferência nestes processos não está bem definida no homem (TASSELLI et al., 2016).

SIRT6 foi identificado como um alvo para tratamentos de LMA. A diminuição da expressão aumenta a sensibilidade aos agentes nocivos ao DNA, como a daunorubicina (DNR) e a citarabina *in vitro* e *in vivo* (CAGNETTA et al., 2018). Em linfomas, SIRT6 demonstrou ser altamente expresso em tumores de Linfomas difusos de Grande Células B e sua alta expressão estava diretamente ligada à resistência à quimioterapia, além disso, seu bloqueio está ligado à sensibilidade à quimioterapia e ao aumento da apoptose destas células (YANG et al., 2020).

SIRT6 é regulada positivamente nas células da linhagem MM, mas seus níveis são praticamente indetectáveis no sangue periférico. Em modelos murinos, o nocaute de SIRT6 leva ao aumento dos danos ao DNA e à instabilidade genômica. Nas linhas celulares MM, o SIRT6 é capaz de se opor ao crescimento celular nesta linha celular, opondo-se ao caminho da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK). Diante de danos de dupla cadeia, o SIRT6 bloqueia MAPK, resultando no aumento da fosforilação do Chk1 no Ser317, mantendo o genoma e corrigindo os danos do DNA (CEA et al., 2016).

Ainda não existem estudos que comprovem a relação de SIRT6 e o seu impacto na Neoplasia Mielodisplásica.

1.1.7 Sirtuina 7 (*SIRT7*)

SIRT7 é identificada como responsável pela homeostase celular, atuante na biologia do envelhecimento, regulação de transcrição de rRNA, ciclo celular, além de atuar na regulação de proteínas no citoplasma (BEDOLLA et al., 2020). Mais de 65% de toda a transcrição do DNA em mamíferos, está relacionado a síntese de rRNA, sendo intimamente ligada a atividade de fatores de crescimento e proliferação celular (FORD et al., 2006).

Esta Sirtuina se encontra presente principalmente dentro do núcleo, em tecidos com alta atividade metabólica, vinculado a atividade da polimerase 1, estando ligada a formação de rRNA e consequentemente a formação do ribossomo. Encontrado na posição 17q25.3 é comumente afetado por alterações cromossômicas em leucemias e linfomas agudos (FORD et al., 2006).

Estudos indicam que a alta expressão de *SIRT7* induz o crescimento de tumores e que a inibição de sua expressão diminui o crescimento celular, indução de apoptose e consequentemente induz a diminuição tumoral. Sua atividade na diminuição da atividade tumoral é discutida sobre seu efeito de deacetilase H3K18, relacionada a atenuação de transcrição de genes ligados a supressão tumoral (BLANK; GRUMMT, 2017).

Em pacientes com LMA, seu nível de expressão é reduzido quando comparado a pessoas saudáveis. Estudos indicam que o *SIRT7* é um excelente biomarcador de resposta ao tratamento de células-tronco com inibidores farmacológicos de mutações iniciadoras (KAISER et al., 2020). Sua baixa expressão está ligada a distúrbios relacionados à idade especialmente em pacientes com mutação do condutor no FLT3, neste caso, os tratamentos em células com mutações FLT3-ITD mostraram melhora na expressão do *SIRT7* em modelos murinos (KAISER et al., 2020).

Ainda não existem estudos que comprovem a relação de *SIRT7* com a Neoplasia Mielodisplásica.

1.2 Aspectos gerais da Neoplasia Mielodisplásica

A Neoplasia Mielodisplásica (SMD) integra um grupo heterogêneo de distúrbios hematológicos caracterizados pelo comprometimento da função da medula óssea (MO), hematopoese clonal (HC) e ineficaz cujo a principal consequência é o surgimento de citopenias periféricas, displasia celular e anormalidades funcionais das células sanguíneas (CAZZOLA, 2020; VALENT, 2019). Sua manifestação clínica cursa

com o aparecimento de citopenias periféricas e em decorrência dessas citopenias podem surgir sintomas como cansaço, infecções recorrentes e sangramento excessivo, além disso, cerca de 30% dos pacientes diagnosticados com SMD podem evoluir para a LMA em algum momento de progressão da doença (ARBER et al., 2016; MENSSEN; WALTER, 2020).

O principal fator de risco para a doença é a idade. Belli e demais colaboradores, demonstraram que a idade média de pacientes diagnosticados com a doença em países da América Latina, está em torno de 69 anos, onde 75% dos pacientes possuem mais de 60 anos no momento do diagnóstico e a incidência praticamente dobra a cada 10 anos em pacientes acima dos 40 anos (BELLI et al., 2015).

A maioria dos pacientes com SMD necessitam de suporte transfusional. A anemia é a citopenia que aparece com maior frequência, cerca de 90% dos pacientes sofrem com essa citopenia e pelo menos 50 a 60% dos pacientes apresentam anemia grave, dessa forma, todos os pacientes com SMD provavelmente receberão transfusões de hemácias em algum momento da vida e em cerca de 40% dos casos, esta é a única opção terapêutica que pode ser oferecida (MALCOVATI et al., 2007). Desse modo, a anemia e a necessidade transfusional 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).

1.2.1 Etiologia

A SMD pode ser definida como sendo primária ou secundária. A SMD primária não possui uma origem definida ocorrendo sem um histórico conhecida de terapia citotóxica ou radioterapia. A SMD secundária apresenta-se após uma condição de exposição a terapias (SMD-t, ou SMD relaciona à terapia) com agentes quimioterápicos ou radioterápicos. Cerca de 85% a 90% dos casos de SMD são idiopáticos e possuem sua origem de lesões nas células-tronco hematopoiéticas. A SMD secundária representa 10% a 15% dos casos, embora seja mais grave, incluindo cariótipo complexo, anormalidades nos cromossomos 5, 7 e 8 e mutação no *TP53* (STEENSMA et al., 2015; VISCONTE; TIU; ROGERS, 2014).

Diversos fatores exógenos capazes de lesar o DNA podem induzir a SMD, dentre esses destacam-se: alquilantes de DNA (ciclofosfamida e melfalano), inibidores da topoisomerase II (etoposídeo), radiação ionizante e hidrocarbonetos voláteis,

principalmente o benzeno (STEENSMA et al., 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 rurais 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, instabilidade no genoma é um fator crucial para o desenvolvimento do câncer e da SMD (COSTA et al., 2021).

1.2.2 Epidemiologia

A SMD caracteriza-se como uma doença predominantemente de idosos. No ano de 2020 os Dados de Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) demonstraram que a taxa de incidência da doença aumenta com a idade, principalmente em uma população acima dos 70 anos (VOLPE; GARCIA-MANERO; KOMROKJI, 2022). Pelo menos 75% dos pacientes com SMD têm mais de 60 anos no momento do diagnóstico, e a taxa de incidência dobra a cada década após os 40 anos de idade (GREENBERG et al., 2012).

Atualmente, a idade média dos pacientes diagnosticados com SMD é de 70 anos, e sua incidência é de 4 a 5 casos por 100.000 pessoas ao ano. Entretanto, a incidência tende a ser maior devido à avaliação incompleta de casos e subnotificação de SMD, podendo chegar próximo a 75 por 100.000 entre pessoas com idade acima de 70 anos (GARCIA-MANERO; CHIEN; MONTALBAN-BRAVO, 2020).

Estima-se que a incidência anual da doença seja de 10.000 a 12.000 novos casos de SMD nos Estados Unidos, segundo o SEER 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 et al., 2015).

Dados mais recentes do programa SEER demonstraram 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 comparativo entre 3 países da América do Sul demonstrou que a

idade média dos pacientes no momento do diagnóstico é de 69 anos e a incidência da doença em solo brasileiro dobra nos pacientes acima dos 40 anos (BELLI et al., 2015).

1.2.3 Patogênese da Neoplasia Mielodisplásica

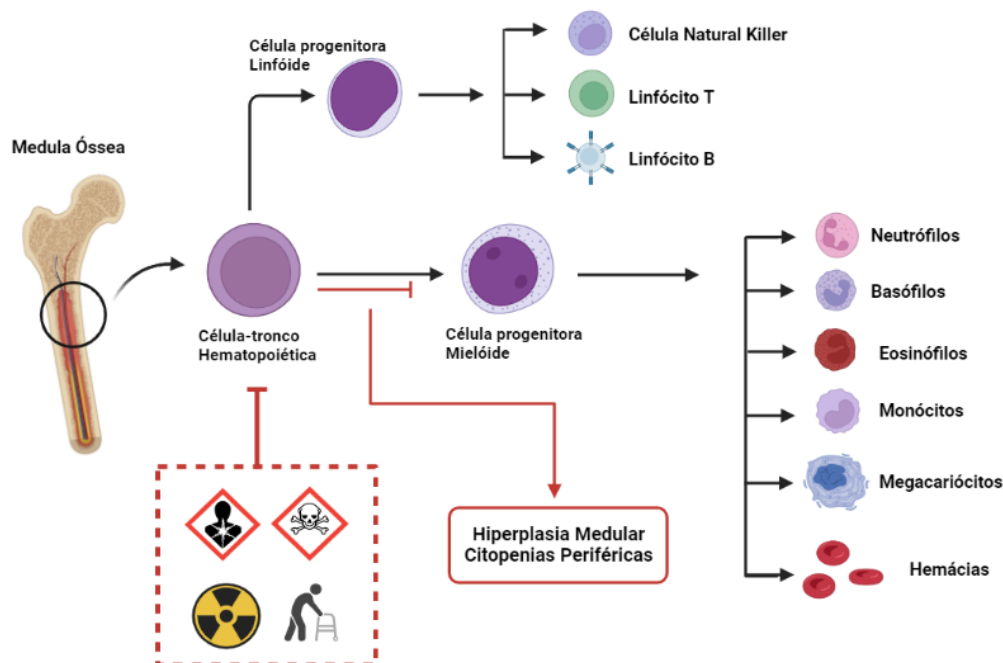
O envelhecimento é o principal fator de risco para o desenvolvimento da SMD, devido a erros na replicação do DNA e mutações espontâneas desencadeando a hematopoiese clonal. Cerca de 80% dos pacientes diagnosticados com SMD apresentam pelo menos uma mutação somática enquanto 50% dos pacientes podem apresentar alterações cromossômicas no exame de cariótipo (PAPAEMMANUIL et al., 2013).

A SMD possui sua origem em alterações moleculares capazes de introduzir a célula-tronco hematopoiética em um estado de carcinogênese. Entre as alterações moleculares presentes na SMD destacam-se as mutações, essas alterações levam a formação de uma hematopoiese clonal em células deficientes que acabam por adquirir uma vantagem proliferativa perante as células normais na medula óssea. Durante o processo de proliferação clonal, as células danificadas perdem sua capacidade de maturação enquanto outras sofrem apoptose durante esse processo de diferenciação levando ao processo de hematopoiese ineficaz, a principal consequência da SMD (Figura 4) (CAZZOLA, 2020).

Dentre as alterações mutacionais encontradas na SMD destacam-se as: alterações em genes de splicing, metilação do DNA, modificação da cromatina, transcrição, receptores Kinases, coesinas, reparo do DNA, entre outros (HAFERLACH et al., 2013). Em um estudo publicado em 2013, Ribeiro e colaboradores demonstraram que polimorfismos presentes no gene *ATM* (responsável pela via de mecanismos de reparo de fita dupla), estavam associados a patogênese da SMD e ao desenvolvimento de SMD de baixo risco (RIBEIRO et al., 2013). Uma nova análise em população brasileira demonstrou que outros polimorfismos nos genes *RAD51*, *XRCC5* e *XRCC6*, responsáveis pelas vias de recombinação homóloga e não-homóloga (HR e NHEJ, respectivamente), estavam relacionados a patogênese da SMD, ressaltando a relevância de estudos de vias de reparo na doença (RIBEIRO et al., 2015).

Novos estudos demonstraram características únicas da SMD na população brasileira. Borges e colaboradores (2022) demonstraram que a presença de polimorfismos em genes Xeroderma pigmentoso (*XPA*, *XPC*, *XPF* e *XPB*) podem estar relacionados a fatores de baixo risco e alto risco, além de características como anemia grave e dependência transfusional nesta população (BORGES et al., 2021).

Figura 4 - Representação esquemática do processo de patogênese da SMD.



Fonte: Resumo gráfico adaptado de Cazzola (2020) através da ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

1.2.4 Diagnóstico e classificação clínica da Neoplasia Mielodisplásica

O principal achado laboratorial sugestivo para a SMD é a presença de citopenias no sangue periférico, avaliadas por meio do hemograma em exames de rotina ou diante de um sintoma clínico, gerando uma suspeita de alterações na produção sanguínea. Após o acompanhamento clínico por um profissional que descarta as demais possibilidades para estes achados clínicos (anemias carenciais, uso excessivo de álcool, uso de drogas, doenças renais ou hepáticas), é indicada uma avaliação da morfologia das células da MO através do mielograma (aspirado medular) e da celularidade por meio da biópsia óssea (MAGALHÃES; LORAND-METZE, 2004). A contagem de blastos na MO é indispensável para a avaliação de risco e classificação da doença (MontaBBar-Bravo & Garcia-Manero, 2018).

O termo “mielodisplasia” foi usado em 1982 pelo grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) para descrever as anormalidades morfológicas mielóides e hematopoiese em condições “pré-leucêmicas” (CAZZOLA, 2020). O primeiro critério de classificação subdividiu a doença 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 Síndrome Mielodisplásica, pela Classificação de SMD do Grupo FAB (BENNETT et al., 1982).

Atualmente, a SMD é classificada de acordo com os critérios da OMS de 2022 cujo critérios de classificação se baseiam em dois fatores: aspectos morfológicos e moleculares. O termo “Síndrome” foi corrigido sendo substituído atualmente por “Neoplasia”, dessa forma, a doença passa a ser reconhecida como uma neoplasia hematológica e não apenas uma doença pré-leucêmica (KHOURY et al., 2022).

Atualmente a SMD é classificada como SMD com mutação bialélica do p53, SMD com del (5q) isolado (SMD-Del5(q)), SMD com baixo percentual de blastos e sideroblastos em anel (associada a mutações no gene *SF3B1*) (SMD-SA-BB), SMD com baixo percentual de blastos (SMD-BB), SMD com excesso de blastos I (SMD-EB1) e II (SMD-EB2), SMD com Fibrose (SMD-f) e SMD hipocelular (SMD-h) (Tabela 2) (Khoury et al., 2022).

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

Blastos		Citogenética	Mutações
SMD com anormalidades genéticas definidoras.			
(SMD-5q)		Deleção isolada ou com 1 outra anormalidade além da monossomia 7 ou deleção 7q	
(SMD-SF3B1 ^a)	<5% MO e <2% SP	Ausência de deleção 5q, monossomia 7 ou cariótipo complexo	<i>SF3B1</i>
(SMD-bi TP53)	<20% MO e SP	Geralmente complexo	Duas ou mais mutações <i>TP53</i> ou 1 mutação com evidência de perda do número de cópias <i>TP53</i> ou cnLOH
SMD, morfollogicamente definido.			
(SMD-BB)	<5% MO e <2% SP		
(SMD-h ^b)			
SMD-EB1	5–9% MO ou 2–4% SP		
SMD-EB2	10–19% MO ou 5–19% SP ou Bastonetes de Auer		
(SMD-f)	5–19% MO; 2–19% SP		

Legenda: SMD-5q (SMD com deleção do braço longo do cromossomo 5); SMD-SF3B1 (SMD com baixo percentual de blastos e mutação SF3B1); SMD-bi TP53 (SMD com inativação bialélica do TP53); SMD-BB (SMD com baixo percentual de blastos); SMD-h (SMD Hipoplásica); SMD-EB1 (SMD com Excesso de blastos tipo 1); SMD-EB2 (SMD com excesso de blastos tipo 2); SMD-f (SMD com fibrose).

^a A detecção de $\geq 15\%$ de sideroblastos em anel pode substituir a mutação *SF3B1*. Terminologia relacionada aceitável: MDS com blastos baixos e sideroblastos em anel.

^b Por definição, $\leq 25\%$ de celularidade da medula óssea, ajustada por idade.

1.2.5 Classificação prognóstica da Neoplasia Mielodisplásica

Criado em 1997 por um grupo colaborativo coordenado por Peter Greenberg, o *International Prognostic Scoring System* (da sigla em inglês, IPSS) (GREENBERG et al., 1997) e sua revisão (IPSS-R) são importantes padrões para avaliar o prognóstico de pacientes adultos diagnosticados com SMD (GREENBERG et al., 2012). O IPSS-R é uma ferramenta de classificação prognóstica para pacientes, possibilitando a realização de estratificação, avaliação do risco de evolução para LMA e avaliação de sobrevida. 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)	$\leq 2\%$	-	$> 2 - > 5\%$	-	5-10%	$> 10\%$	-
HB	≥ 10	-	8 - < 10	< 8	-	-	-
Plaquetas	≥ 100	50 – < 100	< 50	-	-	-	-
ANC	≥ 800	< 800	-	-	-	-	-

Fonte: adaptado de Greenberg e colaboradores (2012).

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 (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. 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). Novos estudos refinaram o que se entende atualmente em contexto de classificação de risco e os critérios de classificação dos subtipos da doença e dessa forma, novas metodologias de classificação de risco começam a surgir, principalmente em contexto molecular (BERNARD et al., 2022).

1.2.6 Alterações moleculares e citogenéticas na SMD

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 (GREENBERG et al., 1997, 2012). O exame de citogenética realizado a partir 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% 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 na SMD (NEUKIRCHEN et al., 2017). Dentre as alterações citogenéticas, destaca-se a del (5q), monossomia 7 ou del (7q), trissomia 8 e del (20q) como as alterações mais frequentes (WALL, 2017). A análise citogenética é importante para determinar a clonalidade em pacientes com suspeita de SMD além de auxiliar no desfecho clínico e nas decisões quimioterápicas da doença (STEENSMA et al., 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 (RAZA; GALILI, 2012). Genes que codificam fatores de splicing de RNA (*SF3B1* e *SFRS2*), metilação de DNA (*TET2*, *DNMT3A* e *IDH2*), fatores de transcrição (*RUNX1* e *CUX1*), manutenção da cromatina (*ASXL1*, *STAG2*, *EZH2* e *BCOR*) e reparo de DNA (*TP53*) (PAPAEMMANUIL et al., 2013).

1.2.7 Alterações do perfil de expressão de HDACs em pacientes com SMD

A hematopoiese ineficaz proveniente do processo de envelhecimento orgânico é uma das responsáveis pelas características particulares das neoplasias mielodisplásicas, sendo comumente associada ao processo de envelhecimento de células tronco hematopoiéticas (CHUNG; PARK, 2017). As características fisiopatológicas decorrentes das alterações epigenéticas ocasionadas pelas alterações no maquinário de histonas deacetilases ainda é desconhecido na SMD, contudo, sabe-se que alterações na expressão de genes supressores de tumor estão associados a modulações epigenéticas na SMD (PELLAGATTI; BOULTWOOD, 2015).

As mais variadas atividades descritas para a família de genes *SIRT*s são relacionadas as atividades de regulação da senescência celular e envelhecimento: silenciamento genômico, recombinação, destino celular e metabolismo (O'CALLAGHAN; VASSILOPOULOS, 2017; WĄTROBA et al., 2017). Diversos são os alvos moleculares das sirtuínas em um contexto de regulação de senescência celular e longevidade conservada. Dentre estes alvos, destacam-se a proteína quinase ativada (AMPK), TET2 e p53 (HUANG et al., 2019; SUN et al., 2018; YAMAKUCHI; LOWENSTEIN, 2009).

Em pacientes *knockout* para *SIRT1*, a enzima TET2 fica impossibilitada de demetilar o DNA, ocasionando diminuição da expressão de genes supressores de tumor e consequente aumento da manutenção de clones neoplásicos em células tronco hematopoiéticas (SUN et al., 2018). Também é reconhecida uma ligação entre a *SIRT1* e p53, esta SIRT inibe a atividade de parada do ciclo celular e indução de apoptose de p53, contudo, aumenta a capacidade de reparo do DNA desta proteína (YAMAKUCHI; LOWENSTEIN, 2009).

Compreendendo os mecanismos epigenéticos e as funções que as sirtuinas exercem sobre as histonas e sua manutenção, além de sua atividade perante o processo de senescência celular e a sua capacidade de suprimir tal processo, faz-se necessário analisar os efeitos de expressão destes genes e seu impacto no prognóstico e/ou no controle evolutivo clonal da Neoplasia Mielodisplásica, uma vez que nesta doença, dentre as características principais, destaca-se a taxa de senescência das células progenitoras hematopoiéticas e o envelhecimento como principais fatores de risco (MATTIUCCI et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel dos genes da família sirtuina (*SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7*) na patogênese e na evolução prognóstica da Neoplasia Mielodisplásica.

2.2 Objetivos específicos

1. Analisar, por predição *in silico*, o perfil de expressão de *SIRT1-7* em amostras de células mononucleadas da medula óssea a partir de banco de dados de expressão gênica por microarray (GEO omnibus);
2. Validar os resultados de predição *in silico* a partir de uma coorte de pacientes brasileiros com SMD.
3. Caracterizar os aspectos clínico-laboratoriais dos pacientes com Neoplasia Mielodisplásica;
4. Caracterizar o perfil de expressão dos genes das sirtuinas (*SIRT1-7*) em pacientes com Neoplasia Mielodisplásica e em indivíduos saudáveis (grupo controle) por análises de RT-qPCR;
5. Correlacionar os achados moleculares com as demais variáveis clínico laboratoriais dos pacientes com Neoplasia Mielodisplásica;
6. Detectar possíveis novos biomarcadores de patogênese ou de estratificação prognóstica que melhor caracterize a patobiologia da Neoplasia Mielodisplásica.

3 MATERIAS E MÉTODOS

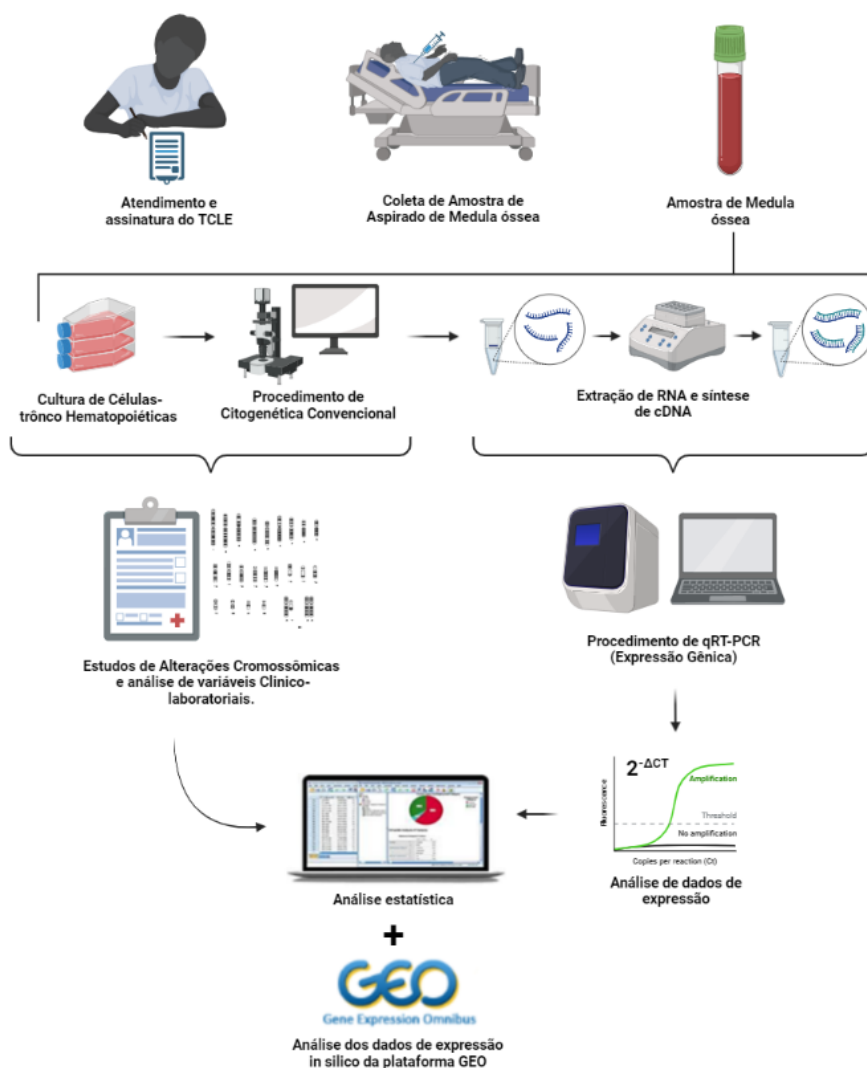
3.1 Validação da expressão de *sirt1-sirt7* em uma coorte de pacientes brasileiros com SMD

Para predizer o perfil de expressão dos genes *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7* na SMD, utilizamos dados de expressão gênica baseados em análises de bases de dados de microarray da base de dados Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) previamente e recentemente publicadas por Ribeiro-Junior e colaboradores (RIBEIRO JUNIOR et al., 2023). Os autores efetuaram uma reanálise de microarray a partir de células primárias mononucleares da medula óssea (700 doentes com SMD e 47 indivíduos saudáveis), total de 747 indivíduos nesta avaliação (RIBEIRO JUNIOR et al., 2023). Em seguida, utilizamos análises da plataforma R para comparar a expressão dos genes *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7* entre os grupos de controle e SMD utilizando o teste t de Student. Criamos boxplots utilizando os pacotes "ggplot2" e "ggpubr". Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.2 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: 41822320.9.0000.5054) através do sistema da Plataforma Brasil, utilizando-se de Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentados na sessão anexos. A equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. A representação esquemática das metodologias utilizadas neste estudo encontra-se apresentadas na figura 5 e serão apresentadas nas sessões a seguir.

Figura 5 - Desenho experimental do estudo.



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

3.3 Coleta e obtenção das amostras

Foram coletadas amostras de medula óssea (5mL) em tubos contendo Heparina sódica, de um total de 110 pacientes diagnosticados com SMD e 10 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 (Figura 5). Voluntários saudáveis trata-se de 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 citopenias periféricas.

Foram analisados dados de expressão de mRNA de 7 genes (*SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7*) em 110 amostras de *pool* celular de medula óssea de pacientes diagnosticados com SMD de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde de 2022 (KHOURY et al., 2022), atendidos em um hospital terciário de referência na cidade de Fortaleza - Ceará no período de 2020 a 2022. As amostras de medula óssea dos doadores saudáveis e do grupo doente 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.

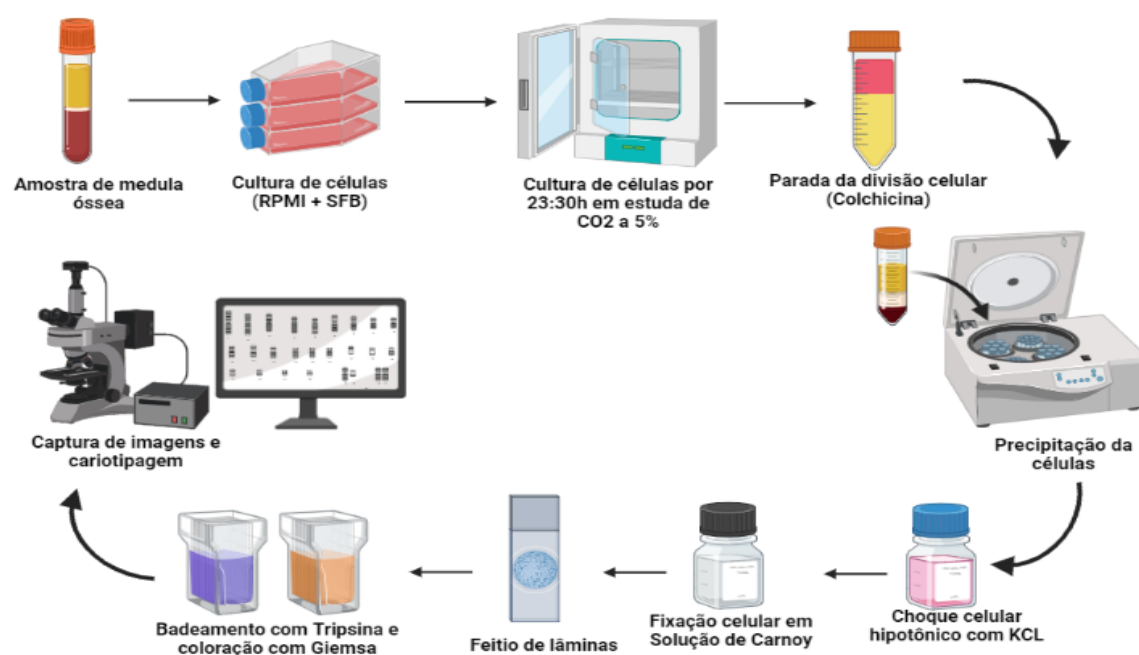
Para a separação das células do *pool* celular da medula óssea, realizou-se primeiramente a lise eritrocitária, como descrito a seguir: a amostra de medula óssea foi transferida para um tubo do tipo Falcon de 50mL, e lavada com a solução de lise (25mL de solução de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato 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.

3.4 Cariótipo por bandeamento-G

A Citogenética foi realizada de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceará, segundo a técnica descrita por Chauffaille e adaptada por Pinheiro (PINHEIRO; CHAUFFAILLE, 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) (WANG, 2021).

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



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

3.5 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

3.5.1 Extração de RNA Total

A extração de RNA das células do pool medular dos pacientes com SMD e dos controles foi realizada a partir da utilização do Trizol LS Reagente® de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para cada 10^6 células armazenadas em 1mL de Trizol Reagente® foram adicionados 200µL de Clorofórmio para desproteinização 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 14.000 rpm 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 (Valor de Referência: 1.8 – 2.0).

3.5.2 *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/uL. 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/uL de RNA total para cada amostra nos microtubos devidamente identificados e preenchido o volume final de 20µL com água ultrapura 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.

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

A quantificação da expressão gênica dos quatro genes avaliados neste estudo (Tabela 3) 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.

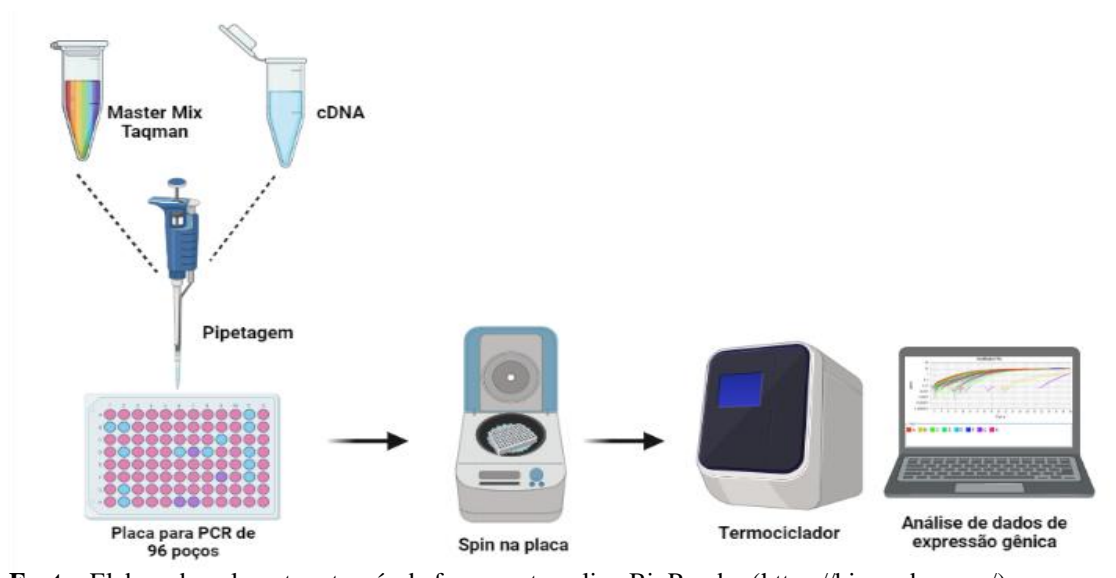
Tipo	Símbolo	Nomenclatura	Cromossomo	Ensaio taqman
Endógeno	<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	12p13.31	Hs03929097_g1
Endógeno	<i>ACTB</i>	<i>Actin beta</i>	7p22.1	Hs99999903_m1
Endógeno	<i>HPRT1</i>	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>	Xq26.2-q26.3	Hs02800695_m1
Endógeno	<i>UBC</i>	<i>Ubiquitin C</i>	12q24.3	Hs01871556_s1
Alvo	<i>SIRT1</i>	<i>Sirtuin 1</i>	10q21.3	Hs01009006
Alvo	<i>SIRT2</i>	<i>Sirtuin 2</i>	19q13.2	Hs00247263
Alvo	<i>SIRT3</i>	<i>Sirtuin 3</i>	11p15.5	Hs00953477
Alvo	<i>SIRT4</i>	<i>Sirtuin 4</i>	12q24.31	Hs00202033
Alvo	<i>SIRT5</i>	<i>Sirtuin 5</i>	6p23	Hs00978331
Alvo	<i>SIRT6</i>	<i>Sirtuin 6</i>	19p13.3	Hs00213036
Alvo	<i>SIRT7</i>	<i>Sirtuin 7</i>	17q25.3	Hs00213029

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 ultrapura 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 6). Cada amostra foi avaliada em duplicata e foram consideradas para análise somente as amostras cujas diferenças de amplificação não excederam a 1 ciclo (VANDESOMPELE et al., 2002). As duplicatas das amostras que apresentaram diferenças maiores que um ciclo, 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 2,5µL 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: Elaborado pelo autor através da ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

Para validar a estabilidade dos níveis de expressão gênica foram utilizados quatro genes de referência: Beta Actina (*ACTB*), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e Hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (*HPRT1*). Para a escolha dos 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). O *RefFinder* atribui um peso apropriado a um gene individual e calcula a média geométrica de seus pesos para a classificação final (XIE et al., 2012). Entende-se como gene endógeno 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.

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 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).

3.6 Variáveis analisadas

As variáveis analisadas neste estudo foram subdivididas da seguinte forma:

- Grupo: Caso e controle
- Sexo: masculino e feminino;
- Idade: ≤ 60 anos e > 60 anos;
- Celularidade da medula óssea: Hipocelular, Normocelular e Hiper celular;
- Fibrose na medula óssea: Presença e Ausência;
- Diseritropoiese: Presença e Ausência;
- Disgranulopoiese: Presença e Ausência;
- Dismegacariopoiese: Presença e Ausência;
- Sideroblastos em anel: Presença e ausência;
- Porcentagens de Blastos (IPSS-R): $\leq 2\%$, $> 2\% - < 5\%$, $5\% - 10\%$, $> 10\%$;
- Classificação dos valores de hemoglobina (Hb) (IPSS-R): $\geq 10\text{g/dL}$, $8 - < 10\text{g/dL}$ e $< 8\text{g/dL}$;
- Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) (IPSS-R): ≥ 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 ;
- Cariótipo (Quanto à presença de alteração): normal e alterado;
- Cariótipo (Quanto a presença de Cariótipo Complexo): Presença e ausência.
- Cariótipo (Quanto ao prognóstico - IPSS-R): muito favorável, favorável, intermediário, desfavorável e muito desfavorável;
- Quanto à classificação da OMS (2022): SMD-Del5(q) (SMD com Deleção do braço longo do cromossomo 5 isolada), SMD-BB (SMD com baixo percentual de blastos), SMD-BB-SA (SMD com baixo percentual de blastos e Sideroblastos

em anel), SMD-EB (SMD com alto percentual de blastos), SMD-h (SMD Hipoplásica), SMD-f (SMD com Fibrose).

- Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- Dependência Transfusional: sim e não.
- Óbito: sim e não;
- Evolução para LMA: sim e não.

3.7 Análises estatísticas

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 de referência utilizados, gerando assim os valores de ΔCq e, conseqüentemente, de $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK et al, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

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

O pós-teste (*post-hoc*) para o ANOVA foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Caso houvesse homogeneidade de variâncias ($p\text{-valor} \geq 0,05$), o pós-teste utilizado foi o teste de Tukey. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados ($p\text{-valor} < 0,05$) foi definido como pós-teste o teste de Games-Howell.

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

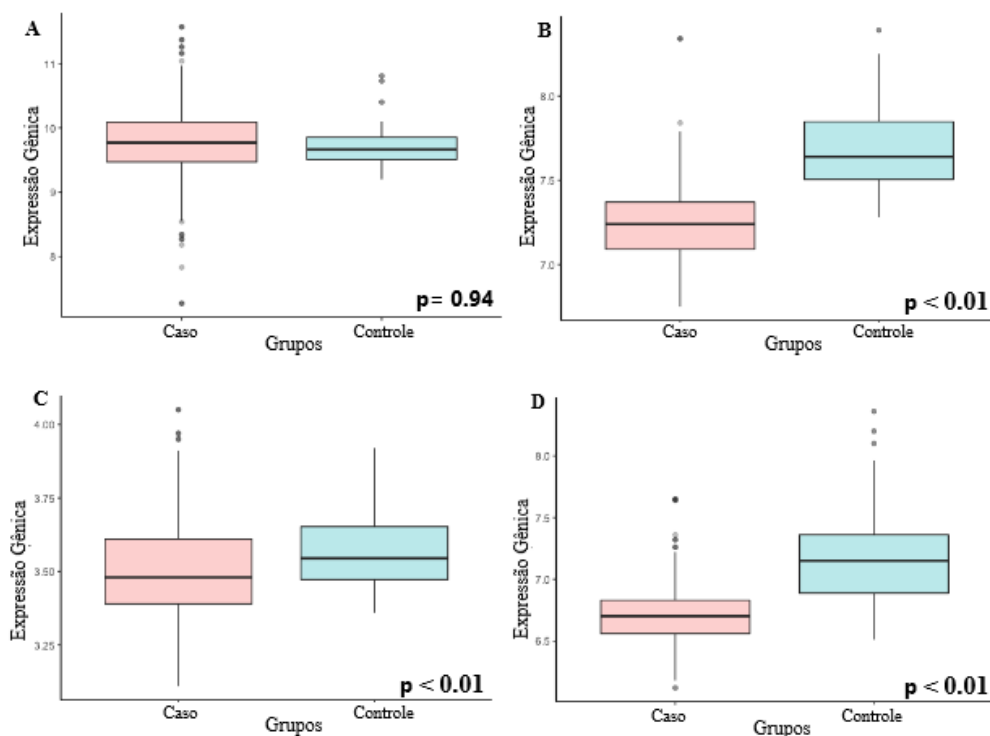
(<https://biorender.com/>) foi utilizada para a elaboração de algumas figuras deste trabalho.

4 RESULTADOS

4.1 Análise *in silico* do nível de expressão gênica da família de sirtuínas (*SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* E *SIRT7*)

Ao avaliar os níveis de expressão gênica em amostras de células mononucleadas de pacientes com SMD (Figura 8), verificamos que houve diminuição dos níveis de expressão de *SIRT2* ($p < 0,01$), *SIRT4* ($p < 0,01$) e *SIRT7* ($p < 0,01$) nos indivíduos portadores de SMD quando comparados com controles saudáveis (Figura 8). Não identificamos significância estatística de *SIRT1* entre os grupos analisados ($p = 0,94$). Não identificamos a expressão de *SIRT3*, *SIRT5* e *SIRT6* nos datasets avaliados.

Figura 8 - Expressão de *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT4* e *SIRT7* em células mononucleadas de medula óssea de pacientes com SMD com base na análise de microarray.



Gene	p-Valor	Média	
		Caso	Controle
<i>SIRT1</i>	0,9415	9,76239	9,757
<i>SIRT2</i>	< 0,01	7,233534	7,727
<i>SIRT4</i>	< 0,01	3,502581	3,579
<i>SIRT7</i>	< 0,01	6,708006	7,236

Legenda: A. Análise de caso versus controle em relação a expressão do gene *SIRT1*. B. Análise de caso versus controle em relação a expressão do gene *SIRT2*. C. Análise de caso versus controle em relação a expressão do gene *SIRT4*. D. Análise de caso versus controle em relação a expressão do gene *SIRT7*.

4.2 Caracterização dos pacientes da coorte brasileira em estudo de caso e controle

Foram incluídos no estudo 104 pacientes com diagnóstico de SMD entre os anos 2020 e 2022. Todavia, foram excluídos do estudo 12 pacientes cujo dados de diagnóstico se encontram incompletos junto ao banco de dados, 1 paciente por possuir uma idade de 15 anos e 11 pacientes cujo as amostras não expressaram algum dos genes de interesse por questões técnicas. Sendo assim, o número amostral final do estudo foi de 80 pacientes para o grupo SMD e 10 controles. Vale ressaltar que os pacientes desta coorte são classificados somente como SMD primária, não possuindo pacientes com SMD secundária. Os dados gerais dos pacientes avaliados se encontram descritos no apêndice A.

O grupo controle foi composto de 10 indivíduos adultos/idosos não portadores de SMD ou outra doença onco-hematológica. Ressaltamos que 8 (80%) são do sexo feminino e 2 (20%) do sexo masculino, com uma média de 69 anos de idade (Tabela 7).

Tabela 7 - Caracterização descritiva das variáveis sociodemográficas dos controles saudáveis.

Características	N	Frequência (%)
Gênero Biológico	Feminino	8
	Masculino	2
Idade	69,8 ± 13,59 (52-86) *	

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

*As características são apresentadas em média, desvio padrão (DP) e valor mínimo e máximo.

Do mesmo modo que os pacientes com SMD, os indivíduos do grupo controle foram submetidos a análise citogenética da medula óssea para melhor compreensão do grupo de estudo. Sendo assim, observamos que todos os 10 controles saudáveis possuíam cariótipo normal, como demonstrados na tabela 8.

Tabela 8 - Características citogenéticas dos controles saudáveis incluídos no estudo.

Paciente	Sexo	Cariótipo
1	F	46,XX[20]
2	F	46,XX[20]
3	F	46,XX[20]
4	F	46,XX[20]

5	F	46,XX[20]
6	F	46,XX[20]
7	M	46,XY[20]
8	M	46,XY[20]
9	F	46,XX[20]
10	F	46,XX[20]

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

Para este estudo, foram incluídos 41 (51,2%) indivíduos do sexo feminino e 39 (48,8%) do sexo masculino. A variável idade foi estratificada de acordo com a idade categorizada dos pacientes (≤ 60 anos, > 60 anos). Para o grupo SMD, a média de idade foi de 68,9 anos (desvio padrão = 16,0, mínimo de 25 anos e máximo de 93 anos) (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise descritiva das variáveis sociodemográficas dos pacientes com SMD.

Características		N	Frequência (%)
Grupo	Caso	80	88,9
	Controle	10	11,1
Dados sociodemográficos de pacientes com SMD			
Gênero Biológico	Feminino	41	51,2
	Masculino	39	48,8
Idade	68,9 \pm 16,0 (25-93) *		
Idade (categorizada)	≤ 60	23	28,7
	> 60	57	71,3

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 (2022), os pacientes foram categorizados da seguinte forma: 2 (2,5%) pacientes como SMD-Del(5q), 22 (27,5%) com SMD com baixo percentual de blastos e sideroblastos em anel, 22 (27,5%) pacientes com SMD com baixo percentual de blastos, para esta análise, reunimos todos os pacientes com excesso de blastos do tipo 1 e do tipo 2 em um único grupo totalizando 26 (31,3%) com SMD com alto percentual de blastos e 1 (1,3%) com SMD com fibrose (Tabela 10).

Tabela 10 - Estratificação clínica dos pacientes com SMD segundo a classificação da OMS (2022).

Subtipo	N	Frequência (%)
SMD com Del(5q) isolado	2	2,5
SMD com baixo percentual de blastos e SA	22	27,5
SMD com baixo percentual de blastos	22	27,5
SMD com excesso de blastos	25	31,3
SMD com Fibrose	1	1,2
SMD Hipoplásica	8	10,0

Legenda: SA (Sideroblastos em anel).

Quanto à variável celularidade da medula óssea, avaliada através da biópsia de medula óssea, 51 pacientes realizaram o exame de biópsia e observamos que 9 (11,3%) pacientes apresentaram medula óssea hipocelular, seguidos de 7 (8,8%) com medula óssea normocelular e 35 (43,8%) com medula hiperclular. Para os pacientes que não houve acesso a biópsia de medula óssea e consequentemente não há essas informações, destaca-se na tabela 12 como não informado, sendo um total de 29 (36,3%) pacientes (Tabela 12).

Também, foi avaliada a presença de displasias na medula óssea analisada principalmente através do exame de mielograma. Observou-se que houve um predomínio de displasias na linhagem eritróide (diseritropoese) em 70 (87,5%) dos casos analisados, seguidos de displasias na linhagem megacariocítica (dismegacariopoese) com 47 (58,8%) dos casos, e, por último, displasias na linhagem granulocítica (disgranulopoe) onde se teve 41 (51,2%) dos casos (Tabela 11).

Quanto à presença de sideroblastos em anel, 55 (68,8%) pacientes não apresentaram sideroblastos em anel na análise do mielograma, enquanto, 25 (31,2%) dos pacientes apresentavam a alteração no mielograma ao diagnóstico (Tabela 11).

No que se refere a porcentagem de blastos na medula óssea, foi observado que 36 (45%) pacientes estavam inclusos na faixa de $\leq 2\%$ de blastos, seguido de 14 (17,5%) na faixa de $>2\%$ e $<5\%$, 17 (21,3%) na faixa de $>5\%$ a 10% e 13 (16,3%) incluídos na faixa $>10\%$ de blastos na medula óssea (Tabela 12).

Tabela 11 - 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	9	11,3
		Normocelular	7	8,8
		Hipercelular	35	43,8
		Não informado	29	36,3
Mielograma	Diseritropoiese	Presença	70	87,5
		Ausência	10	12,5
	Disgranulopoiese	Presença	41	51,2
		Ausência	39	48,8
	Dismegacariopoiese	Presença	47	58,8
		Ausência	33	41,3
	Sideroblastos em anel	Presença	25	31,3
		Ausência	55	68,8
	Percentual de Blastos	≤2%	36	45
		>2 a <5%	14	17,5
		>5% a 10%	17	21,3
		>10%	13	16,3

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 12, 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 12 - Variáveis clínico-laboratoriais relacionadas aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD.

Variáveis	Média (desvio padrão)	Min.	Máx.
Hemoglobina (HB)	7,86 (± 2,26) g/dL	3,3 g/dL	14,20 g/dL
Neutrófilos (ANC)	2085,73 (± 2093,79) /mm ³	144/mm ³	10.374/mm ³
Plaquetas	136.441 (± 135.897) /mm ³	5.000/mm ³	556.100/mm ³

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

Foi observado, ao hemograma, que 69 (86,3%) pacientes apresentaram hemoglobina inferior a 10g/dL, 24 (30%) pacientes apresentaram contagem absoluta de neutrófilos (ANC) inferior a 800 por mm³ e, por fim, 44 (55%) pacientes com contagem de plaquetas inferior ou igual a 100.000/mm³ (Tabela 13).

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

Variáveis		Nº	%
Classificação dos valores de hemoglobina (HB)	> 10g/dL	11	13,8
	8-10g/dL	26	32,5
	< 8g/dL	43	53,8
Classificação dos valores de neutrófilos (ANC)	$\geq 800/\text{mm}^3$	56	70
	$< 800/\text{mm}^3$	24	30
Classificação dos valores de plaquetas	$\geq 100.000/\text{mm}^3$	36	45
	$\geq 50.000 < 100.000/\text{mm}^3$	19	23,8
	$< 50.000/\text{mm}^3$	25	31,2

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

Com relação a classificação de risco baseada no IPSS-R, 1 (1,3%) dos pacientes apresentam IPSS-R de muito baixo risco, 28 (35%) baixo risco, 15 (18,8%) risco intermediário, 14 (17,5%) alto risco e 11 (13,8%) 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 consequentemente não possuem classificação de risco baseada no IPSS-R, portanto, esses casos estão listados na tabela 14 como não se aplica.

Tabela 14 - 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)	1	1,3
	Baixo ($> 1.5 - 3$)	28	35
	Intermediário ($> 3 - 4.5$)	15	18,8
	Alto ($> 4.5 - 6$)	14	17,5
	Muito alto (> 6)	11	13,8
	Não se aplica	11	13,8

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

4.3 Análise das alterações citogenética por banda-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 80 pacientes com SMD incluídos neste estudo. A partir disso, observou-se que 69 (86,3%) deles apresentaram resultados sólidos e conclusivos e 11 (13,7%) apresentaram ausência de metáfase no exame ao diagnóstico. Após a análise dos casos, identificou-se que 45 (56,3%) pacientes possuíam cariótipo normal e 24 (30%) apresentaram cariótipo alterado (Tabela 15). Uma representação esquemática de algumas alterações identificadas em pacientes desta coorte se encontram descritas no apêndice B.

Realizamos também a classificação prognóstica frente ao cariótipo, estabelecida pelo IPSS-R e verificamos que houve um predomínio de pacientes com prognóstico favorável em 49 (61,2%) dos 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 15).

Tabela 15 - Frequência dos resultados citogenéticos e seu impacto prognóstico em pacientes com SMD ao diagnóstico.

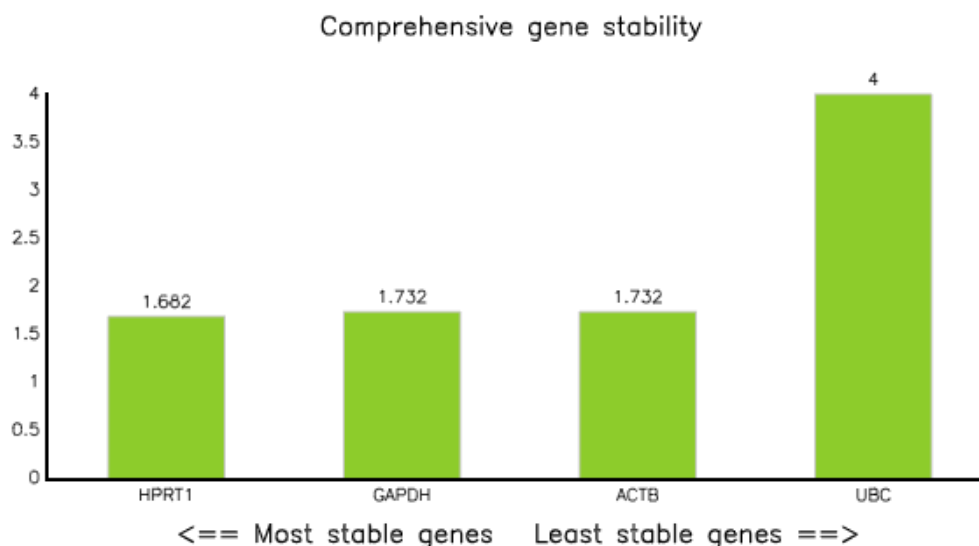
Variáveis		Nº	Frequência (%)
Cariótipo	Normal	45	56,3
	Alterado	24	30
	Ausência de metáfase	11	13,7
Classificação do cariótipo de acordo com o IPSS-R	Muito favorável	1	1,3
	Favorável	49	61,2
	Intermediário	13	16,2
	Desfavorável	2	2,5
	Muito desfavorável	4	5,0
	Não se aplica	11	13,8

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.

4.4 Análise de expressão gênica dos genes de referência em amostras de estudo

Para este estudo, os genes de referência mais estáveis nas amostras de cDNA utilizadas foram *HPRT1*, *GAPDH* e *ACTB* (Figura 9). Devido à baixa homogeneidade de expressão, o gene *UBC* foi excluído.

Figura 9 - Resultado da análise da estabilidade dos endógenos pela ferramenta RefFinder.



Legenda: Representa a classificação do melhor gene testado em todas as ferramentas agrupadas no RefFinder.

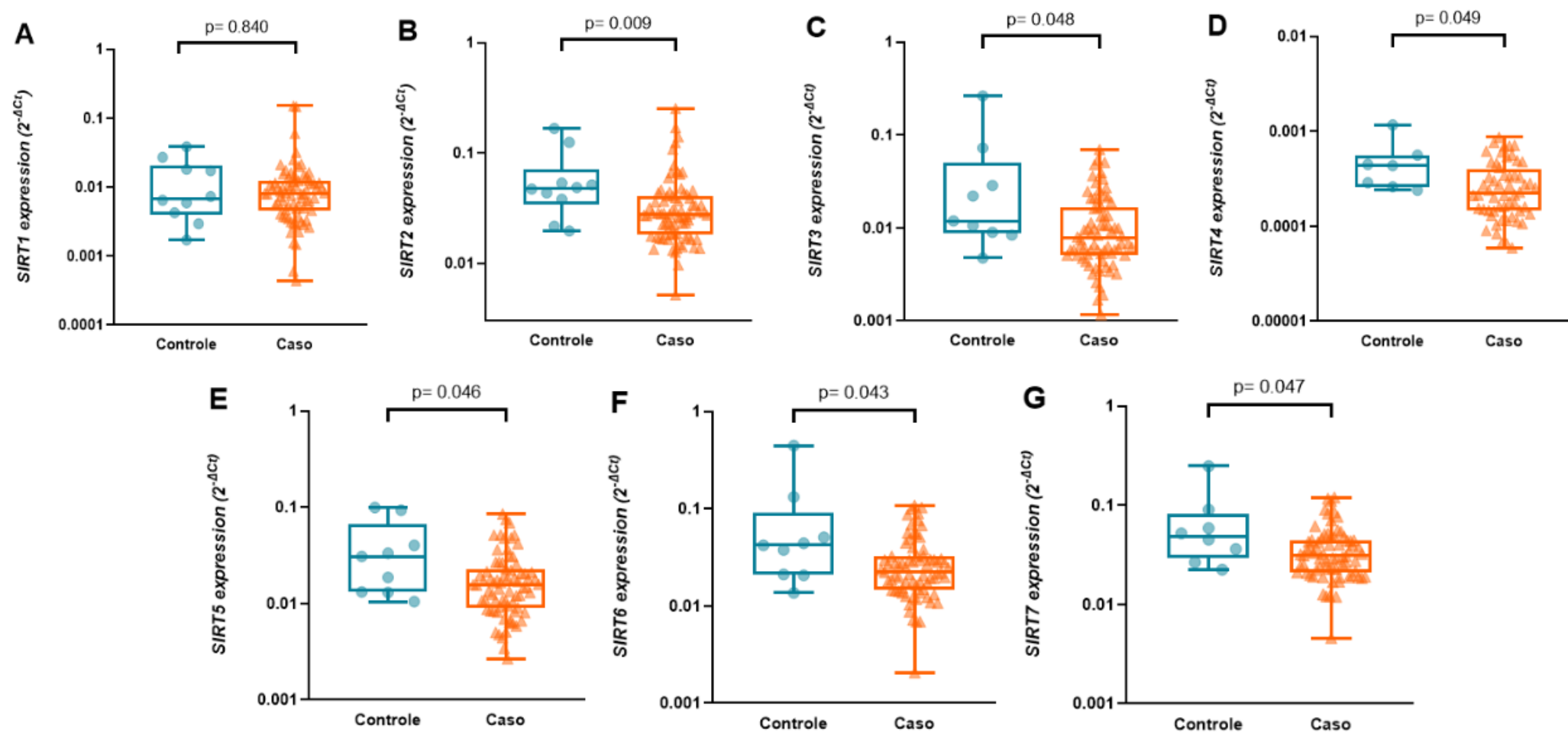
4.5 Análise de expressão gênica por RT-qPCR em amostras de medula óssea de pacientes com SMD

As associações entre os níveis de expressão dos genes *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7* e as variáveis clínico-laboratoriais, bem como a associação com o grupo controle (indivíduos saudáveis) serão apresentados a seguir. Para melhor compreensão, os resultados serão apresentados por variável analisada. Os dados adicionais como Mediana, Mínimo, Máximo e Erro Padrão da Média (E.P.M) estão descritos no Apêndice C.

4.5.1 Expressão gênica dos genes *SIRTs* em pacientes com SMD e indivíduos saudáveis

Ao avaliar os níveis de expressão gênica em pacientes com SMD, verificamos que houve diminuição dos níveis de expressão de *SIRT2* ($p=0,009$), *SIRT3* ($p=0,048$), *SIRT4* ($p=0,049$), *SIRT5* ($p=0,046$), *SIRT6* ($p=0,043$) e *SIRT7* ($p=0,047$) nos indivíduos portadores de SMD quando comparados com controles saudáveis (Figura 10). Não identificamos significância estatística de *SIRT1* entre os grupos analisados ($p>0,05$).

Figura 10 - Nível de expressão dos genes *SIRT*s em pacientes SMD versus controle.

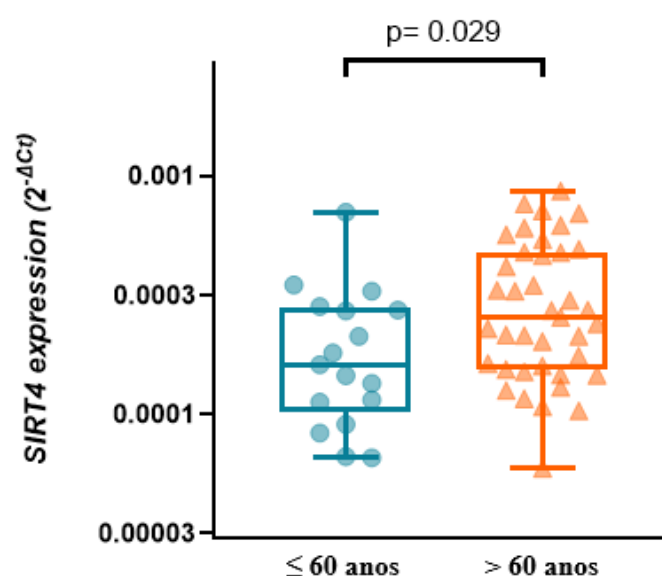


4.5.2 Expressão gênica das SIRTs em pacientes com SMD e variáveis clínicas.

4.5.2.1 Idade.

Para a variável idade, estratificada em dois grupos (>60 anos e ≤ 60 anos), nós constatamos o aumento de expressão de *SIRT4* em pacientes acima de 60 anos ($p=0,029$) quando comparados com pacientes com menos de 60 anos (Figura 11).

Figura 11 - Expressão de *SIRT4* na variável idade.



Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão dos demais genes em relação a variável idade ($p>0.05$) e entre a variável Sexo ($p>0.05$)

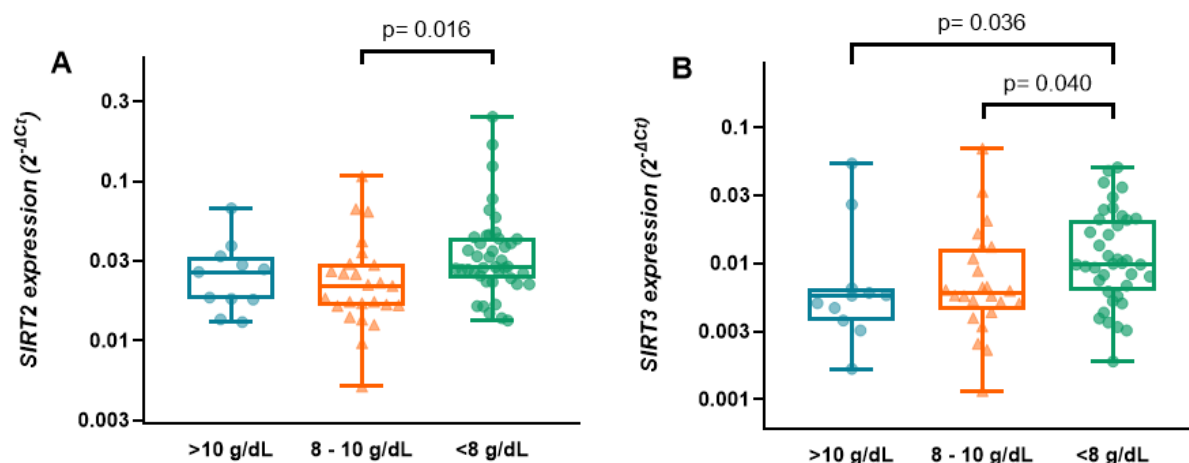
4.5.3 Expressão gênica das SIRTs frente às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD

4.5.3.1 Sangue periférico

Avaliamos a expressão gênica das sirtuínas quanto a variável hemoglobina (Hb) nos pacientes com SMD de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo IPSS-R. Identificamos o aumento da expressão de *SIRT2* em pacientes que apresentaram Hb <8 g/dL ($p= 0,016$) em comparação com os pacientes que apresentaram Hb entre 8-10g/dL (Figura 12). Também identificamos o aumento de expressão de *SIRT3* em pacientes que apresentaram Hb <8 g/dL ($p= 0,036/0,040$) em comparação com os pacientes que apresentaram hemoglobina ≥ 10 g/dL e entre 8-10g/dL, respectivamente (Figura 12). Não foram identificadas associações significantes entre o nível de

expressão dos demais genes avaliados no grupo SMD versus Nível de Hemoglobina categorizado pelo IPSS-R ($p > 0.05$).

Figura 12 - Nível de expressão dos genes, *SIRT2* e *SIRT3* em pacientes com SMD frente à hemoglobina categorizada pelo IPSS-R.



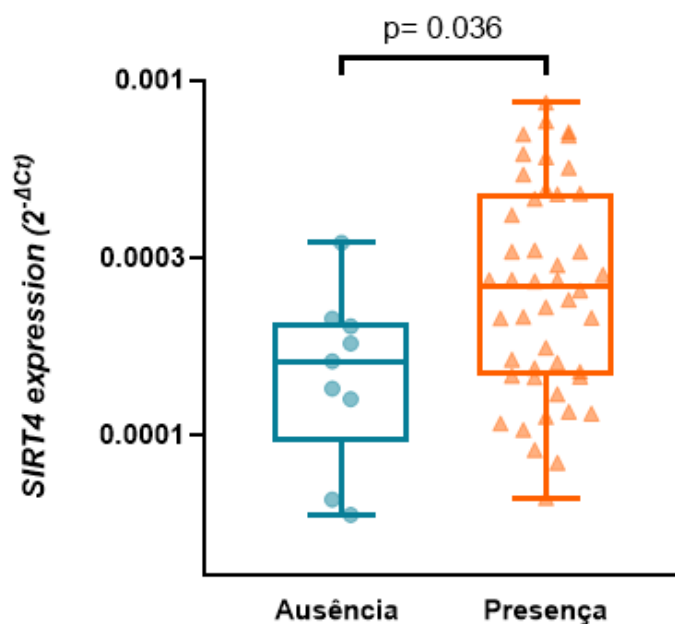
Não foram encontradas associações significantes com relação aos níveis de expressão dos genes *SIRTs* e a Contagem absoluta de neutrófilos (ANC) ($p > 0,05$). Da mesma forma, não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão dos genes avaliados no grupo SMD versus nível de plaquetas de acordo com a classificação IPSS-R ($p > 0.05$).

4.5.3.2 Aspirado de Medula Óssea (Mielograma)

Avaliamos a expressão gênica das sirtuínas em relação as variáveis clínicas ligadas aos resultados provenientes do aspirado de medula óssea (Mielograma e Cariótipo). Para as variáveis ligadas à presença de displasias na MO, nós avaliamos a relação de expressão gênica das sirtuínas em pacientes com a presença/ausência de Diseritropoese, Disgranulopoese e Dismegacariopoese.

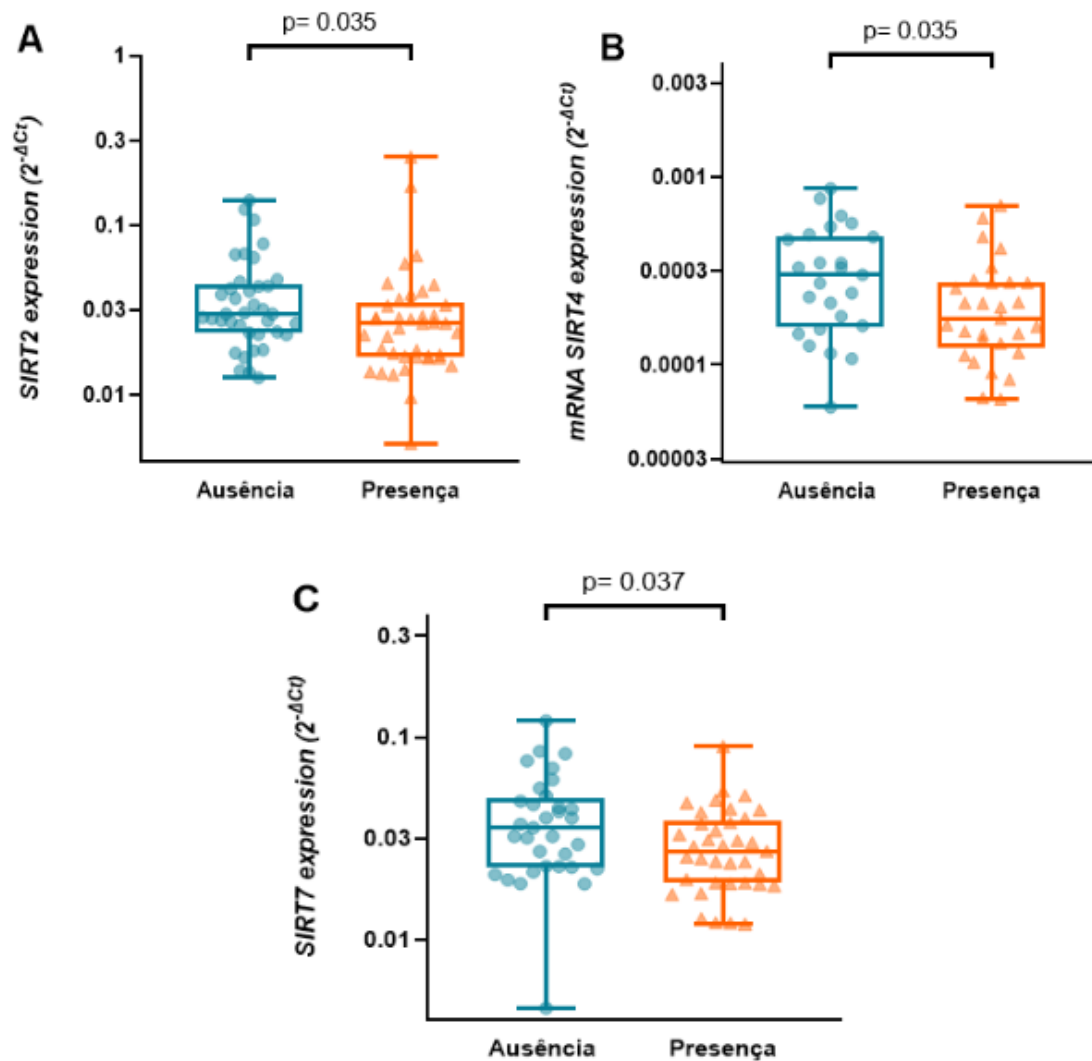
Não identificamos significância estatística ($p > 0,05$) de *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7* em relação a presença de Diseritropoese em nossa coorte, entretanto, identificamos um aumento de expressão de *SIRT4* ($p = 0,036$) em pacientes com a presença de displasia nesta linhagem de células quando comparado aos pacientes com SMD sem a displasia nesta mesma linhagem (Figura 13).

Figura 13 - Nível de expressão do gene *SIRT4* frente a presença de Diseritropoese em pacientes com SMD.



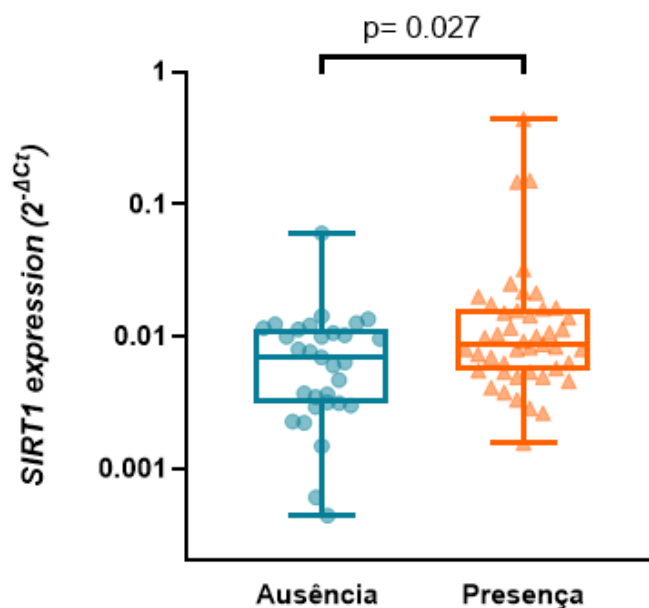
Não identificamos a presença de relações significantes ($p > 0,05$) entre os níveis de expressão gênica de *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT5* e *SIRT6* em relação a presença/ausência de Disgranulopoeise, entretanto, identificamos uma diminuição de expressão de *SIRT2* ($p = 0,035$), *SIRT4* ($p = 0,035$) e *SIRT7* ($p = 0,037$) em pacientes com a presença de Displasia nesta linhagem de células quando comparado com pacientes que não apresentavam displasia nestas células (Figura 14).

Figura 14 - Nível de expressão dos genes *SIRT2*, *SIRT4* e *SIRT7* frente a presença de Disgranulopose em pacientes com SMD.



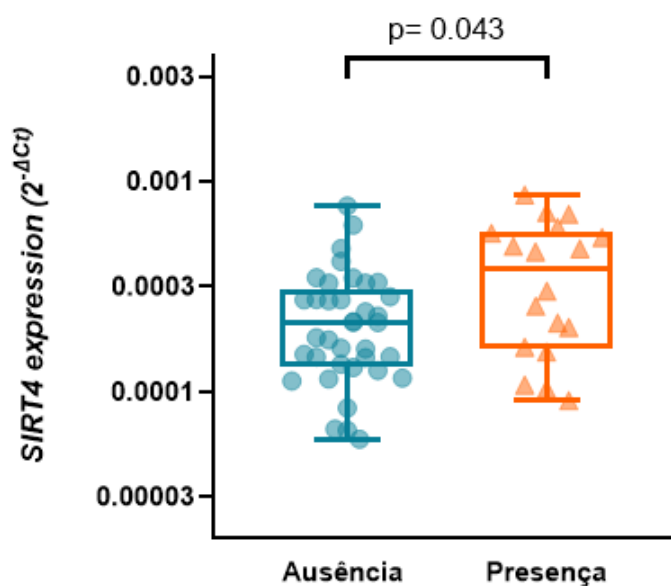
Para a variável Dismegacariopose, identificamos um aumento de expressão de *SIRT1* ($p=0,027$) em pacientes que apresentam a displasia nesta linhagem de células em comparação aos pacientes que não apresentam esta displasia (Figura 15). Não identificamos variações significantes ($p>0,05$) nos demais genes analisados para esta variável.

Figura 15 - Nível de expressão do gene *SIRT1* frente a presença de Dismegacariopose em pacientes com SMD.



Em relação a presença de sideroblastos em anel, identificamos o aumento de expressão de *SIRT4* ($p=0,043$) em pacientes que apresentavam sideroblastos em anel quando comparados com aqueles que não apresentavam esse achado morfológico (Figura 16). Não identificamos a presença de variações significantes ($p>0,05$) nos demais genes avaliados.

Figura 16 - Nível de expressão do gene *SIRT4* frente a presença de sideroblastos em anel em pacientes com SMD.

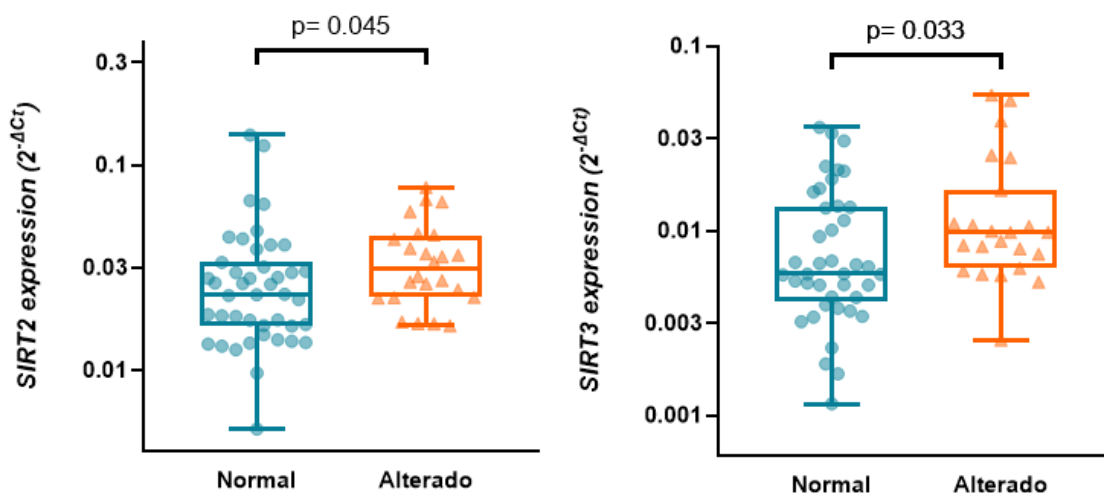


Não identificamos alterações significantes dos genes avaliados entre as variáveis ligadas a porcentagem de blastos na medula óssea de acordo com IPSS-R ($p > 0,05$).

4.5.3.3 Achados Citogenéticos

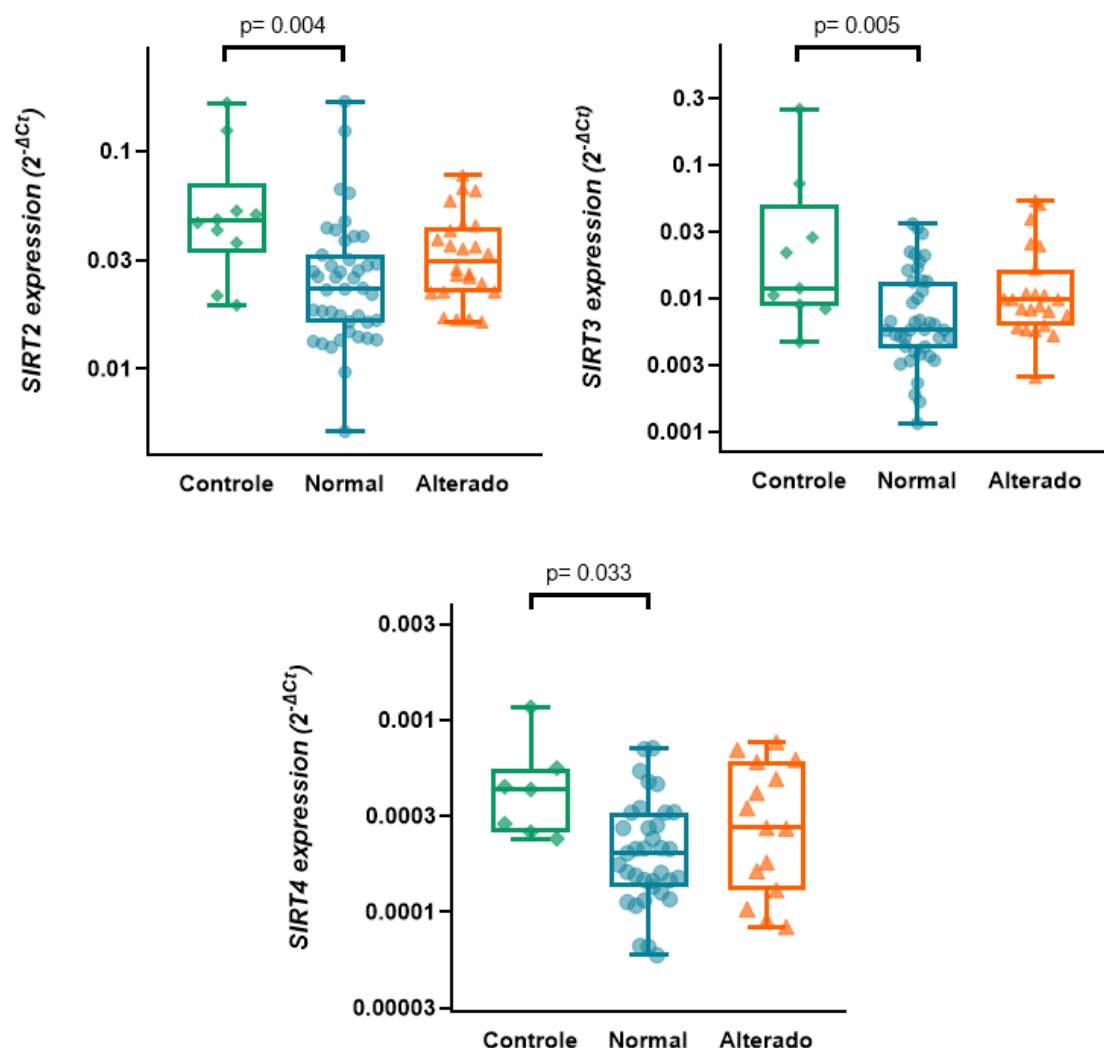
Na análise do nível de expressão gênica associada ao perfil citogenético dos pacientes com SMD, identificamos que pacientes com cariótipo alterado apresentaram maior expressão do gene *SIRT2* ($p=0,045$) e *SIRT3* ($p=0,033$) em relação à pacientes SMD com cariótipo normal (Figura 18).

Figura 17 - Nível de expressão dos genes *SIRT2* e *SIRT3* em pacientes com SMD frente a variável cariótipo normal e alterado.



Quando realizada a análise entre os pacientes com cariótipo normal, cariótipo alterado e controle saudável, observamos que a expressão de *SIRT2* ($p=0,004$), *SIRT3* ($p=0,005$) e *SIRT4* ($p= 0,033$) se apresentam mais elevadas nos pacientes de grupo controle do que nos pacientes com cariótipo normal (Figura 19). Não identificamos relação estatística significativa ($p > 0,05$) entre o grupo controle e os pacientes com cariótipo alterado nos demais genes avaliados.

Figura 18 - Nível de expressão dos genes *SIRT2*, *SIRT3* e *SIRT4* em pacientes com SMD frente a variável cariótipo normal, alterado e o grupo controle.



Não identificamos diferenças estatísticas significantes ($p > 0,05$) entre os demais genes avaliados e a variável Cariótipo (Normal x Alterado). Da mesma forma, não identificamos relações significativas na presença de Cariótipos Complexos ($p > 0,05$).

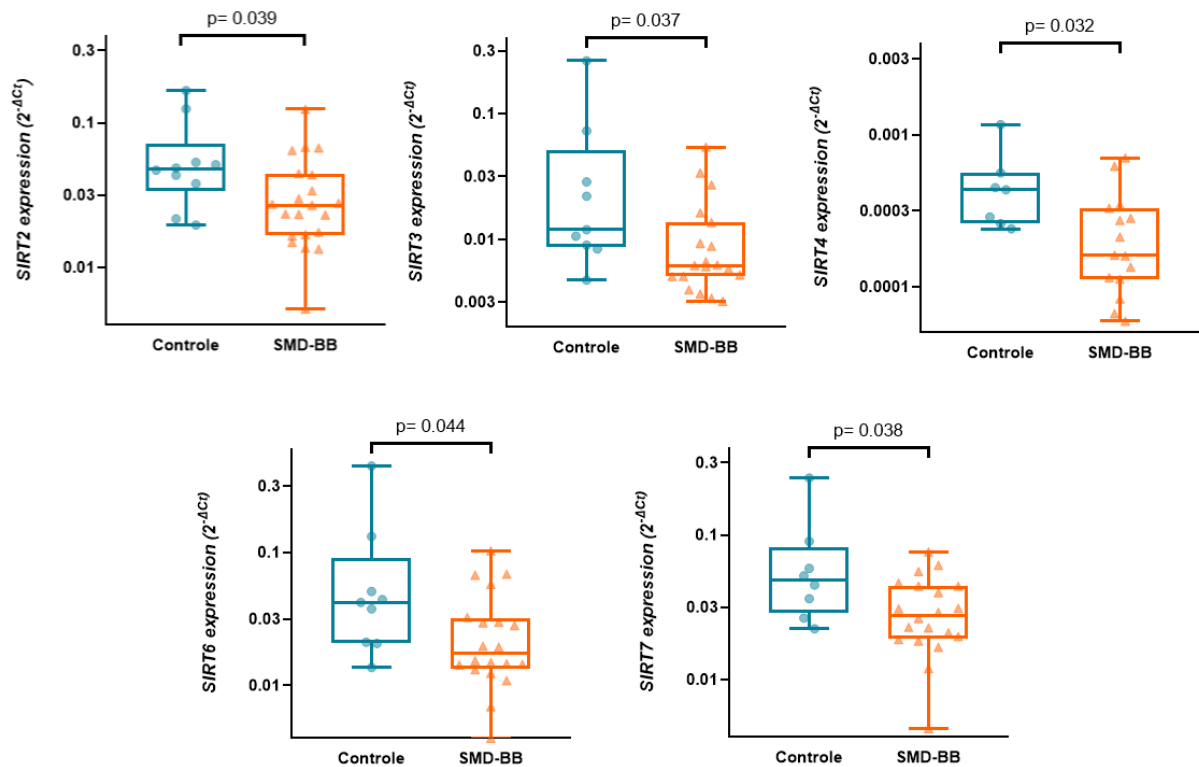
4.6 Expressão gênica das SIRTs frente às variáveis de classificação clínica e estratificação prognóstica

4.6.1 Classificação WHO 2022

Quanto a classificação dos pacientes com SMD de acordo com os subtipos estabelecidos pela OMS de 2022 (KHOURY et al., 2022), não identificamos relação entre a expressão destes genes entre os subgrupos da WHO 2022 ($p > 0,05$), entretanto,

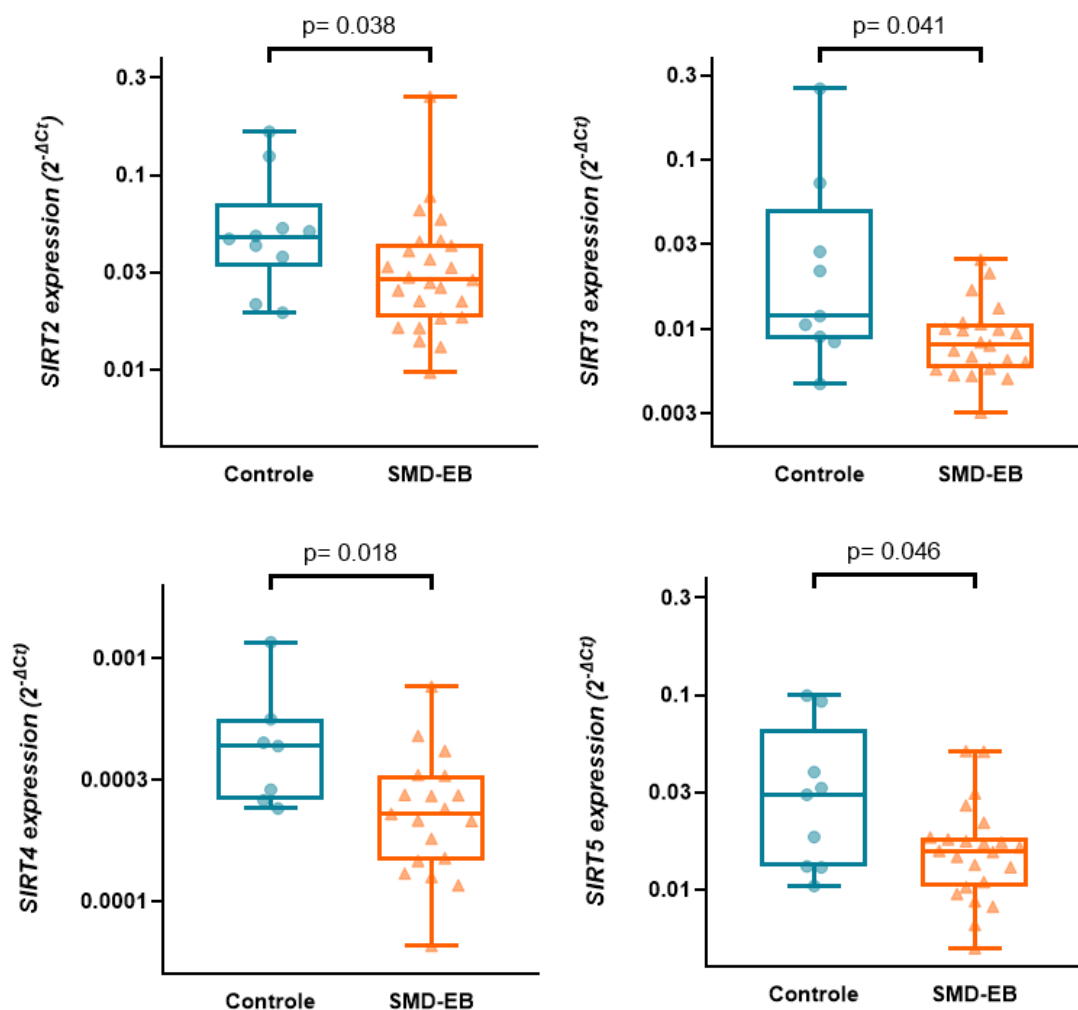
verificamos que existe uma diminuição da expressão de *SIRT2* ($p= 0,039$), *SIRT3* ($p=0,037$), *SIRT4* ($p= 0,032$), *SIRT6* ($p= 0,044$) e *SIRT7* ($p= 0,038$) entre os pacientes diagnosticados como SMD-BB em relação ao controle saudável (Figura 20). Para os genes *SIRT1* e *SIRT5* não obtivemos diferenças significativas em relação aos níveis de expressão gênica com o subtipo com baixo percentual de blastos ($p>0,05$).

Figura 19 - Nível de expressão dos genes *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT6* e *SIRT7* em pacientes com SMD-BB e o grupo controle.



Também identificamos uma diminuição na expressão de *SIRT2* ($p= 0,038$), *SIRT3* ($p= 0,041$), *SIRT4* ($p= 0,018$) e *SIRT5* ($p= 0,046$) em pacientes com SMD com alto percentual de blastos (SMD-EB) quando comparados com controles saudáveis (Figura 21).

Figura 20 - Nível de expressão dos genes SIRT2, SIRT3, SIRT4 e SIRT5 em pacientes com SMD-EB e o grupo controle.



Não identificamos relações significantes ($p > 0,05$) entre os demais subgrupos e o grupo de controle saudável nos genes avaliados.

4.6.2 Classificação dos Grupos de Risco de acordo com o IPSS-R, evolução, Dependência transfusional e óbito.

Quanto à classificação de risco segundo o IPSS-R dos pacientes com SMD, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) nas expressões dos genes avaliados. Da mesma forma, não identificamos relação entre a expressão destes genes frente as variáveis: Dependência transfusional ($p > 0,05$), Evolução para LMA ($p > 0,05$) e Óbito ($p > 0,05$).

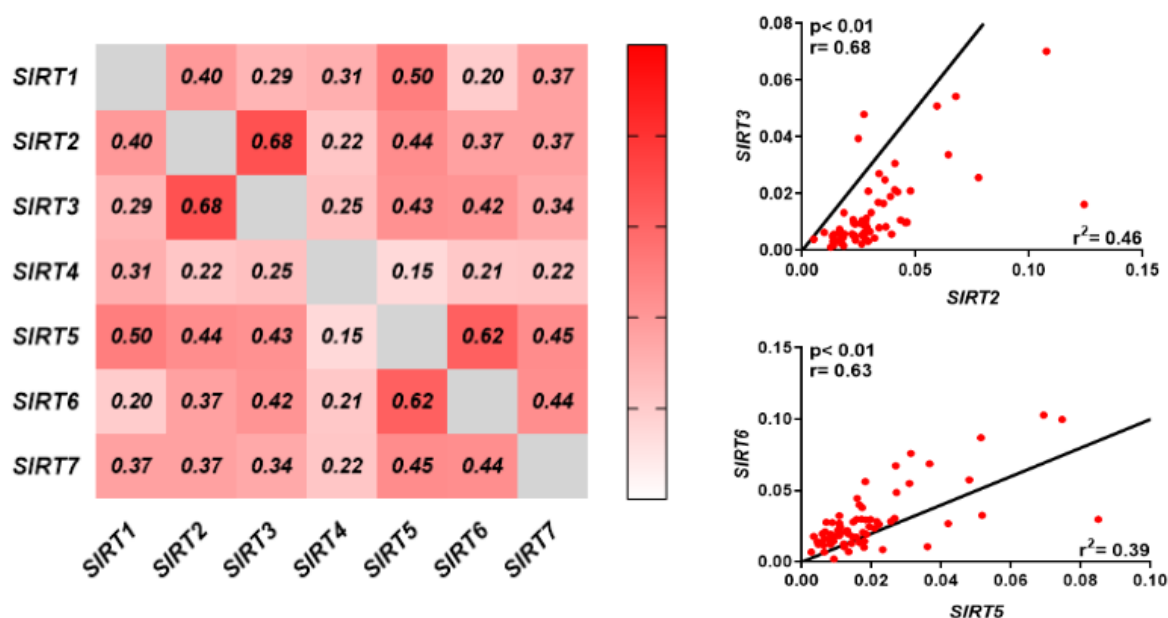
4.7 Análise de correlação entre os níveis de expressão dos genes relacionados ao controle do maquinário de histonas e senescência celular

Para as análises de correlação entre as *SIRT*s, foi analisada a influência da expressão de cada gene sobre a expressão dos demais a partir da análise do teste de correlação de Spearman (R) e obtenção do r^2 (R square), a fim de definir a influência que um gene tem sobre o outro. Os valores de p para esta análise se encontram descritos no Apêndice D.

4.7.1 Análise de correlação entre os genes *SIRT*s na SMD de novo

Inicialmente, realizamos a análise de correlação entre os níveis de expressão gênica dos 7 genes em estudo na SMD. Observamos uma forte correlação entre os genes *SIRT2* e *SIRT3* ($p < 0,01$; $r = 0.68$), demonstrando que estes genes apresentam entre si uma característica de correlação positiva, ou seja, seus níveis de expressão estão correlacionados na doença sendo responsáveis por 46,24% ($r^2 = 0,4624$) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em pacientes com SMD (Figura 22).

Figura 21 - Análise de correlação entre os genes *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7* e seus níveis de expressão gênica na SMD.



Legenda: Representação das análises de correlação de Pearson entre os genes *SIRT*s frente a seus níveis de expressão gênica dos pacientes com SMD realizada no software SPSS e imagem criada na ferramenta online Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

Adicionalmente, identificamos uma forte correlação entre *SIRT5* e *SIRT1* ($p < 0,01$; $r = 0,50$) e entre *SIRT5* com *SIRT6* ($p < 0,01$; $r = 0,63$), demonstrando que a expressão de *SIRT5* influencia em 25% ($r^2 = 0,25$) e 39,69% ($r^2 = 0,3969$) das variações de expressão de *SIRT1* e *SIRT6*, respectivamente (Figura 22).

4.7.2 Análise de correlação entre os genes SIRTs nos subtipos da SMD pela WHO 2022

Com o objetivo de mapear a correlação entre os genes SIRTs, realizamos uma análise de correlação entre os níveis de expressão de sirtuinas entre os subtipos de SMD classificados pela OMS no ano de 2022. Para esta análise, avaliamos os subtipos: SMD-BB, SMD-SA-BB, SMD-EB e SMD-h.

Para o subtipo SMD-BB (SMD com baixo percentual de blastos), identificamos uma forte correlação entre *SIRT2* e *SIRT3* ($p < 0,01$; $r = 0,83$), demonstrando que estes genes são responsáveis por 68,89% ($r^2 = 0,6889$) de variação dos seus respectivos níveis de expressão neste subtipo da doença (Figura 23a). Neste mesmo grupo, identificamos forte correlação entre *SIRT5* e *SIRT1* ($p < 0,01$; $r = 0,66$), *SIRT5* e *SIRT3* ($p = 0,01$; $r = 0,57$) e entre *SIRT5* e *SIRT6* ($p < 0,01$; $r = 0,60$), mostrando que estes genes são responsáveis por 43,56% ($r^2 = 0,4356$), 32,49% ($r^2 = 0,3249$) e 36% ($r^2 = 0,36$) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em pacientes com SMD-BB (Figura 23a).

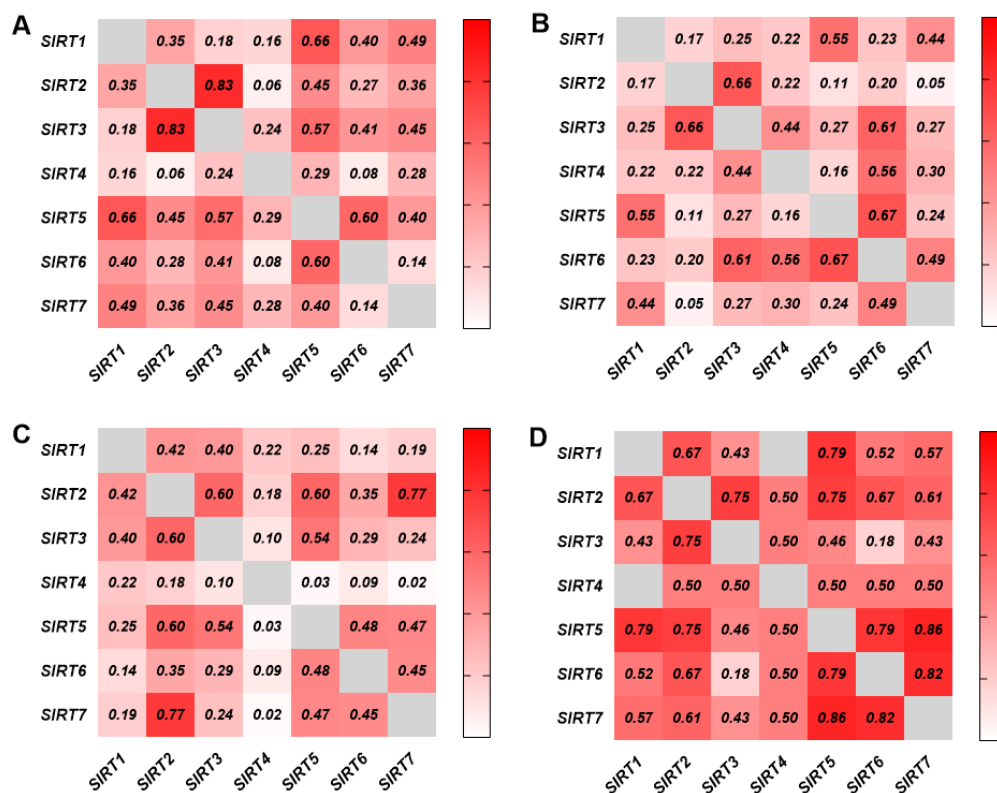
Para o subtipo SMD-SA-BB (SMD com baixo percentual de blastos e sideroblastos em anel), identificamos uma forte correlação entre *SIRT2* e *SIRT3* ($p < 0,01$; $r = 0,66$), sendo responsável por 43,56% ($r^2 = 0,4356$) da variação destes genes neste subtipo da doença. Identificamos a mesma característica de correlação entre *SIRT5* e *SIRT1* ($p = 0,01$; $r = 0,55$), mostrando uma correlação de 30,25% ($r^2 = 0,3025$) entre a variação destes mesmos genes na SMD-SA-BB (Figura 23b). Nesta mesma análise para este grupo, observou-se forte correlação entre os genes *SIRT6* com *SIRT3* ($p < 0,01$; $r = 0,61$), *SIRT4* ($p = 0,01$; $r = 0,56$) e *SIRT5* ($p < 0,01$; $r = 0,67$), demonstrando que *SIRT6* influencia em 37,21% ($r^2 = 0,3721$), 31,36% ($r^2 = 0,3136$) e 44,89% ($r^2 = 0,4489$) do nível de expressão dos genes *SIRT3*, *SIRT4* e *SIRT5*, respectivamente (Figura 23b).

Para o subtipo SMD-EB (SMD com excesso de blastos), identificamos uma forte correlação entre *SIRT2* e *SIRT3* ($p < 0,01$; $r = 0,60$), sendo responsável por 36% ($r^2 = 0,36$) da variação destes genes neste subtipo da doença. Identificamos a mesma característica entre *SIRT2* e *SIRT5* ($p < 0,01$; $r = 0,60$) e entre *SIRT2* e *SIRT7* ($p < 0,01$; $r =$

0.77), sendo responsáveis por 36% ($r^2 = 0,36$) e por 59% ($r^2 = 0,59$) da variação destes genes neste subtipo da doença, respectivamente (Figura 22c).

Para o subtipo SHD-h (SMD hipoplásica), identificamos forte correlação entre os genes *SIRT2* com *SIRT1* ($p = 0,04$; $r = 0.67$), *SIRT3* ($p < 0,01$; $r = 0.75$), *SIRT5* ($p < 0,01$; $r = 0.75$) e *SIRT7* ($p < 0,01$; $r = 0.60$). Estes dados demonstram que influência 44,89% ($r^2 = 0,4489$), 56,25% ($r^2 = 0,5625$), 56,25% ($r^2 = 0,5625$) e 36% (0,36) do nível de expressão dos genes *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT5* e *SIRT7*, respectivamente (Figura 23d). Ainda para os pacientes SMD-h, identificamos uma forte correlação entre *SIRT5* e *SIRT6* ($p = 0.02$; $r = 0.79$) e com *SIRT7* ($p = 0.02$; $r = 0.86$), demonstrando que *SIRT5* é responsável por influenciar em 62,41% ($r^2 = 0,6241$) e em 73,96% ($r^2 = 0,7396$) a expressão de *SIRT6* e *SIRT7*, respectivamente. Na mesma análise, identificamos que *SIRT6* apresenta forte correlação com *SIRT7* ($p = 0,039$; $r = 0.82$), mostrando que *SIRT6* influencia *SIRT7* em 67,24% ($r^2 = 0,6724$) de sua expressão neste subtipo da doença.

Figura 22 - Heatmap da análise de correlação entre os genes *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7* e seus níveis de expressão gênica em subtipos da SMD (A= SMD-BB; B= SMD-SA-BB; C= SMD-EB; D= SMD-h).



Legenda: Representação das análises de expressão dos genes *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7* frente aos grupos de risco dos pacientes com SMD realizada no software SPSS e imagem criada na ferramenta online Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

5. DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, conduzimos uma avaliação e validação da expressão de *SIRT*s em uma coorte de pacientes brasileiros diagnosticados com SMD. Inicialmente, nossos dados de previsão *in silico* indicaram uma redução significativa nos níveis de *SIRT2*, *SIRT4* e *SIRT7* entre os pacientes com SMD quando comparados ao grupo saudável. Posteriormente, quando examinamos a expressão gênica de pacientes SMD em uma coorte de população brasileira, descobrimos um padrão consistente, confirmando a expressão reduzida desses genes. Além disso, ao estender nossa análise aos demais membros da família *SIRT*, também observamos uma regulação negativa de *SIRT3*, *SIRT5* e *SIRT6* em pacientes com SMD. Pela primeira vez, essa avaliação abrangente demonstra a redução na expressão de *SIRT2* a *SIRT7* entre os pacientes com SMD na população brasileira.

A regulação da expressão gênica de *SIRT*s exerce uma profunda influência na preservação das funções celulares, principalmente na preservação dos telômeros, mantendo a integridade do genoma e facilitando mecanismos de reparo do DNA. Consequentemente, os níveis de expressão de *SIRT*s estão intrinsecamente ligados à modulação dos processos de envelhecimento e à inibição da senescência celular, desempenhando um papel fundamental no controle dos processos carcinogênicos (LEE et al., 2019). *SIRT*s desempenham papéis críticos no desenvolvimento das características do câncer, com suas atividades contribuindo significativamente tanto para a promoção quanto para a progressão dos tumores. Essas funções dependem dos padrões de expressão específicos desses genes em diferentes tecidos e de suas variações em condições patológicas (CARAFA; ALTUCCI; NEBBIOSO, 2019; GOES et al., 2022).

SIRT2, *SIRT4* e *SIRT7* têm papéis bem estabelecidos no processo de carcinogênese. A expressão de *SIRT2* exerce influência direta sobre a hematopoiese, a manutenção das células-tronco e suas capacidades proliferativas. Notavelmente, Xu e colegas (2021) elucidaram a interação dentro do eixo NAMPT/*SIRT2*/p53/p21, destacando seu papel crucial na manutenção das células-tronco pluripotentes em adultos saudáveis (XU et al., 2021). Da mesma forma, Kim e colegas (2011) forneceram evidências que destacam a importância da expressão de *SIRT2* na regulação do processo mitótico por meio do complexo promotor de anáfase/ciclossoma (APC/C) em células-tronco hematopoéticas (KIM et al., 2011). A regulação negativa da expressão de *SIRT2* serve como um catalisador para disfunção mitótica, aumentando a apoptose entre as

células-tronco hematopoéticas humanas e comprometendo o controle sobre os processos replicativos. Essa cascata de eventos contribui ultimamente para a aquisição de características clonais na carcinogênese da SMD.

SIRT3 se destaca como o SIRT com a atividade de deacetilação de proteínas mais potente entre as sirtuínas mitocondriais. Seu papel fundamental na regulação do estresse oxidativo tem sido amplamente examinado, principalmente em células-tronco mesenquimais. Em um estudo conduzido por MA e colaboradores (2020), foi demonstrado que a diminuição da expressão de *SIRT3* correlacionava-se com maior dano ao DNA e uma capacidade antioxidante reduzida (MA et al., 2020). Da mesma forma, ao induzir o aumento da expressão de *SIRT3* por meio da via SIRT3-SOD2, a progressão da senescência celular poderia ser mitigada. Isso foi alcançado pela redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, assim, controlando eficazmente o estresse oxidativo (MA et al., 2020).

Entre as SIRTs mitocondriais, *SIRT4* permanece como o membro menos explorado. Seu foco principal está na regulação de EROs e no metabolismo mitocondrial. *SIRT4* exerce influência sobre os níveis de ATP por meio da via SIRT4-AMPK-PGC1 α , governando assim a homeostase metabólica celular controlando os níveis de ATP e a fosforilação de ácidos graxos (HO et al., 2013). Em relação a esses tópicos, vários estudos já demonstraram as características de baixa expressão de SIRTs em doenças onco-hematológicas como Mieloma Múltiplo (ALLEGRA et al., 2021), Leucemia Linfocítica Crônica (VAN DAMME et al., 2012), Leucemia de Células T do Adulto (CHOI et al., 2006) e Leucemia Mieloide Aguda (KAISER et al., 2020). Essa hipótese é reforçada quando identificamos que a análise de correlação revelou uma correlação robusta, significativa e positiva entre os genes *SIRTs* na SMD. No entanto, são necessários estudos funcionais para validar essas descobertas.

Além do papel patogênico de SIRTs na SMD, nossos resultados reforçam que membros da família SIRTs (por exemplo, *SIRT2* e *SIRT3*) foram regulados positivamente em pacientes diagnosticados com SMD com anemia severa (hemoglobina < 8 g/dL de acordo com o IPSS-R). Além disso, a expressão gênica diferencial de membros da família SIRT também foi associada à presença de displasias de medula óssea na MDS. A regulação positiva de *SIRT4* e *SIRT1* foi significativamente associada à diseritropoiese e dismegacariopoiese, respectivamente. No entanto, *SIRT2*, *SIRT4* e *SIRT7* foram regulados negativamente na disgranulopoiese.

SIRT2 desempenha um papel fundamental na regulação de várias vias citoplasmáticas, contribuindo para o controle do metabolismo (JIANG et al., 2011), inflamação (ROTHGIESSER et al., 2010), progressão do ciclo celular (SERRANO et al., 2013) e tumorigênese (KIM et al., 2011). Notavelmente, a regulação do ferro é um tema comum que perpassa todas essas vias, destacando seu papel fundamental na orquestração precisa desses processos no maquinário celular (FISCHER-FODOR et al., 2015; WESSLING-RESNICK, 2010; ZHANG, 2014). Da mesma forma, *SIRT3* desempenha um papel crítico na manutenção da homeostase do ferro. A alta expressão de *SIRT3* tem sido mostrada para regular negativamente a expressão do receptor da transferrina (TfR1) inibindo IRP1 (proteínas reguladoras de ferro), suprimindo assim a proliferação em células cancerosas (JEONG et al., 2015). Isso destaca a relação intrincada entre *SIRT2*, *SIRT3* e a regulação do ferro no contexto da função e saúde celular.

A regulação do ferro é um aspecto importante da terapia de transfusão sanguínea em pacientes com SMD anêmicos. O "paciente típico" com SMD anêmicos que necessita de terapia de transfusão receberá duas unidades de sangue a cada 2 a 6 semanas. Ao longo do tratamento, a sobrecarga de ferro se acumula nos tecidos e órgãos do corpo, e após aproximadamente 20 transfusões, um paciente pode acabar com níveis tóxicos desse componente na circulação sanguínea. A sobrecarga de ferro é comumente identificada em pacientes com SMD dependentes de transfusão, causada pelos problemas duplos de hemopoiese ineficaz ou metabolismo de ferro alterado pela SMD e carregamento de ferro a partir de hemácias transfundidas (PALUMBO et al., 2021). Os efeitos tóxicos do ferro plasmático parecem desempenhar um papel importante em danos nos órgãos. Portanto, é importante monitorar e regular os níveis de ferro em pacientes com SMD que recebem transfusões de sangue para evitar complicações decorrentes do excesso de ferro (WOOD; MCQUILTEN, 2020).

As descobertas apresentadas neste estudo lançam luz sobre a relação complexa entre *SIRT2*, *SIRT3* e a regulação do ferro no contexto da SMD e da anemia. A regulação positiva desses membros da família SIRT em pacientes com SMD e anemia severa destaca seus potenciais papéis na modulação de vias celulares essenciais, incluindo metabolismo, inflamação, progressão do ciclo celular e tumorigênese, todos intimamente relacionados à regulação do ferro. Clinicamente, essas descobertas não apenas aprofundam nossa compreensão dos mecanismos patogênicos na SMD, mas também destacam a importância de monitorar de perto e gerenciar os níveis de ferro em

pacientes com SMD dependentes de transfusão para mitigar o risco de complicações relacionadas ao excesso de ferro. Ao abordar essas conexões intrincadas entre SIRT2 e a regulação do ferro, podemos abrir caminho para estratégias terapêuticas mais direcionadas e eficazes no tratamento da anemia relacionada à SMD.

A regulação positiva de *SIRT2* e *SIRT3* também foi significativa na presença de anormalidades cromossômicas em pacientes com SMD. *SIRT2* é uma deacetilase dependente de NAD^+ que participa da modulação do controle do ciclo celular e da tumorigênese. *SIRT2* desempenha um papel essencial na manutenção da integridade da mitose e foi proposto como um supressor de tumores, prevenindo a instabilidade cromossômica durante a mitose (KOZAKO et al., 2018). De acordo com a associação entre *SIRT2* e o complexo promotor de anáfase/ciclossoma (APC/C), Kim e colegas demonstraram uma relação de feedback na qual a deficiência de *SIRT2* leva ao aumento da atividade e expressão dos genes Aurora-A (*AURKA*) e Aurora-B (*AURKB*) (KIM et al., 2011). Os genes da quinase Aurora fazem parte de um complexo de atividades ligadas ao controle do ciclo mitótico, favorecendo a transição da fase G2 para a fase M (*AURKA*), a ligação cromossômica aos cinetócoros (*AURKB*) e a segregação cromossômica (*AURKB*) (WILLEMS et al., 2018). Em vários conjuntos de dados, a diminuição da expressão de *SIRT2* antecipa piores resultados clinicopatológicos (BORGES et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2013). Por exemplo, alterações na *SIRT2*-H3K18Ac sugerem atividade alterada do P300 e identificam um subconjunto de tumores que podem se beneficiar da inibição da desacetilação de histonas (DAMODARAN et al., 2017).

Da mesma forma, *SIRT3* é uma importante deacetilase dependente de NAD^+ mitocondrial que desempenha um papel crucial na regulação do metabolismo energético mitocondrial, incluindo a oxidação de ácidos graxos, o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória (OUYANG et al., 2022). Foi descrito como um supressor de tumores em vários tipos de câncer, como câncer de mama, carcinoma hepatocelular, malignidades de células B e leucemia e câncer ovariano metastático. Normalmente, a expressão de *SIRT3* se correlaciona com um bom resultado e um aumento geral na sobrevida dos pacientes com câncer (TORRENS-MAS et al., 2017). No entanto, os papéis de *SIRT3* variam em diferentes cânceres e têm especificidades de células e tumores. Ao lado de *SIRT2*, parece que *SIRT3* pode prevenir a morte celular, inibindo o estresse oxidativo (OUYANG et al., 2022). Aqui, *SIRT2* e *SIRT3* foram associados a cariótipos anormais, um marcador importante de prognóstico ruim na SMD. Assim, a relação *SIRT2/SIRT3*

pode desempenhar um papel complexo no desenvolvimento e na progressão da SMD. Portanto, reforçamos que inibidores seletivos de *SIRT2* e *SIRT3* são possíveis agentes terapêuticos candidatos para a SMD.

Em resumo, fica evidente pela primeira vez que o presente estudo revelou descobertas significativas quanto à expressão de SIRTs em pacientes com SMD e suas variáveis clínicas. A validação da redução coletiva na expressão de genes SIRTs (por exemplo, *SIRT2* a *SIRT7*) em pacientes brasileiros diagnosticados com SMD destaca a importância desses alvos na patogênese da doença. Além disso, a associação entre a regulação positiva de *SIRT2* e *SIRT3* em pacientes com anemia severa sugere uma possível ligação entre as SIRTs e o gerenciamento de complicações relacionadas ao excesso de ferro em pacientes dependentes de transfusão sanguínea. Além disso, a associação de *SIRT2/SIRT3* com instabilidade genômica na presença de alterações citogenéticas e seu papel complexo no desenvolvimento e na progressão da SMD destacam áreas promissoras para investigações futuras e possíveis alvos terapêuticos. Nossos resultados enfatizam a importância dos membros da família SIRT na ampliação de nossa compreensão da SMD e destacam novas implicações clínicas, prognósticas e terapêuticas que podem beneficiar pacientes com essa condição clínica.

6. CONCLUSÃO

A partir deste estudo, podemos concluir que:

1. A avaliação *in silico* de expressão das SIRTs demonstrou que há uma diminuição da expressão de *SIRT2*, *SIRT4* e *SIRT7* em pacientes com SMD na população Europeia;
2. A expressão de *SIRT2*, *SIRT4* e *SIRT7* em pacientes com SMD na população brasileira é compatível com o que foi identificado nas análises *in silico* da expressão destes genes, além disso, identificamos que *SIRT3*, *SIRT5* e *SIRT6* também encontram-se diminuídos nesta coorte quando comparados com pacientes saudáveis;
3. Variações de expressão de *SIRT4* na diseritropoese e na presença de sideroblastos em anel, *SIRT1* na dismegacariopoese e de *SIRT2*, *SIRT4* e *SIRT7* na disgranulopoese na medula óssea de pacientes com SMD, demonstra uma possível relação destes genes com as características displásicas e de senescência nestas linhagens celulares;
4. Variações de expressão das SIRTs no que se refere a baixos níveis de hemoglobina (*SIRT2/SIRT3*) e em pacientes com cariótipo alterado (*SIRT2/SIRT3*) tornam estes alvos possíveis candidatos a marcadores de prognóstico para dependentes transfusionais e com cariótipo alterado;

Portanto, nossos resultados destacam que a expressão gênica diferencial dos genes *SIRTs* (*SIRT2-SIRT7*) podem desempenhar um papel importante no controle da instabilidade genômica e no controle dos níveis de hemoglobina, estabelecendo duas das características mais marcantes na SMD, as anormalidades cromossômicas e a dependência transfusional em pacientes de alto risco.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, A. et al. SIRT1 regulates metabolism and leukemogenic potential in CML stem cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 7, p. 2685–2701, 1 jul. 2019.

ALLEGRA, A. et al. SIRT2 and SIRT3 expression correlates with redox imbalance and advanced clinical stage in patients with multiple myeloma. **Clinical Biochemistry**, v. 93, p. 42–49, 1 jul. 2021.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 19 maio 2016.

BARTH, T. K.; IMHOF, A. Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. **Trends in biochemical sciences**, v. 35, n. 11, p. 618–626, nov. 2010.

BEDOLLA, M. A. H. et al. Papel pleiotrópico y homeostático de las Sirtuinas en la función biológica humana. **Ciencia Huasteca Boletín Científico de la Escuela Superior de Huejutla**, v. 8, n. 16, p. 6–20, 5 jul. 2020.

BELLI, C. B. et al. Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 10, p. 851–858, 1 out. 2015.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **British journal of haematology**, v. 51, n. 2, p. 189–99, jun. 1982.

BERNARD, E. et al. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. **Nature medicine**, v. 26, n. 10, p. 1549–1556, 1 out. 2020.

BERNARD, E. et al. Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. **NEJM Evidence**, 12 jun. 2022.

BLANK, M. F.; GRUMMT, I. The seven faces of SIRT7. **Transcription**, v. 8, n. 2, p. 67, 15 mar. 2017.

BORGES, D. DE P. et al. Prognostic importance of Aurora Kinases and mitotic spindle genes transcript levels in Myelodysplastic syndrome. **Leukemia research**, v. 64, p. 61–70, 1 jan. 2018.

BORGES, D. DE P. et al. Functional polymorphisms of DNA repair genes in Latin America reinforces the heterogeneity of Myelodysplastic Syndrome. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, 9 set. 2021.

BRADBURY, C. A. et al. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. **Leukemia**, v. 19, n. 10, p. 1751–1759, 2005.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.

CAGNETTA, A. et al. Depletion of SIRT6 enzymatic activity increases acute myeloid leukemia cells' vulnerability to DNA-damaging agents. **Haematologica**, v. 103, n. 1, p. 80, 1 jan. 2018.

CARAFA, V.; ALTUCCI, L.; NEBBIOSO, A. Dual tumor suppressor and tumor promoter action of sirtuins in determining malignant phenotype. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. JAN, p. 38, 30 jan. 2019.

CAZZOLA, M. Myelodysplastic Syndromes. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1904794>, v. 383, n. 14, p. 1358–1374, 30 set. 2020.

CEA, M. et al. Evidence for a role of the histone deacetylase SIRT6 in DNA damage response of multiple myeloma cells. **Blood**, v. 127, n. 9, p. 1138–1150, 3 mar. 2016.

CHAUHAN, D. et al. Preclinical evaluation of a novel SIRT1 modulator SRT1720 in multiple myeloma cells. **British Journal of Haematology**, v. 155, n. 5, p. 588–598, 1 dez. 2011.

CHEN, J.; WANG, A.; CHEN, Q. SirT3 and p53 Deacetylation in Aging and Cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 9, p. 2308–2311, 1 set. 2017.

CHOI, Y. L. et al. A genomic analysis of adult T-cell leukemia. **Oncogene** 2007 26:8, v. 26, n. 8, p. 1245–1255, 14 ago. 2006.

CHUNG, S. S.; PARK, C. Y. Aging, hematopoiesis, and the myelodysplastic syndromes. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2017, n. 1, p. 73–78, 8 dez. 2017.

COSTA, E. DE B. O.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 125–136, 24 dez. 2013.

COSTA, M. B. et al. Chromosomal abnormalities and dysregulated DNA repair gene expression in farmers exposed to pesticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 103564, 1 fev. 2021.

DAI, Y.; FALLER, D. V. Transcription Regulation by Class III Histone Deacetylases (HDACs)—Sirtuins. **Translational Oncogenomics**, v. 3, n. 3, p. 53, 2008.

DAMODARAN, S. et al. Dysregulation of Sirtuin 2 (SIRT2) and histone H3K18 acetylation pathways associates with adverse prostate cancer outcomes. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 20 dez. 2017.

DAN, L. et al. The role of sirtuin 2 activation by nicotinamide phosphoribosyltransferase in the aberrant proliferation and survival of myeloid leukemia cells. **Haematologica**, v. 97, n. 4, p. 551, 1 abr. 2012.

DE OLIVEIRA, F. M. et al. Differential expression of AURKA and AURKB genes in bone marrow stromal mesenchymal cells of myelodysplastic syndrome: Correlation with G-banding analysis and FISH. **Experimental Hematology**, v. 41, n. 2, p. 198–208, 1 fev. 2013.

DENG, A. et al. SIRT2 is an unfavorable prognostic biomarker in patients with acute myeloid leukemia. **Scientific Reports** 2016 6:1, v. 6, n. 1, p. 1–8, 13 jun. 2016.

FISCHER-FODOR, E. et al. Iron, inflammation and invasion of cancer cells. **Clujul medical (1957)**, v. 88, n. 3, p. 272–277, 22 jul. 2015.

FORD, E. et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. **Genes & development**, v. 20, n. 9, p. 1075–1080, 1 maio 2006.

FRAZZI, R. et al. Resveratrol-mediated apoptosis of hodgkin lymphoma cells involves SIRT1 inhibition and FOXO3a hyperacetylation. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 5, p. 1013–1021, 1 mar. 2013.

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, 1 nov. 2020.

GEIMAN, T. M.; MUEGGE, K. DNA methylation in early development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, n. 2, p. 105–113, 1 fev. 2010.

GOES, J. V. C. et al. Role of Sirtuins in the Pathobiology of Onco-Hematological Diseases: A PROSPERO-Registered Study and In Silico Analysis. **Cancers**, v. 14, n. 19, p. 4611, 23 set. 2022.

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

GREENBERG, P. L. et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454–2465, 20 set. 2012.

HAERLACH, T. et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia** **2014 28:2**, v. 28, n. 2, p. 241–247, 13 nov. 2013.

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

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, 2013.

HIRATSUKA, M. et al. Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: Down-regulation of SIRT2 gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, n. 3, p. 558–566, 26 set. 2003.

HO, L. et al. SIRT4 regulates ATP homeostasis and mediates a retrograde signaling via AMPK. **Aging**, v. 5, n. 11, p. 835–849, 2013.

HUANG, F. TENG et al. Role of SIRT1 in hematologic malignancies. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 20, n. 5, p. 391–398, 1 maio 2019.

JEONG, S. M. et al. SIRT3 regulates cellular iron metabolism and cancer growth by repressing iron regulatory protein 1. **Oncogene**, v. 34, n. 16, p. 2115–2124, 9 jun. 2015.

JEONG, S. M.; HWANG, S.; SEONG, R. H. SIRT4 regulates cancer cell survival and growth after stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 470, n. 2, p. 251–256, 5 fev. 2016.

JIANG, W. et al. Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase. **Molecular cell**, v. 43, n. 1, p. 33–44, 8 jul. 2011.

KAISER, A. et al. SIRT7: an influence factor in healthy aging and the development of age-dependent myeloid stem-cell disorders. **Leukemia** **2020 34:8**, v. 34, n. 8, p. 2206–2216, 25 mar. 2020.

KHOURY, J. D. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. **Leukemia** **2022 36:7**, v. 36, n. 7, p. 1703–1719, 22 jun. 2022.

- KIM, H. B. et al. Sensitization of chemo-resistant human chronic myeloid leukemia stem-like cells to Hsp90 inhibitor by SIRT1 inhibition. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 8, p. 923–934, 11 jun. 2015.
- KIM, H. S. et al. SIRT2 Maintains Genome Integrity and Suppresses Tumorigenesis through Regulating APC/C Activity. **Cancer Cell**, v. 20, n. 4, p. 487–499, 18 out. 2011.
- KOZAKO, T. et al. Novel small molecule SIRT2 inhibitors induce cell death in leukemic cell lines. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, 6 ago. 2018.
- LEE, S. H. et al. Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. **BMB Reports**, v. 52, n. 1, p. 24, 1 jan. 2019.
- LI, L. et al. Activation of p53 by SIRT1 inhibition enhances elimination of CML leukemia stem cells in combination with imatinib. **Cancer Cell**, v. 21, n. 2, p. 266, 2 fev. 2012.
- 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.
- LOMBARD, D. B.; ZWAANS, B. M. M. SIRT3: as simple as it seems? **Gerontology**, v. 60, n. 1, p. 56–64, dez. 2014.
- MA, C. et al. Sirt3 Attenuates Oxidative Stress Damage and Rescues Cellular Senescence in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Targeting Superoxide Dismutase 2. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, 16 nov. 2020.
- MA, J. et al. SIRT3 deacetylase activity confers chemoresistance in AML via regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation. **British Journal of Haematology**, v. 187, n. 1, p. 49, 1 out. 2019.
- MAGALHÃES, S. M. M.; LORAND-METZE, I. Síndromes mielodisplásicas: protocolo de exclusão. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 263–267, dez. 2004.
- MALCOVATI, L. et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 25, n. 23, p. 3503–3510, 10 ago. 2007.
- MARTENS, C. R. et al. Chronic nicotinamide riboside supplementation is well-tolerated and elevates NAD⁺ in healthy middle-aged and older adults. **Nature communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.
- MATTIUCCI, D. et al. Aging- and Senescence-associated Changes of Mesenchymal Stromal Cells in Myelodysplastic Syndromes. **Cell transplantation**, v. 27, n. 5, p. 754–764, 1 maio 2018.
- MENDELSON, A. R.; LARRICK, J. W. Interacting NAD⁺ and Cell Senescence Pathways Complicate Antiaging Therapies. <https://home.liebertpub.com/rej>, v. 22, n. 3, p. 261–266, 17 jun. 2019.
- 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.
- MINTEN, E. V. et al. SIRT2 promotes BRCA1-BARD1 heterodimerization through deacetylation. **Cell reports**, v. 34, n. 13, 30 mar. 2021.

- MONTALBAN-BRAVO, G.; GARCIA-MANERO, G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. **American Journal of Hematology**, v. 93, n. 1, p. 129–147, 1 jan. 2018.
- MOON, J.; KIM, H. R.; SHIN, M. G. Rejuvenating Aged Hematopoietic Stem Cells Through Improvement of Mitochondrial Function. **Annals of laboratory medicine**, v. 38, n. 5, p. 395–401, 2018.
- MORISHIMA, T. et al. LMO2 activation by deacetylation is indispensable for hematopoiesis and T-ALL leukemogenesis. **Blood**, v. 134, n. 14, p. 1159–1175, 3 out. 2019.
- MÜLLER, O. et al. Changing Chromatin Fiber Conformation by Nucleosome Repositioning. **Biophysical Journal**, v. 107, n. 9, p. 2141, 11 nov. 2014.
- NEUKIRCHEN, J. et al. Cytogenetic clonal evolution in myelodysplastic syndromes is associated with inferior prognosis. **Cancer**, v. 123, n. 23, p. 4608–4616, 1 dez. 2017.
- O'CALLAGHAN, C.; VASSILOPOULOS, A. Sirtuins at the crossroads of stemness, aging, and cancer. **Aging cell**, v. 16, n. 6, p. 1208–1218, 1 dez. 2017.
- OUYANG, S. et al. The Double-Edged Sword of SIRT3 in Cancer and Its Therapeutic Applications. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 871560, 27 abr. 2022.
- PALUMBO, G. A. et al. From Biology to Clinical Practice: Iron Chelation Therapy With Deferasirox. **Frontiers in oncology**, v. 11, 6 out. 2021.
- PAPAEMMANUIL, E. et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 122, n. 22, p. 3616–3627, 21 nov. 2013.
- PELLAGATTI, A.; BOULTWOOD, J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. **European journal of haematology**, v. 95, n. 1, p. 3–15, 1 jul. 2015.
- PINHEIRO, R. F.; CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 11, p. 1110–1112, 2009.
- QUESADA, A. E. et al. Expression of Sirt1 and FoxP3 in classical Hodgkin lymphoma and tumor infiltrating lymphocytes: Implications for immune dysregulation, prognosis and potential therapeutic targeting. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 10, p. 13241–8, 2015.
- RAZA, A.; GALILI, N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 12, p. 849–859, 2012.
- RIBEIRO, H. L. et al. ATM polymorphism is associated with low risk myelodysplastic syndrome. **DNA repair**, v. 12, n. 2, p. 87–89, 1 fev. 2013.
- RIBEIRO, H. L. et al. Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. **Hematological oncology**, v. 33, n. 4, p. 220–228, 1 dez. 2015.
- RIBEIRO JUNIOR, H. L. et al. Discrepancy in transcriptomic profiling between CD34 + stem cells and primary bone marrow cells in myelodysplastic neoplasm. **Leukemia research**, v. 129, 1 jun. 2023.

- ROBERTSON, K. D. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. **Oncogene**, v. 20, n. 24, p. 3139–3155, 28 maio 2001.
- ROTHGIESSER, K. M. et al. SIRT2 regulates NF- κ B dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. **Journal of cell science**, v. 123, n. Pt 24, p. 4251–4258, 15 dez. 2010.
- SASCA, D. et al. SIRT1 prevents genotoxic stress-induced p53 activation in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 124, n. 1, p. 121–133, 3 jul. 2014.
- SERRANO, L. et al. The tumor suppressor SirT2 regulates cell cycle progression and genome stability by modulating the mitotic deposition of H4K20 methylation. **Genes & development**, v. 27, n. 6, p. 639–653, mar. 2013.
- STEENSMA, D. P. et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 126, n. 1, p. 9–16, 2 jul. 2015.
- SULTANI, G. et al. NAD⁺ : A key metabolic regulator with great therapeutic potential. **Journal of neuroendocrinology**, v. 29, n. 10, 1 out. 2017.
- SUN, J. et al. SIRT1 Activation Disrupts Maintenance of Myelodysplastic Syndrome Stem and Progenitor Cells by Restoring TET2 Function. **Cell Stem Cell**, v. 23, n. 3, p. 355–369.e9, 6 set. 2018.
- TASSELLI, L. et al. SIRT6 deacetylates H3K18ac at pericentric chromatin to prevent mitotic errors and cellular senescence. **Nature structural & molecular biology**, v. 23, n. 5, p. 434–440, 1 maio 2016.
- TOMASELLI, D. et al. Sirt4: A Multifaceted Enzyme at the Crossroads of Mitochondrial Metabolism and Cancer. **Frontiers in oncology**, v. 10, 15 abr. 2020.
- TORRENS-MAS, M. et al. SIRT3: Oncogene and Tumor Suppressor in Cancer. **Cancers**, v. 9, n. 7, p. 1–10, 12 jul. 2017.
- VALENT, P. ICUS, IDUS, CHIP and CCUS: Diagnostic Criteria, Separation from MDS and Clinical Implications. **Pathobiology**, v. 86, n. 1, p. 30–38, 2019.
- VAN DAMME, M. et al. HDAC isoenzyme expression is deregulated in chronic lymphocytic leukemia B-cells and has a complex prognostic significance. **Epigenetics**, v. 7, n. 12, p. 1403, 2012.
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. 1–12, 18 jun. 2002.
- VISCONTE, V.; TIU, R. V.; ROGERS, H. J. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. **Blood research**, v. 49, n. 4, p. 216, 2014.
- VOLPE, V. O.; GARCIA-MANERO, G.; KOMROKJI, R. S. SOHO State of the Art & Next Questions: Myelodysplastic Syndromes: A New Decade. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 22, n. 1, p. 1–16, jan. 2022.
- WALL, M. Recurrent Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1541, p. 209–222, 2017.

- WANG, H. [Introduction and interpretation of the updated contents of the International System for Human Cytogenomic Nomenclature]. **Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics**, v. 38, n. 12, p. 1165–1170, 10 dez. 2021.
- WANG, L. et al. Sirtuin 1 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in chronic myelogenous leukemia k562 cells through interacting with the Toll-like receptor 4-nuclear factor κ B-reactive oxygen species signaling axis. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 6 mar. 2020.
- WANG, P.; WANG, Z.; LIU, J. Role of HDACs in normal and malignant hematopoiesis. **Molecular Cancer** **2020 19:1**, v. 19, n. 1, p. 1–21, 7 jan. 2020.
- WANG, Y. et al. SIRT2: Controversy and multiple roles in disease and physiology. **Ageing research reviews**, v. 55, 1 nov. 2019.
- WĄTROBA, M. et al. Sirtuins, epigenetics and longevity. **Ageing Research Reviews**, v. 40, p. 11–19, 1 nov. 2017.
- WESSLING-RESNICK, M. Iron homeostasis and the inflammatory response. **Annual review of nutrition**, v. 30, p. 105–122, 21 ago. 2010.
- WILLEMS, E. et al. The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review. **Cell Division**, v. 13, n. 1, p. 7, 19 set. 2018.
- WOOD, E. M.; MCQUILTEN, Z. K. Outpatient transfusions for myelodysplastic syndromes. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2020, n. 1, p. 167–174, 1 dez. 2020.
- XIE, F. et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant molecular biology**, v. 80, n. 1, p. 75–84, set. 2012.
- XIE, Y. et al. Proteasome inhibitor induced SIRT1 deacetylates GLI2 to enhance hedgehog signaling activity and drug resistance in multiple myeloma. **Oncogene** **2019 39:4**, v. 39, n. 4, p. 922–934, 1 out. 2019.
- XU, Y. et al. NAMPT/SIRT2-mediated inhibition of the p53-p21 signaling pathway is indispensable for maintenance and hematopoietic differentiation of human iPS cells. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2021.
- YAMAKUCHI, M.; LOWENSTEIN, C. J. MiR-34, SIRT1, and p53: The feedback loop. **<http://dx.doi.org/10.4161/cc.8.5.7753>**, v. 8, n. 5, p. 712–715, 1 mar. 2009.
- YAN, D. et al. SIRT5 Is a Druggable Metabolic Vulnerability in Acute Myeloid Leukemia. **Blood Cancer Discovery**, v. 2, n. 3, p. 266–287, 1 maio 2021.
- YANG, J. et al. Sirt6 promotes tumorigenesis and drug resistance of diffuse large B-cell lymphoma by mediating PI3K/Akt signaling. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 39, n. 1, p. 1–16, 25 jul. 2020.
- YANG, L. et al. Sirtuin 5: a review of structure, known inhibitors and clues for developing new inhibitors. **Science China Life Sciences**, v. 60, n. 3, p. 249–256, 17 mar. 2017.
- YANG, X. J.; SETO, E. HATs and HDACs: From structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5310–5318, 13 ago. 2007.

YU, W. et al. Loss of SIRT3 Provides Growth Advantage for B Cell Malignancies. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 7, p. 3268, 12 fev. 2016.

YUAN, H. et al. Activation of stress response gene SIRT1 by BCR-ABL promotes leukemogenesis. **Blood**, v. 119, n. 8, p. 1904–1914, 23 fev. 2012.

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

ZHANG, C. Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control. **Protein & cell**, v. 5, n. 10, p. 750–760, 31 out. 2014.

ZHANG, W. et al. SIRT1 inhibition impairs non-homologous end joining DNA damage repair by increasing Ku70 acetylation in chronic myeloid leukemia cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 12, p. 13538–13550, 3 dez. 2015.

ZHAO, E. et al. The Roles of Sirtuin Family Proteins in Cancer Progression. **Cancers**, v. 11, n. 12, 1 dez. 2019.

APENDICES

APENDICE A - CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS E CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM SMD INCLUÍDOS NO ESTUDO.

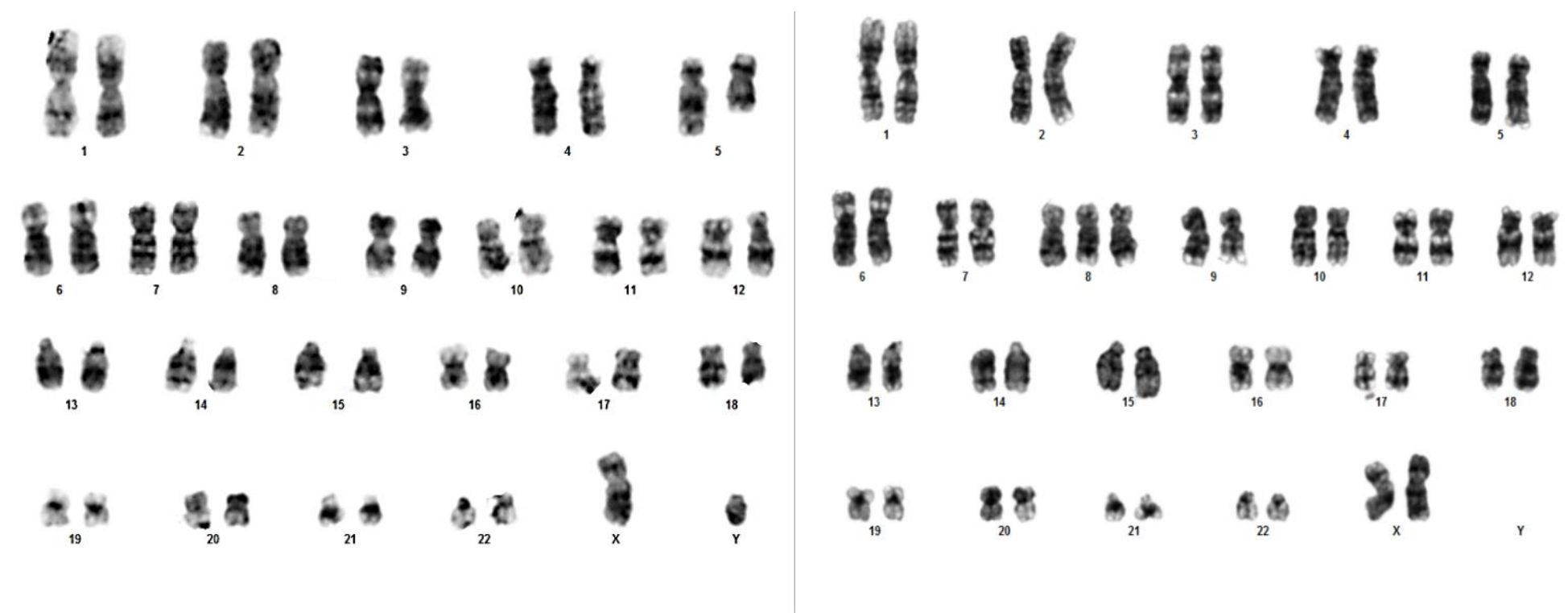
Paciente	Sexo	Idade	Celularidade	Cariótipo	WHO_2022	IPSS_R	Dep_transfusional	Evolução_LMA	Óbito
1	F	85	Hipercelular	46,XX,del(17)(q22q233)[3]/46,XX[22]	SMD-BB	Intermediário	Não	Não	Não
2	M	81	Hipocelular	46,XY[18]	SMD-h	Baixo	Não	Sim	-
3	F	93	-	46,XX,+8[12]/46,XX[8]	SMD-EB	Alto	-	-	-
4	F	45	Normocelular	46,XX[7]	SMD-BB-SA	Baixo	Não	Não	-
5	F	46	Hipercelular	46,XX[20]	SMD-BB	Baixo	Sim	Não	Não
6	F	25	Hipocelular	46,XX[10]	SMD-h	Intermediário	-	-	-
7	M	47	Normocelular	47,XY,+mar[5]/46,XY,del(5)(q31)[5]/46,XY[15]	SMD-Del5(q)	Baixo	Sim	Não	-
8	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,Xydel(X)(q21),t(5;19)(q13.2;q13.4),t(8;21)(q21.3;q22.12)[5]/46,XY[9]	SMD-EB	Muito Alto	Sim	Não	Sim
9	M	31	-	46,XY[24]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	-
10	M	58	Hipocelular	46,XY[13]	SMD-h	Intermediário	Não	Não	-
11	M	86	Hipocelular	46,XY[20]	SMD-BB-SA	Baixo	Sim	Não	Não
12	M	55	Hipercelular	45,XY,-7[15]/46,XY,-7,+mar[5]	SMD-EB	Muito Alto	Sim	Sim	Sim
13	M	58	Hipercelular	46,XY,del(5)(q32)[3]/46,XY,del(5)(q32),del(7)(q36)[3]/46,XY,5,+mar[9]/46,XY[7]	SMD-EB	Muito Alto	-	Não	-
14	F	65	Hipercelular	46,XX[20]	SMD-BB	Intermediário	Não	Não	-
15	M	81	Hipercelular	46,XY[18]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	Não
16	F	70	Hipercelular	Ausência de metáfase	SMD-BB-SA	-	Sim	Não	-
17	M	66	Hipercelular	46,XY[17]	SMD-BB-SA	Alto	Não	Não	-
18	M	62	Hipercelular	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2]	SMD-EB	Muito Alto	Sim	Não	-
19	F	44	Hipercelular	46,XX[20]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	Não
20	F	79	-	46,XX[12]	SMD-EB	Alto	Sim	Não	Sim
21	F	43	-	46,XX[20]	SMD-EB	Intermediário	Não	Não	Sim
22	M	60	Hipercelular	47,XY,+15[10]/46,XY[10]	SMD-BB-SA	Intermediário	Sim	Não	-
23	M	45	Hipocelular	47,XY,+mar[3]/46,XY[17]	SMD-h	Alto	Não	Não	-

24	M	69	Hipercelular	45,XY,del(3)(p22),del(4)(q21),-5,-6,-7,+add(16)(p13),add(20)(p13),+mar[20]	SMD-BB-SA	Muito Alto	Não	Não	Não
25	M	84	-	46,XY[20]	SMD-EB	Alto	Sim	Não	Sim
26	M	82	Hipercelular	Ausência de metáfase	SMD-BB-SA	-	Sim	Não	-
27	M	68	Hipercelular	Ausência de metáfase	SMD-EB	-	Sim	Sim	-
28	M	58	Hipercelular	46,XY[20]	SMD-BB	Alto	Sim	Sim	-
29	M	74	Hipercelular	Ausência de metáfase	SMD-BB-SA	-	Não	Não	-
30	F	66	Hipercelular	46,XX[7]	SMD-BB	Baixo	Sim	Não	-
31	F	45	Hipocelular	46,XX[20]	SMD-h	Intermediário	Não	Não	Não
32	F	80	Hipercelular	46,XX[20]	SMD-BB-SA	Baixo	Não	Não	Não
33	M	64	Hipercelular	46,XY[20]	SMD-f	Intermediário	Não	Não	Não
34	M	92	-	46,XY,del(5)(q32)[13]/46,XY[17]	SMD-Del5(q)	Baixo	Não	Não	Não
35	M	82	-	Ausência de metáfase	SMD-BB	-	Sim	Não	Sim
36	M	34	Hipocelular	46,XY[20]	SMD-h	Baixo	Sim	Não	Sim
37	M	76	Hipercelular	46,XY, del (5)(q31)[2]/46,XY, del(5)(q31)-7,+8[16]	SMD-EB	Muito Alto	Não	Não	Sim
38	M	75	Hipercelular	92,XXYY<4n>[4]/46,XY[8]	SMD-BB-SA	Alto	Não	Sim	Sim
39	M	81	Hipercelular	46 XY [20]	SMD-BB	Intermediário	Não	Sim	Sim
40	M	43	Hipercelular	46,XY[5]	SMD-BB	Baixo	Sim	Não	-
41	M	70	Hipercelular	46,XY,add(17)(p13)[8]/46,XY,del(9)(q13),add(17)(p13)[10]/46,XY[2]	SMD-EB	Muito Alto	Sim	Sim	Sim
42	M	82	Hipercelular	92,XXYY<4n>[5]/46,XY[15]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	-
43	M	85	-	92,XY[3]/46,XY[4]	SMD-BB-SA	Alto	Sim	Não	Não
44	M	88	Normocelular	46,XY[6]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	-
45	F	86	-	46,XX[20]	SMD-BB-SA	Intermediário	Não	Não	-
46	M	71	Hipercelular	46,XY[17]	SMD-BB-SA	Baixo	Não	-	-
47	F	71	Hipercelular	46,XX [10]	SMD-BB-SA	Baixo	Sim	Não	-
48	F	52	Hipercelular	46,XX[8]	SMD-BB	Baixo	Sim	Sim	-
49	F	86	Hipocelular	Ausência de metáfase	SMD-h		Sim	Não	
50	F	77	Hipercelular	46,XX[27]	SMD-EB	Alto	Sim	Não	
51	F	72	-	46,XX,inv(3)(q21q26.2)[16]/46,XX[4]	SMD-EB	Muito Alto	Sim	Não	Sim
52	F	72	-	Ausência de metáfase	SMD-EB		Sim	Não	

53	F	77	-	46,XX[20]	SMD-EB	Baixo	Não	Não	-
54	F	76	-	46,XX[20]	SMD-BB-SA	Baixo	Não	Não	-
55	F	82	-	47,XX,+8[9]/47,XX,+8,del(20)(q12)[5]/46,XX[6]	SMD-BB-SA	Intermediário	Sim	Não	Sim
56	F	62	Hipocelular	46,XX[10]	SMD-h	Baixo	Não	Não	-
57	F	53	Hipercelular	46,XX[20]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	-
58	F	60	Normocelular	Ausência de metáfase	SMD-BB	-	-	Não	-
59	F	84	-	47,XX,+8[20]	SMD-EB	Alto	Sim	Não	Sim
60	F	77	-	Ausência de metáfase	SMD-BB-SA	-	Sim	Não	-
61	F	84	Hipercelular	Ausência de metáfase	SMD-BB-SA	-	Não	Não	-
62	F	45	-	46,XX[20]	SMD-EB	Muito Alto	Sim	Não	-
63	F	81	Hipercelular	46,XX[5]	SMD-BB-SA	Baixo	Sim	Não	-
64	F	87	Hipercelular	46,XX,del(11)(q21)[16]/46,XX[4]	SMD-BB-SA	Baixo	Não	Não	Não
65	F	76	-	46,XX[15]	SMD-BB-SA	Baixo	Não	Não	-
66	F	91	-	46,XX[20]	SMD-EB	Alto	Não	Sim	Sim
67	F	84	-	46,XX[20]	SMD-EB	Intermediário	Não	Não	-
68	M	79	-	46,XY[20]	SMD-EB	Intermediário	Sim	-	-
69	M	87	-	46,XY[20]	SMD-BB	Muito Baixo	-	Não	-
70	M	72	Hipercelular	46,XY[20]	SMD-EB	Alto	Não	Não	Não
71	M	74	Normocelular	46,XY[11]	SMD-BB	Alto	Sim	Não	-
72	M	55	Normocelular	45,X,-Y[15]/45,X,-Y,del(5)(q32)[3]/46,XY[2]	SMD-EB	Muito Alto	-	-	Sim
73	F	63	-	92,XXXX<4n>[3]/46,XX[17]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	-
74	F	86	-	46,XX,del(5)(q14)[5]/46,XX[15]	SMD-EB	Muito Alto	Sim	-	Não
75	F	45	-	47,XX,+6[3]/46,XX[17]	SMD-BB	Intermediário	-	Não	-
76	F	48	-	46,XY[4]	SMD-BB	Baixo	Não	-	-
77	F	81	Hipercelular	46,XY[20]	SMD-EB	Alto	Não	-	-
78	F	61	-	46,XX[20]	SMD-BB	Baixo	Sim	Não	-
79	M	73	-	Ausência de Metáfases	SMD-EB	-	Sim	Não	Sim
80	M	71	Normocelular	46,XY[20]	SMD-BB-SA	Intermediário	Sim	Não	-

Legenda: M (Masculino), F (Feminino), SMD-Del5(q) (SMD com Deleção do braço longo do cromossomo 5 isolada), SMD-BB (SMD com baixo percentual de blastos), SMD-BB-SA (SMD com baixo percentual de blastos e sideroblastos em anel), SMD-EB (SMD com alto percentual de blastos), SMD-h (SMD Hipoplásica), SMD-f (SMD com Fibrose).- (não se aplica/dados não informados).

APENDICE B - Representação esquemática de resultados citogenéticos a partir de amostras de medula óssea de pacientes com SMD.



A. Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo normal 46,XX[20] de prognóstico favorável de acordo com a classificação do IPSS-R (GREENBERG et al., 2012). **B.** Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo 46,XX,+8[12]/46,XX[8] de prognóstico intermediário de acordo com a classificação do IPSS-R.

APÊNDICE C – ESTRATIFICAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE AS
EXPRESSÕES DA *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7* FRENTE ÀS
VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM SMD E GRUPO
CONTROLE.

AVALIAÇÃO CASO X CONTROLE						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	Caso	0,008142	0,000441	0,439585	0,006243	0,840
	Controle	0,006869	0,001709	0,038425	0,003826	
<i>SIRT2</i>	Caso	0,027910	0,005160	0,253332	0,004187	0,009
	Controle	0,047866	0,019648	0,167209	0,014887	
<i>SIRT3</i>	Caso	0,008008	0,001157	0,082292	0,001802	0,048
	Controle	0,011923	0,004734	0,263488	0,027829	
<i>SIRT4</i>	Caso	0,000222	0,000059	0,000865	0,000027	0,049
	Controle	0,000435	0,000241	0,001165	0,000122	
<i>SIRT5</i>	Caso	0,015717	0,002673	0,090543	0,002138	0,046
	Controle	0,030777	0,010466	0,099371	0,011313	
<i>SIRT6</i>	Caso	0,022146	0,002076	0,108094	0,002784	0,043
	Controle	0,042110	0,013634	0,446724	0,046107	
<i>SIRT7</i>	Caso	0,031094	0,004593	0,166402	0,003314	0,047
	Controle	0,074114	0,022492	0,248219	0,026203	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

SEXO						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	Feminino	0,008003	0,000441	0,150451	0,004048	0,430
	Masculino	0,008281	0,001473	0,439585	0,011829	
<i>SIRT2</i>	Feminino	0,026977	0,005160	0,124225	0,003866	0,220
	Masculino	0,027991	0,013394	0,253332	0,007449	
<i>SIRT3</i>	Feminino	0,006858	0,001157	0,070165	0,002352	0,970
	Masculino	0,008008	0,001900	0,050876	0,002067	
<i>SIRT4</i>	Feminino	0,000262	0,000066	0,000714	0,000035	0,413
	Masculino	0,000197	0,000059	0,000865	0,000042	
<i>SIRT5</i>	Feminino	0,017066	0,004772	0,085036	0,002839	0,267
	Masculino	0,014775	0,002673	0,074661	0,002637	
<i>SIRT6</i>	Feminino	0,024176	0,007204	0,102922	0,003610	0,783
	Masculino	0,020649	0,002076	0,108094	0,004269	
<i>SIRT7</i>	Feminino	0,031827	0,004593	0,116735	0,004062	0,689
	Masculino	0,030822	0,012104	0,120326	0,004034	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

IDADE - CATEGORIAZADA						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	≤ 60 anos	0,007939	0,000441	0,439585	0,020386	0,757
	> 60 anos	0,008154	0,000606	0,146963	0,002821	
<i>SIRT2</i>	≤ 60 anos	0,027364	0,005160	0,169687	0,007042	0,505
	> 60 anos	0,027910	0,009670	0,253332	0,005149	
<i>SIRT3</i>	≤ 60 anos	0,006690	0,001677	0,050876	0,002578	0,850
	> 60 anos	0,008114	0,001157	0,070165	0,001961	
<i>SIRT4</i>	≤ 60 anos	0,000161	0,000066	0,000704	0,000038	0,029
	> 60 anos	0,000255	0,000059	0,000865	0,000034	
<i>SIRT5</i>	≤ 60 anos	0,015152	0,004772	0,085036	0,003777	0,925
	> 60 anos	0,016080	0,002673	0,074661	0,002286	
<i>SIRT6</i>	≤ 60 anos	0,022146	0,008709	0,089916	0,004780	0,688
	> 60 anos	0,022857	0,002076	0,108094	0,003424	
<i>SIRT7</i>	≤ 60 anos	0,029062	0,011947	0,085264	0,004160	0,352
	> 60 anos	0,032110	0,004593	0,120326	0,003589	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

HEMOGLOBINA (IPSS-R)						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	≥ 10 g/dL	0,004675	0,000441	0,025025	0,002372	0,176
	8-10 g/dL	0,004931	0,002220	0,150451	0,005921	
	<8 g/dL	0,007985	0,000606	0,146963	0,011520	
<i>SIRT2</i>	≥ 10 g/dL	0,018314	0,013092	0,026987	0,004725	0,016
	8-10 g/dL	0,017556	0,005160	0,042039	0,004446	
	<8 g/dL	0,028617	0,013394	0,059396	0,006749	
<i>SIRT3</i>	≥ 10 g/dL	0,005091	0,001677	0,006063	0,004770	0,036
	8-10 g/dL	0,005814	0,001157	0,020647	0,002953	
	<8 g/dL	0,009302	0,003213	0,050876	0,001972	
<i>SIRT4</i>	≥ 10 g/dL	0,000151	0,000116	0,000348	0,000041	0,421
	8-10 g/dL	0,000176	0,000083	0,000621	0,000037	
	<8 g/dL	0,000255	0,000059	0,000865	0,000042	
<i>SIRT5</i>	≥ 10 g/dL	0,006618	0,004772	0,023174	0,005596	0,546
	8-10 g/dL	0,009506	0,002673	0,085036	0,004203	
	<8 g/dL	0,016538	0,003435	0,074661	0,002205	
<i>SIRT6</i>	≥ 10 g/dL	0,012281	0,006921	0,024720	0,009574	0,747
	8-10 g/dL	0,019712	0,002076	0,032649	0,003884	
	<8 g/dL	0,024832	0,010279	0,099804	0,003495	
<i>SIRT7</i>	≥ 10 g/dL	0,025152	0,011947	0,056015	0,008017	0,688
	8-10 g/dL	0,026541	0,018830	0,061662	0,002880	
	<8 g/dL	0,031094	0,012104	0,090156	0,004059	

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

ANC (IPSS-R)						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	< 800 mm ³	0,008269	0,000441	0,025025	0,001489	0,968
	≥ 800 mm ³	0,008015	0,001473	0,439585	0,008901	
<i>SIRT2</i>	< 800 mm ³	0,026296	0,013092	0,253332	0,009785	0,806
	≥ 800 mm ³	0,027991	0,005160	0,169687	0,004308	
<i>SIRT3</i>	< 800 mm ³	0,008744	0,001677	0,039457	0,002223	0,915
	≥ 800 mm ³	0,007111	0,001157	0,070165	0,002034	
<i>SIRT4</i>	< 800 mm ³	0,000229	0,000116	0,000766	0,000050	0,838
	≥ 800 mm ³	0,000215	0,000059	0,000865	0,000033	
<i>SIRT5</i>	< 800 mm ³	0,017408	0,002673	0,051501	0,002407	0,749
	≥ 800 mm ³	0,015201	0,003435	0,085036	0,002581	
<i>SIRT6</i>	< 800 mm ³	0,022114	0,006953	0,076040	0,004284	0,745
	≥ 800 mm ³	0,023632	0,002076	0,108094	0,003549	
<i>SIRT7</i>	< 800 mm ³	0,031827	0,004593	0,116735	0,005022	0,804
	≥ 800 mm ³	0,030137	0,012104	0,120326	0,003481	

‡Mann-Whitney: Valor estadísticamente signifiante para $p \leq 0,05$.

PLAQUETAS (IPSS-R)						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	≥ 100.000	0,008682	0,001473	0,060251	0,001869	0,990
	50.000 - <100.000	0,008294	0,000441	0,146963	0,007426	
	< 50.000	0,007800	0,001567	0,439585	0,018707	
<i>SIRT2</i>	≥ 100.000	0,030345	0,012582	0,139999	0,005175	0,289
	50.000 - <100.000	0,026196	0,009670	0,067745	0,002861	
	< 50.000	0,028331	0,005160	0,253332	0,010766	
<i>SIRT3</i>	≥ 100.000	0,009809	0,001157	0,070165	0,002474	0,226
	50.000 - <100.000	0,005814	0,001677	0,054267	0,003414	
	< 50.000	0,009142	0,003213	0,050876	0,002401	
<i>SIRT4</i>	≥ 100.000	0,000208	0,000067	0,000714	0,000039	0,882
	50.000 - <100.000	0,000214	0,000091	0,000865	0,000059	
	< 50.000	0,000274	0,000059	0,000766	0,000050	
<i>SIRT5</i>	≥ 100.000	0,016916	0,003435	0,048048	0,002078	0,326
	50.000 - <100.000	0,010770	0,002673	0,074661	0,004555	
	< 50.000	0,017066	0,004427	0,085036	0,004189	
<i>SIRT6</i>	≥ 100.000	0,025801	0,002076	0,108094	0,003994	0,237
	50.000 - <100.000	0,018559	0,006921	0,102922	0,006235	
	< 50.000	0,024177	0,010279	0,089916	0,004934	
<i>SIRT7</i>	≥ 100.000	0,037890	0,012104	0,120326	0,004443	0,210
	50.000 - <100.000	0,023052	0,011947	0,090156	0,005961	
	< 50.000	0,030176	0,004593	0,116735	0,004695	

‡Kruskal-Wallis: Valor estadísticamente signifiante para $p \leq 0,05$.

DISERITROPOESE						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	Ausência	0,008243	0,000441	0,025025	0,002424	0,690
	Presença	0,008142	0,000606	0,439585	0,007175	
<i>SIRT2</i>	Ausência	0,031680	0,013624	0,047708	0,003414	0,546
	Presença	0,027350	0,005160	0,253332	0,004764	
<i>SIRT3</i>	Ausência	0,007500	0,001677	0,030721	0,003118	0,924
	Presença	0,007747	0,001157	0,070165	0,001754	
<i>SIRT4</i>	Ausência	0,000171	0,000059	0,000349	0,000032	0,036
	Presença	0,000263	0,000067	0,000865	0,000031	
<i>SIRT5</i>	Ausência	0,018330	0,004427	0,031271	0,003284	0,825
	Presença	0,015201	0,002673	0,085036	0,002191	
<i>SIRT6</i>	Ausência	0,021533	0,006921	0,076040	0,007197	0,532
	Presença	0,022146	0,002076	0,108094	0,003037	
<i>SIRT7</i>	Ausência	0,037480	0,011947	0,085264	0,007524	0,660
	Presença	0,030958	0,004593	0,120326	0,003095	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

DISGRANULOPOESE						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	Ausência	0,009556	0,000606	0,146963	0,004160	0,197
	Presença	0,007272	0,000441	0,439585	0,011307	
<i>SIRT2</i>	Ausência	0,029867	0,012582	0,139999	0,004784	0,035
	Presença	0,026397	0,005160	0,253332	0,006776	
<i>SIRT3</i>	Ausência	0,009480	0,001157	0,070165	0,002587	0,421
	Presença	0,006736	0,001677	0,050876	0,001748	
<i>SIRT4</i>	Ausência	0,000301	0,000059	0,000865	0,000043	0,035
	Presença	0,000202	0,000066	0,000714	0,000034	
<i>SIRT5</i>	Ausência	0,016802	0,002673	0,074661	0,002930	0,650
	Presença	0,014682	0,004772	0,085036	0,002599	
<i>SIRT6</i>	Ausência	0,022114	0,002076	0,108094	0,004979	0,930
	Presença	0,023632	0,008709	0,089916	0,002871	
<i>SIRT7</i>	Ausência	0,035794	0,004593	0,120326	0,004204	0,037
	Presença	0,028924	0,011947	0,116735	0,003848	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

DISMEGACARIOPOESE						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	Ausência	0,006935	0,000441	0,060251	0,001879	0,027
	Presença	0,008682	0,001567	0,439585	0,010381	
<i>SIRT2</i>	Ausência	0,027911	0,012582	0,253332	0,008447	0,968
	Presença	0,027910	0,005160	0,169687	0,004091	
<i>SIRT3</i>	Ausência	0,008406	0,001157	0,070165	0,003096	0,545
	Presença	0,007172	0,001677	0,047977	0,001577	
<i>SIRT4</i>	Ausência	0,000255	0,000066	0,000714	0,000041	0,786
	Presença	0,000214	0,000059	0,000865	0,000037	
<i>SIRT5</i>	Ausência	0,012788	0,003435	0,069340	0,002783	0,233
	Presença	0,016535	0,002673	0,085036	0,002620	
<i>SIRT6</i>	Ausência	0,023433	0,002076	0,102922	0,003517	0,901
	Presença	0,020649	0,006921	0,108094	0,003948	
<i>SIRT7</i>	Ausência	0,031094	0,011947	0,111124	0,003889	0,940
	Presença	0,030137	0,004593	0,120326	0,003931	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

SIDEROBLASTOS EM ANEL						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	Ausência	0,007797	0,000441	0,439585	0,008713	0,342
	Presença	0,009303	0,000606	0,146963	0,006124	
<i>SIRT2</i>	Ausência	0,027630	0,005160	0,253332	0,005550	1,000
	Presença	0,028471	0,012582	0,139999	0,005709	
<i>SIRT3</i>	Ausência	0,006858	0,003213	0,054267	0,001584	0,949
	Presença	0,008220	0,001157	0,070165	0,003626	
<i>SIRT4</i>	Ausência	0,000214	0,000059	0,000766	0,000027	0,043
	Presença	0,000382	0,000091	0,000865	0,000057	
<i>SIRT5</i>	Ausência	0,015201	0,004427	0,085036	0,002333	0,981
	Presença	0,016125	0,002673	0,074661	0,003609	
<i>SIRT6</i>	Ausência	0,022146	0,002076	0,108094	0,003559	0,556
	Presença	0,022502	0,006953	0,099804	0,004138	
<i>SIRT7</i>	Ausência	0,031460	0,004593	0,120326	0,003364	0,557
	Presença	0,028756	0,012104	0,111124	0,005427	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

CELULARIDADE						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
SIRT1	Hipocelular	0,006020	0,002220	0,439585	0,047965	0,669
	Normocelular	0,012577	0,003153	0,025025	0,002764	
	Hipercelular	0,008015	0,001567	0,150451	0,005980	
SIRT2	Hipocelular	0,028032	0,013573	0,169687	0,016280	0,959
	Normocelular	0,033859	0,013834	0,059396	0,006344	
	Hipercelular	0,028243	0,005160	0,139999	0,004673	
SIRT3	Hipocelular	0,005721	0,003439	0,021022	0,002118	0,348
	Normocelular	0,005798	0,001677	0,050876	0,006911	
	Hipercelular	0,008804	0,002319	0,070165	0,002697	
SIRT4	Hipocelular	0,000247	0,000145	0,000542	0,000095	0,943
	Normocelular	0,000243	0,000160	0,000274	0,000028	
	Hipercelular	0,000202	0,000059	0,000865	0,000047	
SIRT5	Hipocelular	0,013376	0,003435	0,030850	0,003340	0,612
	Normocelular	0,018193	0,006521	0,026928	0,002408	
	Hipercelular	0,014249	0,002673	0,085036	0,003635	
SIRT6	Hipocelular	0,020617	0,010708	0,089916	0,008517	0,935
	Normocelular	0,017315	0,008709	0,067433	0,008638	
	Hipercelular	0,021373	0,006921	0,108094	0,004619	
SIRT7	Hipocelular	0,026718	0,016958	0,085264	0,010025	0,773
	Normocelular	0,021615	0,012138	0,047478	0,005049	
	Hipercelular	0,028756	0,004593	0,120326	0,004057	

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

FIBROSE						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
SIRT1	Ausência	0,008142	0,001567	0,146963	0,003594	0,206
	Presença	0,009994	0,004931	0,439585	0,048360	
SIRT2	Ausência	0,028331	0,013092	0,107626	0,003002	0,990
	Presença	0,028032	0,005160	0,169687	0,019779	
SIRT3	Ausência	0,008580	0,001677	0,070165	0,002428	0,333
	Presença	0,005260	0,001900	0,036262	0,004396	
SIRT4	Ausência	0,000213	0,000059	0,000865	0,000040	0,756
	Presença	0,000230	0,000115	0,000697	0,000131	
SIRT5	Ausência	0,015152	0,002673	0,074661	0,002365	0,524
	Presença	0,019048	0,006521	0,085036	0,009556	
SIRT6	Ausência	0,020617	0,006921	0,108094	0,003991	0,213
	Presença	0,029137	0,016411	0,089916	0,008745	
SIRT7	Ausência	0,026473	0,004593	0,120326	0,003631	0,531
	Presença	0,029531	0,018933	0,082994	0,008287	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

PERCENTUAL DE BLASTOS (IPSS-R)						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	≤2%	0,008269	0,000441	0,439585	0,014176	0,542
	>2% - <5%	0,009874	0,002220	0,032088	0,002119	
	5% - 10%	0,007985	0,002859	0,021234	0,001295	
	>10%	0,006634	0,002993	0,021591	0,001727	
<i>SIRT2</i>	≤2%	0,027910	0,005160	0,169687	0,006406	0,669
	>2% - <5%	0,027318	0,013394	0,067018	0,003736	
	5% - 10%	0,026196	0,009670	0,046183	0,002671	
	>10%	0,033501	0,013092	0,253332	0,017630	
<i>SIRT3</i>	≤2%	0,009566	0,001157	0,070165	0,002804	0,706
	>2% - <5%	0,006221	0,001677	0,039457	0,003331	
	5% - 10%	0,006858	0,001900	0,021397	0,001210	
	>10%	0,008008	0,003213	0,050876	0,004212	
<i>SIRT4</i>	≤2%	0,000283	0,000067	0,000865	0,000044	0,448
	>2% - <5%	0,000213	0,000059	0,000714	0,000080	
	5% - 10%	0,000179	0,000103	0,000329	0,000020	
	>10%	0,000273	0,000066	0,000766	0,000065	
<i>SIRT5</i>	≤2%	0,014588	0,003435	0,085036	0,003591	0,694
	>2% - <5%	0,015717	0,004427	0,047907	0,003049	
	5% - 10%	0,013432	0,002673	0,051671	0,003536	
	>10%	0,017783	0,006618	0,051501	0,003639	
<i>SIRT6</i>	≤2%	0,020546	0,002076	0,102922	0,004816	0,903
	>2% - <5%	0,024210	0,008709	0,108094	0,006628	
	5% - 10%	0,027815	0,006953	0,087042	0,005567	
	>10%	0,021158	0,010279	0,056358	0,004313	
<i>SIRT7</i>	≤2%	0,030137	0,004593	0,085264	0,003477	0,665
	>2% - <5%	0,028453	0,012138	0,120326	0,009723	
	5% - 10%	0,035142	0,018933	0,082994	0,004235	
	>10%	0,035794	0,018830	0,116735	0,008076	

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

CARIÓTIPO (QUANTO A PRESENÇA DE ANORMALIDADES)						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	Normal	0,007778	0,000441	0,439585	0,010801	0,810
	Alterado	0,007602	0,001473	0,017503	0,000925	
<i>SIRT2</i>	Normal	0,024834	0,005160	0,169687	0,005040	0,045
	Alterado	0,031232	0,016472	0,077687	0,003536	
<i>SIRT3</i>	Normal	0,005843	0,001157	0,036262	0,001379	0,033
	Alterado	0,009809	0,002570	0,054267	0,003010	
<i>SIRT4</i>	Normal	0,000202	0,000059	0,000714	0,000028	0,200
	Alterado	0,000274	0,000083	0,000766	0,000061	
<i>SIRT5</i>	Normal	0,014249	0,002673	0,085036	0,002396	0,515
	Alterado	0,015782	0,005848	0,069340	0,003775	
<i>SIRT6</i>	Normal	0,021373	0,002076	0,108094	0,003509	0,534
	Alterado	0,022146	0,006921	0,102922	0,005062	
<i>SIRT7</i>	Normal	0,029227	0,004593	0,120326	0,003806	0,149
	Alterado	0,032994	0,012714	0,116735	0,005143	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

CARIÓTIPO (NORMAL X ALTERADO X CONTROLE)						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	Normal	0.007778	0.000441	0.439585	0,010801	0,885
	Alterado	0.007602	0.001473	0.017503	0,000925	
	Controle	0.006869	0.001709	0.038425	0,003826	
<i>SIRT2</i>	Normal	0.023471	0.005160	0.169687	0,004499	0,004
	Alterado	0.031232	0.016472	0.077687	0,003536	
	Controle	0.047866	0.019648	0.167209	0,014887	
<i>SIRT3</i>	Normal	0.005814	0.001157	0.033753	0,001229	0,005
	Alterado	0.009809	0.002570	0.054267	0,003010	
	Controle	0.011923	0.004734	0.263488	0,027829	
<i>SIRT4</i>	Normal	0.000202	0.000059	0.000714	0,000028	0,033
	Alterado	0.000274	0.000083	0.000766	0,000061	
	Controle	0.000435	0.000241	0.001165	0,000122	
<i>SIRT5</i>	Normal	0.014249	0.002673	0.085036	0,002396	0,087
	Alterado	0.015782	0.005848	0.069340	0,003775	
	Controle	0.030777	0.010466	0.099371	0,011313	
<i>SIRT6</i>	Normal	0.021266	0.002076	0.089916	0,002956	0,075
	Alterado	0.022146	0.006921	0.102922	0,005062	
	Controle	0.042110	0.013634	0.446724	0,046107	
<i>SIRT7</i>	Normal	0.028924	0.004593	0.111124	0,003202	0,073
	Alterado	0.032994	0.012714	0.116735	0,005143	
	Controle	0.048672	0.022492	0.248219	0,026203	

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

CARIÓTIPO (QUANTO A PRESENÇA DE CARIÓTIPO COMPLEXO)						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	Presença	0,008457	0,004587	0,011539	0,001556	0,955
	Ausência	0,008142	0,000441	0,439585	0,006585	
<i>SIRT2</i>	Presença	0,036656	0,016472	0,077687	0,012853	0,404
	Ausência	0,027350	0,005160	0,253332	0,004370	
<i>SIRT3</i>	Presença	0,016616	0,007486	0,025674	0,005015	0,192
	Ausência	0,006797	0,001157	0,070165	0,001637	
<i>SIRT4</i>	Presença	0,000439	0,000181	0,000697	0,000258	0,469
	Ausência	0,000222	0,000059	0,000865	0,000027	
<i>SIRT5</i>	Presença	0,015847	0,006949	0,016533	0,003087	0,584
	Ausência	0,015628	0,002673	0,085036	0,002018	
<i>SIRT6</i>	Presença	0,030161	0,013703	0,044562	0,006379	0,535
	Ausência	0,022082	0,002076	0,108094	0,002928	
<i>SIRT7</i>	Presença	0,027375	0,024304	0,048358	0,007558	0,916
	Ausência	0,031094	0,004593	0,120326	0,002955	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

CARIÓTIPO (CLASSIFICAÇÃO DE RISCO – IPSS-R)						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor[‡]
SIRT1	Favorável	0,007778	0,000441	0,439585	0,009876	0,999
	Intermediário	0,008269	0,002262	0,017503	0,001279	
	Desfavorável	0,007663	0,002993	0,012332	0,004669	
	Muito desfavorável.	0,008457	0,004587	0,011539	0,001556	
SIRT2	Favorável	0,026305	0,005160	0,169687	0,004707	0,749
	Intermediário	0,027350	0,016862	0,067745	0,003870	
	Desfavorável	0,034375	0,022568	0,046183	0,011808	
	Muito desfavorável.	0,036656	0,016472	0,077687	0,012853	
SIRT3	Favorável	0,005829	0,001157	0,050876	0,001601	0,097
	Intermediário	0,009809	0,005739	0,054267	0,003547	
	Desfavorável	0,007614	0,005282	0,009946	0,002332	
	Muito desfavorável.	0,016616	0,007486	0,025674	0,005015	
SIRT4	Favorável	0,000213	0,000059	0,000714	0,000027	0,569
	Intermediário	0,000163	0,000083	0,000766	0,000086	
	Desfavorável	-	-	-	-	
	Muito desfavorável.	0,000439	0,000181	0,000697	0,000258	
SIRT5	Favorável	0,014588	0,002673	0,085036	0,002309	0,858
	Intermediário	0,016538	0,005848	0,069340	0,005689	
	Desfavorável	0,011891	0,010350	0,013432	0,001541	
	Muito desfavorável.	0,015847	0,006949	0,016533	0,003087	
SIRT6	Favorável	0,021728	0,002076	0,108094	0,003340	0,537
	Intermediário	0,019712	0,006921	0,102922	0,008220	
	Desfavorável	0,014675	0,007204	0,022146	0,007471	
	Muito desfavorável.	0,030161	0,013703	0,044562	0,006379	
SIRT7	Favorável	0,029834	0,004593	0,120326	0,003950	0,720
	Intermediário	0,037259	0,012714	0,090156	0,006319	
	Desfavorável	0,029846	0,027298	0,032394	0,002548	
	Muito desfavorável.	0,027375	0,024304	0,048358	0,007558	

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

DEPENDÊNCIA TRANSFUSIONAL						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor[‡]
SIRT1	Sim	0,008349	0,000606	0,021591	0,000956	0,829
	Não	0,009179	0,000441	0,439585	0,012649	
SIRT2	Sim	0,029001	0,013394	0,253332	0,007130	0,235
	Não	0,026397	0,005160	0,169687	0,005856	
SIRT3	Sim	0,008114	0,001900	0,036262	0,001403	0,679
	Não	0,006550	0,001157	0,070165	0,002941	
SIRT4	Sim	0,000273	0,000066	0,000766	0,000038	0,365
	Não	0,000176	0,000059	0,000865	0,000044	
SIRT5	Sim	0,016538	0,003435	0,051501	0,001775	0,264
	Não	0,011574	0,002673	0,085036	0,003908	
SIRT6	Sim	0,020184	0,007204	0,057576	0,002228	0,441
	Não	0,025801	0,006921	0,108094	0,004962	
SIRT7	Sim	0,030137	0,012104	0,116735	0,004247	0,684
	Não	0,031460	0,004593	0,120326	0,004669	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

EVOLUÇÃO PARA LMA						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	Sim	0,007458	0,002993	0,021591	0,002207	0,481
	Não	0,009379	0,000606	0,439585	0,007864	
<i>SIRT2</i>	Sim	0,023020	0,013394	0,035799	0,002958	0,136
	Não	0,028032	0,005160	0,253332	0,004866	
<i>SIRT3</i>	Sim	0,008008	0,003439	0,016593	0,001607	0,509
	Não	0,007486	0,001157	0,070165	0,001814	
<i>SIRT4</i>	Sim	0,000187	0,000059	0,000704	0,000072	0,254
	Não	0,000255	0,000066	0,000865	0,000032	
<i>SIRT5</i>	Sim	0,013056	0,004427	0,051671	0,004743	0,620
	Não	0,015782	0,002673	0,085036	0,002221	
<i>SIRT6</i>	Sim	0,020764	0,010279	0,032649	0,002943	0,451
	Não	0,024720	0,002076	0,108094	0,003200	
<i>SIRT7</i>	Sim	0,029562	0,018917	0,042575	0,003289	0,510
	Não	0,030822	0,004593	0,120326	0,003197	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

ÓBITO						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	Sim	0,009621	0,002993	0,016108	0,001027	0,294
	Não	0,006478	0,001473	0,032088	0,002222	
<i>SIRT2</i>	Sim	0,029875	0,014070	0,253332	0,013499	0,444
	Não	0,027984	0,014875	0,067018	0,004463	
<i>SIRT3</i>	Sim	0,009820	0,003678	0,050876	0,002924	0,280
	Não	0,006690	0,002570	0,039457	0,003259	
<i>SIRT4</i>	Sim	0,000273	0,000059	0,000493	0,000037	0,740
	Não	0,000170	0,000108	0,000697	0,000067	
<i>SIRT5</i>	Sim	0,014775	0,004427	0,051671	0,003012	0,294
	Não	0,010705	0,003435	0,051501	0,004432	
<i>SIRT6</i>	Sim	0,022146	0,007204	0,056358	0,003820	0,964
	Não	0,020617	0,014402	0,108094	0,007880	
<i>SIRT7</i>	Sim	0,032397	0,016757	0,085264	0,004762	0,541
	Não	0,036455	0,018479	0,120326	0,009496	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

CLASSIFICAÇÃO WHO 2022						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
SIRT1	SMD-Del5(q)	0.008923	0.001473	0.016373	0,007450	0,824
	SMD-BB	0.009379	0.000441	0.150451	0,007237	
	SMD-BB-SA	0.009924	0.000606	0.146963	0,006956	
	SMD-EB	0.006634	0.002859	0.021591	0,001116	
	SMD-h	0.007004	0.002220	0.439585	0,053920	
SIRT2	SMD-Del5(q)	0.028277	0.017183	0.039371	0,011094	0,962
	SMD-BB	0.026987	0.005160	0.124225	0,005954	
	SMD-BB-SA	0.028471	0.012582	0.107626	0,006387	
	SMD-EB	0.029001	0.009670	0.253332	0,009872	
	SMD-h	0.027214	0.013573	0.169687	0,018400	
SIRT3	SMD-Del5(q)	0.004184	0.002570	0.005798	0,001614	0,658
	SMD-BB	0.006209	0.003214	0.054267	0,002997	
	SMD-BB-SA	0.011615	0.001157	0.070165	0,004058	
	SMD-EB	0.008356	0.003213	0.050876	0,002204	
	SMD-h	0.006736	0.003439	0.021022	0,002359	
SIRT4	SMD-Del5(q)	-	-	-	-	0,398
	SMD-BB	0.000161	0.000059	0.000704	0,000050	
	SMD-BB-SA	0.000382	0.000091	0.000865	0,000057	
	SMD-EB	0.000229	0.000066	0.000766	0,000038	
	SMD-h	0.000146	0.000145	0.000349	0,000068	
SIRT5	SMD-Del5(q)	0.013224	0.010731	0.015717	0,002493	0,948
	SMD-BB	0.016096	0.004427	0.085036	0,004692	
	SMD-BB-SA	0.016538	0.002673	0.074661	0,004153	
	SMD-EB	0.015847	0.005012	0.051501	0,002647	
	SMD-h	0.014588	0.005107	0.030850	0,003358	
SIRT6	SMD-Del5(q)	0.022227	0.017315	0.027139	0,004912	0,922
	SMD-BB	0.017378	0.002076	0.102922	0,006660	
	SMD-BB-SA	0.023632	0.006953	0.099804	0,004729	
	SMD-EB	0.025496	0.007204	0.087042	0,004526	
	SMD-h	0.024513	0.010708	0.089916	0,009463	
SIRT7	SMD-Del5(q)	0.026050	0.019106	0.032994	0,006944	0,662
	SMD-BB	0.027871	0.004593	0.076461	0,005693	
	SMD-BB-SA	0.030137	0.012104	0.111124	0,006183	
	SMD-EB	0.036527	0.018830	0.116735	0,004526	
	SMD-h	0.029531	0.016958	0.085264	0,011084	

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

AVALIAÇÃO (SMD-BB X CONTROLE)						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
SIRT1	Caso	0.009379	0.000441	0.150451	0,007237	0,779
	Controle	0.006869	0.001709	0.038425	0,003826	
SIRT2	Caso	0.026987	0.005160	0.124225	0,005954	0,039
	Controle	0.047866	0.019648	0.167209	0,014887	
SIRT3	Caso	0.006209	0.003214	0.054267	0,003021	0,037
	Controle	0.011923	0.004734	0.263488	0,027829	
SIRT4	Caso	0.000161	0.000059	0.000704	0,000050	0,032
	Controle	0.000435	0.000241	0.001165	0,000122	
SIRT5	Caso	0.016096	0.004427	0.085036	0,004692	0,113
	Controle	0.030777	0.010466	0.099371	0,011313	
SIRT6	Caso	0.017378	0.002076	0.102922	0,005765	0,044
	Controle	0.042110	0.013634	0.446724	0,046107	
SIRT7	Caso	0.027871	0.004593	0.076461	0,004045	0,038
	Controle	0.048672	0.022492	0.248219	0,026203	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

AVALIAÇÃO (SMD-BB-SA X CONTROLE)						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	Caso	0.009924	0.000606	0.146963	0,006956	0,633
	Controle	0.006869	0.001709	0.038425	0,003826	
<i>SIRT2</i>	Caso	0.028471	0.012582	0.107626	0,004243	0,054
	Controle	0.047866	0.019648	0.167209	0,014887	
<i>SIRT3</i>	Caso	0.011615	0.001157	0.070165	0,004058	0,234
	Controle	0.011923	0.004734	0.263488	0,027829	
<i>SIRT4</i>	Caso	0.000382	0.000091	0.000865	0,000057	0,615
	Controle	0.000435	0.000241	0.001165	0,000122	
<i>SIRT5</i>	Caso	0.016538	0.002673	0.074661	0,004153	0,129
	Controle	0.030777	0.010466	0.099371	0,011313	
<i>SIRT6</i>	Caso	0.023632	0.006953	0.099804	0,004729	0,054
	Controle	0.042110	0.013634	0.446724	0,046107	
<i>SIRT7</i>	Caso	0.030137	0.012104	0.111124	0,006183	0,084
	Controle	0.048672	0.022492	0.248219	0,026203	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

AVALIAÇÃO (SMD-EB X CONTROLE)						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	Caso	0.006634	0.002859	0.021591	0,001090	0,642
	Controle	0.006869	0.001709	0.038425	0,003826	
<i>SIRT2</i>	Caso	0.029001	0.009670	0.253332	0,009473	0,038
	Controle	0.047866	0.019648	0.167209	0,014887	
<i>SIRT3</i>	Caso	0.008356	0.003213	0.050876	0,002112	0,041
	Controle	0.011923	0.004734	0.263488	0,027829	
<i>SIRT4</i>	Caso	0.000229	0.000066	0.000766	0,000037	0,018
	Controle	0.000435	0.000241	0.001165	0,000122	
<i>SIRT5</i>	Caso	0.015847	0.005012	0.051501	0,002529	0,046
	Controle	0.030777	0.010466	0.099371	0,011313	
<i>SIRT6</i>	Caso	0.025496	0.007204	0.087042	0,004351	0,188
	Controle	0.042110	0.013634	0.446724	0,046107	
<i>SIRT7</i>	Caso	0.036527	0.018830	0.116735	0,004316	0,142
	Controle	0.048672	0.022492	0.248219	0,026203	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

AVALIAÇÃO (SMD-h X CONTROLE)						
Gene	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor [‡]
<i>SIRT1</i>	Caso	0.007004	0.002220	0.439585	0,053920	1,000
	Controle	0.006869	0.001709	0.038425	0,003826	
<i>SIRT2</i>	Caso	0.027214	0.013573	0.169687	0,018400	0,101
	Controle	0.047866	0.019648	0.167209	0,014887	
<i>SIRT3</i>	Caso	0.006736	0.003439	0.021022	0,002359	0,056
	Controle	0.011923	0.004734	0.263488	0,027829	
<i>SIRT4</i>	Caso	0.000146	0.000145	0.000349	0,000068	0,117
	Controle	0.000435	0.000241	0.001165	0,000122	
<i>SIRT5</i>	Caso	0.014588	0.005107	0.030850	0,003358	0,142
	Controle	0.030777	0.010466	0.099371	0,011313	
<i>SIRT6</i>	Caso	0.024513	0.010708	0.089916	0,009463	0,236
	Controle	0.042110	0.013634	0.446724	0,046107	
<i>SIRT7</i>	Caso	0.029531	0.016958	0.085264	0,011084	0,232
	Controle	0.048672	0.022492	0.248219	0,026203	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

APÊNDICE D – ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN ENTRE SIRT5 E
ENTRE SMD GERAL E SUBTIPOS DA OMS 2022 (p-Valor).

	<i>SIRT1</i>	<i>SIRT2</i>	<i>SIRT3</i>	<i>SIRT4</i>	<i>SIRT5</i>	<i>SIRT6</i>	<i>SIRT7</i>
<i>SIRT1</i>	-	0.000	0.005	0.031	0.000	0.023	0.001
<i>SIRT2</i>	0.000	-	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000
<i>SIRT3</i>	0.005	0.000	-	0.021	0.000	0.000	0.000
<i>SIRT4</i>	0.031	0.019	0.021	-	0.107	0.028	0.075
<i>SIRT5</i>	0.000	0.000	0.000	0.107	-	0.000	0.000
<i>SIRT6</i>	0.023	0.000	0.000	0.028	0.000	-	0.000
<i>SIRT7</i>	0.001	0.000	0.000	0.075	0.000	0.000	-

Legenda: Representação das análises de correlação de Spearman (p-Valor) entre os genes *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7* frente a seus níveis de expressão gênica dos pacientes com SMD realizada no software SPSS.

	<i>SIRT1</i>	<i>SIRT2</i>	<i>SIRT3</i>	<i>SIRT4</i>	<i>SIRT5</i>	<i>SIRT6</i>	<i>SIRT7</i>
<i>SIRT1</i>	-	0.132	0.480	0.584	0.001	0.091	0.035
<i>SIRT2</i>	0.132	-	0.000	0.830	0.041	0.240	0.120
<i>SIRT3</i>	0.480	0.000	-	0.437	0.010	0.091	0.063
<i>SIRT4</i>	0.584	0.830	0.437	-	0.289	0.771	0.315
<i>SIRT5</i>	0.001	0.041	0.010	0.289	-	0.005	0.082
<i>SIRT6</i>	0.091	0.240	0.091	0.771	0.005	-	0.548
<i>SIRT7</i>	0.035	0.120	0.063	0.315	0.082	0.548	-

Legenda: Representação das análises de correlação de Spearman (p-Valor) entre os genes *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7* frente a seus níveis de expressão gênica dos pacientes com SMD-BB realizada no software SPSS.

	<i>SIRT1</i>	<i>SIRT2</i>	<i>SIRT3</i>	<i>SIRT4</i>	<i>SIRT5</i>	<i>SIRT6</i>	<i>SIRT7</i>
<i>SIRT1</i>	-	0.470	0.297	0.381	0.017	0.348	0.060
<i>SIRT2</i>	0.470	-	0.002	0.381	0.642	0.408	0.825
<i>SIRT3</i>	0.297	0.002	-	0.076	0.276	0.007	0.284
<i>SIRT4</i>	0.381	0.381	0.076	-	0.535	0.017	0.226
<i>SIRT5</i>	0.017	0.642	0.276	0.535	-	0.002	0.341
<i>SIRT6</i>	0.348	0.408	0.007	0.017	0.002	-	0.035
<i>SIRT7</i>	0.060	0.825	0.284	0.226	0.341	0.035	-

Legenda: Representação das análises de correlação de Spearman (p-Valor) entre os genes *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7* frente a seus níveis de expressão gênica dos pacientes com SMD-SA-BB realizada no software SPSS.

	SIRT1	SIRT2	SIRT3	SIRT4	SIRT5	SIRT6	SIRT7
SIRT1	-	0,071	0,337	-	0,036	0,183	0,180
SIRT2	0,071	-	0,052	0,667	0,052	0,071	0,148
SIRT3	0,337	0,052	-	0,667	0,294	0,702	0,337
SIRT4	-	0,667	0,667	-	0,667	0,667	0,667
SIRT5	0,036	0,052	0,294	0,667	-	0,036	0,014
SIRT6	0,183	0,071	0,702	0,667	0,036	-	0,023
SIRT7	0,180	0,148	0,337	0,667	0,014	0,023	-

Legenda: Representação das análises de correlação de Spearman (p-Valor) entre os genes *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7* frente a seus níveis de expressão gênica dos pacientes com SMD-h realizada no software SPSS.

	SIRT1	SIRT2	SIRT3	SIRT4	SIRT5	SIRT6	SIRT7
SIRT1	-	0.042	0.058	0.375	0.252	0.533	0.408
SIRT2	0.042	-	0.003	0.450	0.003	0.113	0.000
SIRT3	0.058	0.003	-	0.681	0.010	0.191	0.286
SIRT4	0.375	0.450	0.681	-	0.989	0.743	0.932
SIRT5	0.252	0.003	0.010	0.989	-	0.027	0.028
SIRT6	0.533	0.113	0.191	0.743	0.027	-	0.039
SIRT7	0.408	0.000	0.286	0.932	0.028	0.039	-

Legenda: Representação das análises de correlação de Spearman (p-Valor) entre os genes *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* e *SIRT7* frente a seus níveis de expressão gênica dos pacientes com SMD-EB realizada no software SPSS.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DE DEACETILAÇÃO DE HISTONAS MEDIADAS POR SIRTUINAS NA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Pesquisador: JOAO VITOR CAETANO GOES

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 3

CAAE: 41822320.9.0000.5054

Instituição Proponente: NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.860.032

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo prospectivo, onde serão utilizadas alíquotas de células (105 células/mm³) estocadas em solução de Trizol Reagente® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a -80°C provenientes de 100 amostras de medula óssea, de ambos os sexos, de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica, diagnosticados segundo os critérios da OMS, entre os anos de 2020 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.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar o papel dos genes da família sirtuina (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 e SIRT7) na patogênese e na evolução prognóstica da Síndrome Mielodisplásica.

Objetivo Secundário:

Endereço: Rua Cel. Nunes da Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

CEP: 60.430-375

E-mail: comape@ufc.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DE DEACETILAÇÃO DE HISTONAS MEDIADAS POR SIRTUINAS NA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DA NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA.

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar.

O abaixo assinado, _____, _____ anos, RG nº _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do pesquisador João Vitor Caetano Goes / Howard Lopes Ribeiro Junior. O abaixo assinado está ciente de que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é estudar as amostras de DNA de pacientes portadores de Neoplasia Mielodisplásica gerando dados que favoreçam a uma melhor compreensão do surgimento, prognóstico, tratamento e evolução clínica desta doença.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

A amostra biológica utilizada na presente pesquisa corresponde a medula óssea do indivíduo.

A medula óssea corresponde a um tecido líquido-gelatinoso que ocupa o interior dos ossos, sendo conhecida popularmente por 'tutano'. Na medula óssea são produzidos os componentes do sangue: as hemácias (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas.

A coleta da medula óssea será realizada por médico hematologista experiente com agulha de mielograma mediante punção esternal. O osso do esterno é um osso chato, plano e ímpar localizado no centro do tórax. O osso do esterno é um importante

osso hematopoiético, ou seja, de produção das células sanguíneas. É neste osso que é realizada a punção da medula óssea.

Serão coletadas somente 2mL de amostra de medula óssea com o uso de uma agulha específica para aspiração da medula óssea. Todo o procedimento de coleta da medula óssea é realizado mediante administração de anestésico local com duração máxima de 15 minutos. Durante o procedimento de coleta esternal da medula óssea, pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxçada) ao redor do local de onde foi retirado a medula óssea, desaparecendo em poucos dias, e poderá ocorrer dor discreta e de fácil alívio, podendo ser, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local. Raramente, pode ocorrer infecção local. Para pacientes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral. A coleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise.

Após o procedimento, serão coletados dados pessoais de sexo e idade, apresentação clínica e checagem dos exames laboratoriais indicados para esclarecimento diagnóstico, tais como: hemograma completo, citologia e histologia (análise microscópica das células) da medula óssea, avaliação para depósitos de ferro medular, bem como outros exames que são feitos mesmo para os pacientes que não participam de nenhuma pesquisa.

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

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo quando desejar, ou mesmo em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador responsável ou a qualquer um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento nesta instituição.

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

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

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

Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, ou autoridades do(s) órgãos(s) regulamentar(es) envolvido(s) terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e

regulamentações aplicáveis, como o propósito de verificar os procedimentos e dados do estudo, sem, no entanto, violar a condição de que tais informações são confidenciais.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja algum imprevisto ou dúvidas, você deverá entrar em contato solicitar contato direto com o pesquisador responsável pelo estudo: **João Vitor Caetano Goes (85 – 98033239)** ou com o Orientador de Mestrado Acadêmico **Howard Lopes Ribeiro Junior (85 – 87396142)**.

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

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

ASSINATURAS

Autorizo o acesso às minhas informações de saúde aos membros da equipe de pesquisadores, nas condições estabelecidas descritas nos itens acima. Não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

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

____/____/____
Data

Assinatura do participante da pesquisa

____/____/____
Data

Assinatura do Pesquisador Responsável

____/____/____
Data

Assinatura do Responsável pela aplicação do TCLE

ANEXO C – 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 Cantann Gomes ^{1,2,†}, Luiz Gustavo Carvalho ^{1,3,†}, Roberta Taiane Germano de Oliveira ^{1,4}, Mayara Magna de Lima Melo ^{1,4}, Lizaro Antônio Campanha Novaes ⁵, Daniel Antunes Moreno ⁶, Paula Gyuliane Gonçalves ⁶, Carlos Victor Montefusco-Pereira ⁶, Ronald Feitosa Pinheiro ^{1,4} and Howard Lopes Ribeiro Junior ^{1,4,*}

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

² Post-Graduate Program in 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 14794-400, São Paulo, Brazil

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

* Correspondence: howardh@bcr.de; Tel.: +55-859-873-96142

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Gomes, 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: Ilkay Schürup

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 #CRD42022300379) and in silico analysis (based on GEPDA 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 D – GENE EXPRESSION PATTERNS OF SIRTUIN FAMILY MEMBERS
(*SIRT1* TO *SIRT7*): INSIGHTS INTO PATHOGENESIS AND PROGNOSTIC OF
MYELODYSPLASTIC NEOPLASM – SUBMETIDO NA REVISTA GENE
JOURNAL.

Manuscript Number:	GENEJOURNAL-D-23-03275
Article Type:	Research paper
Section/Category:	Human Gene
Keywords:	gene expression, Sirtuins; myelodysplastic neoplasm, pathogenesis
Corresponding Author:	Howard Lopes Ribeiro Junior, Ph.D Universidade Federal do Ceará Fortaleza, CE RAZIL
First Author:	João Vitor Caetano Goes
Order of Authors:	João Vitor Caetano Goes Mateus de Aguiar Viana Leticia Rodrigues Sampaio Clarissa Brenda Alves Cavalcante Mayara de Lima Melo Roberta Taiane Germano de Oliveira Daniela de Paula Borges Paola Gyuliane Gonçalves Ronald Feitosa Pinheiro Howard Lopes Ribeiro Junior, Ph.D
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	<p>Purpose: To assess and validate the gene expression profile of SIRTs (<i>SIRT1</i>, <i>SIRT2</i>, <i>SIRT3</i>, <i>SIRT4</i>, <i>SIRT5</i>, <i>SIRT6</i>, and <i>SIRT7</i>) in relation to the pathogenesis and prognostic progression of Myelodysplastic neoplasm (MDS). Patients and methods: Eighty bone marrow samples of patients with de novo MDS were diagnosed according to WHO 2022 and IPSS-R criteria. Ten bone marrow samples were obtained from elderly healthy volunteers and used as control samples. Gene expression levels of all SIRTs were assessed using RT-qPCR assays. Results: Downregulation of <i>SIRT2</i> (p=0.009), <i>SIRT3</i> (p=0.048), <i>SIRT4</i> (p=0.049), <i>SIRT5</i> (p=0.046), <i>SIRT6</i> (p=0.043), and <i>SIRT7</i> (p=0.047) was identified in MDS patients compared to control individuals. Specifically, <i>SIRT4</i> (p=0.029) showed increased expression in patients aged 60 or above, and both <i>SIRT2</i> (p=0.016) and <i>SIRT3</i> (p=0.036) were upregulated in patients with hemoglobin levels below 8g/dL. <i>SIRT2</i> (p=0.045) and <i>SIRT3</i> (p=0.033) were highly expressed in patients with chromosomal abnormalities. Different SIRTs exhibited altered expression patterns concerning specific MDS clinical and prognostic characteristics. Conclusion: The downregulation in SIRTs genes (e.g., <i>SIRT2</i> to <i>SIRT7</i>) expression in Brazilian MDS patients highlights their role in the disease's development. The upregulation of <i>SIRT2</i> and <i>SIRT3</i> in severe anemia patients suggests a potential link to manage iron overload-related complications in transfusion-dependent patients. Moreover, the association of <i>SIRT2/SIRT3</i> with genomic instability and their role in MDS progression signify promising areas for future research and therapeutic targets. These findings underscore the importance of SIRT family in understanding and addressing MDS, offering novel clinical, prognostic, and therapeutic insights for patients with this condition.</p>

