



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**Expressão gênica de *NFKB* e genes da imunidade inata em pacientes com  
Neoplasia Mielodisplásica (SMD) e Leucemia Mieloide Aguda relacionada a  
SMD (LMA-RM)**

**ANDRÉA ALCÂNTARA VIEIRA**

2024



ANDRÉA ALCÂNTARA VIEIRA

EXPRESSÃO GÊNICA DE *NFKB* E GENES DA IMUNIDADE INATA EM PACIENTES  
COM NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA (SMD) E LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA  
RELACIONADA A SMD (LMA-RM)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico  
em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica,  
da Universidade Federal do Ceará, como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA  
2024

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)

---

- V713e    Vieira, Andréa Alcântara.  
          Expressão gênica de NFkB e genes da imunidade inata em pacientes com Neoplasia Mielodisplásica (SMD) e Leucemia Mieloide Aguda relacionada a SMD (LMA-RM) / Andréa Alcântara Vieira. – 2024.  
          116 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2024.  
          Orientação: Prof. Dr. Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro .
1. Neoplasia Mielodisplásica (SMD). 2. Inflamação e Imunidade. 3. TLRs. 4. MYD88 e IRAK. 5. NFkB. I. Título.

CDD 610

---

EXPRESSÃO GÊNICA DE *NFKB* E GENES DA IMUNIDADE INATA EM PACIENTES  
COM NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA (SMD) E LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA  
RELACIONADA A SMD (LMA-RM)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico  
em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica,  
da Universidade Federal do Ceará, como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovada em: 18/06/2024

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Profa. Dra. Silvia Maria Meira Magalhães  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas  
Universidade de Fortaleza (Unifor)



Aos meus filhos, Alice, Henrique e Ester

Ao meu marido, Èrico

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por tudo ao meu redor.

Aos meus filhos, **Alice, Henrique e Ester**, por me apresentarem o maior amor do mundo e por ampliarem meus horizontes todos os dias, trazendo até mim um universo novo e me desafiando à superação diariamente. Vocês colore o mundo e preenchem a minha vida de sentido e esperança ! **Ester**, obrigada por ser meu suporte de sempre em informática !

Aos meus pais, **Hamilton e Rosa**, que cedo me apresentaram a leitura, a música e o estudo, e me fizeram perceber que o conhecimento liberta. Obrigada pelo amor incondicional, por sempre me estimularem e acreditarem em mim, e por darem o melhor de si em todos os momentos. Pai, mesmo ausente da vida terrena, sinto sua presença ao meu lado todos os dias e em tudo que sou!

Aos meus avós **Cleide e Edgard**, meus segundos pais, em cuja casa cresci, cercada de **tios e tias**, e onde aprendi o significado do amor, do cuidar e do compartilhar. Há muito de cada um de vocês em mim !

Aos meus **amigos do coração**, família que a vida me deu, com quem tenho compartilhado alegrias e dificuldades, conquistas e fracassos. Vocês têm feito minha vida mais leve e feliz.

À **Medicina**, por me proporcionar o privilégio de trabalhar cuidando, ajudando e melhorando a vida das pessoas.

Ao meu orientador, **Professor Dr Ronald**, cuja criatividade, espírito científico e mente visionária, aliadas à disciplina e dedicação à medicina são alvo de minha mais sincera admiração. Obrigada por me estimular a retomar este projeto antigo e ajudar a viabilizá-lo. Obrigada por todo o suporte e orientações ao longo do mestrado; foram tempos de muito aprendizado.

À toda equipe do Laboratório de Citogenômica do Câncer, **Sharlene, Mayara, Roberta, doutorandos, mestrandos e bolsistas de iniciação científica**. Grata surpresa conhecer, conviver e aprender com uma equipe tão jovem, competente e dedicada !

Agradecimento especial ao **Hermano**, bolsista de iniciação científica que trabalhou comigo no meu projeto, ao doutorando **João Vitor**, pelo imprescindível suporte na bancada e na organização do banco de dados e ao mestrando **Alessandro**, pela contribuição com as figuras.



Agradecimento especial à doutoranda **Letícia**, pela ajuda na bancada, pela estatística do trabalho, pelas aulas de PCR e estatística, pelas orientações sobre tudo e qualquer coisa, e sempre a qualquer momento ... Letícia, você é gigante e vai longe ! Obrigada pela paciência comigo.

Aos meus colegas de mestrado, **Dyllan**, pelas dicas e ajuda no banco de dados e informações dos prontuários; **Fabiana e Natália Minette**, por compartilhar as angústias e conquistas deste processo.

À **Profa Dra Daniele Calheiros**, pelas orientações e suporte ao longo do mestrado.

Agradecimento especial ao **Prof. Dr Howard**, pelas considerações assertivas e contribuições ao meu projeto, pelas orientações na escrita do artigo de revisão e pelas considerações aos resultados apresentados na qualificação, além das inúmeras discussões e trocas de ideias onde, apesar da teimosia, aprendi muito.

À **Profa Dra Daniela Borges**, pelas contribuições na banca de qualificação.

Aos **membros da banca**, pela disponibilidade em participar e contribuir com este trabalho.

Aos **pacientes** com diagnóstico de SMD que participaram desta pesquisa com suas amostras e informações. Vocês são a motivação e a finalidade da ciência !

Ao **CNPq** e à **CAPES** pelo apoio financeiro a essa pesquisa.

Por fim um agradecimento especial ao meu marido, **Èrico**, pessoa sem a qual este projeto nunca teria saído do papel. Que ao longo de todos estes anos me lembrou, cobrou e estimulou, e que nos últimos 2 anos e meio contribuiu com todo o suporte necessário para que este projeto se tornasse realidade. Esteve ao meu lado em todas as vezes que eu pensei em desistir, e não só me convenceu a prosseguir e mostrou que era possível, mas cuidou para que de fato fosse. Palavras não são capazes de expressar minha gratidão!



A ciência e a vida cotidiana não podem e  
não devem ser separadas.

Rosalind Franklin



## RESUMO

Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são neoplasias mieloides, caracterizadas por proliferação clonal da célula tronco hematopoiética (HSC), displasia medular, citopenia(s) periférica(s), anormalidades genéticas e risco de evolução para LMA. É uma doença heterogênea que predomina em idosos. Exposição a agentes genotóxicos e microambiente medular inflamatório, podem levar a mutações nas HSC, com hematopoese clonal, instabilidade genética e fenótipo típico da SMD. Desordens autoimunes e inflamatórias crônicas aumentam o risco de SMD, e diversos mecanismos moleculares e genéticos estão envolvidos na sinalização inflamatória na SMD, com destaque para a ativação dos *Toll-Like Receptors* (TLRs), cuja principal proteína adaptadora intracelular, MYD88, forma um complexo proteico com membros da família IRAK kinases (IRAK1, IRAK2 e IRAK4), levando à fosforilação do TRAF6, ativação das vias NFκB e MAPK e secreção de citocinas. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica do *TRAF6*, *NFκB* e genes do complexo proteico do MYD88 (*MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2* e *IRAK4*) em pacientes com SMD, associando os achados com variáveis clínico-laboratoriais e cariótipo. Foram avaliados 82 pacientes (76 com SMD e 6 com LMA relacionada a SMD) e 10 indivíduos saudáveis como controles. O estudo citogenético foi realizado por Banda-G e para análise da expressão gênica utilizou-se a metodologia de PCR em tempo real (RT-qPCR). Nesta coorte, observamos que o *NFκB* e o *IRAK4* estão mais expressos em SMD-EB em comparação à SMD-AS ( $p < 0,026$   $p < 0,001$ ), e *TRAF6* está mais expresso no grupo controle em comparação aos grupos com LMA ou SMD ( $p = 0,034$ ). O *MYD88* está menos expresso nos pacientes com LMA em comparação aos controles e pacientes com SMD ( $p = 0,041$  e  $p = 0,02$ ). *MYD88* também está menos expresso em pacientes com hemoglobina inferior a 8g/dl ( $p = 0,036$ ), em pacientes com percentual de blastos na medula óssea  $> 10\%$  ( $p = 0,027$ ), e em pacientes com cariótipo complexo ( $p = 0,056$ ). A expressão do *IRAK1* está diminuída em pacientes com percentual de blastos na medula óssea  $> 10\%$  ( $p < 0,001$ ) e em pacientes com cariótipo anormal ( $p = 0,031$ ). Esta pesquisa revelou expressão anômala do *NFκB* e de genes da imunidade inata na SMD, com maior expressão dos genes do complexo proteico do *MYD88* nas formas de prognóstico mais favorável e maior expressão de *NFκB* e *IRAK4* nas formas com prognóstico desfavorável.

**Palavras-chave:** Neoplasia Mielodisplásica (SMD); Imunidade Inata; Inflamação; *MYD88*; *IRAK1*; *IRAK2*; *IRAK*; *TRAF6*; *NFκB*.

## ABSTRACT

Myelodysplastic neoplasms (MDS) are myeloid neoplasms characterized by clonal proliferation of hematopoietic stem cell, bone marrow dysplasia, cytopenias, genetic abnormalities and high risk of Acute Myeloid Leukemia (AML) evolution. It is a heterogeneous disease and it is more common in elderly. Genotoxic agents and inflammatory medullary microenvironment can promote HSC mutations, leading clonal hematopoiesis, genetic instability and typical MDS phenotype. Chronic autoimmune and inflammatory disorders increase the risk of MDS. Several molecular and genetic mechanisms are involved in the chronic inflammatory signaling of MDS, highlighting the activation of Toll-Like Receptors (TLRs), whose main intracellular adapter protein, MYD88, complex with members of the IRAK kinases family (IRAK1, IRAK2 and IRAK4), leading to the phosphorylation of TRAF6, activation of NF $\kappa$ B and MAPK pathways and cytokine secretion. This study evaluated the gene expression of *TRAF6*, *NF $\kappa$ B* and MYD88 protein complex genes (*MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2* and *IRAK4*) in patients with MDS, and its association with clinical and laboratory variables and karyotype. Eighty-two patients (76 with MDS and 6 with MDS-related AML) and 10 healthy controls were included. The cytogenetic study was carried out using G-Band and real-time PCR (RT-qPCR) methodology was used to analyze gene expression. *NF $\kappa$ B* and *IRAK4* expression were higher in MDS-EB compared to MDS-SA ( $p < 0,026$   $p < 0,001$ ), and *TRAF6* expression was higher in controls compared to MDS and AML patients ( $p = 0,034$ ). *MYD88* expression was lower in AML patients compared to controls and in patients with MDS ( $p = 0,041$  e  $p = 0,02$ ). *MYD88* was also lower in patients with hemoglobin level below 8g/dl ( $p = 0,036$ ), in patients with bone marrow blast percentage  $> 10\%$  ( $p = 0,027$ ) and in patients with complex karyotype ( $p = 0,056$ ). *IRAK1* expression was lower in patients with bone marrow blast percentage  $> 10\%$  ( $p < 0,001$ ) and in patients with abnormal karyotype ( $p = 0,031$ ). Anomalous expression of *NF $\kappa$ B* and innate immune genes were observed in MDS patients, with higher expression of MYD88 protein complex genes in patients with favorable prognosis features and higher expression of *NF $\kappa$ B* and *IRAK4* in patients with unfavorable prognosis features.

**Keywords:** Myelodysplastic Neoplasm (MDS); Innate Immune System; Inflammation; *MYD88*; *IRAK1*; *IRAK2*; *IRAK*; *TRAF6*; *NF $\kappa$ B*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Patogênese da Neoplasia Mielodisplásica.....	26
Figura 2 – Estrutura do Toll-like Receptors 4 e seus ligantes (TLR4).....	36
Figura 3 – TLRs e suas vias de sinalização intracelular.....	37
Figura 4 – Complexo proteico do MYD88.....	43
Figura 5 – TRAF6 e seus reguladores .....	50
Figura 6 – NFkB – via canônica e via alternativa (não canônica).....	53
Figura 7 – Desregulação imune na SMD.....	54
Figura 8 – Representação esquemática do estudo .....	57
Figura 9 – Representação esquemática do procedimento de citogenética clássica .....	59
Figura 10 -Representação esquemática do procedimento do RT-qPCR .....	62
Figura 11 – Nível de expressão de <i>MYD88</i> em relação aos grupos: controle, SMD e LMA-RM .....	70
Figura 12 – Nível de expressão de <i>TRAF6</i> em relação aos grupos: controle, SMD e LMA.....	71
Figura 13 – Nível de expressão de <i>MYD88</i> em relação a variável hemoglobina .....	72
Figura 14 - Nível de expressão gênica de <i>MYD88</i> em relação a variável blastos IPSS-R e blastos categorizados em $\leq 10\%$ e $> 10\%$ .....	73
Figura 15 – Nível de expressão gênica de <i>IRAK1</i> em relação a variável blastos IPSS-R e blastos categorizado em $\leq 10\%$ e $> 10\%$ .....	74
Figura 16 – Nível de expressão gênica de <i>IRAK2</i> em relação a variável blastos IPSS-R.....	75
Figura 17 - Nível de expressão gênica de <i>MYD88</i> em relação a variável cariótipo complexo	76
Figura 18- Nível de expressão gênica de <i>IRAK1</i> em relação ao resultado do cariótipo.....	77
Figura 19 – Nível de expressão gênica de <i>IRAK4</i> em relação aos subtipos SMD com sideroblastos em anel e SMD com excesso de blastos .....	78
Figura 20 – Nível de expressão gênica de <i>NFkB</i> em relação aos subtipos SMD com sideroblastos em anel e SMD com excesso de blastos .....	78
Figura 21– Heatmap da análise de correlação entre os genes <i>IRAK1</i> , <i>IRAK2</i> , <i>IRAK4</i> , <i>TRAF6</i> , <i>NFkB</i> e <i>MYD88</i> e seus níveis de expressão gênica.....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mutações mais frequentes na SMD.....	29
Tabela 2 - Classificação da SMD segundo os critérios da OMS 2022.....	32
Tabela 3 - Categorias de risco citogenético – IPSS-R.....	33
Tabela 4 - Escores de variáveis prognósticas - IPPS-R.....	34
Tabela 5 - Categorias de risco prognóstico - IPSS-R.....	34
Tabela 6 - Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR. ....	61
Tabela 7 - Descrição dos pacientes do estudo quanto ao diagnóstico. ....	66
Tabela 8 - Descrição das variáveis demográficas dos controles saudáveis. ....	66
Tabela 9 - Descrição das variáveis demográficas dos pacientes com diagnóstico de SMD ou LMA-RM.....	67
Tabela 10 - Distribuição dos pacientes com SMD ou LMA-RM segundo a classificação da OMS (2022).....	67
Tabela 11 - Variáveis clínico-laboratoriais relacionadas aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD e LMA-RM.....	68
Tabela 12 - Variáveis clínico-laboratoriais relacionadas aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD e LMA-RM, por categorias .....	68
Tabela 13 – Distribuição dos pacientes com SMD quanto ao percentual de blastos de acordo com categorias do IPSS-R .....	69
Tabela 14 - Frequência dos resultados citogenéticos nos pacientes com SMD e LMA-RM ao diagnóstico.....	69
Tabela 15 - Classificação de risco de pacientes com SMD de acordo com o IPSS-R. ....	69
Tabela 16 – Resumo dos achados de expressão dos genes <i>MYD88</i> , <i>IRAK1</i> , <i>IRAK2</i> , <i>IRAK4</i> , <i>TRAF6</i> e <i>NFKB</i> em SMD e LMA-RM.....	80



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACTB</b>	<i>Actin-beta</i>
<b>AREB</b>	<i>Anemia refratária com excesso de blastos</i>
<b><i>Arhgap1</i></b>	<i>Proteína 1 ativadora de Rho GTPase (murinos)</i>
<b>AP-1</b>	<i>Proteína ativadora 1</i>
<b><i>ASXL1</i></b>	<i>Additional sex combs like 1 (Drosophila)</i>
<b>BTK</b>	<i>Bruton tirosina-kinase</i>
<b>CCUS</b>	<i>Clonal hematopoiesis of unknown significance</i>
<b>CHIP</b>	<i>Clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i>
<b>CO2</b>	<i>Dioxido de carbono</i>
<b><i>c-MYC</i></b>	<i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>
<b>CTH</b>	<i>Células Tronco Hematopoiéticas</i>
<b>DAMPS</b>	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
<b>DEL 5q</b>	<i>Deleção do braço longo do cromossomo 5</i>
<b>DNA</b>	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
<b>DNase</b>	<i>Desoxiribonuclease</i>
<b><i>DNMT3A</i></b>	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha</i>
<b>FAB</b>	<i>French-American-British (FAB) classification</i>
<b>FISH</b>	<i>Hibridização in situ por fluorescência</i>
<b><i>FLT3</i></b>	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
<b>GATA</b>	<i>GATA binding protein (globin transcription fator)</i>
<b>G-CSF</b>	<i>Fator estimulador de colônias de granulócitos</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos</i>
<b>hnRNPA1</b>	<i>Ribonucleoproteína nuclear heterogênea A1</i>
<b>HPRT1</b>	<i>Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>
<b>HSC</b>	<i>Hematopoietic Stem Cell</i>
<b>IPSS</b>	<i>International Prognostic Scoring System</i>
<b>IPSS-R</b>	<i>Revised International Prognostic Scoring System</i>
<b>ISCN</b>	<i>Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana</i>

<b>IFN</b>	<i>Interferon</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<i>Interferon gama</i>
<b>IFN-1</b>	<i>Interferon 1</i>
<b>IKK</b>	<i>Complexo proteico das I<math>\kappa</math>B kinases</i>
<b>IL</b>	<i>Interleucina (IL-6, IL-8, IL-10)</i>
<b>IRAK1</b>	<i>Kinase 1 associada ao receptor de Interleucina 1</i>
<b>IRAK2</b>	<i>Kinase 2 associada ao receptor de Interleucina 1</i>
<b>IRAK3</b>	<i>Kinase 3 associada ao receptor de Interleucina 1</i>
<b>IRAK4</b>	<i>Kinase 4 associada ao receptor de Interleucina 1</i>
<b>JAK</b>	<i>Janus kinase</i>
<b>KCl</b>	<i>Cloreto de potássio</i>
<b>LMA</b>	<i>Leucemia Mielóide Aguda</i>
<b>LMA-RM</b>	<i>Leucemia Mielóide Aguda relacionada à SMD</i>
<b>LMC</b>	<i>Leucemia mielomonocítica crônica</i>
<b>MAPK</b>	<i>Proteína kinase ativada por mitógenos</i>
<b>MDSC</b>	<i>Células supressoras mielóide derivadas</i>
<b>MLL</b>	<i>Mixed lineage leukemia (KMT2A)</i>
<b>MSC</b>	<i>Células tronco mesenquimais</i>
<b>MO</b>	<i>Medula Óssea.</i>
<b>mRNA</b>	<i>RNA mensageiro</i>
<b>miRNA</b>	<i>Micro-RNA</i>
<b>MYD88</b>	<i>Fator de Diferenciação Mielóide</i>
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	<i>Fator de transcrição nuclear KB</i>
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>OMS</b>	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
<b>RIP-kinase</b>	<i>Receptor-interacting protein kinase</i>
<b>RNA</b>	<i>Ácido Ribonucleico</i>
<b>RNase</b>	<i>Ribonuclease</i>
<b>rRNA</b>	<i>RNA ribossômico</i>
<b>RT-qPCR</b>	<i>Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real</i>

<b><i>RUNX1</i></b>	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
<b><i>SA</i></b>	<i>Sideroblastos em anel</i>
<b><i>SF3B1</i></b>	<i>Splicing fator 3h subunit 1</i>
<b><i>SMD</i></b>	<i>Neoplasia Mielodisplásica</i>
<b><i>SMD-EB1</i></b>	<i>SMD com excesso de blastos tipo 1</i>
<b><i>SMD-EB2</i></b>	<i>SMD com excesso de blastos tipo 2</i>
<b><i>SRSF2</i></b>	<i>Serine and arginine rich splicing factor 2</i>
<b><i>SPOP</i></b>	<i>Speckle-type BTB–POZ protein</i>
<b><i>STAG2</i></b>	<i>Stromal Antigen 2</i>
<b><i>STAT</i></b>	<i>Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição</i>
<b><i>STAT5</i></b>	<i>Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 5</i>
<b><i>TAK1</i></b>	<i>Kinase 1 TGFβ ativada</i>
<b><i>TCLE</i></b>	<i>Termo de consentimento livre e esclarecido</i>
<b><i>TET2</i></b>	<i>Ten-eleven translocation 2 (TET2) (metilcitosinadioxigenase 2)</i>
<b><i>TGF-β</i></b>	<i>Fator de crescimento transformador β</i>
<b><i>TIFAB</i></b>	<i>TRAF-Interacting Protein With Forkhead-Associated Domain, B</i>
<b><i>TIR</i></b>	<i>Receptor Toll Intracelular de Interleucina 1</i>
<b><i>TIRAP</i></b>	<i>Proteína adaptadora do receptor TIR</i>
<b><i>TLR</i></b>	<i>Receptor Toll-like (1,2,3,4,6,7,8,9)</i>
<b><i>TNF</i></b>	<i>Fator de necrose tumoral</i>
<b><i>TRAF3</i></b>	<i>Fator 3 associado ao receptor de TNF</i>
<b><i>TRAF6</i></b>	<i>Fator 6 associado ao receptor de TNF</i>
<b><i>Treg</i></b>	<i>Células T regulatórias</i>
<b><i>TRIF</i></b>	<i>Proteína adaptadora TIR indutora de Interferon b</i>
<b><i>TP53</i></b>	<i>Tumor protein 53</i>
<b><i>U2AF1</i></b>	<i>U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1</i>
<b><i>VAF</i></b>	<i>Variant allele Frequency</i>
<b><i>VEXAS</i></b>	<i>Acrônimo Sd VEXAS: Vacúolos, Enzima E1, cromossomo X, autoinflamatória, somática</i>
<b><i>ZRSR2</i></b>	<i>Zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich</i>



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	22
1.1 ASPECTOS GERAIS DAS NEOPLASIAS MIELODISPLÁSICAS .....	22
1.2 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO DA SMD .....	23
1.3 PATOGÊNESE DA SMD.....	24
1.4 ANORMALIDADES CITOGENÉTICAS E MOLECULARES NA SMD .....	27
1.5 CLASSIFICAÇÃO DA SMD .....	30
1.6 PROGNÓSTICO DA SMD.....	32
1.7 IMUNIDADE INATA, INFLAMAÇÃO E HEMATOPOESE .....	35
1.8 DESREGULAÇÃO DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA NA SMD .....	38
1.9 A VIA DO MYD88 E O COMPLEXO PROTEICO DO MYD88.....	42
1.10 O COMPLEXO PROTEICO DO MYD88 NAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS .....	43
1.11 O COMPLEXO PROTEICO DO MYD88 NA NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA (SMD) E NA LMA RELACIONADA A SMD (LMA-RM) .....	44
1.11.1 MYD88.....	44
1.11.2 Kinases receptoras de IL-1 (IRAK).....	45
1.11.2.1 IRAK4.....	46
1.11.2.2 IRAK2.....	47
1.11.2.3 IRAK1.....	47
1.12 TRAF6 NA NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA (SMD) E NA LMA RELACIONADA A SMD (LMA-RM).....	48
1.13 NFkB NA NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA (SMD) E NA LMA RELACIONADA A SMD (LMA-RM).....	52
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>56</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	56
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	56
<b>3 PACIENTES E MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
3.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA .....	57
3.2 COLETA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS .....	58
3.3 CARIÓTIPO POR BANDEAMENTO-G .....	58
3.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR.....	60
3.4.1 Extração de RNA Total.....	60
3.4.2 Síntese de cDNA .....	60

3.4.3 RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) .....	61
3.5 VARIÁVEIS ANALISADAS .....	63
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	64
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES E CONTROLES .....	66
4.2 ANÁLISE DO NÍVEL DE EXPRESSÃO GÊNICA POR qRT-PCR EM AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM SMD E LMA-RM.....	70
4.2.1 Expressão gênica de MYD88, IRAK1, IRAK2, IRAK4, TRAF6 e NFκB em controles e pacientes com SMD e LMA-RM.....	70
4.2.2 Expressão gênica de MYD88, IRAK1, IRAK2, IRAK4, TRAF6 e NFκB em relação às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD e LMA-RM.....	71
4.2.2.1 Achados de sangue periférico .....	72
4.2.2.2 Achados medulares .....	73
4.2.2.3 Achados citogenéticos .....	76
4.2.3 Expressão gênica de <i>MYD88</i> , <i>IRAK1</i> , <i>IRAK2</i> , <i>IRAK4</i> , <i>TRAF6</i> e <i>NFκB</i> na classificação clínica e estratificação prognóstica dos pacientes com SMD e LMA- RM .....	77
4.2.3.1 Classificação OMS 2022 para SMD e LMA-RM .....	77
4.2.3.2 Classificação dos Grupos de Risco de acordo com o IPSS-R para SMD.....	77
4.2.4 Correlação da expressão dos genes <i>NFκB</i> , <i>TRAF6</i> , <i>MYD88</i> , <i>IRAK1</i> , <i>IRAK2</i> e IRAK4 em pacientes com SMD e LMA-RM .....	79
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>89</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>114</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos Gerais das Neoplasias Mielodisplásicas

Neoplasias Mielodisplásicas (SMD) são um grupo de neoplasias mieloides caracterizadas por uma ou mais citopenias ao hemograma, hematopoese ineficaz, displasia medular, anormalidades citogenéticas, instabilidade genômica e risco de evolução para Leucemia Mielóide Aguda (LMA). Há proliferação clonal da *Stem Cell* hematopoietica (HSC), com anormalidades genéticas recorrentes que são positivamente selecionadas, garantindo a expansão clonal e levando à falência medular progressiva e evolução para LMA em aproximadamente 30% dos casos(CAZZOLA, 2020; NAKAJIMA, 2021).

São condições clinicamente e molecularmente heterogêneas e as manifestações clínicas resultam das citopenias: síndrome anêmica de incidência e gravidade variável, infecções de repetição secundárias à neutropenia e sangramentos secundários à plaquetopenia. Estas citopenias podem ser isoladas ou combinadas, sendo anemia a mais comum, descrita em 90% dos pacientes ao diagnóstico, e frequentemente macrocítica. Alguns pacientes apresentam manifestações imunológicas associadas, como vasculite, policondrite e poliartrite soronegativa(CHAMSEDDINE et al., 2016).

O diagnóstico requer a realização de hemograma e mielograma com coloração de ferro medular, estudo citogenético e análise de mutações gênicas do aspirado medular. O pré-requisito para o diagnóstico de SMD é a presença de pelo menos uma citopenia, para a qual outras causas tenham sido descartadas (infecciosas, inflamatórias, carenciais e autoimunes). Às citopenias devem somar-se pelo menos um dos critérios diagnósticos: (1) presença de displasia medular em mais de 10% dos elementos de uma ou de múltiplas linhagens celulares e/ou a presença de mais de 15% de sideroblastos em anel (SA) na coloração de ferro medular e/ou mutação do *SF3B1*, (2) presença de 5 a 19% de blastos no aspirado medular e/ou 2 a 19% de blastos no sangue periférico, (3) presença de pelo menos uma anormalidade cromossômica no estudo citogenético do aspirado medular(VALENT; VALENT, 2019). A biópsia de medula óssea deve ser realizada, sendo particularmente útil na avaliação de formas hipocelulares e/ou com fibrose. Estudos moleculares direcionados à pesquisa de mutações recorrentes em SMD têm utilidade diagnóstica e prognóstica(ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014; CHAMSEDDINE et al., 2016).



## 1.2 Epidemiologia e fatores de risco da SMD

As SMD afetam mais homens que mulheres e são mais prevalentes em idosos, com mediana de idade ao diagnóstico em torno dos 70 anos e incidência anual geral de 4 a 5 casos por 100.000 habitantes/ano(CAZZOLA, 2020). A incidência aumenta com a idade, e de acordo com dados do *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER), do National Cancer Institute, USA*, de 2021, chega a 40,2 casos por 100.000 habitantes/ano na população acima de 75 anos (“SEER Cancer Statistics Fast Stats”, 2021).

A obtenção de dados relativos à incidência global da SMD tem sido prejudicada pelas mudanças nos critérios diagnósticos e nos sistemas de classificação da doença desde a sua descrição inicial. Admite-se que esta incidência seja subestimada, tanto por estas razões quanto pela variabilidade da apresentação clínica da SMD e frequente superposição dos achados clínicos com outras doenças, dificultando o diagnóstico definitivo (ZEIDAN et al., 2019)

Dados do Brasil são limitados, mas um estudo sul-americano envolvendo 1080 pacientes com diagnóstico de SMD no Brasil (345), Chile (100) e Argentina (635), demonstrou que a idade mediana ao diagnóstico no Brasil é de 68 anos, enquanto na Argentina é de 69 anos. No Chile, além da idade mediana ao diagnóstico ser menor, 64 anos, houve predomínio do sexo feminino e foi observada menor sobrevida global, consequente à maior porcentagem de pacientes classificados como de alto risco pelos escores prognósticos (IPSS e IPSSR)( BELLI et al., 2015).

Dados do Registro Brasileiro de Síndromes Mielodisplásicas publicados em 2010 por Magalhães e colaboradores, nos quais foram incluídos 476 pacientes com SMD diagnosticados de janeiro de 2003 a dezembro de 2007, revelaram que no Brasil a idade mediana ao diagnóstico era de 68,3 anos, sendo 50,8% mulheres(MAGALHÃES, 2010).

Conforme exposto acima, idade avançada é o principal fator de risco para o desenvolvimento de SMD. Anormalidades em vias de sinalização intracelular e na resposta inflamatória são comuns na senescência e estão relacionadas à patogênese da doença(SEKERES, 2010)

Exposição a terapias citotóxicas como radioterapia ou quimioterapia, com destaque para agentes alquilantes e inibidores da topoisomerase II, é outro importante fator de risco para desenvolvimento de SMD. Estes agentes são genotóxicos, promovendo dano celular e anormalidades cromossômicas que podem dar início à hematopoese clonal e evolução para SMD e LMA. Cerca de 10-15% dos casos de SMD têm antecedentes óbvios de terapias citotóxicas (ABOU ZAHR et al., 2017).

Exposição à radiação ionizante aumenta o risco de SMD. Iwanaga e colaboradores demonstraram aumento da incidência de SMD em japoneses que sobreviveram à bomba atômica por ocasião da Segunda Guerra Mundial, com incidência inversamente proporcional à distância da moradia ao epicentro da bomba (IWANAGA et al., 2011)

Risco aumentado de SMD também está relacionado à exposição a agentes genotóxicos utilizados na indústria e agricultura. Alguns exemplos são os solventes orgânicos, principalmente os derivados do benzeno, bem como os pesticidas, herbicidas e fertilizantes (STROM et al., 2005; ZEIDAN et al., 2019). Costa e colaboradores demonstraram maior incidência de anormalidades cromossômicas e menor expressão de genes de reparo em trabalhadores rurais do Ceará expostos a agrotóxicos quando comparados aos que trabalhavam na agricultura orgânica (COSTA et al., 2021)

Outros fatores de risco relevantes para SMD são obesidade e tabagismo, sendo o cigarro a principal fonte de exposição não ocupacional ao benzeno (MA et al., 2009; STROM et al., 2005). O consumo de álcool não foi demonstrado como fator de risco independente para SMD (MA et al., 2009; ZEIDAN et al., 2019)

Predisposição genética ao desenvolvimento de neoplasias mieloides, com mutações germinativas envolvidas na hematopoese clonal são descritas e devem ser consideradas em pacientes com diagnóstico de SMD antes dos 50 anos ou com antecedentes familiares de neoplasias mieloides (CAZZOLA, 2020). Anemia de Fanconi, Síndrome de Down e neurofibromatose são outras condições nas quais há predisposição genética ao desenvolvimento de SMD (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014).

### **1.3 Patogênese da SMD**

As SMD são condições reconhecidamente heterogêneas do ponto de vista clínico e molecular, mas a hematopoese ineficaz, a maturação mieloide anômala e a presença de anormalidades genético-moleculares são achados comuns a estas condições (CHAMSEDDINE et al., 2016).

Embora nos últimos anos algumas anormalidades genéticas e epigenéticas recorrentes tenham sido identificadas em pacientes com SMD, os mecanismos patogênicos subjacentes à doença e sua evolução ainda não estão completamente elucidados. O modelo mais aceito é o de múltiplas etapas, no qual ocorrem uma série de eventos moleculares cumulativos envolvendo a HSC e o microambiente medular, levando a instabilidade genética e a

anormalidades da apoptose, da proliferação e da diferenciação das células hematopoiéticas (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014; CHAMSEDDINE et al., 2016).

A HSC acumula mutações condutoras como resultado da exposição a agentes genotóxicos, a processos inflamatórios crônicos ou de repetição e às progressivas disfunções de telômero que ocorrem com a senescência. Mais de 94% dos pacientes com SMD apresentam uma ou mais mutações somáticas condutoras ao diagnóstico, e estas mutações acometem diferentes vias biológicas, justificando a heterogeneidade clínica da doença (BERNARD et al., 2022). As mutações recorrentes na SMD acometem mais frequentemente genes relacionados à regulação epigenética, regulação da transcrição, reparo do DNA e *splicing* do RNA (CHAMSEDDINE et al., 2016)

Embora estas mutações não sejam patognomônicas, o modelo de múltiplas etapas propõe que a aquisição em série de mutações pela HSC leva à formação e expansão de um clone com anormalidades da proliferação, diferenciação e apoptose, que em última instância é responsável pelo fenótipo de SMD. Pode ocorrer instabilidade genômica progressiva, com dominância clonal e evolução para LMA (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014; CAZZOLA, 2020; CHAMSEDDINE et al., 2016; VISCONTE; TIU; ROGERS, 2014).

A hematopoese clonal é um achado característico da SMD, com expansão progressiva do clone mutado, dando origem a precursores anormais, com hematopoese ineficaz e fenótipo clínico característico. No entanto, a hematopoese clonal pode ser subclínica e sem citopenias, caracterizando a Hematopoese Clonal de Potencial Indeterminado (CHIP), que pode preceder a SMD. Nesta condição, cerca de 4% das células hematopoiéticas da medula exibem mutações oncologicamente relevantes, o que corresponde a uma frequência de variante alélica (VAF) de 2%. À medida que o clone avança e ocorre a dominância clonal, com aquisição de mutações adicionais, ocorrem citopenias, caracterizando a Citopenia Clonal de Significado Indeterminado (CCUS). Nesta condição a VAF deve ser de no mínimo 20%. A evolução da CCUS é a SMD, com suas manifestações clínicas e critérios diagnósticos, podendo progredir para LMA, como resultado das anormalidades da diferenciação, seleção e progressão clonal (CAZZOLA, 2020).

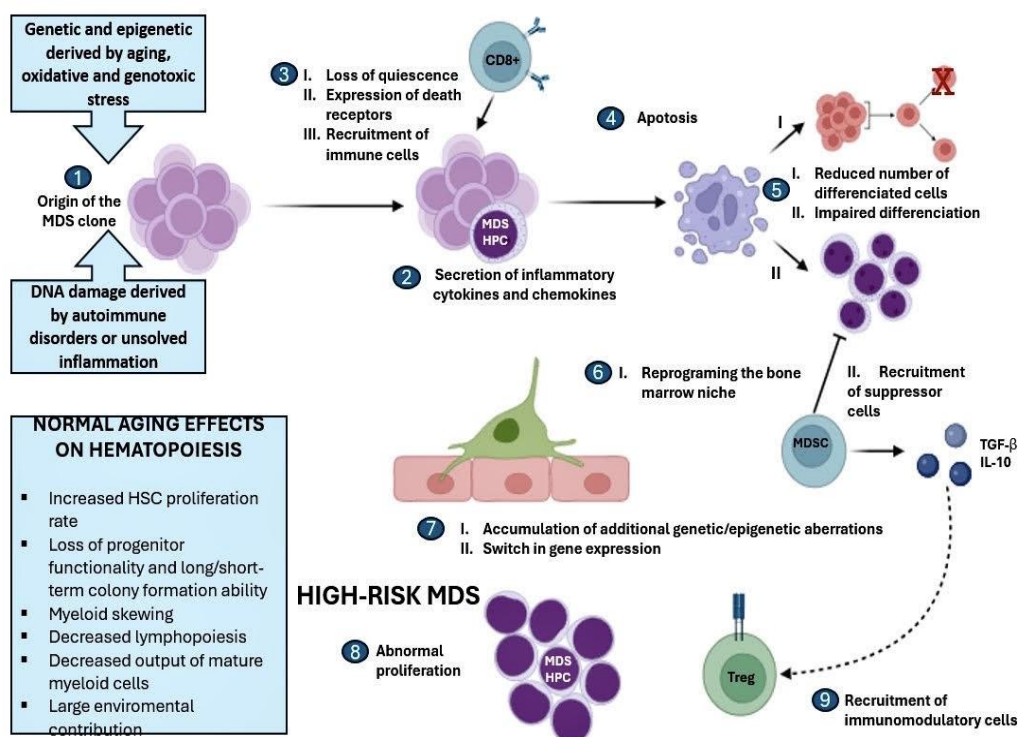
Estas etapas não evoluem de forma inexorável, e há diversos mecanismos biológicos em resposta à instalação e progressão do clone anômalo, produzindo fenótipos clínicos diversos de acordo com as mutações envolvidas e a eficiência dos mecanismos de controle da proliferação clonal (CHAMSEDDINE et al., 2016).

Lesões ao DNA induzem uma resposta ao dano, com ativação de mecanismos biológicos específicos, incluindo a ativação de *checkpoints* que promovem o reparo ou induzem

a apoptose das células clonais anômalas. Também em resposta ao clone em expansão, ocorre ativação das vias do sistema imune inato, com desequilíbrio da secreção de citocinas e quimiocinas envolvidas na apoptose e proliferação. A eficiência destes mecanismos de controle da expansão do clone anormal varia de um paciente para o outro e de acordo com as fases da doença em um mesmo paciente (CHAMSEDDINE et al., 2016).

Em fases iniciais da doença ou em SMD de baixo risco, o aumento da apoptose intramedular leva às citopenias características da doença, com medula óssea hipercelular e precursores displásicos. Mecanismos ainda não elucidados promovem a aquisição sequencial de mutações pela HSC, com progressão clonal e falência dos mecanismos de reparo, resistência à apoptose, progressiva instabilidade genômica e vantagem proliferativa do clone, com potencial evolução para LMA, achados característicos das fases avançadas da doença ou das SMD de alto risco (Figura 1) (CHAMSEDDINE et al., 2016; TROWBRIDGE; STARCZYNOWSKI, 2021).

**Figura 1 – Patogênese da Neoplasia Mielodisplásica**



**Fonte:** Resumo gráfico adaptado de Gañán-Gomes e colaboradores, 2015, utilizando a ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

Evidências acumuladas ao longo dos últimos anos sugerem que a desregulação do sistema imune e o quadro inflamatório associado afeta a hematopoiese de forma ampla e complexa, por mecanismos diretamente relacionados à HSC e mecanismos indiretos,

envolvendo o microambiente medular e células efetoras inflamatórias, contribuindo para a patogênese da SMD não apenas nas fases iniciais, com aumento da apoptose, mas ao longo de toda a evolução e progressão da doença, promovendo anormalidades da diferenciação mielóide, influenciando a relação do clone anômalo com o microambiente medular e contribuindo para a aquisição progressiva de mutações pela HSC (BALANDRÁN; LASRY; AIFANTIS, 2023; CHAMSEDDINE et al., 2016).

#### **1.4 Anormalidades citogenéticas e moleculares na SMD**

A identificação de anormalidades cromossômicas é a variável prognóstica mais importante na SMD, sendo utilizada em todos os modelos prognósticos propostos para a doença. As várias anormalidades citogenéticas descritas refletem a heterogeneidade da doença e são determinantes da patogênese da SMD, sendo úteis no diagnóstico, prognóstico e em alguns casos na seleção de recursos terapêuticos específicos (HAASE et al., 2007; LEE et al., 2016).

Em diversos estudos multicêntricos, a citogenética mostrou-se como um fator prognóstico independente robusto (HAASE, 2008). Por esta razão, o estudo citogenético é parte imprescindível da avaliação inicial da SMD, e as anormalidades citogenéticas foram incorporadas a todos os modelos prognósticos propostos para SMD (BILLSTRÖM et al., 1988; GREENBERG et al., 2012a; KNAPP; DEWALD; PIERRE, 1985; SCHANZ et al., 2012).

Utilizando a técnica de citogenética convencional (banda G), anormalidades cromossômicas são detectadas em cerca de 50% das SMD de novo e 80% das SMD secundárias a tratamento citotóxico. Frequentemente presentes ao diagnóstico, as anormalidades cromossômicas podem surgir ao longo da evolução da doença, refletindo o surgimento de novos clones (VISCONTE; TIU; ROGERS, 2014).

As anormalidades estruturais balanceadas, como translocações e inversões, comumente encontradas na LMA *de novo*, são raras na SMD, onde predominam as anormalidades cromossômicas não balanceadas, com perda de material genético por deleções ou monossomias ou ainda por translocações não balanceadas. Ganho de material genético, como trissomias totais ou parciais, é menos frequente. O mecanismo molecular predominante é a perda ou inativação de genes supressores de tumor, sendo a ativação de oncogenes um mecanismo de menor relevância na SMD (HAASE, 2008; LEE et al., 2016). À exceção da deleção isolada do braço longo do cromossomo 5 (5q-), a maioria destas anormalidades cromossômicas não representam mutações condutoras, sendo mais frequentemente

anormalidades genéticas secundárias à instabilidade genômica da SMD, impactando o processo de evolução clonal da doença (Lee et al., 2016).

Há um grande número de anormalidades citogenéticas descritas na SMD, refletindo a heterogeneidade genética da doença. As mais frequentemente encontradas são:  $-5/5q-$ ,  $-7/7q-$ ,  $+8$ ,  $20q-$  e  $-Y$  (HAASE, 2008). Estas anormalidades têm importância prognóstica e em alguns casos definem fenótipos específicos de SMD. A deleção do braço longo do cromossomo 5 ( $del(5q)$ ) com ou sem outras alterações citogenéticas associadas, é encontrada em 30% dos cariótipos anormais, sendo a anormalidade cromossômica mais frequente em SMD *de novo*. Quando isolada confere um prognóstico favorável, mas que pode ser modificado pela associação com outras anormalidades. A monossomia do cromossomo 7 pode ser total ou parcial e é a segunda anormalidade citogenética mais frequente em SMD. Ocorre em 25% dos cariótipos anormais, e está relacionada a um prognóstico desfavorável. Outra condição de prognóstico desfavorável é a presença de cariótipo complexo, definido como a presença de pelo menos 3 anormalidades cromossômicas independentes dentro de um mesmo clone. Está presente em cerca de 15% dos pacientes com SMD (HAASE, 2008).

Em alguns casos a pesquisa de anormalidades cromossômicas pela citogenética convencional (banda G) não pode ser realizada, pela ausência de metáfases ou baixo índice mitótico na amostra. A citogenética molecular pela hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma alternativa para pesquisa de anormalidades cromossômicas, permitindo a rápida análise de um grande número de células em interfase ou metáfase. É uma técnica de elevada sensibilidade, especificidade e rapidez, que utiliza sondas direcionadas às regiões cromossômicas frequentemente afetadas na SMD. No entanto, uma limitação da FISH é que anormalidades localizadas fora das regiões incluídas nas sondas não são identificadas. Por esta razão, dados da literatura sugerem que a citogenética convencional (banda G) deve ser sempre realizada nos pacientes com SMD, e que as duas técnicas têm caráter complementar, com particular importância do FISH nos pacientes com baixo índice mitótico, nos quais a ausência de metáfases ou a escassez delas limita a técnica por banda G (PINHEIRO; CHAUFFAILLE, 2009; ROMEO et al., 2002).

O advento das técnicas de sequenciamento genético possibilitou a ampliação da compreensão da patogênese e do impacto destas mutações no fenótipo clínico e no prognóstico da SMD (OGAWA, 2019). Papaemmanuil e colaboradores (2013) encontraram pelo menos uma mutação em 78% dos 837 pacientes estudados, sendo o *SF3B1* o gene mais frequentemente mutado (24%), seguido do *TET2* (22%) e do *SRSF2* (14%) (PAPAEMMANUIL et al., 2013). Haferlach e colaboradores (2014) estudaram 944 pacientes e encontraram pelo menos uma

mutação em 89,5% dos pacientes, com uma mediana de 3 mutações por paciente. Os genes mais frequentemente mutados foram *TET2*, *SF3B1*, *ASXL1*, *SRSF2*, *DNMT3A* e *RUNX1* (Tabela 1) (HAFERLACH et al., 2014).

Em 2022, Bernard e colaboradores publicaram resultados da avaliação de mutações em 2957 pacientes com SMD, e 94% deles apresentava pelo menos uma mutação oncogênica relacionada a SMD. Estas mutações foram analisadas junto às anormalidades citogenéticas e variáveis clínicas dos pacientes, servindo de base para a elaboração do IPSS molecular, ferramenta de estratificação prognóstica que incorporou a identificação de mutações recorrentes à avaliação prognóstica da SMD, com importante impacto na tomada de decisões clínicas (BERNARD et al., 2022)

**Tabela 1 - Mutações mais frequentes na SMD**

GENE	FREQUÊNCIA MUTACÃO (%)	FUNÇÃO
<i>TET2</i>	33	Demetilação DNA
<i>SF3B1</i>	33	Splicing RNA
<i>ASXL1</i>	23	Modificação de histonas
<i>SRSF2</i>	18	<i>Splicing RNA</i>
<i>DNMT3A</i>	13	Metilação DNA
<i>RUNX1</i>	11	Fator de transcrição
<i>U2AF1</i>	8	<i>Splicing RNA</i>
<i>ZRSR2</i>	8	<i>Splicing RNA</i>
<i>STAG2</i>	8	Complexo coesinas
<i>TP53</i>	6	Reparo DNA

Fonte: adaptado de Nakajima, H (2021)

## 1.5 Classificação da SMD

As SMD foram descritas inicialmente como “Síndromes Dismielopoiéticas” em 1976 pela FAB (French-American-British Cooperative Group) (BENNETT et al., 1976). Consideradas condições clínicas e morfológicas distintas das leucemias agudas, eram caracterizadas por citopenias, medula óssea hipercelular e com achados displásicos variáveis, podendo ser confundidas com leucemia mieloide aguda (LMA), mas com evolução mais indolente, sem indicação de tratamento imediato e com maior incidência em populações acima dos 50 anos. Até então considerada como “pré-leucemia”, pela primeira vez foi frisado que apenas uma parcela dos pacientes progredia para LMA, mas que a hematopoese ineficaz e a progressiva falência medular era responsável por muitos dos desfechos desfavoráveis. À ocasião foram descritas 2 formas de “Síndromes Dismielopoiéticas”: Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB) e Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC), mas os participantes da FAB já frisavam o caráter heterogêneo destas condições (BENNETT et al., 1976; VARDIMAN, 2012).

Esta descrição subsidiou tentativas de conhecer e caracterizar melhor a SMD quanto ao diagnóstico, apresentação clínica e prognóstico, e nos anos seguintes acumularam-se informações sobre estas condições. Em 1982 a FAB, publicou a primeira proposta de classificação das SMD, que descrevia 5 subtipos e já fazia referência às SMD secundárias a tratamentos oncológicos de quimioterapia e radioterapia (BENNETT et al., 1982).

Nos anos que se seguiram, a Classificação FAB foi uma ferramenta que facilitou a padronização do diagnóstico e os registros epidemiológicos da SMD. Além disso, novas tecnologias para caracterização de imunofenótipo e estudos de anormalidades genéticas em câncer possibilitaram a publicação dos primeiros estudos em larga escala envolvendo anormalidades citogenéticas em neoplasias mieloides e sua correlação com variáveis clínicas (BENNETT et al., 1982; ROWLEY et al., 1980).

Na tentativa de contemplar informações emergentes e otimizar os critérios diagnósticos das Neoplasias Mieloides, em 2001 foi publicada a Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para as neoplasias do tecido hematopoiético e linfóide. Para as neoplasias mieloides, foram utilizados os critérios e descrições já validadas da Classificação FAB, com modificações realizadas com base em informações clínicas, morfológicas, citoquímicas, imunofenotípicas e genéticas, refinando a definição das categorias de doença com base em variáveis relevantes na prática clínica (VARDIMAN, 2012; VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002).



A classificação da OMS trouxe várias modificações à FAB, incluindo retirada da Leucemia Mielomonocítica Crônica da classificação das SMDs, que passou a ser classificada como Neoplasia Mieloproliferativa/Mielodisplásica. No entanto, a modificação de maior impacto clínico foi a redução do limiar de blastos na medula ou sangue periférico necessário para classificação em LMA, que passou a ser de 20%, em substituição aos 30% propostos pela FAB (VARDIMAN, 2012; VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002).

Outro importante marco da Classificação da OMS foi a incorporação de categorias com achados genéticos recorrentes, refletindo o avanço no conhecimento dos aspectos genético-moleculares das neoplasias mieloides. Na classificação das LMA foi descrita uma categoria “LMA com achados genéticos recorrentes” e na SMD foi descrita a “SMD com deleção isolada com 5q-”, ou “Síndrome do 5q-”, um subtipo com achados clínicos específicos, como anemia macrocítica, trombocitose, displasia megacariocítica na medula, predomínio no sexo feminino e boa resposta clínica à terapia imunomoduladora (HAASE et al., 2007; VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002). Os mecanismos pelos quais a haploinsuficiência de genes codificados pelo segmento deletado determina o fenótipo da síndrome têm sido amplamente estudados, e sob muitos aspectos elucidados (HAASE, 2008).

Desde 2001, a Classificação da Organização Mundial da Saúde para os Tumores dos Tecidos Hematopoiéticos e Linfoides vem sendo amplamente utilizada na prática clínica, tendo passado por revisões em 2008, 2016 e 2022. Em sua 5ª edição, de 2022, a Classificação da OMS passou a adotar a nomenclatura “Neoplasias Mielodisplásicas” (mantendo, entretanto, a sigla SMD), com a intenção de realçar a natureza neoplásica/clonal destas condições e uniformizar a nomenclatura com as Neoplasias Mieloproliferativas. Além disso, agrupou os subtipos de SMD em duas categorias: Neoplasias Mielodisplásicas com anormalidades genéticas definidoras e Neoplasias Mielodisplásicas morfológicamente definidas. As anormalidades genéticas definidoras foram a deleção do 5q-, a presença de mutação do gene *SF3B1* e a presença de mutações bialélicas do *TP53*. As categorias de SMD morfológicamente definidas foram divididas em SMD sem excesso de blastos, SMD com excesso de blastos (subdividida em SMD-EB1, SMD-EB2 e SMD com fibrose, de acordo com a presença de fibrose medular e o percentual de blastos na medula e sangue periférico) e SMD hipoplásica, incluída nesta classificação. No caso da SMD sem excesso de blastos e com mutação do *SF3B1*, a presença de sideroblastos em anel em percentual maior ou igual a 15% é aceita para substituir a identificação da mutação (nomenclatura SMD sem excesso de blastos e com sideroblastos em anel). O percentual de blastos que distinguem a SMD e a LMA continuou sendo 20% (Tabela 2) (ALAGGIO et al., 2022).

Um aspecto relevante da 5ª edição da classificação da OMS é o reconhecimento da Hematopoese Clonal como precursora das neoplasias mieloides, e a definição formal da Hematopoese Clonal de Potencial Indeterminado (*Clonal haematopoiesis of indeterminate potential* - CHIP) e da Citopenia Clonal de Significado Indeterminado (*Clonal cytopenia of undetermined potential* - CCUS) como categorias específicas (ALAGGIO et al., 2022). Além da associação da hematopoese clonal com o aumento de risco de neoplasias mieloides, evidências clínicas de sua associação com doenças cardiovasculares e aumento da mortalidade motivaram esta inclusão (JAISWAL et al., 2014).

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

Blastos	Citogenética	Mutações
<b>SMD COM ANORMALIDADES GENÉTICAS DEFINIDORAS</b>		
SMD sem aumento de blastos e com del5q	Deleção isolada ou com 1 outra anormalidade, exceto monossomia 7 ou deleção 7q	
SMD sem aumento de blastos e com mutação <i>SF3B1</i> (SMD- <i>SF3B1</i> <sup>a</sup> )	<5% MO e <2% SP Ausência de deleção 5q, monossomia 7 ou cariótipo complexo	<i>SF3B1</i>
SMD com inativação bialélica do <i>TP53</i> (SMD-bi <i>TP53</i> )	<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
<b>SMD MORFOLOGICAMENTE DEFINIDAS</b>		
SMD sem aumento de blastos	<5% MO	
SMD hipoplásica (SMD-h <sup>b</sup> )	e <2% SP	
SMD com aumento de blastos tipo 1 (SMD-EB1)	5–9% MO ou 2–4% SP	
SMD com aumento de blastos tipo 2 (SMD-EB2)	10–19% MO ou 5–19% SP ou Bastonetes de Auer	
SMD com fibrose (SMD-f)	5–19% MO ou 2–19% SP	

**Fonte:** adaptado de Khoury e colaboradores (2022).

**Legenda:** MO (medula óssea); SP (sangue periférico); cnLOH (perda de heterozigose sem alterações do número de cópias).

<sup>a</sup> Presença de ≥15% de sideroblastos em anel substitui a mutação *SF3B1*. Terminologia aceitável: MDS sem aumento de blastos, com sideroblastos em anel.

<sup>b</sup> Por definição, ≤25% de celularidade da medula óssea, ajustada por idade.

## 1.6 Prognóstico da SMD

Os primeiros estudos de larga escala analisando anormalidades citogenéticas em SMD são da década de 80 (BEN NETT et al., 1982; ROWLEY et al., 1980). A heterogeneidade clínica da SMD e as limitações da estratificação prognóstica baseada apenas na Classificação

FAB e nas variáveis clínicas motivou tentativas de identificar anormalidades cromossômicas que auxiliassem o diagnóstico e a estratificação prognóstica dos pacientes com SMD, a fim de orientar condutas terapêuticas (VARDIMAN, 2012). Foram então publicados diversos estudos com propostas de sistemas de escores prognósticos para SMD e em 1997, Greenberg e colaboradores publicaram um estudo multicêntrico colaborativo com mais de 800 pacientes, subsidiando a elaboração do *International Prognostic Score System* (IPSS), que validou a reprodutibilidade e a importância prognóstica da classificação FAB, mas demonstrou que o número de citopenias, o percentual de blastos e as anormalidades citogenéticas são fatores prognósticos independentes. O IPSS classificava os pacientes em 3 grupos de risco citogenético e combinava estes grupos às citopenias e ao percentual de blastos para agrupar os pacientes em 4 categorias de risco relacionado à sobrevida global e progressão para LMA (P. Greenberg et al., 1997). O IPSS tornou-se o modelo prognóstico padrão para estratificação de risco em SMD, e as principais limitações do modelo eram não considerar a gravidade das citopenias e não ser um modelo dinâmico, não contemplando a avaliação prognóstica seriada e impossibilitando seu uso em pacientes previamente tratados (JONAS; GREENBERG, 2015).

Com o objetivo de aprimorar o valor preditivo do IPSS, um estudo multicêntrico envolvendo 7012 pacientes com SMD foi realizado. O IPSS revisado (IPSS-R) utilizou a nova estratificação prognóstica citogenética proposta por Schanz e colaboradores (SCHANZ et al., 2012), e incorporou 15 categorias citogenéticas, que foram agrupadas em 5 grupos de risco citogenético (Tabela 3). Além disso, aumentou as categorias quanto ao percentual de blastos e incorporou categorias de acordo com a gravidade das citopenias. O modelo do IPSS-R estratifica o paciente em 5 categorias de risco com relação à sobrevida global e progressão para LMA (Tabelas 4 e 5).

**Tabela 3 - Categorias de risco citogenético – IPSS-R**

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

Fonte: adaptado de Greenberg e colaboradores (2012).

Com relação ao IPSS, o IPSS-R foi capaz de modificar a categoria de 27% dos pacientes de baixo risco, que passaram a ser considerados de alto risco e de 18% dos pacientes de alto risco, que passaram a ser considerados de baixo risco, o que demonstra seu melhor poder

preditivo quando comparado ao IPSS (P. L. Greenberg et al., 2012; Jonas & Greenberg, 2015). Embora possua algumas limitações, como a não validação em pacientes com SMD-t, o IPSS-R é atualmente a ferramenta padrão para estratificação de risco na SMD (Jonas & Greenberg, 2015).

**Tabela 4 - Escores de variáveis prognósticas - IPSS-R**

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

Fonte: adaptado de Greenberg e colaboradores (2012).

**Tabela 5 - Categorias de risco prognóstico - 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).

Com o surgimento das novas técnicas de sequenciamento genético, várias mutações recorrentes foram descritas em SMD, com impacto na compreensão da patogênese, na classificação da doença e no seu prognóstico. Como resultado de um estudo multicêntrico envolvendo 2957 pacientes, Bernard e colaboradores propuseram um novo modelo prognóstico que avaliou as mutações recorrentes de 31 genes, o percentual de blastos na medula e as 5 categorias citogenéticas do IPSS-R, elaborando um novo escore prognóstico, o IPSS molecular (IPSS-M), no qual são descritas 6 categorias com diferenças prognósticas relevantes quanto à sobrevida global e progressão para LMA. Com relação ao IPSS-R, o IPSS-M demonstrou maior acurácia prognóstica, levando à reestratificação de 46% dos pacientes. É um escore dinâmico, pode ser utilizado para estratificação de SMD-t e foi validado em uma coorte externa de 754 pacientes japoneses com SMD (Bernard et al., 2022).

No estudo, 94% dos pacientes tinham pelo menos uma mutação com potencial oncogênico, e as mutações associadas a pior prognóstico foram a mutação multi-hit do *TP53*, as mutações do *FLT3* e a duplicação parcial em tandem do *MLL*, enquanto a mutação do *SF3B1* foi associada a melhor prognóstico, embora possa ser modulada pela associação de outras mutações (BERNARD et al., 2022).

## 1.7 Imunidade inata, Inflamação e Hematopoese

A inflamação é uma complexa resposta orgânica às agressões teciduais infecciosas ou estéreis. Promove, em última instância, o *clearance* do agente agressor, e é essencial à restauração da integridade tecidual, atuando também na regulação da hematopoese. Está relacionada à patogênese de diversas condições, incluindo doenças cardiovasculares, infecciosas e auto-imunes, e desde 2009 está incluída como um *hallmark* do câncer. Alguns mecanismos celulares e moleculares que predisõem à carcinogênese, como instabilidade genômica, proliferação celular, anormalidades da apoptose e disfunções das células estromais, são afetados pela inflamação (BALANDRÁN; LASRY; AIFANTIS, 2023; HANAHAN; WEINBERG, 2011)

A imunidade inata é a responsável pela resposta inicial às agressões teciduais, desencadeando a resposta inflamatória, que começa com o reconhecimento do agente agressor, ao qual se seguem a liberação de citocinas inflamatórias, o recrutamento de fagócitos e a ativação do sistema complemento. Os eventos são coordenados e complexos, e têm início com interação dos TLRs (Receptores Toll-Like) com seus ligantes, seguida pelo recrutamento de proteínas adaptadoras que, interagindo com os domínios intracelulares destes receptores, desencadeiam uma cascata de eventos, culminando com a transcrição de fatores reguladores da expressão de Interferon (IFN) e citocinas inflamatórias reguladoras da resposta imune (EL-ZAYAT; SIBAI; MANNAA, 2019; STARCZYNOWSKI; KARSAN, 2010)

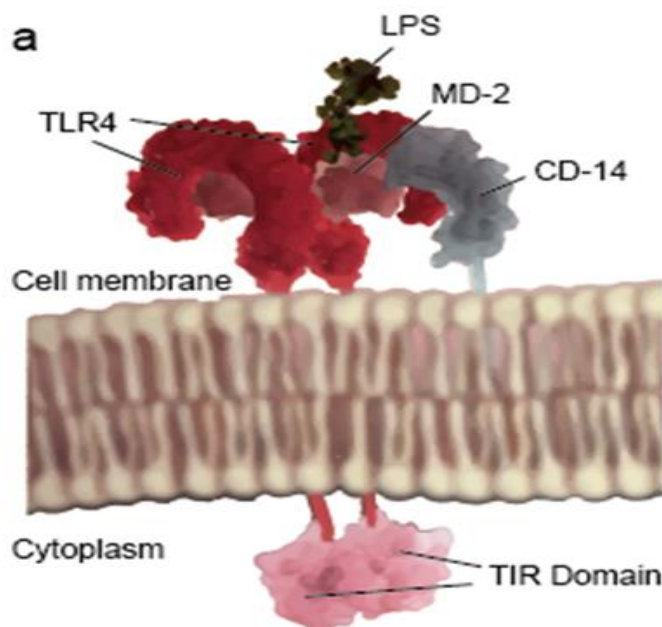
As células hematopoiéticas e a hematopoese estão sob a regulação fisiológica da imunidade inata. Na medula óssea, as HSC são mantidas quiescentes em nichos, numa complexa interação com as células estromais do microambiente medular, e a imunidade inata atua garantindo o equilíbrio entre a proliferação, diferenciação e apoptose destas células percursoras (BALANDRÁN; LASRY; AIFANTIS, 2023).

Os TLRs são os efetores iniciais da imunidade inata e exercem importante papel nos mecanismos fisiológicos de defesa e reparo tecidual (COUSSENS; WERB, 2002). Uma vez que o primeiro evento na ativação do sistema imune inato é a interação dos receptores Toll-Like (TLRs) com seus ligantes, a sinalização destes receptores participa da regulação fisiológica da hematopoese e a disfunção desta sinalização está associada a anormalidades do sistema hematopoiético (MONLISH; BHATT; SCHUETTPELZ, 2016).

Os TLRs são uma super-família de receptores celulares transmembrana capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares

associados a danos teciduais (DAMPs). São expressos em células do sistema imune maduras e em células tronco hematopoiéticas (HSC), exercendo importante papel na diferenciação das mesmas, sendo expressos também em macrófagos, fibroblastos e células dendríticas(FIGURA 2) (BALANDRÁN; LASRY; AIFANTIS, 2023).

**Figura 2 – Estrutura do Toll-like Receptors 4 e seus ligantes (TLR4)**

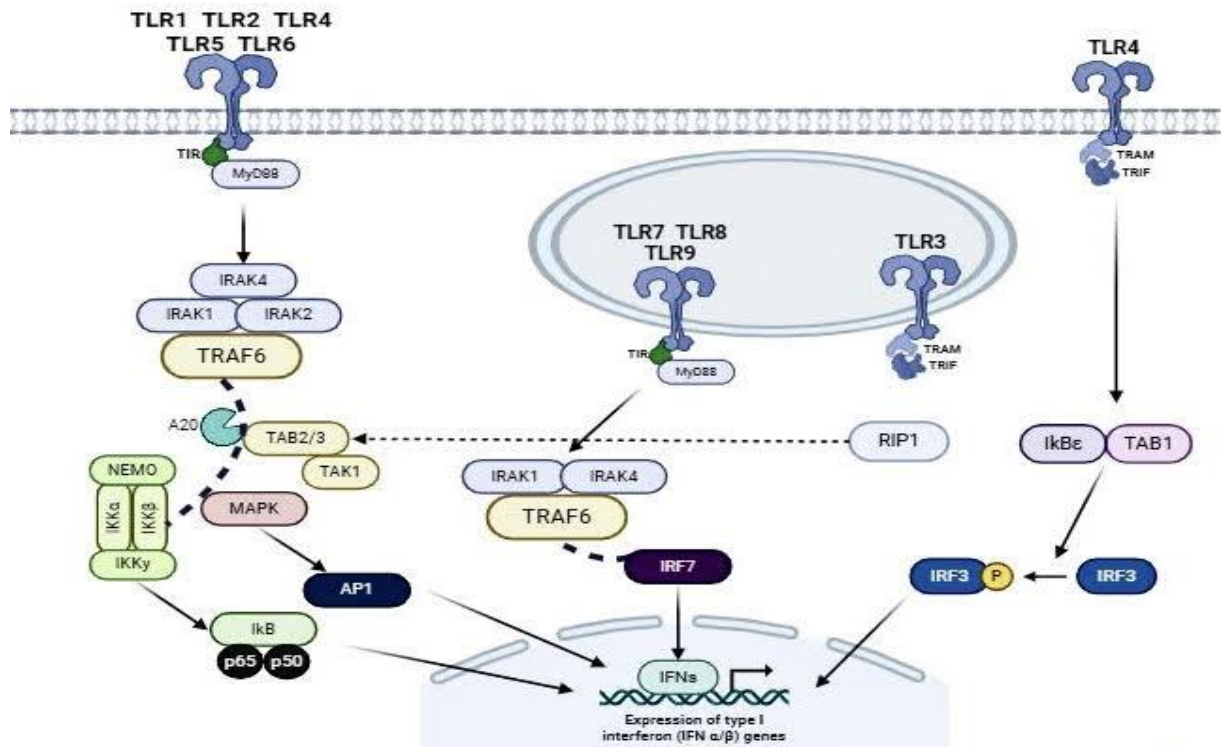


**Fonte:** Lim e colaboradores, 2013

Há 10 TLRs descritos em humanos, distintos entre si pela afinidade aos respectivos ligantes, pelas vias de sinalização intracelular acionadas e pela localização na membrana citoplasmática (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10) ou nas membranas de organelas intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9). A interação destes receptores com seus ligantes desencadeia uma sequência de eventos que culminam com a transcrição de fatores reguladores da expressão de Interferon (IFN) e citocinas inflamatórias envolvidas na iniciação e coordenação da resposta imune (Figura 3). Na ausência de infecção ou outros insultos, a sinalização dos TLRs regula a hematopoese fisiológica, influenciando a mobilização, proliferação e diferenciação das HSCs(BALANDRÁN; LASRY; AIFANTIS, 2023; MONLISH; BHATT; SCHUETTELPELZ, 2016). Em resposta a uma agressão, os TLRs medeiam a sinalização que aciona a “hematopoese de emergência”, privilegiando a diferenciação da HSC em precursores mielóides, numa complexa resposta coordenada que deve ser transitória e auto-

limitada, sob o risco de exaustão da HSC (BALANDRÁN; LASRY; AIFANTIS, 2023; PARACATU; SCHUETTPELZ, 2020).

**Figura 3 – TLRs e suas vias de sinalização intracelular**



**Fonte:** Resumo gráfico adaptado de Zheng C e colaboradores, 2020, utilizando a ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

Estudos experimentais demonstraram que a influência da sinalização dos TLRs na hematopoiese pode ocorrer por mecanismos indiretos (*non cell-autonomous*), quando ocorre ativação das vias dos TLRs das células efectoras do sistema imune, levando à produção de citocinas inflamatórias induzindo a proliferação celular e a diferenciação mieloide das HSCs, ou por mecanismos diretos (*cell-autonomous*), com ativação das vias dos TLRs das HSCs de forma autônoma ou por interação direta com os ligantes, promovendo a proliferação, diferenciação e mobilização destas células (STARCZYNOWSKI; KARSAN, 2010).

A desregulação da imunidade inata, com ativação persistente dos TLRs e processo inflamatório crônico, compromete a homeostase da hematopoiese e a fisiologia do microambiente medular, afetando a proliferação e diferenciação das células tronco hematopoiéticas (HSC) e contribuindo para a patogênese das neoplasias mieloides (BARREYRO; CHLON; STARCZYNOWSKI, 2018).

Na Neoplasia Mielodisplásica, os mecanismos de ativação da imunidade inata parecem ser perpetuados por uma série de fenômenos ainda não elucidados, e a participação da desregulação da imunidade inata na patogênese da SMD tem sido objeto de numerosos estudos.

### **1.8 Desregulação da imunidade na SMD**

As investigações quanto à participação das anormalidades da imunidade inata e inflamação na patogênese das neoplasias mieloides foram motivadas por resultados de estudos populacionais que revelaram a associação de condições inflamatórias crônicas ou doenças autoimunes com o desenvolvimento de LMA e SMD. Um estudo multicêntrico com 13486 pacientes com neoplasias mieloides (entre eles 2471 com SMD e 7824 com LMA) revelou a incidência de alguma doença inflamatória prévia ao diagnóstico em 10-30% dos casos de SMD e LMA, com destaque para doenças reumatológicas, em particular artrite reumatoide (ANDERSON et al., 2009). Kristinson e colaboradores realizaram estudo com uma coorte de 9219 pacientes com LMA, 1662 pacientes com SMD e 42878 controles, encontrando risco 2 vezes maior de desenvolver SMD ou LMA nos pacientes com antecedentes de doenças autoimunes (KRISTINSSON et al., 2011). Inflamação persistente associada a quadros infecciosos crônicos ou agudos de repetição também esteve associada ao aumento de risco de SMD em dois estudos epidemiológicos, com destaque para infecções respiratórias (KRISTINSSON et al., 2011; TITMARSH et al., 2014). Doença inflamatória intestinal, anemia hemolítica autoimune, vasculites e tireoidite são outras condições inflamatórias e autoimunes associadas à SMD (DE HOLLANDA et al., 2011).

Desde então, numerosas evidências clínicas e moleculares têm mostrado que a desregulação imune está relacionada à patogênese da Neoplasia Mielodisplásica (SMD) e da Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (IGNATZ-HOOVER et al., 2015; KRISTINSSON et al., 2011; VEGIVINTI et al., 2023).

Hiperexpressão de genes relacionados à imunidade inata e inflamação são descritos em até 50% dos pacientes com SMD ou LMA, e algumas anormalidades cromossômicas e mutações recorrentes encontradas nestas doenças associam-se ao aumento da resposta inflamatória e parecem ter impacto prognóstico (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2013; HAFERLACH et al., 2014; HOFMANN et al., 2002).

A SMD com deleção isolada do 5q (ou Síndrome do 5q-), um subtipo de SMD com anormalidade genética definidora e achados clínicos e morfológicos característicos, foi a primeira condição na qual se identificou uma relação causal entre mutação envolvida e



anormalidades em genes da imunidade inata. A deleção isolada do 5q- é considerada uma mutação condutora e a região comumente deletada envolve a perda de genes envolvidos na regulação da sinalização de vias dos TLRs e na estabilidade do TRAF6, levando à ativação sustentada dos TLRs, com desregulação do sistema imune e inflamação (PARACATU; SCHUETTPELZ, 2020).

Mutações recorrentes como TET2, ASXL1 e DNMT3A são comuns na SMD e na Hematopoese Clonal Relacionada à Idade (ARCH), e podem desencadear ou amplificar respostas inflamatórias (BALANDRÁN; LASRY; AIFANTIS, 2023). Na LMA, TET2 e DNMT3A também estão entre as mutações frequentemente encontradas (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2013).

Na recém descrita Síndrome VEXAS, uma mutação somática no gene UBA1, localizado no cromossomo X, leva à desregulação inflamatória, com manifestações auto-imunes e anormalidades da hematopoese, com citopenias e displasia em células hematopoiéticas, achados comuns com a SMD (BALANDRÁN; LASRY; AIFANTIS, 2023).

Tais associações corroboram o impacto da disfunção do sistema imune inato e da sinalização inflamatória anômala na proliferação e diferenciação dos precursores hematopoiéticos, contribuindo para hematopoese clonal e sua progressão para SMD e LMA (BALANDRÁN; LASRY; AIFANTIS, 2023; MATOS; MAGALHÃES; RAUH, 2021).

Esta desregulação da imunidade inata e da sinalização inflamatória envolve não apenas a hiperativação das vias dos TLRs, mas também a ativação anômala de vias de proliferação e vias pró-apoptóticas, aumento das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento e anormalidades da imunidade celular, numa complexa rede de processos relacionados entre si (PARACATU; SCHUETTPELZ, 2020)

Elevação dos níveis de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF e GM-CSF, tem sido descrita em pacientes com SMD e LMA, refletindo a hiperativação inflamatória, que contribui para o aumento da proliferação mieloide em detrimento da eritropoese e da linfopoese (GAÑÁN-GÓMEZ et al., 2015). O perfil de citocinas pode variar com o subtipo e a fase da doença, justificando o resultado heterogêneo entre os estudos no tocante às citocinas envolvidas e seu valor prognóstico (SHI et al., 2019). Em SMD de baixo risco, ou em fases iniciais da doença, predominam citocinas relacionadas ao aumento da apoptose característica desta fase (TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ), enquanto em SMD de alto risco, ou em fases avançadas da doença, predominam citocinas mais relacionadas à imunossupressão (IL-10), favorecendo a imunotolerância, com expansão clonal

acelerada e eventual dominância clonal, com progressão para LMA (KORDASTI et al., 2009; SHETTY et al., 1996).

No espectro das anormalidades da imunidade celular, anormalidades funcionais das células tronco mesenquimais (MSC) e das células supressoras mieloide-derivadas (MDSC) são descritas na SMD. Não foram descritas mutações coincidentes com as mutações do clone da HSC, mas foram postulados mecanismos de reprogramação funcional destas células em resposta ao microambiente inflamatório e ao estímulo diferencial de citocinas ao longo da evolução da doença (GAÑÁN-GÓMEZ et al., 2015; MEDYOUF et al., 2014).

As MSC são células precursoras não hematopoiéticas que dão origem a diversas células do estroma medular e exercem importante papel regulador no nicho medular durante a hematopoese, incluindo ação imunossupressora (PITTENGER et al., 1999). Wang e colaboradores (2013) demonstraram que a capacidade imunossupressora das MSC encontra-se comprometida nas fases iniciais da SMD, favorecendo a expansão de linfócitos T citotóxicos, sendo entretanto normal nas fases avançadas da doença (WANG et al., 2013)

As células supressoras mieloide-derivadas (MDSC), por sua vez, são células com ação inflamatória e imunossupressora que expressam CD33 (GABRILOVICH; NAGARAJ, 2009). Chen e colaboradores (2013) demonstraram aumento do número de MDSC na SMD, com impacto na diferenciação eritrocítica e mieloide e na proliferação de linfócitos T, contribuindo para a hematopoese ineficaz da SMD. Em modelos murinos demonstraram também que a interação alarmina S100A9 com o CD33 das MDSC é o evento condutor da expansão destas células, cujos efeitos imunossupressores são mediadores por IL-10 e TGF- $\beta$  (CHEN et al., 2013).

Apesar de linfopenia ser frequente em pacientes com SMD, é descrito incremento da imunidade celular, com aumento do número de linfócitos T citotóxicos (CD8), linfócitos T auxiliares e células NK, com redução dos linfócitos T reguladores (Treg) nas fases iniciais da doença, enquanto nas fases avançadas há comprometimento funcional e redução numérica destas células (EPLING-BURNETTE et al., 2007; FOZZA et al., 2009; KORDASTI et al., 2009). Estes achados realçam a importância das anormalidades do microambiente medular na patogênese da doença e corroboram o modelo de múltiplos passos propostos para a patogênese da SMD, com aumento da citotoxicidade nas fases iniciais e evolução para uma tolerância imune nas fases avançadas, favorecendo a expansão clonal acelerada, a dominância clonal e aumento do risco de progressão LMA (GAÑÁN-GÓMEZ et al., 2015)

A hiperativação das vias relacionadas aos TLR é um evento central da desregulação imune na SMD, desencadeando anormalidades na secreção de citocinas e participando das

anormalidades da imunidade celular acima descritas, sendo um marcador de ativação da imunidade inata.

Eventos genéticos e epigenéticos causam sinalização anômala dos TLRs, que leva a anormalidades da diferenciação mieloide e linfoide e está descrita em neoplasias hematopoiéticas, incluindo doenças linfoproliferativas, SMD e LMA (DATAR; GOODELL, 2020; MONLISH; BHATT; SCHUETTPELZ, 2016). Tanto a hiperativação crônica direta dos TLRs das HSCs, quanto a ativação dos TLRs das células efectoras do sistema imune interferem na proliferação, diferenciação e sobrevivência das HSCs, impactando o potencial de renovação e a sinalização pró-apoptótica das mesmas (MONLISH; BHATT; SCHUETTPELZ, 2016; STARCZYNOWSKI; KARSAN, 2010).

Sinalização anômala dos TLRs também está envolvida na patogênese de diversas condições inflamatórias não-infecciosas e doenças autoimunes, algumas delas associadas ao aumento do risco de SMD e LMA, demonstrando que ativação da imunidade inata e inflamação são eventos comuns às neoplasias mieloides e doenças inflamatórias, e corroborando os estudos clínicos que associam estas doenças.

Vários estudos avaliaram a expressão dos genes *TLR* em SMD e LMA. Maratheftis e colaboradores foram os primeiros a demonstrar aumento da expressão do aumento da expressão do *TLR4* e *TLR2* nas diversas linhagens celulares de medula óssea de pacientes com SMD. Expressão do *TLR4* estava significativamente aumentada em células CD34, sendo sua expressão relacionada à extensão da apoptose intramedular e aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  (MARATHEFTIS et al., 2007). Wei e colaboradores (2013) demonstraram aumento da expressão de *TLR1*, *TLR2* e *TLR6* em células CD34 de uma coorte de pacientes com SMD quando comparadas aos controles, sendo o *TLR2* mais alto nas SMD de baixo risco, enquanto o *TLR6* foi mais alto em doenças de alto risco. No mesmo estudo identificaram uma mutação do *TLR2*, a F217F, presente em 11% dos pacientes e associada ao aumento da ativação da via do *NFKB* (WEI et al., 2013). Zeng e colaboradores demonstraram aumento da expressão de *TLR2* em CD34 de pacientes de SMD de baixo risco quando comparados aos controles e às SMDs de alto risco, estando esta expressão relacionada à apoptose (ZENG et al., 2016). Estes são alguns dos achados demonstrando que anormalidades na sinalização das vias dos TLRs contribuem para a desregulação da imunidade inata e hematopoese ineficaz da SMD (GAÑÁN-GÓMEZ et al., 2015).

O aumento da sinalização dos TLRs pode ser traduzido não apenas pelo aumento de sua expressão ou aumento de citocinas inflamatórias, mas também pelo aumento de

moléculas envolvidas na sinalização intracelular das vias dos TLRs, em particular a via do MYD88.

### **1.9 A Via do MYD88 e o complexo proteico do MYD88**

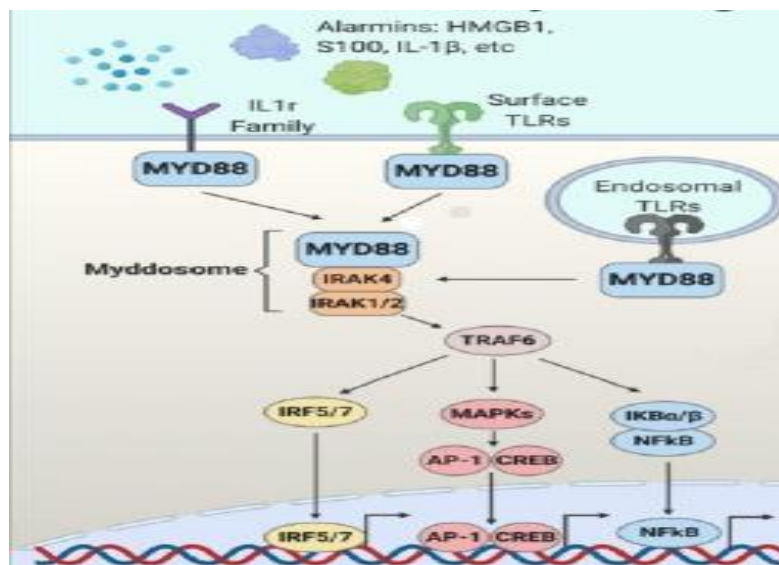
O MYD88 (Fator de Diferenciação Mieloide 88) é a principal proteína adaptadora da sinalização inflamatória dos TLRs. Medeia a interação dos TLRs com a família das quinases associadas ao receptor de interleucina (IRAKs), servindo de plataforma para a formação do complexo proteico do MYD88 (complexo do MYD88), cuja ativação leva, em última instância, à produção de citocinas inflamatórias e Interferon I (IFN-1). Exerce papel central na sinalização inflamatória fisiológica e atua na diferenciação mieloide e linfoide das HSCs, estando também ligada à ativação da via da Bruton Tirosina-Kinase (BTK) nos linfócitos B, participando da resposta imune adaptativa (VEGIVINTI et al., 2023).

Todos os TLRs, à exceção do TLR3, utilizam o MYD88 como proteína adaptadora. Após seu recrutamento pelo domínio intracelular TIR (Receptor Toll Intracelular de IL1) dos TLRs, o MYD88 forma um complexo com a IRAK4 (Kinase 4 associada ao receptor de interleucina), uma serina treonina kinase que a seguir recruta e fosforila a IRAK2 e a IRAK1 (Kinases 2 e 1 associadas ao receptor de interleucina), formando o complexo proteico do MYD88. Após sua fosforilação, a IRAK1 se desliga do complexo proteico e interage com o TRAF6 (Fator 6 associado ao receptor de TNF), cuja autoubiquitinação leva à formação de cadeias de poliubiquitinas K63, com atividade reguladora, possibilitando a ativação da TAK1 (Kinase 1 TGF $\beta$  ativada), que se liga ao complexo IKK pelas cadeias de ubiquitina, ativando a via do NF $\kappa$ B (Fator nuclear kappa B), e promovendo a ativação de membros da família das MAPK (Proteína kinase ativada por mitógenos), que medeiam a ativação do fator de transcrição AP-1 (proteína ativadora 1), culminando com a expressão de diversas citocinas inflamatórias, como interleucinas e TNF (fator de necrose tumoral) (Figura 4). Na estimulação dos TLRs 2 e 4, o MYD88 deve estar acoplado à TIRAP (proteína adaptadora do TIR) para iniciar sua sinalização (MONLISH; BHATT; SCHUETTPELZ, 2016; WANG et al., 2014).

A sinalização do TLR3 é independente do MYD88, e utiliza o TRIF (proteína adaptadora TIR indutora de IFN- $\beta$ ) como proteína adaptadora, recrutando o TRAF3 e levando à transcrição de IFN tipo I. O TRIF também interage com o TRAF6, contribuindo para a ativação das vias do NF $\kappa$ B e MAPK de forma independente do MYD88. TRAF3 também é recrutado na ativação dos TLRs 7 e 9, ambos intracelulares, levando à transcrição de IFN, desta

vez de maneira MYD88 dependente (MONLISH; BHATT; SCHUETTPELZ, 2016; WANG et al., 2014). O TLR4 é o único a utilizar ambas as vias, do MYD88 e do TRIF.

**Figura 4 – Complexo proteico do MYD88**



Fonte: Imagem adaptada de Bayer A.L e colaboradores, 2021

### 1.10 O complexo proteico do MYD88 nas neoplasias hematológicas

Atuando como a principal efetora da sinalização dos TLRs, a via do MYD88 tem importante participação na regulação do processo inflamatório e da hematopoese fisiológica. Anormalidades na expressão ou atividade dos componentes do complexo proteico do MYD88 e do *TRAF6* têm sido descritos em doenças inflamatórias e algumas neoplasias hematológicas, incluindo SMD e LMA, traduzindo a desregulação da via do *MYD88* nestas doenças.

Hiperatividade das vias de sinalização inflamatória secundária à presença de mutações com ganho de função no *MYD88* tem sido implicada em neoplasias hematológicas. Como exemplo, a mutação L265P no domínio TIR, onde a leucina é substituída pela prolina, foi inicialmente descrita no Linfoma Não-Hodgkin Difuso de Grandes Células B tipo ABC, contribuindo para a sobrevivência do linfoma pela hiperativação sustentada da via NFκB, mediada por uma forma hiperfosforilada de IRAK1 (NGO et al., 2011; WANG et al., 2014). A expressão do *MYD88* L265P mutado nas células linfoides foi similar à expressão do *MYD88* não mutado nos tecidos normais, indicando que se trata de uma mutação com ganho de função, com aumento da sinalização da via do complexo proteico do MYD88, aumento da produção de citocinas inflamatórias como IL-6 e IFN- $\gamma$  e aumento da sinalização da via JAK-

STAT (NGO et al., 2011; WANG et al., 2014). Esta mutação também foi descrita em outras neoplasias linfóides, sendo encontrada em cerca de 90% dos casos de Macroglobulinemia de Waldenström, 2-10% das Leucemias Linfóides Crônicas, 69% dos Linfomas Cutâneos de Grandes Células B e 35% dos Linfomas Primários de sistema nervoso central (WANG et al., 2014).

As demais proteínas do complexo proteico do MYD88, IRAK1, IRAK2 e IRAK4, também estão implicadas em neoplasias hematológicas. Num estudo de caracterização de expressão gênica em biópsias de Linfoma Folicular, B. Brodtkorb e colaboradores demonstraram que a expressão de *IRAK1* foi um dos dois principais preditores moleculares de transformação de Linfoma Folicular em formas mais agressivas (MONLISH; BHATT; SCHUETTPELZ, 2016; WANG et al., 2014). Estudos *in vitro* demonstraram que a estimulação dos TLRs promove o crescimento de células de Linfoma de Zona Marginal Esplênico de forma dependente de IRAK1 e IRAK4 (BENNETT; STARCZYNOWSKI, 2022; FONTE et al., 2015).

### **1.11 O Complexo Proteico do MYD88 na Neoplasia Mielodisplásica (SMD) e na LMA relacionada a SMD (LMA-RM)**

Alguns estudos têm avaliado a expressão do *MYD88*, dos demais genes relacionados do complexo proteico do MYD88 (*IRAK1*, *IRAK2* e *IRAK4*) e/ou de genes inflamatórios por ele ativados (ex: *TRAF6* e *NFkB*) como evidências do papel da via do *MYD88* na patogênese da SMD e sua relação com a resposta imune e sinalização inflamação anômalas.

#### **1.11.1 MYD88**

Em uma coorte de 64 pacientes com SMD, Dimicoli S. e colaboradores identificaram que 41% dos casos apresentaram aumento da expressão do *MYD88* em células medulares CD34+, havendo associação com pior sobrevida. Não foram encontradas mutações do *MYD88*. No mesmo estudo, a utilização de um heptapeptídeo inibitório do *MYD88* nas células medulares CD34+ levou ao aumento do número de colônias eritroides de 1 a 2 vezes com relação ao controle, sendo este efeito observado apenas em pacientes com SMD de baixo risco. Este achado correlacionou-se positivamente com o aumento da relação *GATA1/GATA2*, genes essenciais na regulação da hematopoese e cuja relação está relacionada à diferenciação eritroide (DIMICOLI et al., 2013). Apesar da associação com pior sobrevida, níveis de

expressão mais altos de *MYD88* foram encontrados nas células CD34 de pacientes de baixo risco de acordo com o IPSS (DIMICOLI et al., 2013)

Um estudo com 40 pacientes que avaliou o papel da hiperativação do TLR4 e sua via de sinalização na LMA revelou aumento da expressão de *MYD88* em células mononucleares de pacientes com prognóstico desfavorável com relação aos de prognóstico favorável. Expressão aumentada também foi observada nos pacientes quimiorrefratários em comparação aos quimiossensíveis. Os estudos corroboraram o papel na patogênese e o impacto prognóstico desfavorável da hiperativação do TLR4 na LMA (BAAKHLAGH et al., 2021).

O MYD88 é substrato da Speckle-type BTB–POZ protein (SPOP), uma E3 ubiquitina ligase descrita como um dos reguladores da “hematopoese de emergência”. A SPOP promove a ubiquitilação e degradação do MYD88, comprometendo a formação do complexo proteico do MYD88 e contribuindo para limitar o processo inflamatório e restaurar a hematopoese normal. Inibição da SPOP levou a uma resposta inflamatória e proliferação mieloide sustentadas, com ativação persistente da IRAK4, corroborando o papel do complexo proteico do MYD88 na proliferação e diferenciação das HSC (GUILLAMOT et al., 2019).

Diferentemente do identificado em neoplasias linfóides, mutações do *MYD88* não têm sido associadas às neoplasias mieloides (VARNEY et al., 2015a). Estudos de sequenciamento ampliado deste gene alvo, incluindo sequências promotoras e reguladoras, bem como sequenciamento de miRNAs com potencial efeito na regulação transcricional e translacional do gene, poderiam elucidar a expressão aumentada na ausência de mutações (DIMICOLI et al., 2013).

#### 1.11.2 Kinases receptoras de IL-1 (IRAK)

A família das kinases receptoras de IL-1 (IRAK) tem 4 membros: IRAK1, IRAK2, IRAK3 e IRAK4. São serina treonina-quinases envolvidas na sinalização dos receptores TLR e dos receptores de IL-1 (IL-1R), participando da transdução de sinais de diversos processos fisiológicos, incluindo inflamação, apoptose e diferenciação celular. Após ativação dos TLRs, as IRAK4, IRAK2 e IRAK1 interagem com o MYD88 e formam o complexo proteico do MYD88, sendo, portanto, importantes mediadores da resposta inflamatória, participando da regulação da hematopoese e estando implicadas na patogênese da SMD e LMA (Bennett & Starczynowski, 2022; Rhyasen & Starczynowski, 2015).

Todas as IRAK possuem um “domínio letal” N-terminal, através do qual dimerizam com o MYD88, um domínio prolina/serina/treonina e um domínio kinase/pseudokinase.

Apenas as IRAK1, IRAK2 e IRAK3 possuem um domínio c-terminal, necessário para a interação com o TRAF6. Embora recebam o nome de quinases, apenas as IRAK1 e IRAK4 apresentam atividade kinase (RHYASEN; STARCZYNOWSKI, 2015).

#### 1.11.2.1 IRAK4

Após a estimulação do TLR, a IRAK4 é a primeira a interagir com o MYD88 recrutado, dando início ao complexo proteico do MYD88. Como resultado de mecanismos de *splicing* alternativo, o *IRAK4* expressa 2 isoformas de RNA, de acordo com a inclusão ou exclusão do éxon-4 ou éxon-6: a IRAK4-S, isoforma mais curta, onde o éxon-4 ou éxon-6 são excluídos, e a IRAK4-L, isoforma mais longa, onde o éxon-4 ou éxon-6 são incluídos por um mecanismo de *splicing* alternativo. A IRAK4-L é proteína longa completa cujo domínio letal interage eficientemente com o MYD88, levando à ativação das vias do NFkB e MAPK de forma sustentada, exacerbando a resposta inflamatória. A IRAK4-S é uma proteína mais curta, incompleta, que não possui o “domínio letal” e não interage eficientemente com o MYD88 para formar o complexo proteico do MYD88, atuando apenas na manutenção da homeostase do sistema imune inato e da hematopoese normal (KATAOKA; MATSUMOTO; MASAKI, 2021).

A isoforma hiperativa IRAK4-L contribui para a hiperativação inflamatória e patogênese da SMD e LMA, e está associada a mutações envolvendo o *splicing* do RNA, encontradas em cerca de 50% dos pacientes com SMD (SMITH et al., 2019).

Uma destas mutações envolvendo o *splicing* do RNA, do *U2AF1*, é encontrada em 7-11% das SMDs e cerca de 10% das LMAs. A isoforma longa *IRAK4-L*, resultado de *splicing* alternativo com retenção do éxon 4, é preferencialmente expressa e encontrada em 100% das SMDs e LMAs com mutação *U2AF1*, estando associada a pior prognóstico. Cerca de 50% dos pacientes sem a mutação também expressaram preferencialmente o *IRAK4-L*, sugerindo a participação de outros mecanismos genéticos e moleculares na regulação do *splicing* alternativo e expressão das isoformas do *IRAK4-L*. No mesmo estudo, foi demonstrada, em modelo animal, 50% de redução das células de SMD após 3 semanas de tratamento com um inibidor de IRAK4 (PELLAGATTI; BOULTWOOD, 2023; SMITH et al., 2019).

A mutação do *SF3B1*, também envolvendo *splicing* do RNA, é encontrada em 35-43% dos pacientes com SMD, e em 98% dos pacientes com o subtipo SMD com sideroblastos em anel. O *splicing* alternativo leva à retenção do éxon-6, resultando em uma isoforma de *IRAK4-L*, com hiperativação da via NFkB e bloqueio da diferenciação normal. O uso de um



inibidor de IRAK4 em modelo murino resultou em redução da ativação da via do NFkB, redução de citocinas, aumento da diferenciação mieloide e redução do crescimento das células neoplásicas (CHOUDHARY et al., 2022).

Tais achados demonstram a participação da isoforma longa da IRAK4 na imunidade inata e resposta inflamatória, através da interação com o MYD88 para a formação do complexo proteico do MYD88, e sugerem links genéticos entre hiperativação imune e carcinogênese na SMD.

Inibidores de IRAK4 demonstraram resultados promissores em modelos pré-clínicos e atualmente o CA-4948 (Emavusertib) está sendo utilizado em ensaios clínicos para SMD, LMA e linfomas (BENNETT et al., [s.d.]).

#### 1.11.2.2 IRAK2

A IRAK2 é fosforilada pela IRAK4, a qual se une, juntamente com o MYD88, para formar o núcleo do complexo proteico do MYD88. É uma pseudokinase e possui um domínio n-terminal que interage com o TRAF6. No entanto, a participação da IRAK2 na via do MYD88 não é conhecida em detalhes, embora participe da sinalização de vários TLRs, sendo descrita associação de sua hiperexpressão com aumento da ubiquitilação do TRAF6 e ativação da via do NFkB. Estudos sugerem que a IRAK2 é crítica para manter a sinalização da via NFkB na ativação sustentada da via do MYD88, uma vez que mantém sua atividade catalítica em fases tardias da ativação destas vias. Não há dados relativos à sua expressão em SMD ou LMA (BENNETT; STARCZYNOWSKI, 2022; RHYASEN; STARCZYNOWSKI, 2015).

#### 1.11.2.3 IRAK1

Não faz parte do núcleo do complexo proteico do MYD88, mas interage transitoriamente com a IRAK4, que a fosforila, desligando-se a seguir, para ativar o TRAF6. É um importante mediador da sinalização dos TLRs, sendo extensivamente fosforilado após sua estimulação (BENNETT; STARCZYNOWSKI, 2022; RHYASEN; STARCZYNOWSKI, 2015).

O *IRAK1* está hiperexpresso em 20 a 30% dos pacientes com SMD, sendo observado também aumento da expressão da proteína IRAK1 numa forma hiperativada. Os mecanismos moleculares envolvidos na hiperexpressão do *IRAK1* não estão elucidados, sendo

a hiperestimulação dos TLRs ou a hiperexpressão de cofatores os mecanismos possíveis (RHYASEN; BOLANOS; STARCZYNOWSKI, 2013).

Os microRNAs miR-145 e miR-146a são reguladores negativos do *IRAK1*, e pacientes com SMD e deleção de miRNAs apresentam aumento da expressão de *IRAK1* e de mediadores inflamatórios (VEGIVINTI et al., 2023).

Um inibidor não seletivo de IRAK1/4, originalmente desenvolvido para tratar doenças autoimunes e autoinflamatórias foi utilizado em linhagens celulares de SMD e LMA, sendo observada redução da proliferação e da viabilidade celular em pacientes com SMD, com menor resposta em células de LMA, mas não está clinicamente disponível. Inibidores seletivos de IRAK1 ainda não foram avaliados, mas o pacritinibe, um inibidor multi-kinase que inibe a JAK2, o FLT3 e a IRAK1 demonstrou resultados num estudo fase 1 para tratamento de Mielofibrose e promoveu inibição significativa da IRAK1, podendo servir de base para estudos adicionais com moléculas inibidoras de IRAK1 e suas aplicações (SINGER et al., 2018).

### **1.12 TRAF6 na Neoplasia Mielodisplásica (SMD) e na LMA relacionada a SMD (LMA-RM)**

O TRAF6 é uma proteína adaptadora com importantes funções na regulação da imunidade inata, participando de diversas vias de sinalização intracelular, incluindo a via do MYD88. Não faz parte do complexo proteico do MYD88, mas é ativada pelo IRAK1, atuando como um mediador central na sinalização da imunidade inata. Participa da regulação da hematopoese como transdutor de sinais, com importante papel na diferenciação, homeostase e ativação de precursores mieloides, células linfoides B e T, macrófagos e células dendríticas. Anormalidades da expressão do *TRAF6* têm sido implicadas em tumores sólidos e neoplasias hematológicas (LI et al., 2020; WALSH; LEE; CHOI, 2015).

O TRAF6 tem atividade E3 ubiquitina-ligase e possui três domínios funcionais distintos. Na extremidade C-terminal encontra-se o domínio TRAF, que facilita sua oligomerização e possibilita a interação com receptores e outras proteínas sinalizadoras. Na extremidade N-terminal, o domínio RING tem atividade de E3 ubiquitina ligase, que facilita a formação de cadeias de poliubiquitinas K63. Por fim, ligando estas duas extremidades há cinco domínios em “dedo de zinco”, com função estrutural (LI et al., 2020).

Na via de sinalização dos TLRs dependente do MYD88, a autoubiquitinação do TRAF6, após sua ativação pelo IRAK1, leva à formação de cadeias de poliubiquitinas K63 com atividade reguladora, possibilitando a ativação da kinase 1 beta ativada (TAK1), e consequente

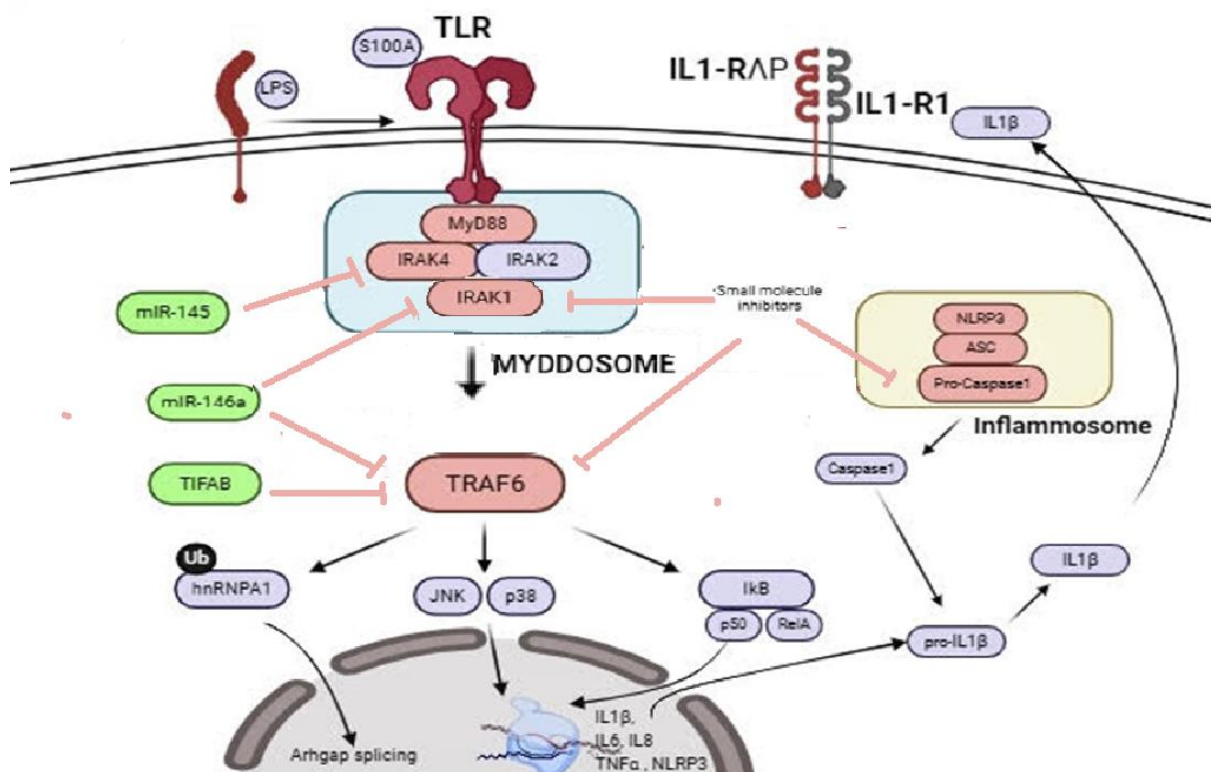
ativação da via do NFkB, e da via das MAPK (p38 e JNK) levando à produção de citocinas inflamatórias. No caso do TLR2 e TLR4, o TIRAP (proteína adaptadora do domínio TIR) otimiza o acoplamento do domínio TIR ao MYD88 e consequente formação do complexo proteico do MYD88 (KAWASAKI; KAWAI, 2014; LI et al., 2020; PARACATU; SCHUETTPELZ, 2020). Na via independente do MYD88, o TRIF (proteína adaptadora TIR indutora de IFN- $\beta$ ) recruta o TRAF6 e o TRAF3. O TRAF6 recruta a RIP-Kinase, que ativa o complexo TAK1 (KAWASAKI; KAWAI, 2014).

A sinalização relacionada ao TRAF6 não apenas envolve a ubiquitinação e ativação de diversas proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular, mas está relacionada também à homeostase do sistema imune, sendo alvo de regulação negativa de acordo com a célula envolvida e o contexto imunológico. Exemplos de regulação negativa do TRAF6 são a desubiquitinação promovida pela ação de enzimas específicas, como as enzimas A20, e os microRNAs, cujas ações reguladoras pós transcricionais da expressão gênica participam da regulação negativa do TRAF6. Além disso, uma proteína que atua por um mecanismo dependente de lisossomos, a TIFAB, é responsável pela degradação da TRAF6. Tais mecanismos são importantes no “ajuste fino” da resposta imune e no estabelecimento da imunotolerância (Figura 5) (LI et al., 2020; RHYASEN; STARCZYNOWSKI, 2012; VARNEY et al., 2015b).

TRAF6 é, portanto, um mediador central na sinalização da imunidade inata, e diversos mecanismos moleculares e anormalidades genéticas envolvendo o sistema imune inato e encontradas na SMD e LMA convergem para sua desregulação.

Em um estudo de caracterização do padrão de expressão gênica em SMD, Hofmann WK et al observaram expressão aumentada do *TRAF6* em células CD34 de pacientes com SMD em comparação com controles saudáveis, sendo este aumento significativo tanto para SMD de baixo risco quanto para SMD de alto risco (HOFMANN et al., 2002; RHYASEN; STARCZYNOWSKI, 2012). Fang J et al observaram expressão aumentada de TRAF6 em 40% das células CD34 de pacientes com SMD, em comparação com CD34 de indivíduos saudáveis, nos quais expressão aumentada foi observada em 15% (FANG et al., 2017).

**Figura 5 – TRAF6 e seus reguladores**



**Fonte:** Resumo gráfico adaptado de Barreyro L e colaboradores, 2018, utilizando a ferramenta online BioRender (<https://biorender.com/>).

A Síndrome do 5q- é um subtipo de SMD definida pela presença de uma deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5 e caracterizada pela presença de anemia refratária, neutropenia e plaquetose, com presença de megacariócitos hipolobulados na medula óssea. Neste subtipo, a região comumente deletada envolve diversos genes relacionados à hematopoese, incluindo os codificadores dos microRNAs miR-145 (5q33.1) e miR-146 (5q33.3), e o *TIFAB*, que codifica a proteína TIFAB. Estes microRNAs e a TIFAB estão envolvidos na modulação do sistema imune pela regulação da expressão e estabilidade do *TRAF6*, respectivamente. Os miR-145 (5q33.1) e miR-146 (5q33.3) também são reguladores negativos do TIRAP, proteína adaptadora que otimiza a ligação dos TLR2 e TLR4 ao MYD88, facilitando a formação do complexo proteico do MYD88 (PARACATU; SCHUETTPELZ, 2020) .

Starczynowski e colaboradores encontraram menor expressão de miR-145 e miR-146a em células CD34 de pacientes com del (5q) em comparação aos controles. A perda simultânea destes miRNAs resultou em maior sinalização do sistema imune inato, com elevação do TIRAP e do TRAF6, além de ativação persistente da via do *NFκB* e aumento da produção de IL-6. Modelo murino com *knockdown* de miR-145 e miR-146a levou a fenótipos

hematológicos semelhantes à Síndrome do 5q-, enquanto ratos transplantados com células medulares com elevada expressão de *TRAF6*, além de reproduziram os achados da Síndrome do 5q-, demonstraram risco aumentado de progressão para falência medular e LMA (GAÑÁN-GÓMEZ et al., 2015; PARACATU; SCHUETTPELZ, 2020; STARCZYNOWSKI et al., 2010).

Na del(5q) ocorre também a haploinsuficiência do *TIFAB*, cuja proteína codificada, a TIFAB, reduz a estabilidade do TRAF6 por um mecanismo dependente de lisossomos. Varney e colaboradores demonstraram, em modelo animal, que perda do *TIFAB* promove hematopoese anormal e falência medular progressiva, com citopenias e displasia granulocítica. Foi observada desregulação imune, com hipersensibilidade à estimulação do TLR4 e aumento do TRAF6. Demonstraram ainda que a associação da deleção do *TIFAB* com a deleção do miR-146a, potencializa a hiperexpressão do *TRAF6* e a disfunção da hematopoese (PARACATU; SCHUETTPELZ, 2020; VARNEY et al., 2015b).

O tratamento preconizado para Síndrome do 5q- é o uso de imunomoduladores, como Lenalidomida, evidenciando o papel da hiperativação imune neste subtipo de SMD (STARCZYNOWSKI et al., 2010).

Diversos fatores auxiliares de *splicing* do RNA são substratos da atividade E3 ubiquitina-ligase do TRAF6, e sua hiperexpressão nas HSC associou-se a anormalidades no *splicing* do RNA de genes relacionados à regulação da hematopoese. Utilizando modelo murino, Fang e colaboradores demonstraram que o TRAF6 pode ubiquitinar a hnRNPA1 (Ribonucleoproteína nuclear heterogênea A1), promovendo *splicing* alternativo e redução da expressão de Arhgap1, um inibidor da proteína CDC42, cujo aumento está relacionado à hematopoese aberrante e implicado na hematopoese ineficaz relacionada à senescência. Estes achados sugerem que o *TRAF6* induz anormalidades intrínsecas na HSC (FANG et al., 2017; PARACATU; SCHUETTPELZ, 2020).

Tais resultados evidenciam a relação entre o aumento da sinalização imune inata e os mecanismos de regulação do processamento do RNA através do *splicing* alternativo e/ou modificações pós translacionais, e reforçam a importância da presença de mutações recorrentes em fatores relacionados ao *splicing* do RNA na patogênese da LMA e SMD.

Além das numerosas descrições do *TRAF6* como um gene potencializador ou promotor de hematopoese aberrante na SMD e LMA, Muto e colaboradores descreveram achados de um cenário no qual o *TRAF6* tem ação supressora de tumor. Seus dados revelaram que hipoeexpressão do *TRAF6* coopera com a mutação de perda de função do *TET2* na patogênese de neoplasias mieloides. Demonstraram que após a ativação dos TLRs, aumentada na mutação do *TET2*, o TRAF6 medeia a ubiquitinação do MYC, evitando o estímulo à

proliferação resultante da ativação deste gene alvo, e que a hipoexpressão do *TRAF6* leva à menor ubiquitinação do MYC e maior proliferação celular. Mutações com perda de função no *TET2*, gene implicado na regulação epigenética, são encontradas em aproximadamente 19% das SMD e 13% das LMA, estando associadas ao aumento da atividade inflamatória e expansão do compartimento mieloide (BALANDRÁN; LASRY; AIFANTIS, 2023; CHOU et al., 2011; HOSONO, 2019; MUTO et al., 2022) .

Conforme exposto, várias mutações envolvendo o sistema imune inato e associadas a SMD convergem para o TRAF6. Em particular, a hiperexpressão do *TRAF6*, mediador central da imunidade inata, está relacionada à perda da homeostase da hematopoese, reforçando o papel da desregulação da imunidade inata na SMD.

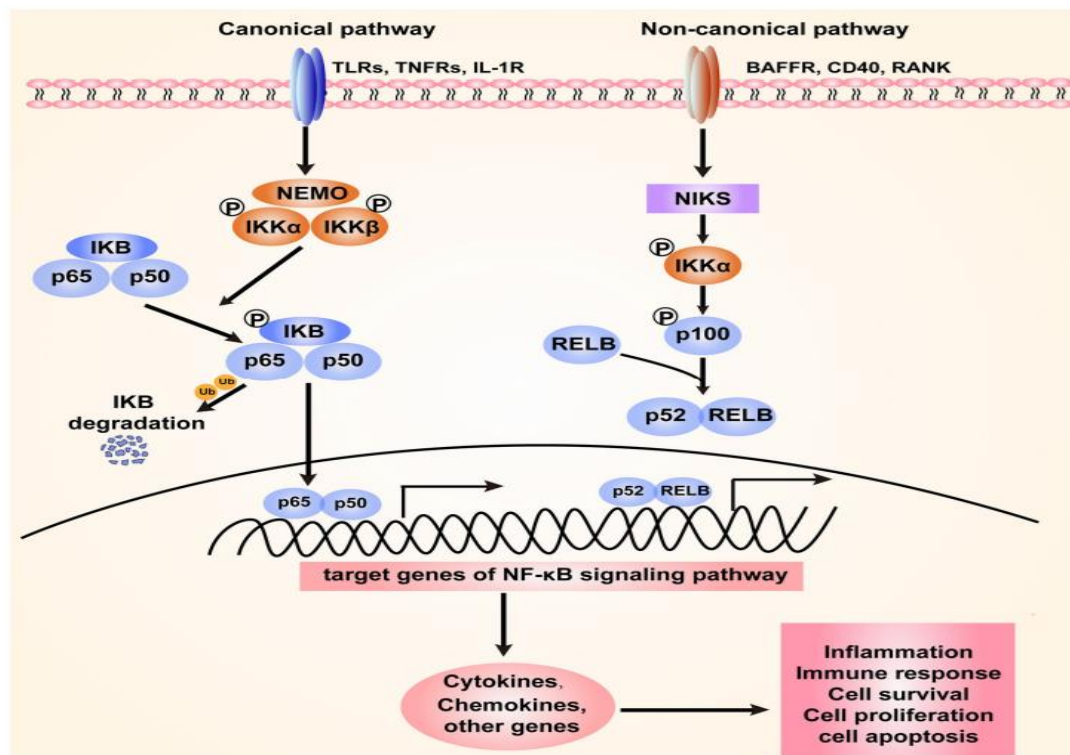
### **1.13 NFkB na Neoplasia Mielodisplásica (SMD) e na LMA relacionada a SMD (LMA-RM)**

NFkB (Fator Nuclear KB) é uma família de fatores de transcrição envolvidos na regulação de vários genes da resposta imune e inflamatória. Esta família é composta por 5 proteínas estruturalmente relacionadas, incluindo NFkB1 (p50), NFkB2 (p52), RelA (p65), RelB e c-Rel, que são mantidas no citoplasma inativas do ponto de vista transcricional pela ligação às proteínas inibitórias da família IκB. Estas proteína inibitórias são alvos das IκB kinases, proteínas do complexo IKK, que ativadas por diversos estímulos como citocinas, fatores de crescimento e PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), fosforilam as proteínas IκB, promovendo sua degradação mediada por ubiquitinas e possibilitando a translocação nuclear das proteínas NFkB, que atuarão como fatores de transcrição de vários genes envolvidos na regulação da resposta imune e da inflamação, influenciando a ativação, diferenciação e função das células da imunidade inata e da imunidade adaptativa e atuando na regulação de citocinas inflamatórias e quimiocinas, incluindo TNF-α, IL-6, IL-8 e proteínas anti-apoptóticas (PERKINS; GILMORE, 2006). Há duas vias de ativação do NFkB distintas quanto aos estímulos necessários e aos seus mecanismos de sinalização, mas ambas são importantes na regulação imune e inflamatória (Figura 6) (LIU et al., 2017).

A família de fatores de transcrição NFkB é considerada um elemento central na resposta inflamatória, estando associada à patogênese de várias doenças inflamatórias e ao câncer, onde atua tanto no estímulo à citotoxicidade imune direcionada às células neoplásicas quanto na manutenção do ambiente inflamatório que contribui para a tumorigênese, sendo sua contribuição distinta de acordo com a neoplasia e seu estágio evolutivo (HOESEL; SCHMID,

2013). Ativação constitutiva da via NF $\kappa$ B já foi descrita em algumas neoplasias hematológicas como Linfoma de Hodgkin e Leucemia Linfóide Aguda, bem como em alguns tumores sólidos (MARTY W. MAYO, 2000).

**Figura 6 – NF $\kappa$ B – via canônica e via alternativa (não canônica)**



Fonte: Peng C e colaboradores, 2020

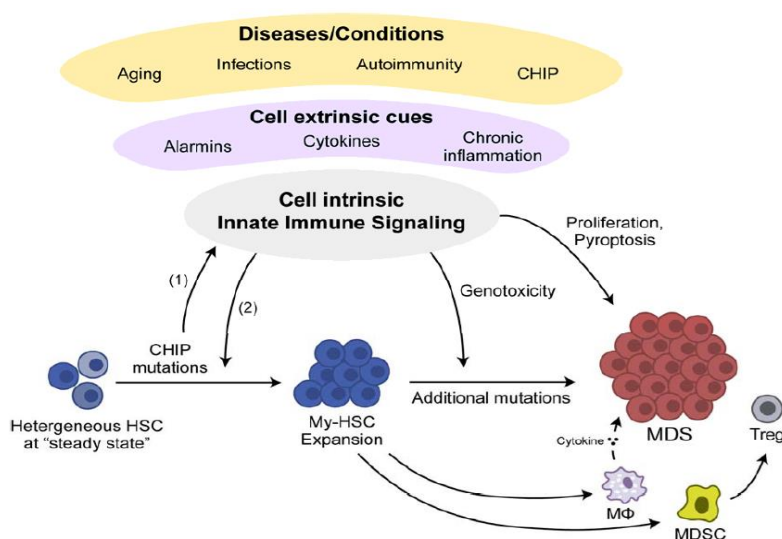
Ativação basal da via NF $\kappa$ B é necessária para a homeostase das HSC, ao passo que hiperativação desta via associa-se a anormalidades da hematopoese (MUTO et al., 2022). A atividade da via NF $\kappa$ B está aumentada em HSC de SMD, estando relacionada à progressão da doença, com maior atividade observada nas doenças avançadas (KERBAUY et al., 2005). O bloqueio NF $\kappa$ B em HSC de SMD induziu apoptose destas células, sugerindo que a ativação desta via confere vantagem proliferativa às células progenitoras na SMD (BRAUN et al., 2006; PYATT et al., 1999). Baumgartner e colaboradores demonstraram aumento da atividade NF $\kappa$ B e das I $\kappa$ B kinases em blastos de pacientes com LMA (BAUMGARTNER et al., 2002).

Estudos sugerem que os efeitos da via NF $\kappa$ B na hematopoese são indiretos (*not cell autonomous*). A ativação desta via nas células mielóides não parece ser suficiente para levar ao fenótipo de SMD, mas a desregulação da via NF $\kappa$ B no compartimento não hematopoietico promove um ambiente inflamatório e relaciona-se ao risco de desenvolvimento de SMD e outras neoplasias mielóides (RUPEC et al., 2005).

Numa coorte de 25 pacientes com diagnóstico de SMD e 20 controles, Matos e colaboradores encontraram níveis aumentados de IL-8 e atividade NFκB nos pacientes com SMD quando comparados aos controles, com a maior elevação sendo observada em pacientes acima de 75 anos. Houve correlação positiva entre atividade NFκB e IL-8, e a atividade NFκB associou-se a maior percentual de blastos e níveis mais altos de ferritina, marcadores clínicos de prognóstico desfavorável (A. G. de Matos et al., 2017).

Em resumo, a ativação da via NFκB é um evento para o qual convergem diversas vias inflamatórias, incluindo a via do MYD88 após ativação dos TLR. Dados da literatura demonstram que a via NFκB tem importante papel na patogênese da SMD, possibilitando a expressão de numerosas citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, contribuindo para as anormalidades da hematopoiese características da SMD (GAÑÁN-GÓMEZ et al., 2015)

**Figura 7 – Desregulação imune na SMD**



**Fonte:** Barreyro L e colaboradores, 2018

Conforme exposto acima, evidências acumuladas ao longo dos últimos anos sugerem que a desregulação do sistema imune e o quadro inflamatório associado afeta a hematopoiese de forma complexa, por mecanismos diretamente relacionados à HSC e mecanismos indiretos, envolvendo o microambiente medular e células efectoras inflamatórias e contribuindo para a patogênese da SMD não apenas nas fases iniciais, com aumento da apoptose, mas ao longo de toda a evolução e progressão da doença, promovendo anormalidades da diferenciação mieloide, influenciando a relação do clone anômalo com o microambiente medular e contribuindo para a aquisição progressiva de mutações pela HSC (Figura 7)



(BARREYRO; CHLON; STARCZYNOWSKI, 2018; CHAMSEDDINE et al., 2016; GAÑÁN-GÓMEZ et al., 2015). Embora associações mais recentes da hematopoese clonal com condições inflamatórias tenham proporcionado avanços na compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à relação entre inflamação e SMD, estudos adicionais ainda são necessários para que biomarcadores e potenciais alvos terapêuticos sejam identificados (ALAGGIO et al., 2022).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Avaliar a expressão de genes relacionados ao processo inflamatório (*NFKB*, *TRAF6*, *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2* e *IRAK4*) e sua associação com a patogênese da doença e anormalidades citogenéticas em pacientes com SMD e LMA-RM.

### 2.2 Objetivos específicos

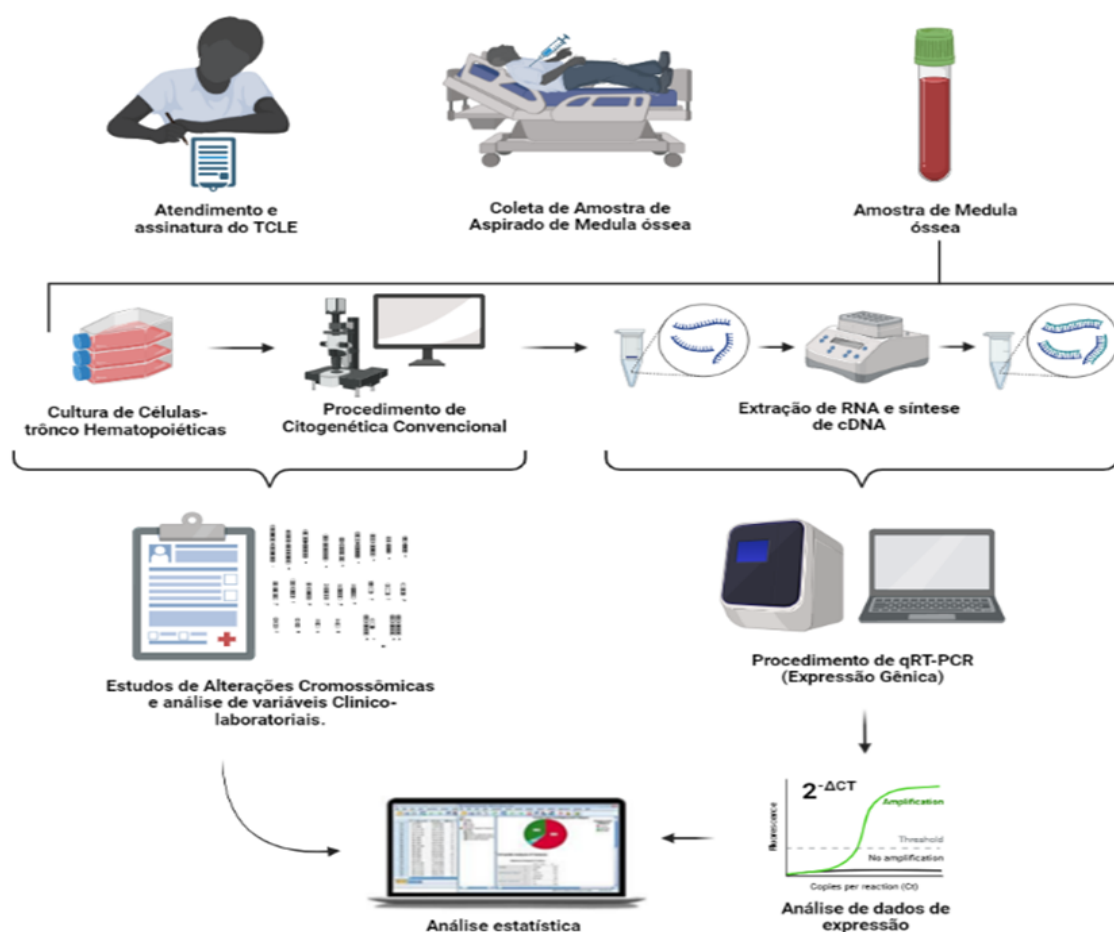
1. Avaliar a expressão do mRNA dos genes *NFKB*, *TRAF6*, *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2* e *IRAK4* através da utilização da metodologia de qPCR.
2. Detectar as alterações citogenéticas dos pacientes com SMD e LMA-RM através da metodologia de cariótipo por banda G.
3. Associar a expressão dos genes *NFKB*, *TRAF6*, *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2* e *IRAK4* com características clínico-laboratoriais de pacientes com SMD e LMA-RM.
4. Correlacionar a expressão dos genes *NFKB*, *TRAF6*, *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2* e *IRAK4* em pacientes com SMD e LMA-RM.

### 3 PACIENTES E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos éticos da pesquisa

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará/PROPESQ-UFC (número de processo: 76021523.2.0000.5054) 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 8 e serão apresentadas nas sessões a seguir.

**Figura 8 – Representação esquemática do estudo**



Fonte: Gomes, JVC, 2023

### 3.2 Coleta e obtenção das amostras

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) foram coletadas amostras de medula óssea de 92 indivíduos, sendo 76 diagnosticados com SMD, 6 diagnosticados com LMA relacionada a SMD (LMA-RM) e 10 indivíduos saudáveis, atendidos em dois hospitais terciários de referência na cidade de Fortaleza, Ceará, no período de 2022 a 2024 (Hospital Universitário Walter Cantídio e Hospital geral de Fortaleza). Foram considerados indivíduos saudáveis pacientes com suspeita de SMD que não foi confirmada, sendo também descartadas outras doenças onco-hematológicas. Em sua maioria eram pacientes que tinham deficiências nutricionais como causas das citopenias periféricas.

Em cada indivíduo foram coletados 5ml de medula óssea em tubos contendo heparina sódica 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 8).

Foram analisados dados de expressão de mRNA de 6 genes (*NFKB*, *TRAF6*, *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2* e *IRAK4*) das 95 amostras de *pool* celular de medula óssea dos indivíduos acima descritos. Os dados de expressão gênica foram correlacionados com outras variáveis, dados citogenéticos e dados clínico-laboratoriais obtidos a partir de revisão de prontuário.

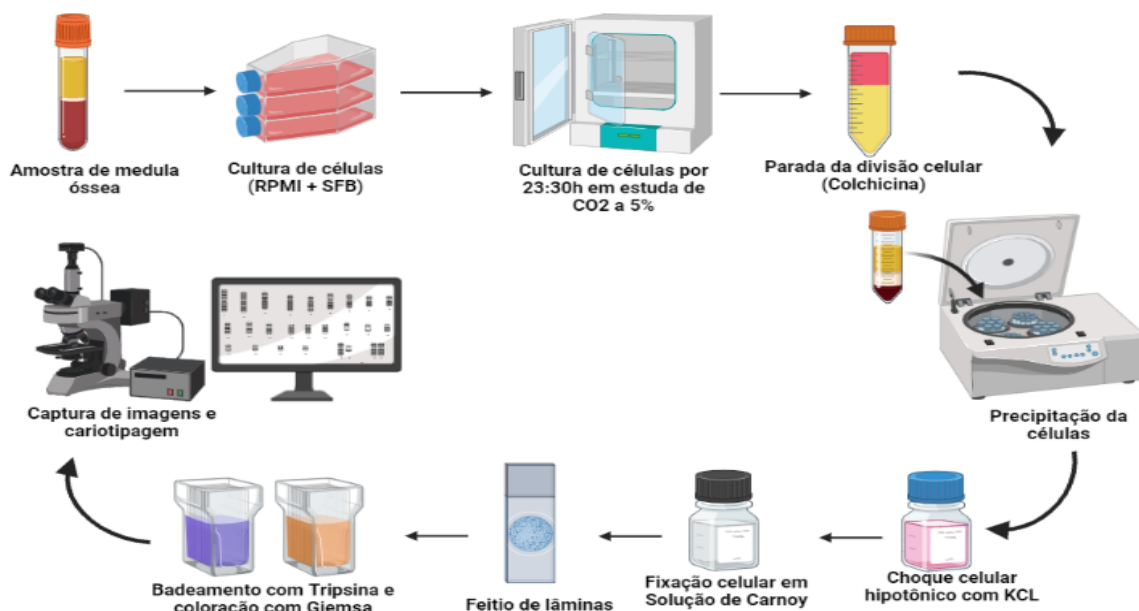
Para a separação das células do *pool* celular da medula óssea, realizou-se primeiramente a lise eritrocitária, como descrito a seguir: a amostra de medula óssea foi transferida para um tubo do tipo Falcon de 50mL, e lavada com a solução de lise (25mL de solução de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato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

### 3.3 Cariótipo por bandeamento-G

A Citogenética foi realizada 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 CO<sub>2</sub>. Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 50µL de colchicina (Colcemid®) por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e submetidos a nova suspensão 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 9). 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 9 – Representação esquemática do procedimento de citogenética clássica**



Fonte: Gomes, JVC, 2023

### 3.4 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

#### 3.4.1 Extração de RNA Total

A extração de RNA das células do pool medular dos pacientes com SMD 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 submetido a nova suspensão 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).

#### 3.4.2 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada com a utilização do Kit para Transcrição Reversa (RT) da Applied Biosystems® (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada reação de transcrição reversa foram utilizados uma quantidade otimizada de RNA total para uma concentração final de 1000ng/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.

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

A quantificação da expressão gênica dos seis genes avaliados neste estudo 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.**

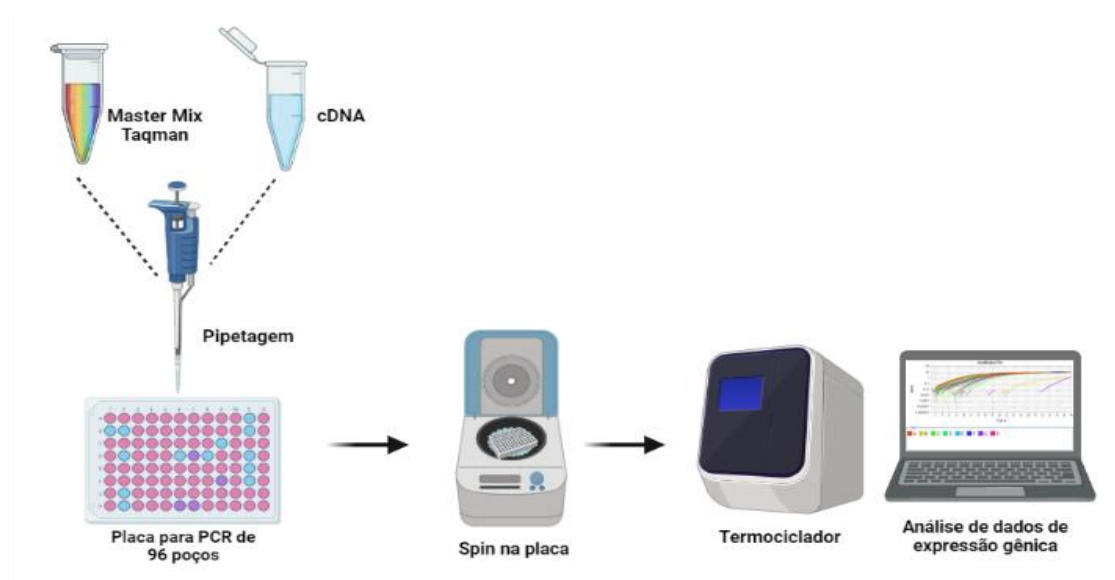
Tipo	Símbolo	Nomenclatura	Ensaio taqman
Endógeno	<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Hs03929097_g1
Endógeno	<b>ACTB</b>	<i>Actin beta</i>	Hs99999903_m1
Endógeno	<b>HPRT1</b>	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>	Hs02800695_m1
Alvo	<b>IRAK1</b>	<i>Interleukin 1 receptor associated kinase 1</i>	Hs00155570_m1
Alvo	<b>IRAK2</b>	<i>Interleukin 1 receptor associated kinase 2</i>	Hs00176394_m1
Alvo	<b>IRAK4</b>	<i>Interleukin 1 receptor associated kinase 4</i>	Hs00211610_m1
Alvo	<b>MYD88</b>	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>	Hs01573837_g1
Alvo	<b>TRAF6</b>	<i>TNF receptor associated factor 6</i>	Hs00939742_g1
Alvo	<b>NFKB1</b>	<i>Nuclear factor kappa B subunit 1</i>	Hs00765730_m1

**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 10). 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 10 -Representação esquemática do procedimento do RT-qPCR**



Fonte: Gomes, JVC, 2023

Para validar a estabilidade dos níveis de expressão gênica foram utilizados três genes de referência: Beta Actina (*ACTB*), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e Hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (*HPRT1*). Para a escolha dos genes de referência mais estáveis, foi utilizada 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 que apresentaram menor valor de desvio padrão e maior correlação entre si foram considerados os mais estáveis (VANDESOMPELE et al., 2002).

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  $\Delta Cq$  e de  $2^{-\Delta Cq}$  tanto dos genes alvos quanto dos genes de referência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001b). 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).

### 3.5 Variáveis analisadas

As variáveis analisadas neste estudo foram subdivididas da seguinte forma:

- Grupo: Caso e controle
- Sexo: masculino e feminino;
- Idade:  $\leq 60$  anos e  $> 60$  anos;
- Diseritropoiese: Presença e Ausência;
- Disgranulopoiese: Presença e Ausência;
- Dismegacariopoiese: Presença e Ausência;
- Sideroblastos em anel:  $< 15\%$  e  $\geq 15\%$
- Porcentagens de Blastos (IPSS-R):  $\leq 2\%$ ,  $> 2\%$  -  $< 5\%$ ,  $5\%$  -  $10\%$ ,  $> 10\%$ ;
- Classificação dos valores de hemoglobina (Hb) (IPSS-R):  $\geq 10\text{g/dL}$ ,  $8\text{-}<10\text{g/dL}$  e  $< 8\text{g/dL}$ ;
- Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) (IPSS-R):  $\geq 800$  por  $\text{mm}^3$  e  $< 800$  por  $\text{mm}^3$ ;

- Classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R):  $\geq 100.000$  por  $\text{mm}^3$ ,  $50.000 - < 100.000$  por  $\text{mm}^3$  e  $\leq 50.000$  por  $\text{mm}^3$ ;
- 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 sem excesso de blastos, SMD-SA (SMD sem excesso de blastos e com sideroblastos em anel), SMD-EB (SMD com excesso 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;

### 3.6 Análises estatísticas

Os resultados gerados pelas análises de expressão gênica foram avaliados pelos resultados de cada Cq (quantitative cycle) de cada amostra de cDNA (em duplicatas). Em seguida, para normalizar os valores de Cq com o objetivo de diminuir as diferenças geradas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o Cq de uma amostra foi subtraído pela média geométrica dos Cq's dos genes constitutivos utilizados (*GAPDH* e *HPRT1*) da mesma amostra, gerando assim os valores de  $\Delta\text{Cq}$  e, posteriormente, convertidos para  $2^{-\Delta\text{Cq}}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001a).

Para as variáveis maiores ou iguais a 50 casos, foi realizado o teste de Skinner's/Kurtosis com objetivo de avaliar se as amostras apresentavam distribuição normal. Com essa mesma finalidade, para as variáveis com menos de 50 casos, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Os valores de outliers foram retirados do estudo porque apresentavam valores contrastantes com os demais. A partir da normalização dos casos, foram realizados testes paramétricos através de testes T de Student, quando se comparavam médias entre dois grupos, e o teste de one-way ANOVA, quando se comparavam três ou mais grupos. O pós-teste (post-hoc) para o ANOVA foi definido pela análise de homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Se a homogeneidade fosse confirmada ( $p\text{-valor} \geq 0,05$ ), o pós-teste utilizado foi o teste de Tukey. Se não houvesse homogeneidade ( $p\text{-valor} < 0,05$ ), o pós-teste foi o teste de Games-Howell.

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.

Os dados sobre os níveis de expressão gênica (valores de  $2^{-\Delta C_q}$ ) foram expressos em média ou mediana  $\pm$  desvio padrão (SD), com intervalo de confiança (IC) (máximo e mínimo), a fim de determinar a possível associação entre o nível de expressão dos genes frente cada variável analisada. O nível de significância estatística utilizado foi de  $p < 0,05$  e todas as análises foram efetuadas com recurso do software SPSS para Windows (versão 21.0).

O teste de correlação de Pearson foi utilizado para a obtenção dos valores de  $r$  e  $r$ -square ( $r^2$ ) que demonstra a influência do nível de expressão de um dado gene sobre o outro na população avaliada, buscando demonstrar se tais genes são regulados pelo mesmo mecanismo molecular.

Para realização das análises estatísticas 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 Caracterização dos pacientes e controles

O número amostral total do estudo foi de 92 indivíduos, incluídos no período de 2022 a 2024, sendo 10 controles saudáveis (10,9%), 76 pacientes com SMD primária (82,6%) e 6 pacientes com LMA relacionada a SMD (6,5%), Não havia casos de SMD secundária (Tabela7).

Tabela 7 - Descrição dos pacientes do estudo quanto ao diagnóstico.

Características		N	Frequência (%)
Grupo	SMD	76	82,6
	LMA-RM	6	6,5
	Controle	10	10,9

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

Quanto às variáveis demográficas dos 10 indivíduos incluídos no grupo controle, 3 eram do sexo masculino (30%) e 7 eram do sexo feminino (70%). A idade média foi de 75anos (Tabela 8).

Tabela 8 - Descrição das variáveis demográficas dos controles saudáveis.

Características		N	Frequência (%)
Gênero Biológico	Feminino	7	70
	Masculino	3	30
Idade		75 ± 11,43 (52-87) *	

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.

Quanto às variáveis demográficas, dos 82 pacientes com diagnóstico de SMD ou LMA-RM, 40 eram do sexo feminino (48,8%) e 42 eram do sexo masculino (51,2%). A variável idade foi categorizada em ≤60 anos ou >60 anos, sendo 17 pacientes com idade ≤60 anos (20,7%) e 65 pacientes com idade > 60 anos (79,3%). A idade média foi de 71,4 anos (71,4 ± 15,1 (25-93) (Tabela 9).

**Tabela 9 - Descrição das variáveis demográficas dos pacientes com diagnóstico de SMD ou LMA-RM**

Dados demográficos de pacientes do estudo		N	Frequência (%)
Gênero Biológico	Feminino	40	48,8
	Masculino	42	51,2
Idade		71,2 ± 15,4 (25-93) *	
Idade (categorizada)	≤60	17	20,7
	>60	65	79,3

**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.

Os pacientes foram classificados de acordo com a 5ª Edição da Classificação da OMS para as Neoplasias do Tecido Hematopoiético (2022), sendo distribuídos da seguinte forma: 2 pacientes (2,4%) com SMD sem aumento de blastos e com deleção isolada do 5q; 13 pacientes (15,9%) com SMD com sideroblastos em anel e sem aumento de blastos; 1 paciente (1,2%) com SMD com inativação bialélica do *TP53*; 32 pacientes (39%) com SMD sem aumento de blastos; 4 pacientes (4,9%) com SMD hipoplásica; 12 pacientes (14,7%) com SMD com aumento de blastos tipo 1; 11 pacientes (13,4%) com aumento de blastos tipo 2; 1 paciente (1,2%) com SMD com fibrose e 6 pacientes (7,3%) com LMA relacionada a SMD (Tabela 10).

**Tabela 10 - Distribuição dos pacientes com SMD ou LMA-RM segundo a classificação da OMS (2022)**

SMD - Subtipo	N	Frequência (%)
SMD com Del(5q) isolado	2	2,4
SMD com baixo percentual de blastos e SA	13	15,9
SMD com inativação bialélica do <i>TP53</i>	1	1,2
SMD com baixo percentual de blastos	32	39
SMD com excesso de blastos I	12	14,7
SMD com excesso de blastos II	11	13,4
SMD com Fibrose	1	1,2
SMD Hipoplásica	4	4,9
LMA	N	Frequência (%)
LMA relacionada a SMD	6	7,3

**Legenda:** SMD (Neoplasia Mielodisplásica); LMA-RM (Leucemia Mieloide Aguda Relacionada a SMD); SA (Sideroblastos em anel).

Os achados clínico-laboratoriais observados no sangue periférico dos pacientes com SMD ou LMA encontram-se destacados na Tabela 12, com a média e desvio padrão, valor

mínimo e máximo (Tabela 11). Para melhor visualização, estes resultados foram divididos em categorias (Tabela 12).

**Tabela 11 - Variáveis clínico-laboratoriais relacionadas aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD e LMA-RM**

Variáveis	Média (desvio padrão)	Min.	Máx.
Hemoglobina (HB)	8,2 ( $\pm$ 2,6) g/dL	3,3 g/dL	15,8 g/dL
Neutrófilos (ANC)	2328,5 ( $\pm$ 2813,7) /mm <sup>3</sup>	104/mm <sup>3</sup>	18.000/mm <sup>3</sup>
Plaquetas	125.644 ( $\pm$ 121.949) /mm <sup>3</sup>	5.000/mm <sup>3</sup>	556.100/mm <sup>3</sup>

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

Foi observado, ao hemograma, que 67 (81,7%) pacientes apresentaram hemoglobina inferior a 10g/dL, 22 (26,8%) pacientes apresentaram contagem absoluta de neutrófilos (ANC) inferior a 800 por mm<sup>3</sup> e, por fim, 48 (58,5%) pacientes apresentaram contagem de plaquetas inferior a 100.000/mm<sup>3</sup> (Tabela 12).

**Tabela 12 - Variáveis clínico-laboratoriais relacionadas aos achados do sangue periférico em pacientes com SMD e LMA-RM, por categorias**

Variáveis	Nº	%
Classificação dos valores de hemoglobina (HB)	> 10g/dL	15 18,3
	8-10g/dL	28 34,1
	< 8g/dL	39 47,6
Classificação dos valores de neutrófilos (ANC)	$\geq$ 800/mm <sup>3</sup>	60 73,2
	< 800/mm <sup>3</sup>	22 26,8
Classificação dos valores de plaquetas	$\geq$ 100.000/mm <sup>3</sup>	34 41,5
	$\geq$ 50.000 < 100.000/mm <sup>3</sup>	20 24,4
	<50.000/mm <sup>3</sup>	28 34,1

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

Quanto à porcentagem de blastos na medula óssea, dos 76 pacientes com diagnóstico de SMD, obtivemos resultado de 75, que foram classificados de acordo com as categorias do IPSS-R para percentual de blastos (GREENBERG et al., 2012b), sendo que 39 (52%) dos pacientes estavam incluídos na faixa de  $\leq$  2%; 12 (16%) dos pacientes na faixa de >2 a <5%; 13 (17,3%) na faixa de 5%-10% e 11 (14,7%) na faixa >10% (Tabela 13).

**Tabela 13 – Distribuição dos pacientes com SMD quanto ao percentual de blastos de acordo com categorias do IPSS-R**

Variáveis Clínicas		Nº	Frequência (%)
Percentual de Blastos	≤2%	40	52,6
	>2 a <5%	12	15,8
	5% a 10%	13	17,1
	>10%	11	14,5

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

Dos 82 pacientes com diagnóstico de SMD ou LMA-RM, 78 tinham resultado de estudo citogenético. Entre eles, 41 cariótipos eram normais (52,6%), 29 anormais (37,2%) e 8 não apresentavam metáfases (10,2%). Cariótipo complexo foi encontrado em 6 pacientes, (7,7% do total de cariótipos e 20,7% dos cariótipos anormais (Tabela 14).

**Tabela 14 - Frequência dos resultados citogenéticos nos pacientes com SMD e LMA-RM ao diagnóstico.**

Variáveis		Nº	Frequência (%)
Cariótipo	Normal	41	52,6
	Alterado	29	37,2
	Ausência de metáfase	8	10,2
Cariótipo complexo	Presença	6	7,7

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

Os pacientes com SMD foram classificados de acordo com a estratificação de risco baseada no IPSS-R, 3 (3,9%) dos pacientes apresentam IPSS-R de muito baixo risco, 27 (35,5%) baixo risco, 15 (15,8%) risco intermediário, 15 (15,8%) alto risco e 10 (13,2%) muito alto risco. Os pacientes com cariótipo sem metáfases ou que não realizaram cariótipo não puderam ser classificados quanto ao risco pelo IPSS-R (12 pacientes, 15,8%) (Tabela 15).

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

Variáveis		Nº	%
Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R	Muito baixo (≤1.5)	3	3,9
	Baixo (>1.5 - 3)	27	35,5
	Intermediário (>3 - 4.5)	12	15,8
	Alto (>4.5 - 6)	12	15,8
	Muito alto (>6)	10	13,2
	Não se aplica	12	15,8

**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.

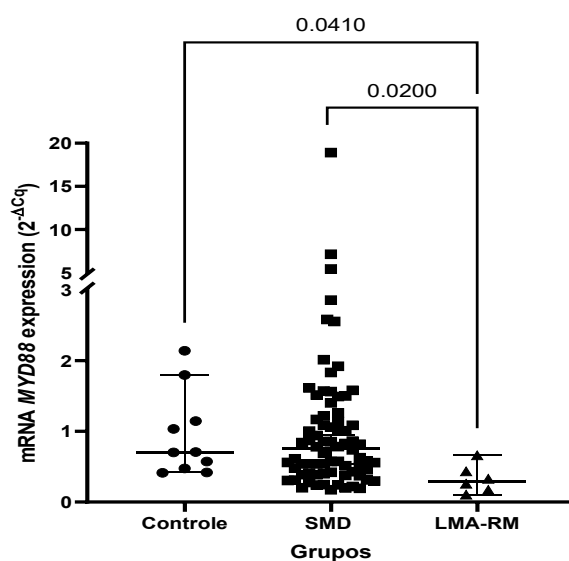
## 4.2 Análise do nível de expressão gênica por qRT-PCR em amostras de medula óssea de pacientes com SMD e LMA-RM

A seguir serão apresentadas as associações entre os níveis de expressão gênica dos genes *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2*, *IRAK4*, *TRAF6* e *NFKB* e as variáveis clínico-laboratoriais, bem como a associação com os indivíduos controles. Para melhor entendimento, os resultados serão apresentados separadamente por variável analisada.

### 4.2.1 Expressão gênica de *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2*, *IRAK4*, *TRAF6* e *NFKB* em controles e pacientes com SMD e LMA-RM

Para o gene *MYD88*, pacientes diagnosticados com LMA apresentaram menor expressão do que o grupo controle ( $p=0,041$ ) e do que pacientes diagnosticados com SMD ( $p=0,02$ ) (Figura 11).

**Figura 11 – Nível de expressão de *MYD88* em relação aos grupos: controle, SMD e LMA-RM**



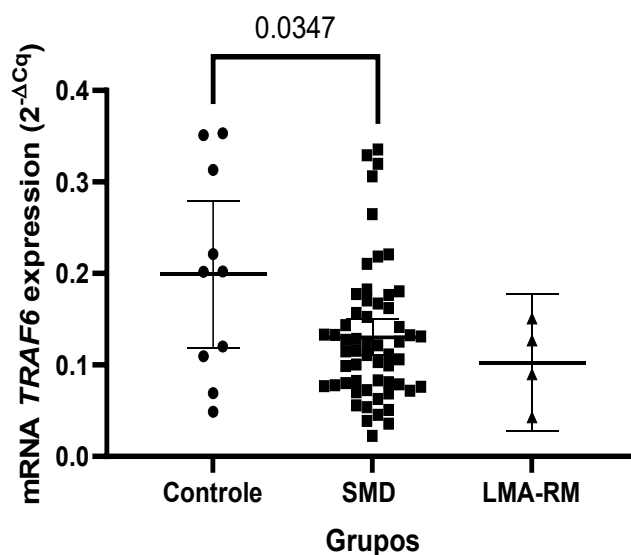
Gene		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>MYD88</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ ))						
<i>MYD88</i>								
Diag nóstico	N	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Kruskal- Wallis†	Ranks	P-valor
Controle	10	,705370	,599081	,511913	1,369026	,0210	51,50	,0410
SMD	76	,759635	2,32508	,736083	1,798691		48,13	,0200
LMA	06	,292835	,200488	,115888	,536687		17,50	,0410/,0200

†Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . N: número de casos.



Para o gene *TRAF6*, amostras do grupo controle apresentaram maior expressão do que amostras de pacientes com SMD ( $p=0,0347$ ) (Figura 12).

**Figura 12 – Nível de expressão de *TRAF6* em relação aos grupos: controle, SMD e LMA**



Gene <i>TRAF6</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>TRAF6</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ ))						
Diagnóstico	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	Anova†	Tukey
Controle	10	,199071	,1125852	,118532	,279609	,086	,0304	,0347
SMD	57	,130170	,0735286	,110660	,149679			,0347
LMA	04	,102637	,0470444	,027779	,177495			-

†ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

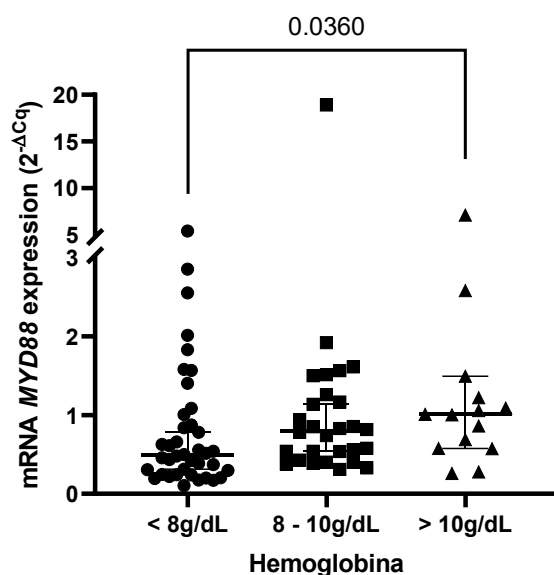
Os demais genes analisados não apresentaram diferenças significativas entre o grupo controle, pacientes com SMD e pacientes com LMA ( $p > 0,05$ ) (Apêndice 2).

4.2.2 Expressão gênica de *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2*, *IRAK4*, *TRAF6* e *NFκB* em relação às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD e LMA-RM

#### 4.2.2.1 Achados de sangue periférico

Pacientes com valores de hemoglobina abaixo de 8 g/dL apresentaram menor valor de expressão gênica de *MYD88* quando comparados aos pacientes que apresentavam hemoglobina > 10 g/dL ( $p=0,036$ ) (Figura 13).

**Figura 13 – Nível de expressão de *MYD88* em relação a variável hemoglobina**



Gene <i>MYD88</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>MYD88</i> (2 <sup>-ΔCq</sup> ))						
Hemoglobina	N	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Kruskal-Wallis†	Ranks	p-valor
< 8 g/dL	39	,49944	1,00357	,52808	1,17873	,0240	34,44	,0360
8-10 g/dL	28	,80056	3,44467	,15709	2,82850		45,39	-
> 10 g/dL	15	1,00936	1,75341	,57551	2,51752		52,60	,0360

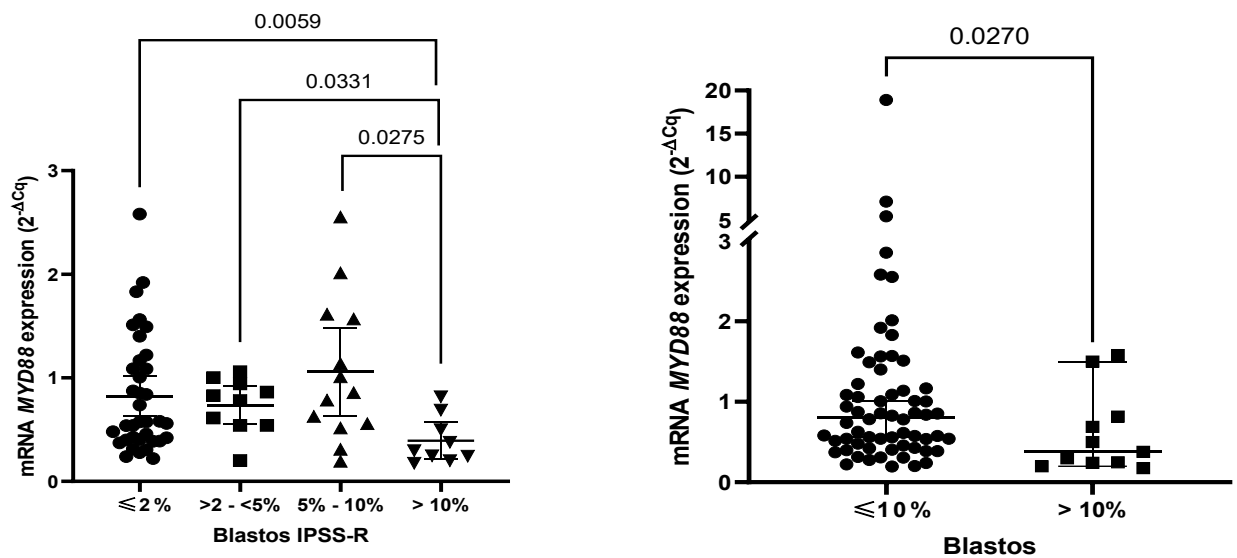
†Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para  $p \leq 0,05$ . N: número de casos.

Não foram encontradas outras associações significativas entre o nível de expressão de *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2*, *IRAK4*, *TRAF6* e *NFKB* e as demais variáveis relacionadas ao sangue periférico: contagem de neutrófilos categorizado pelo IPSS-R e contagem de plaquetas categorizada pelo IPSS-R ( $p > 0,05$ ) (Apêndice 2).

#### 4.2.2.2 Achados medulares

Em relação aos achados medulares, a porcentagem de blastos na medula foi categorizada segundo o IPSS-R ( $\leq 2\%$ ,  $> 2 - < 5\%$ ,  $5-10\%$  e  $> 10\%$ ), sendo observado que pacientes com porcentagem de blastos acima de  $10\%$  apresentavam menor expressão gênica de *MYD88* quando comparados aos pacientes com  $\leq 2\%$  de blastos ( $p=0,0059$ ),  $> 2 - < 5\%$  de blastos ( $p=0,0331$ ) e  $5-10\%$  de blastos ( $p=0,0275$ ) (Figura 14). Categorizando a variável blastos em valores  $\leq 10\%$  e  $> 10\%$ , os pacientes com porcentagem  $> 10\%$  apresentaram menor expressão de *MYD88* em comparação à categoria com blastos  $\leq 10\%$  ( $p=0,027$ ).

**Figura 14 - Nível de expressão gênica de *MYD88* em relação a variável blastos IPSS-R e blastos categorizados em  $\leq 10\%$  e  $> 10\%$**



Gene <i>MYD88</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>MYD88</i> (2 <sup>-ΔCq</sup> ))						
Blastos IPSS-R	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	Anova†	Games-Howell
≤ 2%	36	,823208	,5612417	,633311	1,013105	,009	,0437	,0059
> 2 - < 5%	10	,736874	,2625796	,549035	,924712			,0331
5-10%	13	1,05691	,6997225	,634072	1,479748			,0275
> 10%	09	,393461	,2281083	,218121	,568800			,0059/,0331/,0275

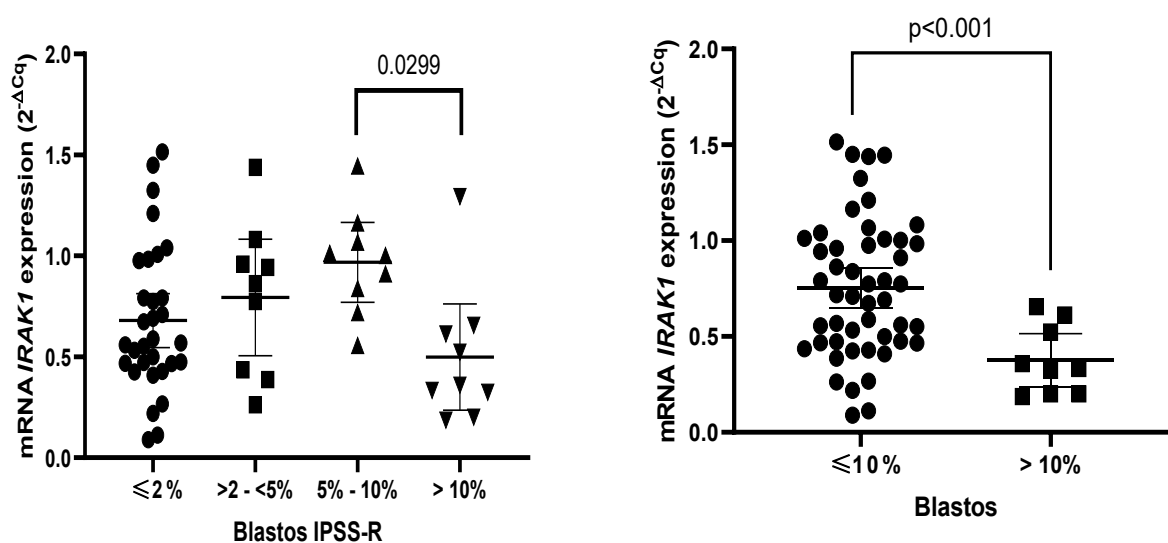
†ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

Gene <i>MYD88</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>MYD88</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ ))					
Blastos	N	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Mann-Whitney†	Ranks
$\leq 10\%$	64	,806455	2,510834	,754688	2,00906	,0270	40,31
$> 10$	11	,376910	,506894	,261327	,942400		24,55

†Mann-Whitney: Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . N: número de casos.

Para o gene *IRAK1*, pacientes com porcentagem de blastos acima de 10% apresentaram menor expressão do que pacientes com 5-10% de blastos ( $p=0,0299$ ) Categorizando a variável blastos em valores  $\leq 10\%$  e  $> 10\%$ , os pacientes com porcentagem  $> 10\%$  apresentaram menor expressão de *IRAK1* em comparação à categoria com blastos  $\leq 10\%$  ( $p < 0,001$ )(Figura 15).

**Figura 15 – Nível de expressão gênica de *IRAK1* em relação a variável blastos IPSS-R e blastos categorizado em  $\leq 10\%$  e  $> 10\%$**



Gene <i>IRAK1</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>IRAK1</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ ))						
Blast IPSS-R	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	Anova†	Tukey
$\leq 2\%$	31	,679469	,3639968	,545954	,812984	,634	,0385	-
2-5%	09	,793874	,375591	,505169	1,082579			-
5-10%	09	,968288	,2576591	,770234	1,166343			,0299
$> 10\%$	09	,498624	,3414522	,236161	,761087			,0299

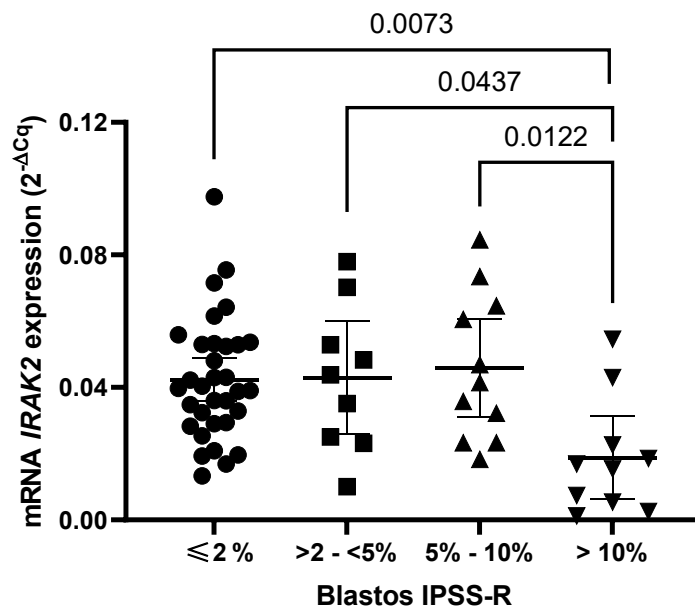
†ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N: número de casos.

Gene <i>IRAK1</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>IRAK1</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ ))					
Blastos	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	P-valor†
≤ 10%	49	,753531	,3603888	,0923448	,6160347	,044	,0000
> 10 %	08	,399341	,1784865	,1832487	,5251308		

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

De modo semelhante, pacientes com porcentagem de blastos acima de 10% apresentaram menor expressão gênica de *IRAK2* do que pacientes com  $\leq 2\%$  de blastos ( $p=0,073$ ), pacientes com  $<2 - >5\%$  de blastos ( $p=0,0437$ ) e pacientes com 5-10% de blastos ( $p=0,0122$ ) (Figura 16).

**Figura 16 – Nível de expressão gênica de *IRAK2* em relação a variável blastos IPSS-R**



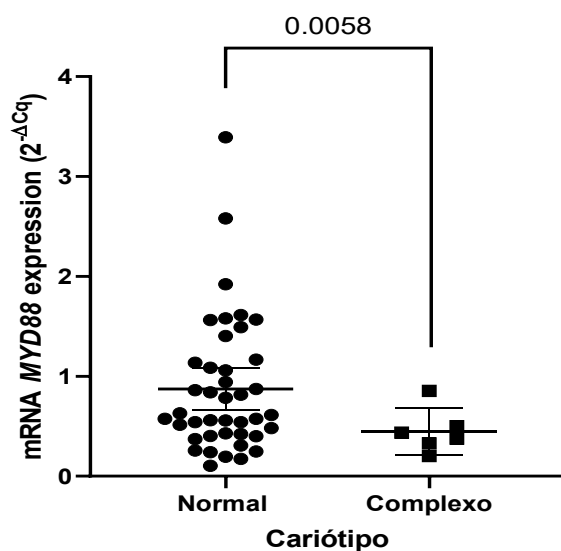
Gene <i>IRAK2</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>IRAK2</i> (2 <sup>-ΔCq</sup> ))						
Blastos IPSS-R	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	Anova‡	Tukey
≤ 2%	33	,042406	,0183830	,035888	,048924	,597	,0065	,0073
2-5%	09	,042934	,0222335	,025844	,060024			,0437
5-10%	11	,045859	,0221605	,030971	,060746			,0122
> 10%	10	,018744	,0175657	,006178	,031309			,0073/,0437/,0122

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

#### 4.2.2.3 Achados citogenéticos

Pacientes que apresentaram cariótipo complexo apresentaram menor expressão de *MYD88* do que pacientes que tinham cariótipo não complexo ( $p=0,058$ ) (Figura 17).

**Figura 17 - Nível de expressão gênica de *MYD88* em relação a variável cariótipo complexo**

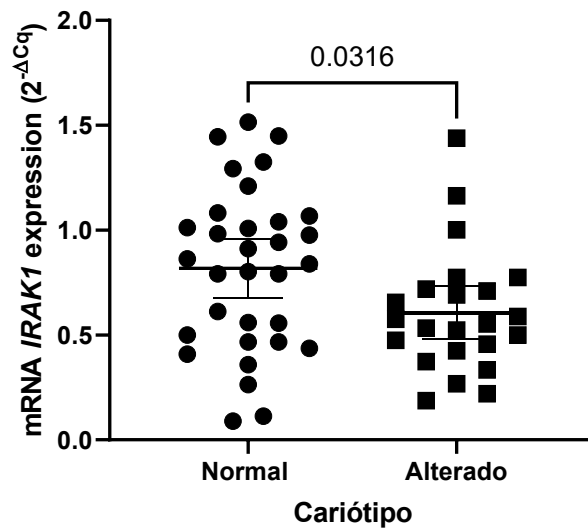


Gene <i>MYD88</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>MYD88</i> (2 <sup>-ΔCq</sup> ))					
Cariótipo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	P-valor†
Normal	41	,873339	,6787280	-,1428812	,9913507	,068	,0058
Complexo	6	,449105	,2221780	,1354193	,7130501		

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Para o gene *IRAK1*, pacientes que possuíam resultado de cariótipo alterado apresentaram menor expressão gênica do que pacientes com resultado de cariótipo normal ( $p=0,0316$ ) (Figura 18).

**Figura 18- Nível de expressão gênica de *IRAK1* em relação ao resultado do cariótipo**



Gene <i>IRAK1</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>IRAK1</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ ))					
Resultado cariótipo	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	P-valor†
Normal	32	,817930	,3867112	,0194471	,4051230	,082	,0316
Alterado	23	,605645	,2954093	,0276989	,3968712		

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

#### 4.2.3 Expressão gênica de *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2*, *IRAK4*, *TRAF6* e *NFκB* na classificação clínica e estratificação prognóstica dos pacientes com SMD e LMA-RM

##### 4.2.3.1 Classificação OMS 2022 para SMD e LMA-RM

Em relação à classificação dos pacientes de acordo com os subtipos estabelecidos pela OMS (Khoury et al., 2022), não encontramos diferenças significativas entre os grupos para os genes analisados ( $p > 0,05$ ) (Apêndice 2).

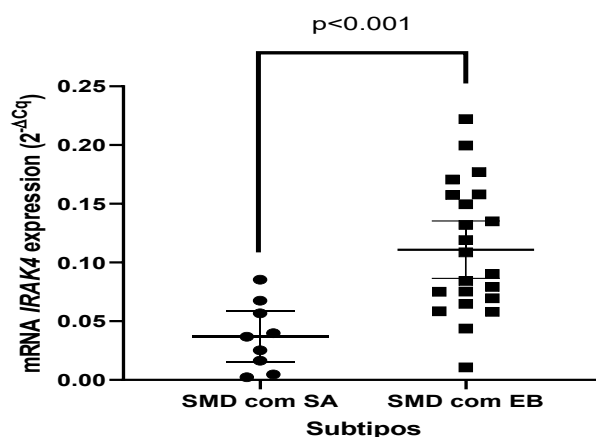
##### 4.2.3.2 Classificação dos Grupos de Risco de acordo com o IPSS-R para SMD

Quanto à classificação de risco segundo o IPSS-R, não foram observadas diferenças nas expressões dos genes analisados entre os grupos de risco do IPSS-R (muito baixo risco, baixo risco, intermediário, alto risco, muito alto risco).

No entanto, quando categorizamos a doença em duas grandes formas subtipos SMD com sideroblastos em anel e SMD com excesso de blastos, encontramos que o gene *IRAK4*

estava mais expresso em pacientes com SMD com excesso de blastos com relação aos pacientes com SMD com sideroblastos em anel ( $p<0,001$ ) (Figura 19).

**Figura 19 – Nível de expressão gênica de *IRAK4* em relação aos subtipos SMD com sideroblastos em anel e SMD com excesso de blastos**

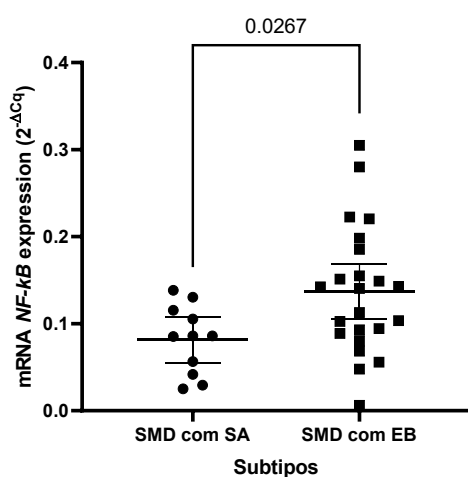


Gene <i>IRAK4</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>IRAK4</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ ))					
Subtipos	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	P-valor†
SMD com SA	09	,037192	,0284826	-,1135108	-,0338256	,021	,0000
SMD com EB	22	,110860	,0551202	-,1046624	-,0426740		

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

De modo semelhante, o gene *NFKB* estava mais expresso em pacientes com SMD com excesso de blastos com relação aos pacientes com SMD com sideroblastos em anel ( $p<0,0267$ ) (Figura 20).

**Figura 20 – Nível de expressão gênica de *NFKB* em relação aos subtipos SMD com sideroblastos em anel e SMD com excesso de blastos**





Gene <i>NF-κB</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>NF-κB</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ ))					
Subtipos	N	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	P-valor†
SMD com SA	11	,081740	,0393508	-,1033511	-,0067748	,092	,0267
SMD com EB	23	,136803	,0733406	-,0945176	-,0156083		

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

#### 4.2.4 Correlação da expressão dos genes *NFKB*, *TRAF6*, *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2* e *IRAK4* em pacientes com SMD e LMA-RM

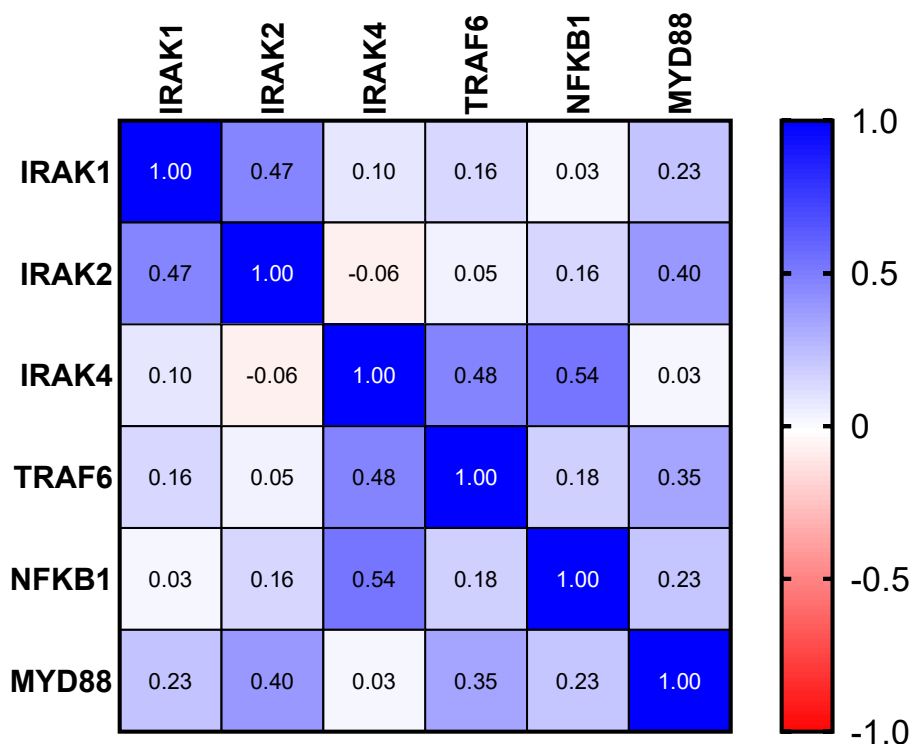
O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) foi realizado para se analisar a intensidade da associação linear existente entre os genes e o  $r^2$  (r square) foi realizado para analisar a influência de um gene sobre outro.

Observou-se uma fraca correlação entre os genes *TRAF6* e *MYD88* ( $r = 0,352$ ;  $p = 0,007$ ), demonstrando uma influência de 12,4% ( $r^2 = 0,124$ ) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro.

Uma correlação moderada entre os genes *IRAK1* e *IRAK2* ( $r = 0,475$ ;  $p = 0,000$ ), demonstrando uma influência de 22,6% ( $r^2 = 0,226$ ) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro. Correlação moderada também foi observada entre os genes *IRAK2* e *MYD88* ( $r = 0,402$ ;  $p = 0,007$ ), apresentando uma influência de 16,2% ( $r^2 = 0,162$ ) nos seus níveis de expressão gênica e entre os genes *IRAK4* e *TRAF6* ( $r = 0,481$ ;  $p = 0,000$ ) com uma influência de 23,1% ( $r^2 = 0,231$ ) na variação dos seus níveis de expressão nos pacientes.

Uma alta correlação foi encontrada entre os genes *IRAK4* e *NFKB1* ( $r = 0,537$ ;  $p = 0,000$ ) que apresentaram uma influência de 28,9% ( $r^2 = 0,289$ ) na variação dos seus níveis de expressão de um gene sobre o outro. A figura 21 apresenta o resumo das correlações entre todos os genes.

**Figura 21– Heatmap da análise de correlação entre os genes *IRAK1*, *IRAK2*, *IRAK4*, *TRAF6*, *NFKB* e *MYD88* e seus níveis de expressão gênica**



**Tabela 16 – Resumo dos achados de expressão dos genes *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2*, *IRAK4*, *TRAF6* e *NFKB* em SMD e LMA-RM**

GENE	RESULTADOS
<i>MYD88</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Menor expressão em LMA em comparação a controles e SMD</li> <li>✓ Menor expressão em Hb &lt; 8g/dl em comparação a Hb &gt; 10g/dl</li> <li>✓ Menor expressão em blastos &gt; 10% em comparação a blastos ≤ 10%</li> <li>✓ Menor expressão em blastos &gt; 10% em comparação às demais categorias de blastos do IPSS-R</li> <li>✓ Menor expressão em cariótipo complexo em comparação a cariótipo normal</li> </ul>
<i>IRAK1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Menor expressão em blastos &gt; 10% em comparação a blastos ≤ 10%</li> <li>✓ Menor expressão em blastos &gt; 10% em comparação à categoria blastos 5-10% do IPSS</li> <li>✓ Menor expressão em cariótipo anormal em comparação a cariótipo normal</li> </ul>
<i>IRAK2</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Menor expressão em blastos &gt; 10% em comparação às demais categorias de blastos do IPSS-R</li> </ul>
<i>IRAK4</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Maior expressão na SMD com excesso de blastos em comparação com SMD com sideroblastos em anel</li> </ul>
<i>TRAF6</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Maior expressão em controles em comparação a SMD</li> </ul>
<i>NFKB</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Maior expressão em SMD com excesso de blastos em comparação com SMD com sideroblastos em anel</li> </ul>

## 5 DISCUSSÃO

Conforme sugerem as evidências clínicas e moleculares, estimulação imune crônica pode funcionar como um gatilho para o desenvolvimento de SMD (GAÑÁN-GÓMEZ et al., 2015). Tanto a imunidade inata quanto imunidade adquirida estão implicadas na doença, mas os potenciais mecanismos moleculares subjacentes à vinculação entre disfunção imune e hematopoese clonal ainda não estão completamente elucidados.

A contribuição do ambiente inflamatório na carcinogênese tem sido bem descrita, sendo a inflamação considerada um *hallmark* do câncer, de comportamento ubíquo, influenciando e modulando diversos outros *hallmarks*. Ambiente inflamatório e desregulação da imunidade inata contribuem para a disfunção das HSC e hematopoese ineficaz de maneira particularmente relevante, uma vez que o sistema imune inato é regulador fisiológico da hematopoese (BALANDRÁN; LASRY; AIFANTIS, 2023).

Agressões diversas desencadeiam resposta imune e inflamação, e as citocinas inflamatórias produzidas pelas células efectoras do sistema imune atuam como fatores de crescimento e expansão das HSCs, com privilégio à diferenciação mieloide em detrimento dos setores linfóide e eritroide. Persistência destes estímulos levam à ruptura da homeostase da hematopoese e disfunção das HSCs, num mecanismo “non cell-autonomous” de estimulação destas células (STARCZYNOWSKI; KARSAN, 2010).

No entanto, aumento da compreensão dos mecanismos moleculares da SMD revelaram que, em alguns casos, a inflamação e disfunção da imunidade inata não são apenas elementos que se somam aos demais para promover e amplificar a hematopoese clonal, dentro do modelo de patogênese multifatorial da doença. Em alguns casos, mutações condutoras características da SMD, e que envolvem genes relacionados à imunidade inata e inflamação, são a causa da hiperativação imune e inflamatória frequentemente descritas na doença (PARACATU; SCHUETTPELZ, 2020).

Elucidação dos genes envolvidos na regulação inflamatória codificados por segmentos frequentemente deletados na del 5q e identificação do impacto do *splicing* alternativo resultante das mutações *SF3B1* e *U2AF1*, que codificam proteínas reguladoras da resposta inflamatória, são exemplos de como a desregulação imune e a inflamação podem ser resultado de mutações condutoras características da doença. Este seria o mecanismo “cell autonomous” no qual a disfunção inflamatória do compartimento hematopoiético seria

resultado de anormalidades intrínsecas das HSCs (PARACATU; SCHUETTPELZ, 2020; STARCZYNOWSKI; KARSAN, 2010).

Estudos envolvendo a desregulação do sistema imune na SMD envolvem aspectos da imunidade inata e adquirida, bem como aspectos humorais e celulares envolvidos na resposta imune. Há, no entanto, particular interesse na compreensão dos mecanismos envolvendo as vias dos TLRs, incluindo a função destes receptores, seus ligantes, e as moléculas intracelulares sinalizadoras destas vias, em particular a via do MYD88, principal proteína adaptadora dos TLRs.

Este trabalho avaliou a expressão de *NFKB* e genes da imunidade inata relacionados ao complexo proteico do MYD88, (*TRAF6*, *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK2* e *IRAK1*), numa coorte brasileira de 82 pacientes com diagnóstico de SMD ou LMA-RM e 10 controles, relacionando a expressão destes genes a variáveis clínico-laboratoriais e estratificação prognóstica dos pacientes.

A expressão do *NFKB* foi maior em pacientes com SMD com excesso de blastos (SMD-EB) quando comparada ao subtipo de SMD sem excesso de blastos e com sideroblastos em anel (SMD-SA). Este achado tem sido descrito na literatura em outras coortes, com níveis aumentados de expressão e/ou atividade *NFKB* encontrados em formas avançadas da doença, uma vez que a ativação desta via induz a expressão de citocinas inflamatórias e sinalização de vias relacionadas à proliferação, conferindo vantagem proliferativa e favorecendo a dominância clonal nas fases avançadas (IMMUNE DYSREGULATION).

A expressão do *MYD88* foi menor em pacientes com LMA quando comparados aos controles e às SMDs. Pacientes com Hb < 8,0g/dl apresentaram menor expressão quando comparados aos com Hb > 10g/dl, sendo menor expressão de *MYD88* observada também em pacientes com blastos > 10% quando comparados a blastos ≤ 10% e às demais categorias do IPSS quanto ao percentual de blastos. Além dos achados relativos às variáveis clínico-laboratoriais, menor expressão de *MYD88* também foi observada em pacientes com cariótipo complexo quando comparados aos pacientes com cariótipo normal.

Ao contrário das neoplasias linfoides, nas quais mutação com ganho de função (L265P) do *MYD88* é amplamente descrita, sendo conhecida sua contribuição para a patogênese destas doenças, os dados da literatura relativos ao *MYD88* em SMD em pacientes com neoplasias mieloides são escassos, e a relação entre expressão/atividade aumentada deste gene e variáveis prognósticas não é conclusiva. Dimiccoli e colaboradores (2013) mostraram, numa coorte de 64 pacientes com SMD, que 40% deles apresentavam aumento da expressão do *MYD88* com relação aos controles. Esta expressão foi maior no grupo de baixo risco quando

comparado ao grupo de alto risco. No entanto, os pacientes com maior expressão apresentaram menor sobrevida, o que poderia refletir o dado da literatura de que 50% dos óbitos em SMD são relacionados às citopenias e não à transformação para LMA (GAÑÁN-GÓMEZ et al., 2015). Baakhlagh e colaboradores (2021), por sua vez, numa coorte de 40 pacientes com LMA, identificaram expressão aumentada do *MYD88* nos pacientes com prognóstico desfavorável e nos quimiorrefratários quando comparados com os de prognóstico favorável e quimiosensíveis (BAAKHLAGH et al., 2021).

Na coorte estudada neste trabalho, a expressão de *MYD88* foi menor em pacientes com características clínicas e laboratoriais relacionadas a prognóstico desfavorável. Dados relativos à expressão e/ou atividade dos TLRs sugerem que hiperativação e/ou hiperexpressão destes receptores e de moléculas sinalizadoras das suas vias estão mais frequentemente associadas a SMD de baixo risco, na qual há aumento da apoptose e da piroptose, com hematopoese ineficaz e citopenias (PARACATU; SCHUETTPELZ, 2020). Utilizando um modelo murino, Monlish e colaboradores demonstraram que a perda de *TLR2* e/ou *MYD88* levou à redução da apoptose e acelerou a transformação leucêmica, sugerindo um papel da imunovigilância no controle da progressão clonal (MONLISH et al., 2018). Não há dados semelhantes em humanos, mas Wei e colaboradores (2013) demonstraram aumento da expressão de *TLR2* em pacientes de baixo risco comparados aos pacientes de alto risco, enquanto Wei e colaboradores demonstraram a associação entre hiperexpressão de *TLR2* e aumento da apoptose em um estudo *in vitro* (WEI et al., 2013; ZENG et al., 2016b), corroborando a ideia de que hiperatividade das vias dos TLRs, em particular *TLR2* e *TLR4*, estão associadas a doenças de baixo risco, e sugerindo que as moléculas sinalizadoras das vias dos TLRs podem também estar preferencialmente hiperexpressas nestas formas de SMD (PARACATU; SCHUETTPELZ, 2020).

Variáveis relativas à regulação da expressão gênica, como regulação transcricional e translacional do gene, bem como relativas à expressão de reguladores negativos do *MYD88* devem ser consideradas na interpretação dos resultados, sendo necessários estudos adicionais, incluindo avaliação da expressão da proteína *MYD88*.

A expressão do *IRAK4*, por sua vez, foi maior na SMD com excesso de blastos em comparação com a SMD sem excesso de blastos e com sideroblastos em anel (SMD-SA). Sabe-se que o *IRAK4* expressa pelo menos 2 isoformas de mRNA, resultado de mecanismo de *splicing* alternativo: a *IRAK4-S*, isoforma mais curta, onde o éxon-4 ou éxon-6 são excluídos, e a *IRAK4-L*, isoforma mais longa, onde o éxon-4 ou éxon-6 são incluídos. A

isoforma longa, IRAK4-L, leva à ativação persistente da via do MYD88, interagindo de forma mais eficiente com esta proteína.

Mutações em proteínas relacionadas ao *splicing*, como a *SF3B1* e a *U2AF1* são comuns em SMD e estão relacionadas à expressão diferencial das isoformas de IRAK4. Choudhary e colaboradores (2022) demonstraram que a mutação do *SF3B1*, com retenção do éxon 6, leva à hiperexpressão de uma isoforma longa de IRAK4 (IRAK4-L), com maior atividade da via NFκB. Este achado foi relacionado às variáveis clínicas e laboratoriais de 183 amostras de células CD34 de pacientes com SMD, havendo maior expressão nos grupos com menor contagem de plaquetas, maior percentual de blastos e maior necessidade transfusional, variáveis clínicas associadas a prognóstico desfavorável. Em outra coorte de casos de SMD e LMA, expressão da IRAK4-L foi maior nos pacientes com cariótipo complexo (CHOUDHARY et al., 2022). Nas SMDs e LMAs com mutação *U2AF1* a isoforma longa IRAK4-L é preferencialmente expressa, como resultado de *splicing* alternativo com retenção do éxon 4, estando associada a prognóstico desfavorável (PELLAGATTI; BOULTWOOD, 2023; SMITH et al., 2019). Khalilian e colaboradores (2024), por sua vez, encontraram aumento da expressão de *IRAK4* em células mononucleares de MO de pacientes com SMD e LMA em comparação com os controles, sendo a expressão maior em SMD que em LMA. Nesta coorte não foram analisadas as isoformas de IRAK4 (KHALILIAN et al., 2024).

No presente trabalho a expressão do mRNA das isoformas IRAK-L e IRAK-S não foi avaliada, o que poderia explicar a ausência de expressão diferencial de *IRAK4* no subgrupo de SMD sem excesso de blastos e com sideroblastos em anel (SMD-SA), na qual a mutação *SF3B1* é um critério diagnóstico e tem reconhecido papel na patogênese. No entanto, o achado de maior expressão de *IRAK4* em formas mais avançadas de SMD nesta coorte converge com os dados da literatura (PELLAGATTI et al., 2010). A correlação forte demonstrada entre *IRAK4* e *NFκB* no estudo de correlação converge com as informações da literatura acerca do papel crítico da IRAK4 na ativação da via NFκB, razão pela qual tem sido estudada como um potencial alvo terapêutico em doenças inflamatórias e SMD (GONZALEZ -LUGO; VERMA, [s.d.]).

Embora participe da sinalização de vários TLRs, faça parte do complexo proteico do MYD88 e sua hiperexpressão esteja associada ao aumento da ubiquitilação do TRAF6 e ativação da via do NFκB, não há dados relevantes acerca da expressão de *IRAK2* em SMD e neoplasias mieloides (BENNETT; STARCZYNOWSKI, 2022; RHYASEN; STARCZYNOWSKI, 2015). Na presente coorte, a expressão do *IRAK2* foi menor nos pacientes

com blastos > 10% quando comparados às demais categorias do IPSS quanto ao percentual de blastos.

A IRAK1 é o último elemento do complexo proteico do MYD88. Após ser fosforilado pela IRAK4, ativa o TRAF6, atuando como um importante mediador da sinalização dos TLRs. É alvo de regulação negativa pelos microRNAs miR-145 e miR-146a, e pacientes com SMD e deleção de miRNAs, como ocorre na del 5q, apresentam aumento da expressão de *IRAK1* e hiperativação inflamatória (VEGIVINTI et al., 2023).

Quanto à expressão de *IRAK1*, nesta coorte pacientes com blastos > 10% apresentaram menor expressão de *IRAK1* quando comparados aos com blastos ≤ 10%. Expressão menor também foi observada nos pacientes com cariótipo anormal quando comparados a cariótipo normal. Dados da literatura revelam que o *IRAK1* está hipereexpresso em 20 a 30% dos pacientes com SMD, estando relacionado à pior sobrevida. Foi observada também aumento da expressão da proteína IRAK1 numa forma hiperativada (RHYASEN; BOLANOS; STARCZYNOWSKI, 2013). Não há dados relacionando expressão do *IRAK1* às variáveis prognósticas.

O TRAF6, por sua vez, não faz parte do complexo proteico do MYD88, mas é ativado pelo IRAK1, sendo um mediador central na sinalização da imunidade inata. Expressão e/ou atividade aumentada de *TRAF6* pode refletir hiperativação das vias dos TLRs ou redução dos seus inibidores, miR-145 e miR-146a (regulação da expressão) e TIFAB (regulação da estabilidade).

Alguns trabalhos demonstraram aumento da expressão do *TRAF6* na SMD e LMA quando comparado aos controles, sendo um gene potencializador ou promotor de hematopoese aberrante nestas doenças. No entanto, Muto e colaboradores descreveram uma possível ação supressora de tumor do *TRAF6* que, cooperando com a mutação de perda de função do *TET2*, associada à hiperativação dos TLRs, promove ubiquitinação do *MYC*, reduzindo a ação proliferativa resultante da ativação deste gene. Hipoeexpressão do *TRAF6* leva à menor ubiquitinação do *MYC* e maior proliferação celular (MUTO et al., 2022).

Na presente coorte, *TRAF6* apresentou maior expressão nos controles quando comparados à SMD. Melhor compreensão destes achados demandaria estudos com avaliação da expressão da proteína e/ou estudos associados da expressão dos reguladores do TRAF6, miR-145, miR-146a e TIFAB (regulação da estabilidade).

Em resumo, os achados da expressão gênica de genes da imunidade inata na presente coorte revelaram menor expressão de *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2* e *TRAF6* em pacientes com critérios clínico-laboratoriais de prognóstico desfavorável, enquanto *IRAK4* e *NFKB*

estiveram mais expressos em formas mais avançadas de doença, como a SMD com excesso de blastos.

Tais achados devem considerar as variáveis genéticas e epigenéticas envolvidas na expressão diferencial de genes relacionados à imunidade inata, e devem ser interpretados à luz da complexidade da relação entre desregulação imune e SMD, que inclui desregulação das vias dos TLRs, anormalidades das citocinas, das vias de proliferação e de apoptose, além de anormalidades da imunidade celular (GARCIA-MANERO, 2023). Esta desregulação imune pode determinar o aumento da apoptose, predominante nas fases iniciais da doença, ou a imunotolerância e dominância clonal características das fases tardias da doença (PARACATU; SCHUETTPELZ, 2020).

Nas doenças iniciais ou de baixo risco, predominam citocinas relacionadas à apoptose e há um incremento da imunidade celular, como evidenciado, pelo aumento de linfócitos T CD8, com ação citotóxica, redução das células Treg, que auxiliam na tolerância imune, e aumento de mediadores envolvidos nas vias de apoptose. Nas doenças avançadas, ou nas formas de alto risco, há redução dos linfócitos T CD8, aumento dos Treg, e aumento de mediadores envolvidos em vias anti-apoptóticas e proliferativas, com a via NFkB (SALLMAN; LIST, 2019).

Tais achados corroboram a ideia de que os mecanismos envolvidos na relação entre desregulação imune e SMD são complexos e variam de acordo com as formas da doença, influenciados por fatores genéticos e epigenéticos. O conhecimento destes mecanismos possibilita a identificação de biomarcadores e de moléculas com potencial efeito terapêutico nas diferentes fases da doença.

Nas doenças de baixo risco, o uso de imunossupressores e imunomoduladores, como a Lenalidomida, com reconhecido efeito terapêutico para a Síndrome do 5q-, encontra-se bem estabelecido. Nas doenças de alto risco, por sua vez, nas quais os agentes hipometilantes já têm papel bem definido, a associação com inibidores de check-points (nivolumab, durvalumab) têm sido estudada, visando suplantiar a imunotolerância característica destas formas de SMD (GARCIA-MANERO, 2023).

A melhor compreensão dos mecanismos moleculares da via do MYD88 na SMD e LMA tem provocado interesse no estudo de drogas inibidoras de IRAK1 e IRAK4 no tratamento destas doenças. O CA4948 (Emavusertib), por exemplo, é uma droga inibidora de IRAK4 que se liga ao domínio kinase da proteína e que vem sendo estudada para tratamento de SMD e LMA como droga isolada e em combinação com agentes hipometilantes ou inibidores de BCL2. Um inibidor combinado de IRAK1/IRAK4, o R289/R835 também encontra-se em estudo com



esta finalidade. O crescente interesse nestas drogas envolvidas no controle da desregulação imune reflete a importância das vias relacionadas à imunidade e inflamação na patogênese da SMD (PLATZBECKER, 2019).

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho, realizado numa coorte brasileira de pacientes com SMD, sugerem a presença de anormalidades da expressão de *NFKB* e genes relacionados à imunidade inata, em particular *TRAF6* e genes relacionados ao complexo proteico do MYD88, nesta doença.

A maior expressão de *NFKB* e sua correlação com a expressão aumentada do *IRAK4* em subgrupos de variáveis prognósticas desfavoráveis de SMD corrobora a importância da via *NFKB* na patogênese da doença, e da *IRAK4* como potencial alvo terapêutico, uma vez que suas isoforma *IRAK4-L* tem papel crítico na ativação da via *NFKB*.

A menor expressão de *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK2* e *TRAF6* em pacientes com a doença e em subgrupos de variáveis prognósticas favoráveis converge com o modelo de patogênese proposto para a SMD, no qual nas fases iniciais da doença há maior atividade dos mecanismos de controle da progressão clonal, incluindo aumento da resposta imunidade inata e inflamação, levando à apoptose e hematopoese ineficaz.

Algumas limitações deste estudo incluem a utilização de células mononucleares de MO, e não de células CD34, e a não utilização de sonda de *IRAK4* que incluíssem os éxons 4 e/ou 6, para avaliação da expressão da isoforma longa, *IRAK4-L*. Outra limitação é a ausência de análise da expressão das proteínas para avaliar se as anormalidades encontradas na expressão dos genes estudados são traduzidas em anormalidades da expressão das respectivas proteínas.

Na SMD esta avaliação da expressão proteica é de particular importância para interpretar os dados de expressão gênica, uma vez que anormalidades epigenéticas e relacionadas ao *splicing* são frequentemente descritas na SMD, podendo afetar significativamente a expressão das proteínas.

Como perspectivas futuras, uma alternativa para melhor compreensão dos achados deste estudo é o estudo da expressão das proteínas *TRAF6* e do complexo proteico do MYD88, para avaliar se os achados de menor expressão de *MYD88*, *IRAK2* e *IRAK1* em SMD com características clínicas de prognóstico favorável, bem como se menor expressão de *TRAF6* em pacientes com SMD em comparação com os controles se traduzem na redução da expressão das proteínas codificadas por estes genes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUZAHAR, A. et al. Therapy-related myelodysplastic syndromes, or are they? *Blood Rev*, 31(3):119-128, May 2017

ADÈS, L. et al. Myelodysplastic syndromes. *The Lancet*, 383(9936):2239-52, Jun 28 2014

ALAGGIO, R. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, 36(7):1720-1748, Jul 2022

ANDERSON, L. A. et al. Risks of myeloid malignancies in patients with autoimmune conditions. *British Journal of Cancer*, 100(5):822-8, Mar 2009

BAAKHLAGH, S. et al. Toll-like receptor 4 signaling pathway is correlated with pathophysiological characteristics of AML patients and its inhibition using TAK-242 suppresses AML cell proliferation. *International Immunopharmacology*, 90:107202, Jan 2021.

BALANDRÁN, J. C.; LASRY, A.; AIFANTIS, I. The Role of Inflammation in the Initiation and Progression of Myeloid Neoplasms. *Blood Cancer Discovery*, 4(4):254-266, Jul 2023.

BARREYRO, L.; CHLON, T. M.; STARCZYNOWSKI, D. T. Chronic immune response dysregulation in MDS pathogenesis. *Blood*, v. 132, n. 15, p. 1553–1560, Oct 2018.

BAUMGARTNER, B. et al. Increased I $\kappa$ B kinase activity is associated with activated NF- $\kappa$ B in acute myeloid blasts. *Leukemia* (10):2062-71, Oct 2002

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, Oct 2015.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*. 51(2):189-99, Jun 1982

BENNETT, J. et al. Paralog-specific signaling by IRAK1/4 maintains MyD88-independent functions in MDS/AML. Disponível em: <[http://ashpublications.org/blood/article-pdf/142/11/989/2076529/blood\\_bld-2022-018718-main.pdf](http://ashpublications.org/blood/article-pdf/142/11/989/2076529/blood_bld-2022-018718-main.pdf)>.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. *British Journal of Haematology*. 33(4):451-8, Aug 1976

BENNETT, J.; STARCZYNOWSKI, D. T. IRAK1 and IRAK4 as emerging therapeutic targets in hematologic malignancies. *Current Opinion in Hematology*. 29(1):8-19, Jan 2022.

BERNARD, E. et al. Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *NEJM Evidence*, v.1(7):EVIDo220000, Jun 2022.

BILLSTRÖM, R. et al. Bone marrow karyotype and prognosis in primary myelodysplastic syndromes. *European Journal of Haematology*, v. 41, n. 4, p. 341–346, 1988.

BRAUN, T. et al. NF- $\kappa$ B constitutes a potential therapeutic target in high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*, v. 107, n. 3, 2006.

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, abr. 2009.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, v. 368, n. 22, p. 2059–2074, maio 2013.

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

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

CHEN, X. et al. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Clinical Investigation*, v. 123, n. 11, 2013.

CHOU, W. C. et al. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood*, 118(14):3803-10, oct 2011.

CHOUDHARY, G. S. et al. Activation of targetable inflammatory immune signaling is seen in myelodysplastic syndromes with SF3B1 mutations. *eLife*, 11:e78136, aug 2022.

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

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917):860-7,dez. 2002.

DATAR, G. K.; GOODELL, M. A. Where There's Smoke, There's Fire: Inflammation Drives MDS. *Trends in Immunology*, 41(7):558-560, jul. 2020.

DE HOLLANDA, A. et al. Systemic and immune manifestations in myelodysplasia: A multicenter retrospective study. *Arthritis Care and Research*, v. 63, n. 8, p. 1188–1194, ago. 2011.

DE MATOS, A. G. et al. Interleukin-8 and nuclear factor kappa B are increased and positively correlated in myelodysplastic syndrome. *Medical Oncology*, 34(10):168, out. 2017.

DIMICOLI, S. et al. Overexpression of the Toll-Like Receptor (TLR) Signaling Adaptor MYD88, but Lack of Genetic Mutation, in Myelodysplastic Syndromes. *PLoS ONE*, 8(8):e71120, ago. 2013.

EL-ZAYAT, S. R.; SIBAIL, H.; MANNAA, F. A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bulletin of the National Research Centre*, 43, a 187 v. 43, dez. 2019.

EPLING-BURNETTE, P. K. et al. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood*, 109(11):4816-24, jul 2007.

FANG, J. et al. Ubiquitination of hnRNPA1 by TRAF6 links chronic innate immune signaling with myelodysplasia. *Nature Immunology*, v. 18, n. 2, p. 236–245, 1 fev. 2017.

FONTE, E. et al. Toll-like receptor stimulation in splenic marginal zone lymphoma can modulate cell signaling, activation and proliferation. *Haematologica*, 100(11):1460-8, nov 2015.

FOZZA, C. et al. Patients with myelodysplastic syndromes display several T-cell expansions, which are mostly polyclonal in the CD4<sup>+</sup> subset and oligoclonal in the CD8<sup>+</sup> subset. *Experimental Hematology*, 37(8):947-55, ago 2009.

GABRILOVICH, D. I.; NAGARAJ, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 9(3):162-74, mar 2009

GAÑÁN-GÓMEZ, I. et al. Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 29(7):1458-69, jul. 2015.

GARCIA-MANERO, G. Myelodysplastic syndromes: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, v. 98, n. 8, p. 1307–1325, 1 ago. 2023.

GONZALEZ -LUGO, J. D.; VERMA, A. Targeting inflammation in lower-risk MDS. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2022(1):382-387, dec 2022

GREENBERG, P. et al. International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes . *Blood*, 15;89(6):2079-88, 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. 2012a.

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

GUILLAMOT, M. et al. The E3 ubiquitin ligase SPOP controls resolution of systemic inflammation by triggering MYD88 degradation. *Nature Immunology*, v. 20, n. 9, p. 1196–1207, 1 set. 2019.

HAASE, D. et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*, 110(13):4385-95, dec 2007.

HAASE, D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Annals of Hematology*, 87(7):515-26, jul. 2008.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5):646-74, mar. 2011.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*, v 12, a 86, ago. 2013.

HOFMANN, W.-K. et al. Characterization of gene expression of CD34 cells from normal and myelodysplastic bone marrow. *Blood*, 100(10):3553-6, nov 2002

HOSONO, N. Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS. *International Journal of Clinical Oncology*, . 24(8):885-892, ago 2019

IGNATZ-HOOVER, J. J. et al. The role of TLR8 signaling in acute myeloid leukemia differentiation. *Leukemia*, v. 29, n. 4, p. 918–926, 15 abr. 2015.

IWANAGA, M. et al. Risk of myelodysplastic syndromes in people exposed to ionizing radiation: A retrospective cohort study of Nagasaki atomic bomb survivors. *Journal of Clinical Oncology*, v. 29, n. 4, p. 428–434, 1 fev. 2011.

JAISWAL, S. et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *New England Journal of Medicine*, v. 371, n. 26, p. 2488–2498, 25 dez. 2014.

JONAS, B. A.; GREENBERG, P. L. MDS prognostic scoring systems - Past, present, and future. *Best Practice and Research: Clin Haematol*. 28(1):3-13, mar. 2015.

KATAOKA, N.; MATSUMOTO, E.; MASAKI, S. Mechanistic insights of aberrant splicing with splicing factor mutations found in myelodysplastic syndromes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15):7789, ago. 2021.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*, 5:461, set 2014.

KERBAUY, D. M. B. et al. NF- $\kappa$ B and FLIP in arsenic trioxide (ATO)-induced apoptosis in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood*, v. 106, n. 12, 2005.

KHALILIAN, P. et al. Toll-Like Receptor 4, 2, and Interleukin 1 Receptor Associated Kinase4: Possible Diagnostic Biomarkers in Myelodysplastic Syndrome Patients. *Advanced Biomedical Research*, v. 13, n. 1, 1 jan. 2024.

KNAPP, R. H.; DEWALD, G. W.; PIERRE, R. V. Cytogenetic Studies in 174 Consecutive Patients With Preleukemic or Myelodysplastic Syndromes. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 60, n. 8, p. 507–516, 1985.

KORDASTI, S. Y. et al. IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology*, v. 145, n. 1, p. 64–72, abr. 2009.

KRISTINSSON, S. Y. et al. Chronic immune stimulation might act as a trigger for the development of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, v. 29, n. 21, p. 2897–2903, 20 jul. 2011.

LEE, E. J. et al. The evolving field of prognostication and risk stratification in MDS: Recent developments and future directions. *Blood Reviews*, v. 30, n. 1, p. 1–10, 1 jan. 2016.

LI, J. et al. The relationship between TRAF6 and tumors. *Cancer Cell Int*, 20:429, set. 2020.

LIU, T. et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Nature*, v 2, a 17023, jul 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001a.

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. 2001b.

MA, X. et al. Obesity, lifestyle factors, and risk of myelodysplastic syndromes in a large US cohort. *American Journal of Epidemiology*, v. 169, n. 12, p. 1492–1499, jun. 2009.

MAGALHÃES, S. M. M. ET AL. Epidemiological and Clinicopathological Data From the Brazilian Registry of Patients with Myelodysplastic Syndromes and Comparative Analysis between different geographic areas. *Blood*. 116, abstract 1884 2010. BLOOD. Anais.2010.

MARATHEFTIS, C. I. et al. Toll-like receptor-4 is up-regulated in hematopoietic progenitor cells and contributes to increased apoptosis in myelodysplastic syndromes. *Clinical Cancer Research*, v. 13, n. 4, p. 1154–1160, 15 fev. 2007.

MARTY W. MAYO, A. S. B. \*. The transcription factor NF- $\kappa$ B: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1470, p. M55–M62, 2000.

MATOS, A.; MAGALHÃES, S. M. M.; RAUH, M. J. Immune Dysregulation and Recurring Mutations in Myelodysplastic Syndromes Pathogenesis. Em: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. [s.l.] Springer, 2021. v. 1326p. 1–10.

MEDYOUNG, H. et al. Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. *Cell Stem Cell*, v. 14, n. 6, 2014.

MONLISH, D. A. et al. Loss of Toll-like receptor 2 results in accelerated leukemogenesis in the NUP98-HOXD13 mouse model of MDS. *Blood*. 131(9):1032-1035, mar. 2018.

MONLISH, D. A.; BHATT, S. T.; SCHUETTPELZ, L. G. The role of toll-like receptors in hematopoietic malignancies. *Frontiers in Immunology*, 7:390, set. 2016.

MUTO, T. et al. TRAF6 functions as a tumor suppressor in myeloid malignancies by directly targeting MYC oncogenic activity. *Cell Stem Cell*, v. 29, n. 2, p. 298- 314.e9, 3 fev. 2022.

NAKAJIMA, H. Molecular pathogenesis and treatment of myelodysplastic syndromes. *Internal Medicine (Japanese Society of Internal Medicine)*, 60(1):15–2, jan. 2021.

NGO, V. N. et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*, v. 470, n. 7332, 2011.

OGAWA, S. Review Series MYELODYSPLASTIC SYNDROMES Genetics of MDS. *Blood*, 133 (10): 1049–1059, 2019

PAPAEMMANUIL, E. et al. Prepublished online as Blood First Edition paper. *BLOOD*, v. 122, p. 22, 2013.

PARACATU, L. C.; SCHUETTPELZ, L. G. Contribution of Aberrant Toll Like Receptor Signaling to the Pathogenesis of Myelodysplastic Syndromes. *Frontiers in Immunology*, 11:1236, jun. 2020.

PELLAGATTI, A. et al. Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia*, v. 24, n. 4, p. 756–764, 2010.

PELLAGATTI, A.; BOULTWOOD, J. Splicing factor mutations in the myelodysplastic syndromes: Role of key aberrantly spliced genes in disease pathophysiology and treatment. *Advances in Biological Regulation*, v. 87, 1 jan. 2023.

PERKINS, N. D.; GILMORE, T. D. Good cop, bad cop: The different faces of NF- $\kappa$ B. *Cell Death Differ*, 13(5):759-72, may 2006

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. *Braz J Med Biol Res* 42 (11), Nov 200

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, n. 5411, 1999.

PLATZBECKER, U. Treatment of MDS (Review Series Myelodysplastic Syndromes). *Blood*, 133(10):1096-1107, mar 2019.

PYATT, D. W. et al. An essential role for NF- $\kappa$ B in human CD34+ bone marrow cell survival. *Blood*, v. 93, n. 10, 1999.

RHYASEN, G. W.; BOLANOS, L.; STARCZYNOWSKI, D. T. Differential IRAK signaling in hematologic malignancies. *Experimental Hematology*, 41(12):1005–1007, set 2013.

RHYASEN, G. W.; STARCZYNOWSKI, D. T. Deregulation of microRNAs in myelodysplastic syndrome. *Leukemia Nature*, v 26, pages13–22, 2012

RHYASEN, G. W.; STARCZYNOWSKI, D. T. IRAK signalling in cancer. *Br J Cancer*, 112(2):232-7, jan. 2015.

ROMEO, M. et al. Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodysplastic syndrome patients. *Leuk Res*, 26(11):993-6, nov 2022

ROWLEY, J. et al. GENERAL REPORT ON THE SECOND INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOMES IN LEUKEMIA *Int J Cancer*, 15;26(5):531-3, nov 1980.



RUPEC, R. A. et al. Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I $\kappa$ B $\alpha$ . *Immunity*, v. 22, n. 4, 2005.

SALLMAN, D. A.; LIST, A. The central role of inflammatory signaling in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Blood*, 133(10):1039-1048, mar 2019

SCHANZ, J. et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of Clinical Oncology*, v. 30, n. 8, p. 820–829, 10 mar. 2012.

SEER Cancer Statistics Fast Stats - <https://seer.cancer.gov/statfacts/>

SEKERES, M. A. The epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am*, 24(2):287-94 abr. 2010.

SHI, X. et al. The inflammatory cytokine profile of myelodysplastic syndromes: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore, USA)*, 98(22):e15844, may 2019.

SINGER, J. W. et al. Inhibition of interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) as a therapeutic strategy. *Oncotarget*, 9(70):33416-33439, sept 2018

SMITH, M. A. et al. U2AF1 mutations induce oncogenic IRAK4 isoforms and activate innate immune pathways in myeloid malignancies. *Nature Cell Biology*, v. 21, n. 5, p. 640–650, 1 maio 2019.

STARCZYNOWSKI, D. T. et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q-syndrome phenotype. *Nature Medicine*, v. 16, n. 1, p. 49–58, jan. 2010.

STARCZYNOWSKI, D. T.; KARSAN, A. Innate immune signaling in the myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am*, 24(2):343-59, abr. 2010.

STROM, S. S. et al. Risk factors of myelodysplastic syndromes: A case-control study. *Leukemia*, v. 19, n. 11, p. 1912–1918, 2005.

TITMARSH, G. J. et al. Community-acquired infections and their association with myeloid malignancies. *Cancer Epidemiology*, v. 38, n. 1, p. 56–61, 2014.

TROWBRIDGE, J. J.; STARCZYNOWSKI, D. T. Innate immune pathways and inflammation in hematopoietic aging, clonal hematopoiesis, and MDS. *J Exp Med*, 5;218(7):e20201544 jun. 2021.

VALENT, P.; VALENT, P. ICUS, IDUS, CHIP and CCUS: Diagnostic Criteria, Separation from MDS and Clinical Implications. *Pathobiology*, 86(1):30-38. jan. 2019.

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, a: research0034.1, (2002)

VARDIMAN, J. The classification of MDS: From FAB to WHO and beyond. *Leuk Res*, 36(12):1453-8, dec 2012

VARDIMAN, J. W.; HARRIS, N. L.; BRUNNING, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7):2292-302, oct. 2002.

VARNEY, M. E. et al. Deconstructing innate immune signaling in myelodysplastic syndromes. , *Exp Hematol.*, 3(8):587–598, aug. 2015a.

VARNEY, M. E. et al. Loss of Tifab, a del(5q) MDS gene, alters hematopoiesis through derepression of Toll-like receptor-TRAF6 signaling. *Journal of Experimental Medicine*, v. 212, n. 11, p. 1967–1985, 19 out. 2015b.

VEGIVINTI, C. T. R. et al. Role of innate immunological/inflammatory pathways in myelodysplastic syndromes and AML: a narrative review. *Experimental Hematology & Oncology*, v 12, a 60, dez. 2023.

VISCONTE, V.; TIU, R. V.; ROGERS, H. J. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: An overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. *Blood Res*, 23;49(4):216–227, dec, 2014.

WALSH, M. C.; LEE, J.; CHOI, Y. Tumor necrosis factor receptor- associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. *Immunological Reviews*, v. 266, n. 1, p. 72–92, 1 jul. 2015.

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, J. Q. et al. Toll-like receptors and cancer: MYD88 mutation and inflammation. *Frontiers in Immunology* . *Front Immunol*, 31;5:367, jul 2014.

WANG, Z. et al. The Different Immunoregulatory Functions on Dendritic Cells between Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow of Patients with Low-Risk or High-Risk Myelodysplastic Syndromes. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, 2013.

WEI, Y. et al. Toll-like receptor alterations in myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, v. 27, n. 9, p. 1832–1840, set. 2013.

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.

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

ZENG, Q. et al. Apoptosis in human myelodysplastic syndrome CD34+ cells is modulated by the upregulation of TLRs and histone H4 acetylation via a  $\beta$ -arrestin 1 dependent mechanism. *Experimental Cell Research*, v. 340, n. 1, 2016a.

ZENG, Q. et al. Apoptosis in human myelodysplastic syndrome CD34<sup>+</sup> cells is modulated by the upregulation of TLRs and histone H4 acetylation via a  $\beta$ -arrestin 1 dependent mechanism. *Experimental Cell Research*, v. 340, n. 1, p. 22–31, 1 jan. 2016b.

## APENDICES

### APENDICE 1 - CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS E CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM SMD E LMA

Paciente	Sexo	Idade	Celularidade	Cariótipo	WHO_2022	IPSS_R	Dep_transfusional	Evolução_LMA	Óbito
1	F	81	-	46,XX[5]	SMD-BB-SA	Baixo	Sim	Não	-
2	F	46	Hipercelular	46,XX[8]	SMD-BB	Baixo	Sim	Sim	-
3	M	86	Hipercelular	46,XY[25]	SMD-BB	Intermediário	Sim	-	-
4	M	63	-	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2]	SMD-EB	Alto	Sim	Não	Sim
5	M	66	Hipercelular		SMD-BB	-	Sim	Não	-
6	M	32	Hipocelular	46,XY,del(5)(q15q33),del(17)(p11.2)[7]/46,XY[13]	SMD-BB	Baixo	Não	-	-
7	M	92	Hipercelular	Ausência de metáfases	SMD-BB	-	Não	Não	-
8	M	85	Hipercelular	46,XY[20]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	-
9	M	77	-	46,XY,add(13)(p11)[12]/46,XY,del(7)(q32),add(13)(p11)[4]/48,XY,add(13)(p11),+22,+mar[9]/48,XY,del(7)(q32),add(13)(p11),+22,+mar[3]/46,XY[2]	SMD-BB	Muito alto	Sim	Não	-
10	F	44	-	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(?q25)[7]/46,XX[4]	SMD-BB	Baixo	Sim	Não	-
11	M	47	Normocelular	47,XY,+mar[5]/46,XY,del(5)(q31)[5]/46,XY[15]	SMD-BB	Baixo	Sim	Não	-
12	M	81	Hipercelular	46,XY[20]	SMD-BB	Intermediário	Sim	Sim	-
13	M	79	Normocelular	46,XY[6]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	-
14	M	71	Hipercelular	46,XY[17]	SMD-BB-SA	Baixo	Não	Não	-
15	M	68	Hipercelular	Ausência de metáfases	SMD-EB	-	Sim	Não	-
16	F	72	-	-	SMD-EB	-	Sim	Não	-
17	F	59	-	Ausência de metáfases	SMD-BB	-	Sim	Não	-
18	F	84	-	Ausência de metáfases	SMD-BB-SA	-	Não	Não	-
19	M	78	-	-	SMD-BB	-	-	Não	-
20	F	73	Hipercelular	46,XX[20]	SMD-BB-SA	Baixo	Sim	Não	-
21	F	70	Hipercelular	-	SMD-BB-SA	-	Sim	Não	-

Paciente	Sexo	Idade	Celularidade	Cariótipo	WHO_2022	IPSS_R	Dep_transfusional	Evolução_LMA	Óbito
22	M	79	-	46,XY, del(5)(q34),del(11)(q23)[7]/46,XY[5]	SMD-BB	Intermediário	Sim	Não	Sim
23	M	25	Hipocelular	46,XY[20]	SMD-h	Baixo	Sim	Não	Não
24	F	60	Normocelular	45,X,-X[20]/46,XX[4]	SMD-EB	Muito Alto	Sim	Não	Sim
25	M	60	-	47,XY,+15[10]/46,XY[10]	SMD-BB-SA	Intermediário	Sim	Não	-
26	M	40	Hipocelular	47,XY,+mar[6]/46,XY,del(5)(q31)[3]/46,XY,del(7)(q32)[2]/46,XY,del(5)(q31),del(7)(q32)[2]/46,XY[7]	SMD-h	Intermediário	Não	Não	Não
27	F	87	Hipercelular	47,XX,t(4;11)(q27;q32),+mar[4]/46,XX[16]	SMD-BB	Intermediário	Não	Sim	-
28	F	77	Hipercelular	46,XX[15]	SMD-BB	Muito baixo	Não	Sim	-
29	F	74	Hipercelular	Ausência de metáfase	SMD-BB	-	Sim	Não	-
30	M	59	-	Ausência de metáfases	SMD-BB	-	Não	Não	-
31	M	61	Hipercelular	Ausência de metáfases	SMD-BB-SA	-	Não	Não	Não
32	F	53	Hipercelular	46,XX[20]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	-
33	F	63	Hipocelular	46,XY[10]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	-
34	M	76	Hipercelular	Ausência de metáfases	SMD-BB-SA	-	Não	Não	-
35	M	81	Hipocelular	46,XY[18]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	-
36	M	92	-	46,XY,del(5)(q32)[13]/46,XY[17]	SMD-Del(5q)	Baixo	-	Não	-
37	M	71	Normocelular	46,XY[20]	SMD-EB	Intermediário	Sim	Não	-
38	F	75	-	46,XX[20]	SMD-BB-SA	Baixo	-	Sim	-
39	M	75	Hipercelular	92,XXYY<4n>[4]/46,XY[8]	SMD-EB	Alto	-	Sim	-
40	M	83	Hipercelular	92,XXYY[5]/46,XY[15]	SMD-BB	Muito baixo	Não	Não	-
41	M	71	Hipercelular	46,XY[20]	SMD-BB	Baixo	Sim	Sim	Sim
42	F	25	Hipocelular	46,XX[20]	SMD-h	Intermediário	-	Não	-
43	F	78	-	46,XX[20]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	Não
44	M	79	-	46,XY[20]	SMD-EB	Intermediário	-	Não	-
45	F	81	-	47,XX,+8[9]/47,XX,+8,del(20)(q12)[5]/46,XX[6]	SMD-BB-SA	Intermediário	-	Não	-
46	F	83	-	46,XX[12]	SMD-EB	Alto	-	-	-
47	F	81	Hipercelular	46,XX [20]	SMD-BB	Muito baixo	Não	Não	-

Paciente	Sexo	Idade	Celularidade	Cariótipo	WHO_2022	IPSS_R	Dep_transfusional	Evolução_LMA	Óbito
48	M	89	-	46,XY,t[5;19](q13.2;q13.4)[3]/46,XY,t[5;19](q13.2;q13.4),t(8;21)(q21.3;q22.12)[3]/46,XY,del(X)(q21),t(5;19)(q13.2;q13.4),t(8;21)(q21.3;q22.12)[5]/46,XY[9]	SMD-EB	Muito alto	-	Sim	-
49	F	46	Hipercelular	46,XX[20]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	-
50	F	93	-	46,XX,+8[12]/46,XX[8]	SMD-EB	Muito alto	-	Não	-
51	M	84	-	46,XY[20]	SMD-EB	Alto	-	Não	-
52	F	81	Hipercelular	46,XX[20]	SMD-BB-SA	Baixo	-	Não	-
53	M	87	-	46,XY[20]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	-
54	F	49	-	46,XX[4]	SMD-BB	Baixo	-	Não	-
55	M	76	Hipercelular	46,XY,del(5)(q31)[2]/46,XY,del(5)(q31),-7,+8[16]	SMD-EB	Muito alto	-	Não	-
56	F	85	-	46,XX[20]	SMD-EB	Intermediário	-	Não	-
57	F	48	Hipocelular	46,XX[20]	SMD-h	Intermediário	-	Não	-
58	M	73	Hipercelular	46,XY[20]	SMD-EB	Alto	-	Não	-
59	F	91	-	46,XX[20]	SMD-EB	Alto	Sim	Não	Sim
60	M	65	Hipercelular	46,XY[20]	SMD-f	Alto	-	Não	-
61	F	87	-	46,XX,del(5)(q14)[5]/46,XX[15]	SMD-EB	Muito alto	-	Não	-
62	F	86	-	Trissomia do 8	SMD-EB	Alto	-	Não	-
63	M	86	Hipercelular	46,XY[20]	SMD-BB-SA	Baixo	-	Não	-
64	F	44	Hipercelular	46,XX[20]	SMD-BB	Baixo	-	Não	-
65	M	86	-	92,XY[3]/46,XY[4]	SMD-BB-SA	Alto	-	Não	-
66	M	69	Hipercelular	43,XY,del(3)(p22),del(4)(q21),-5,-6,-7,+add(16)(p13),add(20)(p13),+mar[20]	SMD- <i>biTP53</i>	Muito alto	-	Sim	-
67	M	81	Hipercelular	46,XY[18]	SMD-BB	-	-	Não	-
68	F	55	-	92-184,XX[8]/46,XX[20]	SMD-EB	Alto	Não	-	Sim
69	M	69	-	46,XY[15]	SMD-EB	Muito alto	-	Não	-
70	F	77	Hipercelular	46,XX[20]	SMD-BB	Baixo	Sim	Não	Não
71	F	65	Normocelular	46,XX, 16qh+[20]	SMD-BB	Baixo	Não	Não	Sim
72	F	64	Hipercelular	46,XX[20]	SMD-EB	Alto	Sim	-	Sim
73	F	71	Hipercelular	46,XX[10]	SMD-EB	Alto	Não	Não	Não
74	F	79	-	46,XX,del(5)(q13)[8]/46,XX[12]	SMD-EB	Muito Alto	-	-	-

Paciente	Sexo	Idade	Celularidade	Cariótipo	WHO_2022	IPSS_R	Dep_transfusional	Evolução_LMA	Óbito
75	F	86	-	46,XX, del(5)(q14)[20]	SMD-Del(5q)	Baixo	-	Não	-
76	F	65	Hipercelular	47,XX,+mar [12]	SMD-EB	Muito alto	-	-	-
77	F	69		45,XX,-5,del(5)(q31)[3]/45,XX,-5,del(5)(q31),der(1)t(1;8)(p36.3;q24)[16]/46,XX[1]	LMA secundária			-	
78	M	79		46,XY[20]	LMA secundária			Não	
79	M	76		46,XY[20]	LMA secundária			Não	
80	F	82		46,XX,del(3)(q21),-5,+6,+8,i(11)(q10),add(16)(p13.3),add(17)(p13),+mar [20]	LMA secundária			Não	
81	M	75		46,XY[20]	LMA secundária				
84	M	81		45,X,-Y[20]	LMA secundária				

APÊNDICE 2 – ESTRATIFICAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE AS EXPRESSÕES DE  
*IRAK1*, *IRAK2*, *IRAK4*, *TRAF6*, *NFKB* e *MYD88* FRENTE ÀS VARIÁVEIS CLÍNICO-  
 LABORATORIAIS DOS PACIENTES

CONTROLE X SDM X LMA							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	Controle	,5406150	,4551950	,32115	,82218	,1944276	,402 <sup>†</sup>
	SMD	,7190249	,6727700	,08877	1,51437	,3654998	
	LMA	,6727117	,5370450	,37276	1,33034	,3537542	
<i>IRAK2</i>	Controle	,0397856	,0328300	,01872	,06709	,0194044	,455 <sup>†</sup>
	SMD	,0391536	,0374200	,00124	,09752	,0209747	
	LMA	,0282133	,0212500	,00996	,05237	,0179147	
<i>IRAK4</i>	Controle	,1815870	,0874850	,01000	,48966	,1814055	,757 <sup>#</sup>
	SMD	,1245811	,0752500	,00227	,85757	,1592974	
	LMA	,1518417	,0886350	,00616	,53592	,1958501	
<i>TRAF6</i>	Controle	,1990710	,2020400	,04887	,35302	,1125852	,030 <sup>†</sup>
	SMD	,1301700	,1156400	,02250	,33553	,0735286	
	LMA	,1026375	,1084150	,04290	,15082	,0470444	
<i>NFKB</i>	Controle	,0915375	,1001550	,03766	,14780	,0435144	,613 <sup>†</sup>
	SMD	,1100845	,1030100	,00618	,22266	,0500408	
	LMA	,1120167	,1083700	,03845	,20950	,0672227	
<i>MYD88</i>	Controle	,9404700	,7053700	,41402	2,13870	,5990811	,021 <sup>#</sup>
	SMD	1,2673872	,7596350	,17491	18,91766	2,3250831	
	LMA	,3262883	,2928350	,10460	,66045	,20048824	

**†One-way Anova:** Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . **# Kruskal-Wallis:** Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

SEXO							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	Feminino	2,0691879	,8221800	,08877	19,39559	3,816146	,842 <sup>#</sup>
	Masculino	1,8590329	,7091400	,11247	19,46249	3,657110	
<i>IRAK2</i>	Feminino	,0413993	,0374200	,00124	,09752	,022422	,190 <sup>†</sup>
	Masculino	,0353131	,3235100	,00253	,07348	,018259	
<i>IRAK4</i>	Feminino	,1427778	,0802950	,00227	,85984	,1839008	,683 <sup>#</sup>
	Masculino	,1220585	,0751200	,00459	,71128	,1381883	



SEXO							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>TRAF6</i>	Feminino	,6319700	,4066053	,02250	5,49682	1,2506405	,069 <sup>#</sup>
	Masculino	,2883320	,1286900	,03589	2,94848	,4957250	
<i>NFKB</i>	Feminino	,1133871	,1078000	,00618	,22266	,0506810	,402 <sup>‡</sup>
	Masculino	,1038398	,1016100	,02503	,22048	,0504369	
<i>MYD88</i>	Feminino	1,3494200	,7812500	,17491	18,91766	2,7112723	,163 <sup>#</sup>
	Masculino	,9835804	,5597600	,10460	7,11924	1,2896258	

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

IDADE - CATEGORIAZADA							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	≤ 60 anos	1,6444474	,7737500	,08877	12,35848	2,7554774	,977 <sup>‡</sup>
	> 60 anos	2,0575050	,7968950	,11247	19,46249	3,9716554	
<i>IRAK2</i>	≤ 60 anos	,0721026	,0351500	,01328	,57941	,1265168	,601 <sup>#</sup>
	> 60 anos	,0615739	,0429750	,00124	,38440	,0657092	
<i>IRAK4</i>	≤ 60 anos	,1055772	,0627400	,00656	,85984	,1933235	,091 <sup>#</sup>
	> 60 anos	,1405649	,0877850	,00227	,79134	,1565416	
<i>TRAF6</i>	≤ 60 anos	,3800184	,1254900	,02250	2,15457	,5981986	,646 <sup>‡</sup>
	> 60 anos	,4896578	,1517350	,03589	5,49682	1,0533970	
<i>NFKB</i>	≤ 60 anos	,1132394	,1111000	,00618	,18543	,0556216	,625 <sup>‡</sup>
	> 60 anos	,1064050	,1016100	,02503	,22266	,0494986	
<i>MYD88</i>	≤ 60 anos	,9142500	,7380200	,22136	2,58131	,6254612	,740 <sup>#</sup>
	> 60 anos	1,2477418	,6202100	,10460	18,91766	2,3889390	

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

HEMOGLOBINA (IPSS-R)							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	≥ 10 g/dL	,6137970	,6121400	,40924	,86287	,1518330	,582 <sup>‡</sup>
	8-10 g/dL	,7089075	,6303800	,08877	1,44931	,3993118	
	<8 g/dL	,7518384	,6908800	,18637	1,51437	,3814627	
<i>IRAK2</i>	≥ 10 g/dL	,0465842	,0355350	,01553	,08452	,0258046	,095 <sup>‡</sup>
	8-10 g/dL	,0414658	0,198590	,01535	,09752	,0198590	

HEMOGLOBINA (IPSS-R)							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	P Valor
<i>IRAK4</i>	<8 g/dL	,0329682	,0338150	,00124	,07154	,0187097	,358 <sup>#</sup>
	≥ 10 g/dL	,0711585	,0653100	,00747	,18469	,0570017	
	8-10 g/dL	,1616054	,0751850	,00227	,85984	,2281782	
	<8 g/dL	,1218292	,0877850	,00616	,71128	,1229028	
<i>TRAF6</i>	≥ 10 g/dL	,0928822	,0987600	,04290	,13283	,0317883	,125 <sup>†</sup>
	8-10 g/dL	,1357611	,1254900	,02250	,31980	,0717554	
	<8 g/dL	,1105831	,1114100	,03589	,21857	,0471994	
	≥ 10 g/dL	,1161107	,1078000	,04237	,18543	,0472593	
<i>NFKB</i>	8-10 g/dL	,1189776	,1111500	,02503	,22048	,0599839	,380 <sup>†</sup>
	<8 g/dL	,1011421	,1006300	,00618	,22266	,0450240	
	≥ 10 g/dL	1,5465200	1,0093601	,25760	7,11924	1,7534101	
	8-10 g/dL	1,4928014	,8005600	,30962	18,91766	3,4446738	
<i>MYD88</i>	<8 g/dL	,8534082	,4994400	,10460	5,4135	1,0035769	<b>,024<sup>#</sup></b>

†One-way Anova: Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . # Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

ANC (IPSS-R)							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	< 800 mm <sup>3</sup>	,6371680	,6123100	,18637	1,33034	,3101207	,315 <sup>†</sup>
	≥ 800 mm <sup>3</sup>	,7454788	,6908800	,08877	1,51437	,3759892	
<i>IRAK2</i>	< 800 mm <sup>3</sup>	,0302489	,0288050	,00124	,07018	,0288050	,065 <sup>†</sup>
	≥ 800 mm <sup>3</sup>	,0408178	,0396900	,00737	,09752	,0206791	
<i>IRAK4</i>	< 800 mm <sup>3</sup>	,0742505	,0584400	,00616	,22213	,0610190	,152 <sup>#</sup>
	≥ 800 mm <sup>3</sup>	,1438888	,0902700	,00227	,85984	,1794617	
<i>TRAF6</i>	< 800 mm <sup>3</sup>	,6822119	,180400	,06271	4,20869	1,0070410	,075 <sup>#</sup>
	≥ 800 mm <sup>3</sup>	,4321372	,1311700	,02250	5,49682	1,0272589	
<i>NFKB</i>	< 800 mm <sup>3</sup>	,1075179	,1086000	,00618	,22266	,0533536	,788 <sup>†</sup>
	≥ 800 mm <sup>3</sup>	,1093335	,1017100	,02503	,22048	,0493299	
<i>MYD88</i>	< 800 mm <sup>3</sup>	,9400410	,8532200	,10460	2,58131	,7911502	,667 <sup>#</sup>
	≥ 800 mm <sup>3</sup>	1,2875131	,6121700	,20232	19,91766	2,5696060	

†T-test: Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . #Mann-Whitney: Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

PLAQUETAS (IPSS-R)							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	P Valor
<i>IRAK1</i>	≥ 100.000	,7971800	,7091400	,26285	1,51437	,3456833	
	50.000 - <100.000	,6622079	,6930300	,11247	1,44541	,3898785	,256 <sup>‡</sup>
	< 50.000	,6395277	,5339250	,08877	1,43851	,3587979	
<i>IRAK2</i>	≥ 100.000	,0434414	,0409450	,01856	,0972	,0182172	
	50.000 - <100.000	,0327335	,0351500	,00124	,07545	,0202612	,204 <sup>‡</sup>
	< 50.000	,0360912	,0282800	,00253	,08452	,0233276	
<i>IRAK4</i>	≥ 100.000	,1246341	,0848150	,00227	,79134	,1450393	
	50.000 - <100.000	,0770500	,0456800	,00486	,22213	,0762128	,249 <sup>#</sup>
	< 50.000	,1618808	,0722550	,01247	,85984	,2107915	
<i>TRAF6</i>	≥ 100.000	,1216365	,1212650	,05091	,21857	,04657625	
	50.000 - <100.000	,1129231	,0899400	,02250	,22091	,0590119	,578 <sup>‡</sup>
	< 50.000	,1051594	,1027650	,03589	,24853	,0523597	
<i>NFKB</i>	≥ 100.000	,1117607	,1070000	,02503	,22048	,0480973	
	50.000 - <100.000	,0960789	,0973350	,00618	,22266	,0530746	,356 <sup>‡</sup>
	< 50.000	,1186880	,1238600	,02608	,20950	,0529378	
<i>MYD88</i>	≥ 100.000	1,4116615	,8047300	,19488	18,91766	3,1439460	
	50.000 - <100.000	1,3971155	,7064750	,10460	7,11924	1,8179893	,363 <sup>#</sup>
	< 50.000	,7978700	,5571950	,17234	3,39223	,7395532	

**‡One-way Anova:** Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . **# Kruskal-Wallis:** Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

DISERITROPOESE							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	Ausência	,5577857	,4748400	,37276	,79118	,1579929	
	Presença	,7258507	,6559600	,08877	1,51437	,3757364	,249 <sup>‡</sup>
<i>IRAK2</i>	Ausência	,0440855	,0489200	,01002	,07794	,0221744	
	Presença	,0379768	,0360700	,00124	,09752	,0204263	,373 <sup>‡</sup>
<i>IRAK4</i>	Ausência	,1134227	,0567900	,00930	,53592	,1585659	
	Presença	,1321378	,0877850	,00227	,85984	,1640672	,288 <sup>#</sup>

DISERITROPOESE							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>TRAF6</i>	Ausência	,7349864	,1216500	,03589	5,44779	1,6026904	,534 <sup>#</sup>
	Presença	,4705671	,1434500	,02250	5,49682	,9223212	
<i>NFKB</i>	Ausência	,1210030	,1029700	,02608	,20950	,0556274	,521 <sup>†</sup>
	Presença	,1096660	,1052150	,00618	,22266	,0507130	
<i>MYD88</i>	Ausência	,7470391	,5740300	,17234	1,8136	,5540216	,414 <sup>#</sup>
	Presença	1,2999932	,7380200	,17491	18,91766	2,4328420	

†**T-test:** Valor estatisticamente significante para  $p \leq 0,05$ . #**Mann-Whitney:** Valor estatisticamente significante para  $p \leq 0,05$ .

DISGRANULOPOESE							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	Ausência	2,0182605	,6908800	,18637	19,46249	3,6483926	,690 <sup>#</sup>
	Presença	2,2892556	,9424700	,08877	19,39559	4,2996189	
<i>IRAK2</i>	Ausência	,0385534	,0358200	,00124	,09752	,0214888	,867 <sup>†</sup>
	Presença	,0394015	,0414700	,00536	,08452	,0200887	
<i>IRAK4</i>	Ausência	,1467466	,0980700	,00227	,79134	,1752568	,413 <sup>#</sup>
	Presença	,1084665	,0701250	,00486	,85984	,1450936	
<i>TRAF6</i>	Ausência	,5220159	,1325700	,03589	5,49682	1,1828039	,641 <sup>#</sup>
	Presença	,4910597	,1526500	,02250	4,20869	,8616897	
<i>NFKB</i>	Ausência	,1137969	,1113200	,00618	,22266	,0562047	,676 <sup>†</sup>
	Presença	,1086265	,1021500	,03525	,22048	,0459436	
<i>MYD88</i>	Ausência	1,2573888	,6121700	,17234	18,91766	2,9005696	,388 <sup>#</sup>
	Presença	1,1888210	,8164200	,20232	7,11924	1,3747451	

†**T-test:** Valor estatisticamente significante para  $p \leq 0,05$ . #**Mann-Whitney:** Valor estatisticamente significante para  $p \leq 0,05$ .

DISMEGACARIOPOESE							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	Ausência	,7902062	,7648700	,11247	1,51437	,4077080	,185 <sup>†</sup>
	Presença	,6651695	,5683200	,08877	1,44541	,3306950	
<i>IRAK2</i>	Ausência	,0421588	,0403700	,00124	,09752	,0225298	,335 <sup>†</sup>

DISMEGACARIOPOESE							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK4</i>	Presença	,0371081	,0351500	,00253	,08452	,0195427	,896 <sup>#</sup>
	Ausência	,1414959	,0980700	,00227	,79134	,1710845	
<i>TRAF6</i>	Presença	,1217628	,0751850	,00486	,85984	,1580487	,816 <sup>#</sup>
	Ausência	,8074248	,1434500	,02250	5,49682	1,5521010	
<i>NFKB</i>	Presença	,3168124	,1333200	,03589	1,61656	,3914363	,707 <sup>†</sup>
	Ausência	,1083556	,1017100	,02503	,22266	,0521094	
<i>MYD88</i>	Presença	,1131253	,1111000	,00618	,22048	,0511093	,132 <sup>#</sup>
	Ausência	1,5004306	,5387300	,17234	18,91766	3,4771048	
	Presença	1,049533	,8282100	,19488	5,41325	,9339318	

†T-test: Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . #Mann-Whitney: Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

SIDEROBLASTOS EM ANEL							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	Ausência	,7087142	,6727700	,08877	1,51437	,3644709	,842 <sup>†</sup>
	Presença	,7283300	,6076950	,11247	1,44931	,3652953	
<i>IRAK2</i>	Ausência	,0375118	,0358200	,00124	,08452	,0211112	,647 <sup>†</sup>
	Presença	,0401058	,0390400	,01328	,09752	,0205479	
<i>IRAK4</i>	Ausência	,1133989	,0723700	,00486	,85984	,1386560	,586 <sup>#</sup>
	Presença	,1579465	,0853400	,00227	,079134	,2046320	
<i>TRAF6</i>	Ausência	,5171683	,1328300	,02250	5,44779	,9928379	,753 <sup>#</sup>
	Presença	,4423430	,1526500	,05381	5,49682	1,1141732	
<i>NFKB</i>	Ausência	,1121202	,1070000	,00618	,22266	,0520826	,631 <sup>†</sup>
	Presença	,1056929	,0980400	,02503	,19816	,0495660	
<i>MYD88</i>	Ausência	1,0102644	,6604500	,10460	7,11924	1,0774497	,688 <sup>#</sup>
	Presença	1,6814591	,5597600	,20232	18,91766	3,9068104	

†T-test: Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . #Mann-Whitney: Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

PERCENTUAL DE BLASTOS (IPSS-R)							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	≤2%	,6794694	,5683200	,08877	1,51437	,3639968	<b>,038<sup>‡</sup></b>
	>2% - <5%	,7938744	,8628700	,26285	1,43851	,3755918	
	5% - 10%	,9682889	1,0018900	,55611	1,44541	,2576591	
	>10%	,4986240	,4995000	,18637	1,33034	,3414522	
<i>IRAK2</i>	≤2%	,0424061	,0396900	,01328	,09752	,0183830	<b>,006<sup>‡</sup></b>
	>2% - <5%	,0429340	,0438200	,01002	,07794	,0222335	
	5% - 10%	,0458591	,0414700	,01826	,08452	,0221605	
	>10%	,018744	,0177150	,00124	,05455	,0175657	
<i>IRAK4</i>	≤2%	,0661269	,0417150	,00227	,26834	,0645200	<b>,016<sup>‡</sup></b>
	>2% - <5%	,1347175	,1369500	,00656	,28571	,0914392	
	5% - 10%	,1131533	,1139000	,01075	,19961	,0566588	
	>10%	,1081090	,0872600	,00616	,30634	,0561266	
<i>TRAF6</i>	≤2%	,5370690	,1311700	,03589	5,49682	1,0280572	<b>,404<sup>#</sup></b>
	>2% - <5%	,1532967	,1274850	,02250	,32902	,0967020	
	5% - 10%	,4348569	,2647000	,07773	1,61656	,4375950	
	>10%	,7112694	,1231800	,03897	5,44779	1,5729291	
<i>NFKB</i>	≤2%	,0966809	,095504	,02503	,19895	,0464525	<b>,180<sup>‡</sup></b>
	>2% - <5%	,1305820	,1194800	,08885	,19157	,0385253	
	5% - 10%	,122564	,0944700	,00618	,22266	,0752503	
	>10%	,1180462	,1122150	,03845	,20950	,0456323	
<i>MYD88</i>	≤2%	,8232081	,5597600	,22136	1,56287	,56124170	<b>,043<sup>‡</sup></b>
	>2% - <5%	,7368740	,8047300	,20232	1,05839	,26257961	
	5% - 10%	1,0569100	,7847000	,19488	1,61384	,6997225	
	>10%	,393461	,2963400	,10460	,81642	,2281083	

**‡One-way Anova:** Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . **# Kruskal-Wallis:** Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

CARIÓTIPO (QUANTO A PRESENÇA DE ANORMALIDADES)							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	Normal	,8179303	,85086650	,08877	1,51437	,3867112	<b>,031<sup>‡</sup></b>
	Alterado	,6056452	,5519800	,18637	1,43851	,2954093	
<i>IRAK2</i>	Normal	,0414356	,0409200	,00536	,092752	,0216553	<b>,493<sup>‡</sup></b>
	Alterado	,0376104	,0349650	,00124	,08452	,0208278	

CARIÓTIPO (QUANTO A PRESENÇA DE ANORMALIDADES)							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK4</i>	Normal	,1286855	,0723700	,00459	,85984	,1799655	,752 <sup>#</sup>
	Alterado	,1156903	,0902300	,00747	,53592	,1112408	
<i>TRAF6</i>	Normal	,2872190	,1311700	,02250	2,15457	,4267388	,368 <sup>#</sup>
	Alterado	,5570814	,1283500	,03589	5,44779	1,2317431	
<i>NFKB</i>	Normal	,1087021	,1017100	,02503	,19895	,0401807	,841 <sup>†</sup>
	Alterado	,1058660	,1025900	,00618	,20950	,0606752	
<i>MYD88</i>	Normal	,8733398	,6121700	,10460	3,39223	,6787280	,655 <sup>#</sup>
	Alterado	,9297838	,5797800	,17491	5,41325	1,0401899	

†**T-test:** Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . #**Mann-Whitney:** Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

CARIÓTIPO (QUANTO A PRESENÇA DE CARIÓTIPO COMPLEXO)							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	Normal	2,0540737	,9759800	,08877	19,46249	3,7640352	,429 <sup>#</sup>
	Complexo	,9477200	,5114250	,37276	2,39573	,8112340	
<i>IRAK2</i>	Normal	,0399847	,0400300	,00124	,09752	,0221426	,522 <sup>†</sup>
	Complexo	,0333140	,0250100	,01856	,05365	,0166563	
<i>IRAK4</i>	Normal	,1422890	,0751850	,00459	,85984	,1981862	,434 <sup>#</sup>
	Complexo	,1910583	,1041550	,04537	,49055	,1944839	
<i>TRAF6</i>	Normal	,1040513	,1060300	,02250	,18044	,0443223	,657 <sup>†</sup>
	Complexo	,0922967	,1032900	,06271	,11089	,0259030	
<i>NFKB</i>	Normal	,1157165	,1052000	,02503	,22266	,0460127	,894 <sup>†</sup>
	Complexo	,1126500	,1025900	,03845	,20950	,0626076	
<i>MYD88</i>	Normal	,8733398	,5740300	,10460	1,92071	,6787280	<b>,005<sup>†</sup></b>
	Complexo	,4491050	,4057900	,20232	,85322	,2221780	

†**T-test:** Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . #**Mann-Whitney:** Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

RISCO – IPSS-R							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	Muito baixo	,4420400	,4420400	,40924	,47484	,0463862	,233 <sup>†</sup>
	Baixo	,7787078	,7739600	,08877	1,51437	,3908879	
	Intermediário	,6234467	,5561100	,21937	1,06721	,30919612	

RISCO – IPSS-R							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK2</i>	Alto	,9330089	,9110100	,35884	1,44541	,33790553	,081 <sup>†</sup>
	Muito alto	,6209975	,5114250	,18637	1,43851	,40901887	
	Muito baixo	,0585167	,0641800	,03592	,07545	,0203644	
	Baixo	,0460686	,0400300	,01966	,09752	,0199361	
	Intermediário	,0355620	,0356400	,01002	,06461	,0189943	
<i>IRAK4</i>	Alto	,0443400	,0422200	,01535	,08452	,0227156	,252 <sup>†</sup>
	Muito alto	,0278240	,0217850	,00124	,05455	,0194557	
	Muito baixo	,0493800	,0238300	,00930	,11501	,0572996	
	Baixo	,0904371	,0652200	,00459	,27198	,0805651	
	Intermediário	,0730236	,0638900	,00656	,17780	,0563600	
<i>TRAF6</i>	Alto	,1307110	,1335200	,06962	,19961	,0452989	,070 <sup>#</sup>
	Muito alto	,0824489	,0584400	,01075	,22213	,0613812	
	Muito baixo	,1064750	,1064750	,08012	,13283	,0372716	
	Baixo	,1105043	,1114100	,05091	,22091	,0490455	
	Intermediário	,1086730	,1049450	,02250	,17752	,062457	
<i>NFKB</i>	Alto	,1846510	,1619450	,07773	,33553	,0942190	,382 <sup>†</sup>
	Muito alto	,0925233	,0932450	,06271	,12318	,0236449	
	Muito baixo	,0970033	,0966300	,08738	,10700	,0098153	
	Baixo	,1180809	,1069550	,02503	,19895	,0480336	
	Intermediário	,0934420	,0785450	,02608	,22048	,0628450	
<i>MYD88</i>	Alto	,1368240	,1456350	,04772	,22266	,0565898	,142 <sup>#</sup>
	Muito alto	,1022910	,1030100	,00618	,20950	,0549701	
	Muito baixo	1,0517900	1,0879900	,57539	1,49199	,4593710	
	Baixo	,9320344	,7380200	,24028	3,39223	,7372826	
	Intermediário	,8732893	,5959750	,22136	1,61384	,5400877	
	Alto	1,2996200	,8005600	,19488	5,41325	1,4321646	
	Muito alto	,6133418	,3380700	,17491	2,01331	,6063987	

†One-way Anova: Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . # Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .



CLASSIFICAÇÃO WHO 2022							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor <sup>‡</sup>
<i>IRAK1</i>	SMD-Del5(q)	,4783800	,4783800	,42432	,53244	,0764523	,416 <sup>‡</sup>
	SMD-BB	,7327592	,7000100	,08877	1,51437	,3943487	
	SMD-BB-SA	,6889840	,5557050	,26667	1,44931	,3639773	
	SMD-EB	,6915771	,6559600	,18637	1,29289	,3463885	
	SMD-h	,7739700	,7914500	,58799	,94247	,1778853	
	SMD-f	1,4454100	-	-	-	-	
<i>IRAK2</i>	SMD-Del5(q)	,0414050	,0414050	,03478	,04803	,0093691	,690 <sup>‡</sup>
	SMD-BB	,0430568	,0395700	,01002	,07794	,0188699	
	SMD-BB-SA	,0414890	,0393650	,01328	,09752	,0228090	
	SMD-EB	,0325210	,0233150	,00124	,08452	,0245622	
	SMD-h	,0368833	,0430700	,01930	,04828	,0154488	
	SMD-f	,0414700	-	-	-	-	
<i>IRAK4</i>	SMD-Del5(q)	,0708200	,0708200	,04357	,09807	,0385373	,070 <sup>‡</sup>
	SMD-BB	,0927486	,0672850	,00486	,27198	,0802369	
	SMD-BB-SA	,0371922	,0367900	,00227	,08534	,0284826	
	SMD-EB	,1108605	,0994600	,01075	,22213	,0551202	
	SMD-h	,0432575	,0506700	,00656	,06513	,0275955	
	SMD-f	-	-	-	-	-	
<i>TRAF6</i>	SMD-Del5(q)	,1157800	,1157800	,07891	,15265	,0521420	,369 <sup>‡</sup>
	SMD-BB	,1144226	,1182700	,03589	,22091	,0512190	
	SMD-BB-SA	,0903057	,0824200	,05381	,12747	,0278066	
	SMD-EB	,1301350	,1257650	,03897	,26470	,0555846	
	SMD-h	,0852500	,0756700	,02250	,16716	,0602470	
	SMD-f	-	-	-	-	-	
<i>NFKB</i>	SMD-Del5(q)	,1207900	,1207900	,06862	,17296	,0737795	,416 <sup>‡</sup>
	SMD-BB	,1139866	,1070000	,02608	,19895	,0461003	
	SMD-BB-SA	,0817409	,0858500	,02503	,13831	,0393508	
	SMD-EB	,1256870	,1266550	,00618	,02226	,0557861	
	SMD-h	,0859267	,1017100	,04055	,11552	,0398993	
	SMD-f	-	-	-	-	-	
<i>MYD88</i>	SMD-Del5(q)	,4634250	,4634250	,38812	,53873	,1064973	,481 <sup>#</sup>
	SMD-BB	1,2315373	,8727700	,20232	7,11924	1,2880017	
	SMD-BB-SA	2,4295138	,5597600	,22136	18,91766	5,1447915	

CLASSIFICAÇÃO WHO 2022							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor <sup>‡</sup>
	SMD-EB	,8511148	,6282500	,17491	2,55227	,6631300	
	SMD-h	,7024575	,5103700	,38672	1,40237	,4708603	
	SMD-f	-	-	-	-	-	-

‡**One-way Anova:** Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . # **Kruskal-Wallis:** Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

SUBTIPO SMD-SA x SMD-EB							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	SMD-SA	,6889840	,5557050	,26667	1,44931	,3639773	,766 <sup>‡</sup>
	SMD-EB	,7334567	,6870850	,18637	1,44541	,3801280	
<i>IRAK2</i>	SMD-SA	,0352633	,0390400	,01328	,05298	,0122166	,730 <sup>‡</sup>
	SMD-EB	0,329471	,0233200	,00124	,08452	,0240198	
<i>IRAK4</i>	SMD-SA	,0371920	,0645100	,00227	,85984	,0284826	,000 <sup>‡</sup>
	SMD-EB	,1042240	,1086900	,01075	,30634	,0567727	
<i>TRAF6</i>	SMD-SA	,1053250	,0969150	,05381	,21046	,0496727	,440 <sup>‡</sup>
	SMD-EB	,1211640	,1231800	,03897	,18250	,0439397	
<i>NFKB</i>	SMD-SA	,0817409	,0858500	,02503	,13831	,0393508	,026 <sup>‡</sup>
	SMD-EB	,1368030	,1128900	,00618	,222666	,0733406	
<i>MYD88</i>	SMD-SA	,5332060	,4421500	,22136	1,00692	,2679543	,766 <sup>#</sup>
	SMD-EB	,7179436	,5924700	,17491	1,61384	,4900892	

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

DEPENDÊNCIA TRANSFUSIONAL							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
<i>IRAK1</i>	Não	,5735672	,4735750	,08877	1,29289	,3106066	,947 <sup>‡</sup>
	Sim	,6968930	,7232600	,11247	1,51437	,3534137	
<i>IRAK2</i>	Não	,0423895	,0359200	,01002	,08452	,0224441	,080 <sup>‡</sup>
	Sim	,0343409	,0359450	,00253	,06056	,01565211	
<i>IRAK4</i>	Não	,1550691	,0864800	,00227	,85984	,22218731	,846 <sup>#</sup>
	Sim	,0948776	,0675200	,01075	,21663	,0644015	

DEPENDÊNCIA TRANSFUSIONAL							
Gene	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	E.P.M	p Valor
TRAF6	Não	,1105875	,1000050	,04556	,21857	,0549301	,440 <sup>‡</sup>
	Sim	,1161275	,1205650	,03589	,22091	,0510530	
NFKB	Não	,1029330	,0986300	,02503	,19895	,0473665	,514 <sup>‡</sup>
	Sim	,1074014	,1016750	,00618	,22266	,0546872	
MYD88	Não	1,9953635	,8282100	,27685	18,91766	3,9646452	,350 <sup>#</sup>
	Sim	,8840509	,7380200	,19921	2,85366	,6515953	

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

		IRAK1	IRAK2	IRAK4	TRAF6	NFKB	MYD88
<b>IRAK1</b>	Correlação de Pearson	1	,475**	,095	,155	,032	,233
	Sig. (2 extremidades)		,000	,494	,267	,814	,075
	N	59	57	54	53	55	59
<b>IRAK2</b>	Correlação de Pearson	,475**	1	-,060	,050	,161	,402**
	Sig. (2 extremidades)	,000		,655	,720	,217	,001
	N	57	64	58	53	61	63
<b>IRAK4</b>	Correlação de Pearson	,095	-,060	1	,481**	,537**	,035
	Sig. (2 extremidades)	,494	,655		,000	,000	,786
	N	54	58	68	59	60	64
<b>TRAF6</b>	Correlação de Pearson	,155	,050	,481**	1	,184	,352**
	Sig. (2 extremidades)	,267	,720	,000		,188	,007
	N	53	53	59	60	53	57
<b>NFKB</b>	Correlação de Pearson	,032	,161	,537**	,184	1	,227
	Sig. (2 extremidades)	,814	,217	,000	,188		,077
	N	55	61	60	53	66	62
<b>MYD88</b>	Correlação de Pearson	,233	,402**	,035	,352**	,227	1
	Sig. (2 extremidades)	,075	,001	,786	,007	,077	
	N	59	63	64	57	62	69

## ANEXOS

### ANEXO 1



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**PROJETO: Avaliação da expressão gênica de NF- $\kappa$ B, TRAF6 e genes do Mitossomo (MyD88, IRAK1, IRAK2 e IRAK4) e sua relação com alterações citogenéticas em pacientes com neoplasias mieloides.**

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 Andréa Alcântara Vieira, aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFC. O abaixo assinado está ciente de que:

**NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO**

O objetivo da pesquisa é estudar o material genético de pacientes portadores de Neoplasia Mielodisplásica (SMD) ou Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e de voluntários saudáveis, gerando dados que favoreçam a uma melhor compreensão do surgimento e evolução clínica desta doença.

**PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES**

Aspiração de medula óssea para coleta de 4mL será realizada por médico capacitado, com uso de uma agulha específica e mediante administração de anestésico local, com duração máxima de 15 minutos, não sendo necessária internação do paciente. A aspiração pode ser feita no esterno ou em crista ilíaca posterior direita, de acordo com decisão do médico que realiza a punção e das condições clínicas e anatômicas do paciente. O procedimento de coleta, pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxeada) ao redor do local de onde foi

retirado a medula, 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 de fácil compressão local realizada por técnico. Raramente, pode ocorrer infecção local. A coleta deste material pode ser necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise. A convocação para coleta é feita poucos dias após a coleta inicial, depois de avaliada a adequação do material. O procedimento para aspiração é idêntico ao da coleta inicial, e a escolha do local a ser puncionado segue os mesmos critérios, podendo inclusive ser realizada no mesmo local.

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) do sangue periférico, bem como outros exames que são feitos mesmo para os pacientes que não participam de nenhuma pesquisa.

Após a concordância de participação neste estudo, a equipe de pesquisa ficará responsável por informar os procedimentos de rotina do serviço e agendar datas e horários para o seu comparecimento.

## **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA**

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) é aplicável a sua participação voluntária como paciente com diagnóstico de Neoplasia Mielodisplásica (SMD) ou Leucemia Mieloide Aguda (LMA) ou a sua participação como voluntário saudável.

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

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo, do não cumprimento das normas estabelecidas, de qualquer outro motivo que, a critério da pesquisadora, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes e, por fim, da suspensão do estudo como um todo.

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

## **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: **Dra. Andréa Alcântara Vieira, aluna de mestrado (85-988872001) ou seu orientador, Prof Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (8581881972)**. Poderá ainda 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 33668344, 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

Caso você concorde em participar deste estudo, você receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinada pelo pesquisador e pelo responsável pela aplicação do mesmo.

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

