MARIANA OZELLO BARATTI

# VERIFICAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS CD34<sup>+</sup> E ESTROMAIS DE PACIENTES COM SÍNDROME MIELODIPLÁSICA



### **OZELLO BARATTI**

# VERIFICAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS CD34<sup>+</sup> E ESTROMAIS DE PACIENTES COM SÍNDROME MIELODIPLÁSICA

Tese de doutorado apresentada à Pósgraduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de doutor em Fisiopatologia Médica, Área de Concentração Medicina Experimental. Sob orientação da Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

CAMPINAS 2011

## FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652

# BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

### UNICAMP

B213v	Baratti, Mariana Ozello, 1980 - Verificação do perfil de expressão gênica de células cd34+ e estromais de pacientes com síndrome mielodiplásica. / Mariana Ozello Baratti Campinas, SP : [s.n.], 2011.
	Orientador : Sara Teresinha Olalla Saad Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
	<ol> <li>Síndromes mielodisplásicas. 2. Análise em microsséries. 3. Células estromais. 4. Células tronco.</li> <li>I. Saad, Sara Teresinha Olalla. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</li> </ol>

#### Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Gene expression profiles of CD34+ and stromal cells from patients with

myelodysplastic syndrome

#### Palavra-chave em inglês:

Myelodysplastic syndromes

Microarray analysis

Stromal cells

Stem cells

Área de concentração: Medicina experimental

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica

#### Banca examinadora:

Sara Teresinha Olalla Saad [Orientador]

Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille

François Marie Artiguenave

Letícia Frohlich Archângelo

Rodrigo do Tocantis Calado de Saloma Rodrigues

**Data da defesa:** 29-07-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

# Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a) : Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Olalla Saad

Membros:			
1.	Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Olalla Saad	the of	
2.	Prof(a). Dr(a). Maria de Lourdes Lopes Ferrar	i Chauffaille	
3.	Prof(a). Dr(a). François Marie Artiguenave	HA	
4.	Prof(a). Dr(a). Letícia Frohlich Archângelo	fri	
5.	Prof(a). Dr(a). Rodrigo do Tocantins Calado E	De Saloma Rodrigues	

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/07/2011

## DEDICATÓRIA

DEDICO ESTE TRABALHO A TODOS QUE SEMPRE ME APOIARAM, PRINCIPALMENTE AOS MEUS PAIS, LUSIA E OTÁVIO E MEU MARIDO GUSTAVO, QUE SEMPRE ESTIVERAM AO MEU LADO E ME DERAM INCENTIVO PARA CONTINUAR.

### AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Otávio e Lusia, pela grande lição de vida, por me ensinarem a importância dos estudos, os conselhos, as ajudas em todas as horas e principalmente pelo amor e carinho de todos os dias.

Ao meu marido Gustavo, por sua enorme compreensão, paciência, cuidados, além do companheirismo e amor que me fortalece sempre.

Minha irmã Luciana e cunhado Wander, por sempre me incentivarem nos estudos, me acolherem em sua casa durante toda minha permanência em Campinas e grande amizade.

Minha irmã Camila e cunhado Euclides, por sempre estarem ao meu lado, me ajudando nas horas difíceis.

Meu irmão Rodrigo, cunhada Karina e lindos sobrinhos Joaquim, Bernardo e Lorenzo, por torcerem por mim e tornarem minha vida mais completa e feliz.

Ao Luiz, Helena, Murilo e Luiz Henrique, por me acolherem em sua família, cuidarem sempre de mim e compreenderem minhas ausências nos inúmeros churrascos da família.

A Profa Dra. Sara T. Olalla-Saad por sua grande orientação e apoio para a realização deste trabalho e principalmente por ter me aceitado em seu laboratório desde a minha iniciação científica e permitir iniciar minha carreira com ensinamentos essenciais, que levarei por toda vida.

A Tereza Sales por ter me aguentado todos esses anos, seus cuidados, grande amizade, ensinamentos, paciência, dedicação e conselhos que foram fundamentais para a minha formação acadêmica e pessoal.

ix

Х

A Carina Malaguti minha irmã escolhida, pelas grandes discussões científicas e pessoais, sem dúvida amiga para todos os momentos.

A Raquel Foglio pela persistência de procurar e fazer prestar o curso, sem sua ajuda seria impossível, além dos inúmeros auxílios, grande amizade e companhia.

A Carol e Luciene minhas grandes amigas, pelas alegrias, risadas, tristezas, frustrações e bancadas compartilhadas, com vocês aprendi muito e hoje mesmo distante continuam sendo companheiras para todas as horas.

A Laure por me dar à honra ser dinda da Elis e mesmo sendo amiga há poucos anos, temos uma amizade de gerações.

A Karla Ferro pela amizade e enorme ajuda no final do segundo tempo.

Ao Yuri Moreira, meu colaborador, pela ajuda e paciência com os experimentos de microarranjo.

Aos amigos do laboratório, Letícia, Rita, Patrícia Rodrigues, Mariana, Karin, Juliana, João, Pedro, Vitor, Tiago, Bruna, Matheus, Anamika, Patrícia Favaro e Daniella por dividirem as frustrações e as alegrias de todos os dias.

A Fabíola Traina pela dedicação de selecionar os pacientes, coletar amostras e auxilio nas inúmeras dúvidas sobre a doença.

A Ana Leda e Irene por me ajudarem com os ensaios de citometria de fluxo, mesmo na minha correria e impresvistos estavam sempre dispostas.

A Ana Carolina Silva Costa, que mesmo nos momentos conturbados da vida, me recebeu e acolheu em sua casa em São Paulo. A minha prima de coração, Larissa Pezzoto, por me acolher em sua casa durante semanas para eu conseguir finalizar meus experimentos de microarranjo.

Ao Prof. Sérgio Verjovski, colaborador deste trabalho, por me acolher em seu laboratório de Bioquímica na USP e disponibilizar seu aluno para me ajudar neste trabalho.

Aos Professores Hernandes F. Carvalho e Carlos Lenz Cesar, por compreenderem minhas ausências e permitirem que eu terminasse este trabalho.

Ao Prof. Dr. José Vassalo e Paulo Latufo, por auxiliar nos experimentos e análises de imuno-histoquímica.

A Dra. Letícia pelas críticas feitas à minha qualificação, que me ajudaram a melhorar este trabalho e por aceitar novamente a fazer parte da banca examinadora da minha defesa.

Aos membros da banca examinadora da minha defesa, por aceitarem fazer parte desta grande etapa da minha vida.

A todos os funcionários do laboratório, Simone, Lena, Adriana, Patrícia e Luis, pela grande disposição e atenção prestada em todos os momentos que precisei.

As agências de fomento FAPESP, CNPQ pela bolsa e auxílio.

### RESUMO

As síndromes mielodisplásicas (SMDs) constituem um grupo heterogêneo de desordens hematopoéticas, caracterizadas por exibirem hematopoese ineficaz com evidências de displasia da medula óssea resultando em citopenias no sangue periférico. Tecnologia de microarranjo tem permitido o refinado mapeamento da atividade transcricional do genoma humano. RNAs não codificadores (ncRNAs) transcritos de regiões intrônicas de genes conhecidos estão envolvidos em vários processos relacionados com controle transcricional e pós-transcricional da expressão gênica, interações com cromatinas, modificação de histonas e também estão se tornando evidentes em vários tipos de cânceres. Caracterização de ncRNAs em células progenitoras e células estromais de pacientes com SMD representa uma estratégia aparentemente importante para o entendimento da regulação gênica nesta doença. Neste estudo, o perfil de expressão gênica de células CD34<sup>+</sup> e estromais de pacientes com SMD do subgrupo anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA) foi comparado com o de indivíduos saudáveis, usando oligoarranjos de 44 kilobases contendo íntrons e éxons, o qual incluiu sequências para genes codificadores, RNAs sense e antisense totalmente e parcialmente intrônicos. Em células CD34<sup>+</sup> de pacientes com SMD-ARSA, 216 genes foram diferencialmente expressos (q-value  $\leq 0.01$ ) em comparação com indivíduos saudáveis, dos quais 65 (30%) eram transcritos não codificadores. O gene DMT1, um transportador de ferro, foi encontrado hiperexpresso em células CD34<sup>+</sup> de SMD-ARSA. Em medula óssea total de 34 pacientes, a expressão foi mais evidente no subgrupo de pacientes com SMD de baixo risco/INT-1. Ensaios de imuno-histoquímica corroboram os dados encontrados na análise de expressão gênica e demonstram que DMT1 se encontra mais expresso nas células eritroblásticas. A hiperexpressão de DMT1 pode estar relacionada com o homeostase do ferro anormal nas SMDs. Em células estromais de SMD-ARSA, 12 genes foram diferencialmente expressos  $(q-value \le 0.05)$  em comparação com indivíduos saudáveis, dos quais 3 (25%) eram transcritos não codificadores. O gene SEMA3A, um membro secretado da família das semaforinas, foi encontrado hiperexpresso em células estromais de SMD-ARSA e na medula óssea total de 34 pacientes; sua hiperexpressão foi mais evidente em pacientes com

SMD de alto risco/INT-2 e em pacientes com leucemia mieloide aguda (n=19). Ensaios funcionais demonstraram que

*SEMA3A* está envolvido com aumento da adesão, diminuição da diferenciação e apoptose de células leucêmicas cocultivadas com células estromais HS27 hiperexpressando *SEMA3A* e age de maneira parácrina sobre as células precursoras. Pela primeira vez, o perfil diferencial de ncRNA em células CD34<sup>+</sup> e células estromais entre SMD-ARSA e indivíduos saudáveis foi demonstrado, sugerindo que ncRNA pode ter um importante papel durante o desenvolvimento das síndromes mielodisplásicas.

### ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a group heterogeneous of hematological disorders characterized by ineffective hematopoiesis with morphological evidence of marrow cell dysplasia resulting in peripheral blood cytopenia. Microarray technology has permitted a refined high-throughput mapping of the transcriptional activity in the human genome. Noncoding-RNAs (ncRNAs) transcribed from intronic regions of genes are involved in a number of processes related to post-transcriptional control of gene expression, and chromatins interaction, and histone modification and they are becoming evident in several cancers. Characterization of ncRNAs in progenitor cells and stromal cells of MDS patients could be strategic for understanding gene expression regulation in this disease. In this study, gene expression profiles of CD34<sup>+</sup> and stromal cells of MDS patients with refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS) subgroup were compared those of healthy individuals, using 44 kilobases combined introns and exons oligoarrays, which included probes for protein-coding genes, for sense and antisense strands of totally and partially intronic noncoding RNAs. In CD34<sup>+</sup> cells of MDS-RARS patients, 216 genes were significantly differentially expressed (q-value  $\leq 0.01$ ) in comparison to healthy individuals, of which 65 (30%) were noncoding transcripts. The DMT1 gene, an iron-transporter, was found up-regulated in CD34+ cells of MDS-RARS. In the total bone marrow of 34 patients, the expression of DMT1 was more evident in the subgroup of low risk/INT-1 MDS patients. The immunohistochemistry assay confirms the data obtained in the gene expression assay and show that DMT1 is more expressed in erythroid cells. The higher expression of *DMT1* can be related with abnormal iron homeostasis in MDS. In stromal cells of MDS-RARS, 12 genes were significantly differentially expressed (q-value  $\leq 0.05$ ) in comparison to healthy individuals, of which 3 (25%) were noncoding transcripts. The SEMA3A gene, a secreted member of the semaphorins family, was found up-regulated in stromal cells of MDS-RARS and in the total bone marrow of 34 patients; further, the higher expression was more evident in high risk/ INT-2 subgroup of MDS patients and acute myeloid leukemia patients (n = 19). Functional assays demonstrated that SEMA3A is related to adhesion increase, differentiation decrease, and apoptosis of leukemia cells cocultivated with HS27 stromal cells higher expressing SEMA3A, also acting in a paracrine

fashion in the precursors cells. These results demonstrated, for the first time, in CD34<sup>+</sup> cells and stromal cells the differential ncRNA expression profile between MDS-RARS and healthy individuals, suggesting that ncRNAs may play an important role during the development of myelodysplastic syndromes.

### LISTA DE ABREVIATURAS

ABCB7 – *ATP binding cassette, sub-family B, member 7* 

AR – anemia refratária

- AREB anemia refratária com excesso de blasto
- AREB-T anemia refratária com excesso de blasto em transformação
- ARSA anemia refratária com sideroblasto em anel

ATRA – ácido trans-retinoico

COX11 – cytochrome c oxidase assembly homolog (yeast)

CRDM - citopenia refratária com displasia multilinear

CRDU – citopenia refratária com displasia unilinear

cRNA – RNA complementar

Cy3 – Cyanina 3

Cy5 – Cyanina 5

DMT1 – divalent metal transporter 1

ELN – European Leukemia-Net

ENCODE – Encyclopedia of DNA Elements

ESTs – *Expressed Sequence Tags* 

FAB – French-American-British

FACS – Fluorescence-Actived Cell Sorting

FDR – false discovery rate

FLT3 – *fms-related tyrosine kinase 3* 

GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GCDH – glutaryl-CoA dehydrogenase

GENCODE – Integrated annotation of existing cDNA and protein resources to define

transcripts with both manual review and experimental testing procedures

GEO – Gene Expression Omnibus

HCK – hematopoietic cell kinase

HLA-E – major histocompatibility complex, class I, E

HPRT1 – hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

HS – *horse serum* 

- INT-1 intermediário-1
- INT-2 intermediário-2
- IPA programa Ingenuity Pathways Analysis
- IPSS International Prognostic Scoring System
- IRE *iron-responsive element*
- LMA Leucemia Mieloide Aguda
- MILE Microarray Innovations in Leukemia
- miRNA microRNA
- MYO5C myosin VC
- NCBI National Center for Biotechnology Information
- ncRNA RNA não codificador de proteína
- NR4A1 nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
- NR4A2 nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2
- NR4A3 nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
- OMIM Online Mendelian Inheritance in Man
- PBS phosphate buffered saline
- PIN partially intronic noncoding
- PPIF peptidylprolyl isomerase F
- qPCR PCR em tempo real
- RIN *RNA integrity number*
- SAM Significance Analysis of Microarray
- SEMA3A sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A
  - SFB bovine fetal serum
  - SMD Síndrome Mielodisplásica
  - SMD-N Síndrome Mielodisplásica não classificada
  - SMD-t Síndrome Mielodisplásica associada à terapia
  - snRNA small nuclear RNA
  - SPINT2 serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2
  - TIN totally intronic noncoding
  - TBCD tubulin folding cofactor D

WB – Western Blot WHO – World Health Organization

WPSS – WHO Prognostic Scoring System

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos pacientes SMD-ARSA na hora da coleta da medula		
óssea		
Tabela 2: Características dos pacientes na hora da coleta da medula óssea		
Tabela 3: Sequências de iniciadores utilizados nos ensaios de qPCR		
Tabela 4: Transcritos com expressão alterada em células CD34 <sup>+</sup> de SMD-ARSA87		
Tabela 5: Processos biológicos dos genes diferencialmente expressos em células		
CD34 <sup>+</sup> de pacientes SMD-ARSA		
Tabela 6: Redes gênicas de transcritos codificadores de proteína diferencialmente		
expressos em células CD34 <sup>+</sup> de SMD-ARSA, obtidos na análise de IPA		
Tabela 7: Transcritos com expressão alterada em células estromais de SMD-ARSA.		
Tabela 8: Processos biológicos dos genes diferencialmente expressos em células		
estromais de pacientes SMD-ARSA		
Tabela 9: Rede gênica dos transcritos codificadores diferencialmente expressos em		
células estromais de SMD-ARSA, obtidos na análise de IPA		

### LISTA DE FIGURAS

Figura 5: Cultura das células estromais de medula óssea. (A) Aparência das células aderentes usando microscópio invertido, nos primeiros dias após incubação com 10% de confluência (aumento 40x), com duas semanas atingindo confluência > 50% (aumento 10x), na terceira a quarta semana, ao atingem confluência maior que 90% (aumento 10x) as células foram tripsinizadas e utilizadas após a quarta passagem. (B) Utilizamos citometria de fluxo para demonstrar a ausência de células não-estromais, o resultado foi considerado satisfatório sendo encontrado apenas 5% de células precursoras hematopoiéticas (marcadas com anticorpo anti-CD34/PE-Cy5.5); 1,8% de células hematopoiéticas (marcadas com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorp

Figura 7: Normalização das amostras RNAs de células CD34<sup>+</sup>. (A) Intensidade de fluorescência pela freqüência de pontos (sondas) de cada amostra em duplo canal (Cy3

Figura 10: Rede de genes codificadores de proteínas com expressão alterada em células CD34<sup>+</sup> (p < 0,001). As principais funções dos genes desta rede estão relacionadas com desenvolvimento e função do sistema hematológico, resposta humoral e morfologia do tecido. A intensidade das cores dos genes indica o grau de hiperexpressão (vermelho) ou hipoexpressão (verde) em células CD34<sup>+</sup> de pacientes SMD-ARSA em comparação com indivíduos normais. Genes em cinza não foram identificados diferencialmente expressos em nossos experimentos e em branco não estão presentes em nossa plataforma de microarranjo: ambos foram integrados computacionalmente pela rede gerada com base em evidências armazenadas no banco de dados do IPA, indicando relevância para esta rede. 108

Figura 12: Expressão gênica de *DMT1* em células de medula óssea total de pacientes com SMD e LMA. O gráfico de dispersão mostra que *DMT1* foi significantemente maior (p < 0,05) em pacientes com SMD (24/34) em relação aos indivíduos saudáveis e também

Figura 17: Transcritos diferencialmente expressos em células estromais de pacientes SMD-ARSA e indivíduos saudáveis. Os pacientes foram agrupados de acordo com a
Figura 21: Expressão gênica de *SEMA3A* nos subgrupos de SMD. (A) Expressão de *SEMA3A* foi maior em todos os subgrupos: AR (10/16), ARSA (4/6), AREB (6/7, p < 0,05) e AREB-T (5/5, p < 0,05), de acordo com a classificação FAB, em relação a indivíduos saudáveis (CTRL). (B) Na classificação IPSS a expressão de *SEMA3A* foi significantemente maior em ambos ossubgrupos (p < 0,05), baixo risco/INT-1 (21/28) e alto risco/INT-2 (6/6), em relação a indivíduos saudáveis (CTRL). (C) Na classificação

WHO2008, todos os subgrupos apresentaram expressão de *SEMA3A* aumentada: CRDU (1/3), CRDM (9/12), ARSA (4/6), AREB I (6/7) e AREB II (6/6 p < 0,05), em relação aos indivíduos saudáveis (CTRL). 125

Figura 25: Diferenciação de células K562 e NB4 em cocultura com HS27. A hiperexpressão de SEMA3A em células HS27 colocadas em cocultura com células leucêmicas mieloides K562 e NB4 (A e B, respectivamente) diminuiu a presença dos antígenos de diferenciação, tanto de diferenciação para monócito (CD11c), quanto de diferenciação para macrófago (CD14).

Figura 26: Taxa de apoptose em hiperexpressão de SEMA3A. (A) Células HS27 hiperexpressando SEMA3A: células NB4 e U937 foram tratadas previamente com ATRA por 24 horas, e cocultivadas com células HS27 transfectadas com Sema3aFlag, para hiperexpressar SEMA3A e o vetor vazio NSPI como controle. Houve pequena diminuição

Figura 27: A aquisição do ferro na célula precursora hematopoética saudável (A) e na célula precursora de SMD (B). (A) Na situação normal: A transferrina com duas moléculas de ferro férrico (Fe<sup>3+</sup>) se liga ao receptor de transferrinana membrana celular e este complexo induz o endossomo. O pH do endossomo diminui com a presença da bomba de próton e faz o complexo liberar o  $Fe^{3+}$ , o qual é reduzido para  $Fe^{2+}$  pela ferroredutase Steap3 (seis-transmembrana epitelial antígeno de próstata) e saem do endossomo via transportador DMT1. No citosol o  $Fe^{2+}$  livre pode ser direcionado para o núcleo, para a mitocôndria, onde participada cadeia respiratória e da biosíntese do heme, para regular proteínas regulatórias-ferro (IRP1 e IRP2), ou para ser armazenado na ferritina, onde será estocado e reutilizado. O endossomo com o complexo (transferrina + receptor de transferrina) e DMT1 são redirecionados para membrana e o pH neutro libera a transferrina do receptor [104]. O DMT1 também importa diretamente o NTBI (ferro não ligado à transferrina) para dentro da célula [96]. (B) Defeitos putativos causados na célula hematopoética de SMD devido ao aumento de DMT1: com o aumento da hipóxia e do ferro livre aumenta DMT1 na membrana da célula, aumentando o transporte do ferro livre e a endocitose do ferro férrico. O aumento do ferro contribui para a geração de ROS (espécies reativas de oxigênio) na mitocôndria, causando hematopoese deficiente e efeitos genotóxicos ao DNA nuclear e mitocondrial causando danos no reparo do DNA e mutações [101]. Além disto, na mitocôndria, o aumento de ROS causa peroxidação lipídica e abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, diminuindo o potencial de membrana, podendo levar à liberação do citocromo c, ativando caspases e consequentemente aumento 

DEDICATÓRIA	VII
AGRADECIMENTOS	IX
RESUMO	XV
ABSTRACT	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS	XXIII
LISTA DE TABELAS	XXIX
LISTA DE FIGURAS	XXXI
SUMÁRIO	XLIII
INTRODUÇÃO	49
OBJETIVO	57
1. Objetivos específicos	
MATERIAL E MÉTODOS	61
1. Pacientes	61
2. Separação das células CD34 <sup>+</sup> e das células estromais	
3. Citometria de Fluxo (FACS)	67
4. Extração do RNA	67
5. Experimento de Microarranjo	
6. Análise dos dados	69
7. Agrupamentos hierárquicos dos transcritos válidos	70
8. Análise funcional <i>in silico</i> dos genes diferencialmente expressos	70
9. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)	71
10. Análise Estatística da Expressão Relativa	74
11. Extração de Proteína	74
12. Western Blot	74
13. Imuno-histoquímica	75
14. Linhagens Celulares	76
15. Transfecção transitória de DNA plasmidial	76
16. Ensaio de Adesão	77
17. Ensaio de Diferenciação	

18. Ensaio de Apoptose
RESULTADOS
1. Caracterização das células CD34 <sup>+</sup> e estromais de medula óssea
2. Perfil de expressão dos transcritos codificadores e não codificadores de proteína
em células CD34 <sup>+</sup> de SMD-ARSA
3. Expressão gênica e protéica do transcrito candidato SLC11A2 em medula óssea
total de pacientes com SMD
4. Perfil de expressão dos transcritos codificadores e não codificadores em células
estromais 114
5. Expressão gênica e protéica do transcrito candidato SEMA3A em células
estromais e de medula óssea total de pacientes com SMD122
6. Ensaios funcionais do gene selecionado SEMA3A
DISCUSSÃO
CONCLUSÃO
REFERÊNCIAS145
ANEXO I
ANEXO II

# Introdução

# INTRODUÇÃO

Síndromes Mielodisplásicas constituem um grupo heterogêneo de desordens hematopoéticas clonais, que exibem hematopoese ineficaz. A expansão do clone anômalo é um fenômeno medular caracterizado por displasia morfológica e diferenciação deficiente, resultando em células não funcionais. As consequências desta hematopoese deficiente no sangue periférico são citopenias, que podem vir a envolver os três segmentos do sangue: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A anemia e seus sintomas relacionados são as manifestações clínicas mais comuns da maioria das SMDs [1,2]

A exata causa das SMDs é desconhecida e provavelmente multifatorial. Estudos epidemiológicos sugerem que a taxa de incidência aumente com o a idade, e também podem estar associadasa alguns fatores como tabagismo, radiação ionizantes, sexo masculino, parentes de primeiro grau afetado por doença hematológica e exposição a produtos químicos como solventes orgânicos, benzeno, pesticidas e fungicidas. Há também SMDs associadas à terapia (SMD-t), que está relacionada à exposição a drogas citotóxicas, em particular agentes alquilantes, inibidores de topoisomerase II e radiação terapêutica. As SMD-t afetam 15% dos pacientes com linfoma que receberam quimioterapias agressivas [3,4].

As SMDs estão entre as 5 causas de anemia em idosos, tendo como mediana da idade, no diagnóstico, a faixa que vai de 60 a 75 anos. Na Europa ocorrem de 3,5 a 12,6 casos/100.000/ano, aumentando para 15-50/100.000/ano em pessoas com mais de 70 anos [4]. Estudos de retrospectiva do banco de dados nacional Medicare SAF nos Estados Unidos revisaram dados clínicos de 97% dos pacientes acima de 65 anos e calcularam uma incidência de 162 casos de SMD/100.000 durante o ano de 2003 e apenas 4% haviam sido diagnosticados em consultórios médicos [5]. Cerca de um terço dos pacientes com SMDs evoluem para leucemia mieloide aguda (LMA). As SMDs com maior percentual de blastos são de pior prognóstico e possuem maior chance de evolução para LMA, com sobrevida de 6 meses após a apresentação da citopenia [4].

Subtipos morfológicos de SMD baseado predominantemente na proporção de blastos na medula têm classificado pacientes dentro de subgrupos e na presença ou ausência de sideroblasto em anel. A classificação Franco-Americano-Britânica (FAB) requeria no mínimo displasia bilinear e considerava progressão para LMA quando havia mais de 30% de blastos na medula, esta classificação distinguiu 5 subcategorias: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-T) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) [6]. O novo critério definido pela Organização Mundial da Saúde (WHO) em 2008 também está baseado na porcentagem de blastos presentes na medula óssea e no sangue periférico, porém considera LMA quando há mais de 20% de blastos na medula, além do tipo e grau da displasia, a presença de sideroblasto em anel e a presença de anormalidades citogenéticas. A classificação WHO 2008, distinguiu 7 subtipos de SMDs: citopenia refratária com displasia unilinear (CRDU), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), citopenia refratária com displasia multilinear (CRDM), anemia refratária com excesso de blastos (AREB I e AREB II), SMD-não classificada (SMD-N) e SMD associada com del(5q) isolada [7,8].

Outra importante característica clínica que tem implicações terapêuticas e prognósticas, é a citogenética da medula, verifica-se anormalidades cromossômicas clonais em alguns pacientes, incluindo monossomia 5 e 7, deleções 5q e 7q, trissomia 8 e deleções de 20q [8]. O Sistema de Índice de Prognóstico Internacional (IPSS) combina blastos na medula, citogenéticas específicas e número de citopenias para ajudar na determinação dos caminhos clínicos dos pacientes e acima de tudo a sobrevida e potencial progressão para LMA [9,10]. O IPSS tem 4 subgrupos: pacientes baixo risco ou Intermediário – 1 e alto risco ou Intermediário – 2. Recentes análises de um amplo grupo de pacientes com SMD refinou a citogenética dos subgrupos IPSS. O WHO WPSS tem acrescentado a este sistemaa dependência de transfusão de hemácias, que tem um fator negativo para os pacientes de baixo risco [8,11].

As SMDs de baixo risco são caracterizadas por anemia e dependência transfusional. A SMD-ARSA é um subtipo de baixo risco na qual ocorre acúmulo de ferro na mitoferritina mitocondrial (MtF) e a mitocôndria se encontra organizada perinuclearmente, formando um anel ao redor do núcleo do eritroblasto [9,12,13]. Entretanto as bases moleculares das SMD-ARSA ainda são desconhecidas.

Há uma década o perfil de expressão gênica foi com sucesso introduzido nas pesquisas hematológicas [14]. Novas relevâncias clínicas dos subgrupos de pacientes foram

identificadas com distintas características e as classificações foram desenvolvidas, as quais são capazes de predizer prognósticos ou mesmo a participação de componentes específicos, como por exemplo, a predição da responsividade para lenalidomida em casos de SMD sem del (5q) [15].

O grupo de estudo internacional MILE (Microarray Innovations in Leukemia) formou o grupo de trabalho de perfil de expressão gênica ELN (European Leukemia-Net, www.leukemia-net.org), que reuniu 11 laboratórios em 3 continentes e analisaram 3.334 pacientes, formando 17 classes representando subclasses de leucemias agudas e crônicas, como também as SMDs e concluíram que a tecnologia de microarranjo pode classificar e diagnosticar a leucemia, de forma confiável e com sofisticados dados algorítmicos, além de analisar a expressão de múltiplos genes em paralelo [16]. A partir do banco de dados gerado pelo MILE, um novo modelo de classificação de prognóstico para SMD foi validado, o qual prediz a probabilidade em meses de transformação para LMA: grupo A, menos de 18 meses, grupo B de 18 a 36 meses e grupo C mais de 36 meses [17]. Hoje está claro que a tecnologia de microarranjo tem um ótimo potencial para melhorar o diagnóstico nas doenças hematológicas, podendo definir novos alvos terapêuticos e proporcionar maior seleção diferencial de estratégias terapêuticas [18].

O perfil de expressão das células progenitoras hematopoéticas dos pacientes com SMD identificou genes relacionados com diferenciação, proliferação celular, transcrição, metabolismo, citoesqueleto e sinalização/transporte [19-23]. Investigação do perfil de expressão das células precursoras CD34+ de pacientes SMDs observou que o aumento da expressão de genes que codificam subunidades proteossômicas estão relacionados à menor sobrevida dos pacientes [24]. Pellagatti e colaboradores [25] demonstraram que a expressão do fator de ligação linfóide 1 (LEF1) foi significativamente menor em pacientes com SMD de alto risco e sugerem que LEF1 pode estar envolvido na maturação prejudicada dos progenitores hematopoéticos em pacientes com SMDs.

Há evidências que em certas doenças hematológicas, o microambiente medular é anormal, tanto em composição quanto em função [26]. Em SMD, a camada aderente de estroma da medula óssea é ineficaz no suporte da mielopoese normal in vitro, apresentando manutenção prejudicada das células-tronco hematopoéticas [27]. Alterações nos componentes do estroma, a relativa deficiência dos fatores de crescimento hematopoéticos e a aberrante liberação de inibidores, podem ser implicadas na modificação do desenvolvimento e apoptose das células hematopoéticas das SMDs [28-30].

Estudos sobre a expressão gênica do estroma medular evidenciam a importância deste microambiente em doenças hematológicas. O perfil de expressão gênica de células estromais da medula óssea em mielodisplasia infantil apresentou progressiva diminuição no nível de expressão de genes associados principalmente com processos biológicos que podem alterar a capacidade das células estromais em manter a diferenciação das células hematopoéticas [31] e demonstrou hiperexpressão do fator-2 especifico de osteoblasto (OSF-2), que é conhecido por sustentar preferencialmente as células precursoras imaturas do sangue, mantendo sua proliferação e retardando a sua diferenciação, resultando na hipercelularidade da medula óssea e citopenia periférica [32].

O interesse na investigação de genes diferencialmente expressos em células estromais de medula óssea tem crescido Zeng e colaboradores [33] trataram células estromais com a citocina interferon gama (IFNG) e verificaram, através de microarranjo de cDNA, a diminuição da expressão do número de genes e hiperexpressão de genes induzidos pelo IFNG como ASP4, VCAM1, CXCL10, CCL5 e OASL.

Além das alterações de expressão de genes codificadores de proteínas, alterações em RNAs não codificadores (ncRNAs) curtos, com < 30 bases, contribuem para a patogênese do câncer [34]. Pequenos ncRNAs como microRNAs (miRNAs) tem mostrado expressão especifica em distintos subtipos de LMA, podendo auxiliar na classificação genética [35]. Estudos recentes descobriram que muitas classes de pequenos RNAs nucleares (snRNAs) possuem características estruturais que são funcionais e bem conservadas através da evolução [36].

O projeto piloto ENCODE identificou e caracterizou apenas 1% do genoma humano e mostrou que 74% a 93% das bases são transcritas, sendo que a maioria (63%) eram ncRNAs longos (> 200 bases), os quais residem em regiões intrônicas (40,9%) e intergênicas (22,6%), fora das anotações do GENCODE [37]. ncRNAs estão envolvidos em diferentes processos biológicos como a sobrevivência celular, regulação da progressão do ciclo celular, controle transcricional e pós transcricional da expressão gênica [38, 39], imprinting genômico [40, 41], interação com cromatinas [42], modificações de histonas [39], inativação do cromossomo X [43, 44] e biogênese de RNAs maduros através de mudanças estruturais íntron-éxon dos genes vitais [45]. Foi demonstrado que sítios de ncRNAs intrônicos longos são responsivos a estímulos fisiológicos como a ácido retinoico [46] ou hormônio andrógeno [47].

Os ncRNAs longos receberam menor atenção da comunidade científica, baseada na percepção provavelmente equivocada de que todos eles resultavam de RNAs imaturos [48]. Porém o levantamento in silico dos projetos de análise de expressão em larga escala, levou à identificação de ncRNAs de transcrição independente [49]. A abordagem in silico baseada no mapeamento genômico e agrupamento de ESTs (Expressed Sequence Tags), juntamente com experimentos de microarranjos combinando íntrons e éxons, apontaram para regiões intrônicas como potenciais ncRNAs reguladores [50, 51]. Além disso, revelou que aproximadamente 81% de todos os genes codificadores de proteína que sofreram clivagem contêm íntrons transcricionalmente ativos [51].

Análises dos genomas identificaram sequências de ncRNAs longos 100% conservadas entre os genomas de humano, camundongo e rato, 99% entre cachorro, 97% em galinha e 67% entre peixe, esta alta conservação indica que esses ncRNAs tem uma função biológica essencial para as células normais [52-54]. Além disto, são expressos de maneira órgão específica, sugerindo que sua função está relacionada com fenômenos fisiológicos específicos de cada órgão. Recentemente, descreveu-se que o conservado ncRNA eosinófilo grânulo ontogene (EGO) regula a proteína básica principal (MBP) e níveis de RNAm de eosinófilo derivado de neurotoxina (EDN) em progenitoras CD34+ [55]. Análise dos ncRNAs longos expressos especificamente no timo revelou que o ncRNA Thy-ncR1 foi expresso especificamente em células T imaturas de estágio III e controla a abundância do mRNA de MFAP4 (glicoproteína 4 associada à microfibrila), que codifica polipeptídios para adesão celular [56].

A tecnologia de microarranjo tem permitido um refinado mapeamento da atividade transcricional do genoma humano [57], e tem revelado expressão diferencial de ncRNAs intrônicos longos em próstata, fígado e rim [50]. ncRNAs longos mudaram a interpretação das bases funcionais de muitas doenças [58, 59]. O ncRNA longo MIAT está associado com infarto do miocárdio [60]. O ncRNA longo induzido pela deleção cromossômica que trunca o sítio de poliadenilização do gene LUC7L resulta na metilação aberrante e silenciamento do gene vizinho HBA2, levando a  $\alpha$ -talassemia [44, 61].

Recentemente, foi descrito que transcritos ncRNA intergênicos estão associados com regulação da mielopoese [62], doença de Alzheimer [63] e metástase em adenocarcinomas de pulmão [48, 64], além de diferencialmente expressos em vários tipos de cânceres [65-68].

No início dos anos 90, oncogenes e genes supressores tumorais como N-myc (MYCN) e p53 (TP53) foram identificados apresentando ncRNAs transcritos em sua região intrônica [69, 70]. Mais recentemente estudos envolvendo ncRNAs e p53 demonstraram p53 regula muitos ncRNAs longos intergênicos [71].

A crescente caracterização da existência de transcrição intrônica e intergênica de ncRNAs generalizada no genoma humano e a correlação com diversos cânceres [72, 73] sugerem a necessidade de um amplo estudo de possíveis alterações de expressão desse grupo de transcritos. Além disto, a caracterização de genes importantes que possam contribuir para a fisiopatologia das SMDs está sendo explorado. Neste trabalho, foi caracterizado o perfil de expressão gênica de células CD34+ e células estromais de pacientes SMD-ARSA e indivíduos saudáveis usando uma plataforma de 44k oligoarranjos combinados de íntron-éxon, permitindo a identificação de sinais de expressão de transcritos codificadores de proteínas e ncRNAs modulados em pacientes com SMD-ARSA. A validação de genes canditados (DMT1 e SEMA3A) nos diferentes subgrupos de SMD sugerem a participação destes genes no desenvolvimento da doença.

# Objetivo

#### **OBJETIVO**

Verificar o perfil de expressão gênica de células CD34<sup>+</sup> e estromais de medula óssea de pacientes com Síndrome Mielodisplásica do subtipo anemia refratária com sideroblastos em anel, utilizando um conjunto de genes conhecidos e transcritos intrônicos humano, imobilizados em lâminas de microarranjos e validar genes candidatos nos diferentes subgrupos de SMD.

### 1. Objetivos específicos

• Análise funcional *in silico* dos genes diferencialmente expressos, verificando enriquecimento de categorias de ontologias e de redes gênicas relevantes na SMD e seleção de genes para estudo funcional.

• Validação dos genes candidatos através de PCR em tempo real.

• Verificação da expressão gênica e protéica do gene *DMT1* em células de medula óssea total de pacientes de diferentes subgrupos de SMD, separados de acordo com as classificações FAB, IPSS e WHO2008.

• Verificação da expressão gênica e protéica do gene *SEMA3A* em células de medula óssea total e estromais de pacientes de diferentes subgrupos de SMD, separados de acordo com as classificações FAB, IPSS e WHO2008.

• Ensaios funcionais do gene *SEMA3A* através de transfecção transitória em células estromais HS27.

# Material e Métodos

#### 1. Pacientes

Amostras de medula óssea foram coletadas de indivíduos saudáveis e pacientes, tratados no Centro de Hematologia e Hemoterapia, da Universidade Estadual de Campinas.

Para obter transcritos representativos nas SMDs, no ensaio de microarranjo foi utilizo amostras de sete pacientes diagnosticados com SMD do subgrupo anemia refratária com sideroblasto em anel (ARSA), de acordo com a classificação Franco-Americano-Britânica (FAB) por ser o subgrupo mais homogêneo e não apresentavam anormalidades cromossômicas, antes de tratamento e sem alterações secundárias. O diagnóstico e a coleta foram realizados pela Dra. Fabíola Traina do Centro de Hematologia e Hemoterapia, da Universidade Estadual de Campinas. As características de todos os pacientes estão demonstradas na Tabela I.

Pacientes	Análise da expressão	Análise da expressão gênica	Idade		Hgb	Neut	Plt	blasto	SA
<b>(n)</b>	gênica das	das células	(anos)	Gênero	(g/dL)	(x10 <sup>3</sup> /	(x10 <sup>3</sup> /	s MO	(%)
	células CD34 <sup>+</sup>	estromais				uL)	uL)	(70)	
1	Microarranjo	Nenhum	72	F	7,2	0,95	75	2	30
2	Microarranjo,	Nonhum	78	М	8,3	1,23	136	0	50
2	2 qPCR	Nennum							30
2	Microarranjo,	aDCD	62	м	12.4	0.00	110	2	16
3	qPCR	qPCK	02	101	12,4	0,99	110	2	10
4	Microarranjo,	Microarranjo,	70 M	м	10,2	5,34	322	0	38
4	qPCR	qPCR		IVI					
F	- DCD	Microarranjo,	69	F	6,7	0,51	72	0	22
3	<b>qPCR</b>	qPCR							
6		Microarranjo,	57	М	8,4	<b>a</b> 01		0	01
	qpck	qPCR	56			2,81	/54	U	91
7	Nenhum	qPCR	75	М	6,3	0,75	216	0	27

Tabela 1: Características dos pacientes SMD-ARSA na hora da coleta da medula óssea.

F indica feminino; M masculino; Hgb hemoglobina; Neut neutrófilo absoluto; Plt Plaquetas; MO medula óssea e SA sideroblastos em anel.

Para análise de expressão gênica dos genes *DMT1* e *SEMA3A* por qPCR, foram utilizadas amostras de RNA de medula óssea total de indivíduos saudáveis e pacientes com SMD e LMA, coletadas entre o período de 2005 a 2011. No total foram incluídas 60 amostras, das quais 7 eram de indivíduos saudáveis, 34 de pacientes com SMD e 19 de pacientes com LMA (Tabela II)

o suspineo
WHO
- CRDM
- CDRU
- CRDM

Tabela 2: Características dos pacientes na hora da coleta da medula óssea.

.

					baixo	
8	85	М	SMD	AR	risco/INT-	CRDM
					1	
					baixo	
9	63	F	SMD	AR	risco/INT-	AREB I
					1	
					baixo	
10	29	F	SMD	AR	risco/INT-	CRDU
					1	
					baixo	
11	25	М	SMD	AR	risco/INT-	CRDM
					1	
					baixo	
12	39	F	SMD	AR	risco/INT-	CRDM
					1	
					baixo	
13	63	М	SMD	AR	risco/INT-	CRDM
					1	
					baixo	
14	77	F	SMD	AR	risco/INT-	CRDU
					1	
					baixo	
15	33	F	SMD	AR	risco/INT-	CRDM
					1	
					baixo	
16	20	F	SMD	AR	risco/INT-	CRDM
					1	
					baixo	
17	82	F	SMD	ARSA	risco/INT-	ARSA
					1	

					baixo	
18	83	М	SMD	ARSA	risco/INT-	ARSA
					1	
					baixo	
19	76	М	SMD	ARSA	risco/INT-	ARSA
					1	
					baixo	
20	76	М	SMD	ARSA	risco/INT-	ARSA
					1	
					baixo	
21	62	Μ	SMD	ARSA	risco/INT-	ARSA
					1	
					baixo	
22	70	Μ	SMD	ARSA	risco/INT-	ARSA
					1	
					baixo	
23	66	F	SMD	AREB	risco/INT-	AREB I
					1	
					baixo	
24	79	М	SMD	AREB	risco/INT-	AREB I
					1	
					baixo	
25	59	Μ	SMD	AREB	risco/INT-	AREB I
					1	
					baixo	
26	69	Μ	SMD	AREB	risco/INT-	AREB I
					1	
					baixo	
27	67	М	SMD	AREB	risco/INT-	AREB I
					1	

					alto	
28	64	М	SMD	AREB	risco/INT-	AREB I
					2	
					alto	
29	61	М	SMD	AREB	risco/INT-	AREB II
					2	
					alto	
30	71	М	SMD	AREB-T	risco/INT-	AREB II
					2	
					alto	
31	44	F	SMD	AREB-T	risco/INT-	AREB II
					2	
					alto	
32	44	F	SMD	AREB-T	risco/INT-	AREB II
					2	
					alto	
33	41	М	SMD	AREB-T	risco/INT-	AREB II
					2	
					alto	
34	71	М	SMD	AREB-T	risco/INT-	AREB II
					2	
35	68	М	LMA			
36	52	М	LMA			
37	26	F	LMA			
38	60	Μ	LMA			
39	71	М	LMA			
40	52	Μ	LMA			
41	52	Μ	LMA			
42	49	М	LMA			
43	52	Μ	LMA			
44	35	F	LMA			

45	53	F	LMA
46	63	F	LMA
47	27	F	LMA
48	75	Μ	LMA
49	81	F	LMA
50	79	F	LMA
51	39	F	LMA
52	30	F	LMA
53	67	Μ	LMA
54	29	Μ	CTRL
55	34	F	CTRL
56	40	F	CTRL
57	47	М	CTRL
58	37	Μ	CTRL
59	27	М	CTRL
60	22	Г	OTDI

F indica feminino; M masculino; SMD Síndrome Mielodisplásica; LMA leucemia mieloide aguda; FAB Franco-Americano-Britânica; IPSS Sistema de Índice de Prognóstico Internacional; WHO Organização Mundial da Saúde; AR anemia refratária; CRDU citopenia refratária com displasia unilinear, CRDM citopenia refratária com displasia multilinear, ARSA anemia refratária com sideroblasto em anel; AREB anemia refratária com excesso de blasto; AREB-T anemia refratária com excesso de blasto em transformação; CTRL controle.

Todos os pacientes e indivíduos saudáveis forneceram consentimento e o estudo foi aprovado pelo comitê de ética (número CEP/CONEP 124/2005, ver anexo I). O projeto está de acordo com as normas e diretrizes das resoluções 196/96 e 251/97A.

## 2. Separação das células CD34<sup>+</sup>e das células estromais

As células mononucleares da medula óssea foram isoladas por centrifugação de gradiente de densidade com Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Suíça), incubadas

com CD34 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Mönchengladbach, Alemanha) e as células  $CD34^+$  foram isoladas usando colunas magnéticas de separação celular MACS, seguindo as instruções do fabricante. A pureza das células  $CD34^+$  foi no mínimo de 90%, determinada por citometria de fluxo (FACS), usando anticorpo anti-CD34/PE (Caltag Laboratories, Burlingame, CA). As células mononucleares isentas de  $CD34^+$ , foram cultivadas em meio de cultura Iscove's Dulbeccos (IMDM) (Sigma, St Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e 10% de soro equino (HS), mantidas em estufa úmida com 5% de  $CO_2$  a 37°C. O meio de cultura foi semanalmente substituído. Ao atingir 90% de confluência, a monocamada de células foi tripsinizada e cultivada nas mesmas condições. Depois de 4 passagens, uma população de células homogêneas foi obtida e as células estromais foram validadas por FACS pela ausência de antígenos CD34, CD45 e CD68 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA).

### 3. Citometria de Fluxo (FACS)

Análises de FACS foram utilizadas para verificar na membrana das células, a presença de antígenos de grupos de diferenciação (CD). As células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos, o botão foi lavado duas vezes em tampão salina fosfato (PBS) (137mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 10mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 2mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) para retirada do meio de cultura e resuspendido em 100  $\mu$ L de PBS, em seguida, as células foram incubadas com 2  $\mu$ L anticorpo contra o antígeno CD de interesse conjugados com fluoróforos específicos, por 30 minutos a temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS, as células foram analisadas no citometro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience) com 10.000 eventos adquiridos.

#### 4. Extração do RNA

RNA total foi extraído com o material *RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare, Freiburg, Alemanha). A integridade do RNA foi avaliada usando o equipamento Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), que realiza eletroforese capilar de alta tensão das amostras de RNAs. O valor de integridade do RNA (*RNA Integrity Number*, RIN) foi atribuído pelo programa *2100 Expert* (Agilent Technologies) através do traçado eletroforético da amostra.

#### 5. Experimento de Microarranjo

Para cada amostra, 150 ng RNA total foi amplificado e marcado com Cyanina 3 (Cy3) ou Cyanina 5 (Cy5) usando o material *Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit PLUS, two-Color* (Agilent Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante (Figura 1).



Figura 1: Método de amplificação de cRNA e marcação com fluoróforos (Agilent Technologies).

cRNA de cada amostra, marcando tanto com Cy5 quanto com Cy3, foi hibridizado, usando o material *Gene Expression Hybridization* (Agilent Technologies). As medidas das expressões gênicas foram realizadas usando uma lâmina com 44.000 oligos íntron-éxon customizada pelo grupo de Verjovski-Almeida e colaboradores [50] e impressa por Agilent Technologies. Destes 44k oligos, 6.954 correspondem a éxons de transcritos codificadores de proteína, 7.135 sense e 7.135 antisense de transcritos não codificadores totalmente intrônicos (TIN), 4.439 sense e 4.439 antinsense de transcritos não codificadores parcialmente intrônicos (PIN), 8.780 são oligos de microarranjos da Agilent e 2.256 são controles negativos e positivos, as coordenadas genômicas foram extraídas do Banco do Genoma Humano de Maio de 2004 (hg17) (Figura 2). As lâminas foram hibridizadas sob rotação de 10 rpm, a 65°C por 17 horas e em seguida lavadas utilizando tampões adequados. A aquisição da imagem dos transcritos expressos, de cada amostra, realizou-se através do Scanner Gene PIX 4000B – Molecular Devices (MDS Analytical Technologies, Califórnia – USA), utilizando laser 532nm para excitar moléculas de Cy3 e laser 633nm para moléculas de Cy5. Os dados de intensidade obtidos na imagem foram extraídos usando o programa *Agilent Feature Extration* (Agilent Technologies). Os níveis de ruídos e controles de hibridização estavam dentro do limite aceitável. Os alvos com intensidade significantemente acima do ruído (p > 0,05) de todas as amostras foram consideradas para análise.



**Figura 2:** Desenho do microarranjo de oligos íntron-éxon. Sonda 1 corresponde ao transcrito antisense parcialmente intrônico; sonda 2 corresponde ao éxon que se sobrepõe, na fita oposta, a cada transcrito parcialmente intrônico; sondas 3 e 4 correspondem ao pares de sonda reverso-complementares para cada uma das possíveis fitas dos transcritos totalmente intrônicos e sonda 5 corresponde aos oligos disponíveis comercialmente pela Agilent.

#### 6. Análise dos dados

Os dados foram normalizados por *quantil* [74] usando o programa *Spotfire Decision Site*® *for Microarray Analysis* (TIBCO Software Inc, Somerville, MA, USA). Os genes diferencialmente expressos entre SMD-ARSA e indivíduos normais foram identificados com análise estatística usando o programa *Significance Analysis of Microarray* (SAM) [75], a qual leva em consideração o p-valor do teste-t, o número de testes realizados – um para cada oligo, e a probabilidade de se obter oligos com valores altos de significância (ex. p valor menor que 0,05), mas resultantes do grande número de perguntas (40.000 oligos x 0,05 = 200 oligos), a chamada taxa de falsa descoberta (FDR). Para uma análise mais robusta realizamos o SAM seguido por validação sem uma amostra [76], a qual consiste na remoção de uma amostra e determinação de uma nova amostragem de genes significantemente alterados usando as amostras restantes. Este processo foi repetido para cada amostra, computando a significância estatística de cada transcrito em várias validações sem uma amostra. Para ambas as amostras celulares CD34<sup>+</sup> e estromais os seguintes parâmetros foram utilizados: duas classes não pareadas, teste t-student e 500 permutações. Foram considerados significantemente alterados os transcritos que mostraram diferença de no mínimo 1,7 vezes e FDR de 1% para células CD34<sup>+</sup> e 5% para células estromais entre todas as validações sem uma amostra. Os dados íntegros foram depositados no banco de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO) (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) com número de acesso GSE18911.

#### 7. Agrupamentos hierárquicos dos transcritos válidos

A fim de tornar os transcritos comparáveis entre si, independentemente da intensidade, foi utilizado para cada transcrito a normalização *Z-score* [77], na qual é calculada a média e desvio padrão da expressão de cada transcrito ao longo das amostras, em seguida cada valor de expressão é subtraído pela média e este resultado é então dividido pelo desvio padrão. Desta maneira, o valor de expressão considerado é o número de desvios padrões acima ou abaixo da média de cada gene ao longo dos experimentos em seguida realizamos o agrupamento hierárquico dos pontos válidos usando o método *Unweighted Pair-Group*, que agrupa dados similares.

#### 8. Análise funcional *in silico* dos genes diferencialmente expressos

Parâmetros menos estringentes (FDR de 5% para células CD34<sup>+</sup> e 15% para células estromais) foram usados na geração da lista dos genes codificadores de proteína alterados para análise funcional no programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (Ingenuity® Systems, <u>www.ingenuity.com</u>), o qual identifica as redes biológicas dos genes relevantes. O programa indica as interações e funções dos genes já conhecidos e documentados na base de dados, índices estatísticos, fornecendo ao usuário os genes significativos, o tamanho da

rede e o número de moléculas conhecidas. O índice de cada rede é um valor de p logarítmico negativo, o qual reflete a probabilidade de encontrar moléculas alvos na rede genômica por trocas aleatórias. A rede identificada é apresentada como gráfico, indicando as relações moleculares entre os produtos dos genes.

O banco de dados *Gene Ontology Annotation* (GOA) (www.ebi.ac.uk/GOA/) foi usado para as anotações dos processos biológicos das proteínas codificadas pelos transcritos que mostram alterações nos níveis de expressão de no mínimo 1,7 vezes. Descrições funcionais dos genes foram obtidas do banco de dados *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

RNAs não codificante intrônicos com variação de no mínimo 1,7 vezes foram anotados de acordo com o gene codificador da proteína traduzida pelo mesmo *locus*.

#### 9. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

PCR em tempo real foram realizados para confirmar os níveis de expressão dos transcritos selecionados. Transcrições reversa dos RNAs foram realizadas usando o material Superscript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies). As amostras de cDNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop e 60 ng foram utilizadas por reação. Iniciadores foram desenhados usando o programa PRIMER3 (versão 0.4.0) (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) com os dados das sequências publicadas no banco de dados do NCBI (Tabela III). Para encontrar a melhor concentração de iniciadores, diluição seriada de 150 a 600nM de cada par de iniciador foi realizada, considerando reações de amplificação do produto gênico no menor ciclo (Ct) como sendo a melhor concentração, evitando sobra de reagente e formações de dímeros. Em seguida, a eficiência da amplificação foi verificada através da curva de diluição seriada de cDNA (1:2), consideradas eficientes reações de amplificação maiores que 95% e inclinação de -3,30 a -3,34. Os genes HPRT e GAPDH foram selecionados como controles endógenos por não alterarem os seus níveis de expressão em todas as amostras de estudo. Além disso, sua complementaridade com os genes alvos foi verificada, através da curva de dispersão, que utiliza os valores de  $\Delta C_t$  ( $C_t$  alvo –  $C_t$  endógeno) (os valores de  $C_t$  são gerados na curva padrão de eficiência), em comparação ao log de entrada (log da diluição do cDNA utilizada), as

eficiências das duas reações de PCR foram consideradas equivalentes quando apresentaram inclinação entre -0,1 a 0,1.

	Sense	antisense				
Transcritos candidatos para validação em células CD34 <sup>+</sup>						
	5'	5'				
ABCB7	TAAGGTAGCCGAACGTGGTACC	TTATCATGGTTCTGCACACGG				
	3'	3'				
COV11	5' CTGCACTGGCGTTTTACAGA	5' TGGGGATTAAGCCTTTGTTC				
COATT	3'	3'				
	5' CAACTGCTGCTTCACCAGAC	5' TATCAGCTCCTCCTGCCTTG				
ГL13	3'	3'				
	5! ^ ^ CC ^ CCTTTCCCTTTTTCT	5'				
GCDH_ncRNA	21	CGCCTTAGTGACAGCTTCCAG				
	5	3'				
UCV	5 'GAGTTCATGGCCAAAGGAAG	5' GGAGGTCTCGGTGGATGTAG				
NCK	3'	3'				
MV5OC	5' CGTGGCAGAAGAGGCATACA	5' AGCGAGCCGACACTGTCTTT				
WIT SOC	3'	3'				
		5' ACTTGGCGTTTTTCTGCACT				
MAAI	5' GTGCTGTGTGTGGGGGACA 3'	3'				
NR4A1_ncRNA	5'AAACCTCCCCAATGTCTTC 3'	5' ACCGTCCAGATCCTGCTG 3'				
		5'				
NR4A2	5' ACTCCAACCCGGCTATGAC 3'	CATGGAGCCAGTCAGGAGAT				
		3'				
ND442 maDNA	5 ' CTTCCGGGTGTCTGAGAAAG	5' TTTGCATGTGCTAGGAGCTG				
INK4A2_NCKINA	3'	3'				
		5' TGGAGGGGAAGGGCTATATT				
INIX4AJ	5' TCCGCTCCTCCTACACTCTC 3'	3'				
NR4A3_ncRNA	5' CCGTTAAGACCCTGGTTTTC	5' AGGCGCTGAGAATTATTGGA				

**Tabela 3:** Sequências de iniciadores utilizados nos ensaios de qPCR
	3'	3'
		5'
PPIF_ncRNA		AGCAACAGTGTAGCGCAATG
	3'	3'
		5'
SLC11A2	5'	GAGCCGATGATAGCCAACTC
	GTGGTTACTGGGCTGCATCT 3'	3'
Transcritos can	didatos para validação em células estron	nais
		5'
HLA-E	5' ATCGTGGGCATCATTGCT 3'	GAGTAGCTCCCTCCTTTTCCA
		3'
	5' AGGGACCGAAAACAACGTC	5' CGTGGGTCCTCCTGTTTCTA
SEMA3A	3'	3'
	5'	5'
SPINT2	TCTGTTTCTCTGGGAGGTAGGA	CGATCAGCGAGGAAACAACT
	3'	3'
		5'
TBCD_ncRNA		AAGGTGTTGGAAGGGAGGAG
	3	3'
Genes		
endógenos		
		5'
GAPDH	3'	CTGTGCCTGTAGCCAAATTCGT
	5	3'
HDDT	5' TCCAGCAGGTCAGCAAAGAA	5' GAACGTCTTGCTCGAGATGT
III NI	3'	3'

Para a análise qPCR, Power SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) foi usado de acordo com instruções do fabricante, e as reações foram corridas no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) por 40 ciclos. Cada amostra foi feita em triplicata e o controle negativo sem amostra foi incluído em cada par

de iniciador. A expressão do transcrito foi normalizada pelos genes endógenos e a expressão relativa foi calculada como  $2^{-\Delta\Delta C}_{t}$ , onde  $\Delta\Delta C_{t}$  é a diferença do o valor de  $C_{t}$  para cada paciente normalizado pela média do  $C_{t}$  da diferença de  $C_{t}$  das amostras dos indivíduos saudáveis (método  $C_{t}$  Comparativo $\Delta\Delta C_{t}$ ) [78].

#### 10. Análise Estatística da Expressão Relativa

A comparação dos valores da quantidade relativa de expressão gênica dos genes candidatos entre os grupos de pacientes e indivíduos normais foi realizada através do teste estatístico de *Mann-Whitney*, usando o programa GraphPad Prism versão 5.0, valores de p  $\leq 0,05$  foram considerados significativos.

#### 11.Extração de Proteína

As células foram lisadas em tampão RIPA (150mM NaCl, 50mM Tris-Cl, 0,5% deoxicolato, 0,1% SDS e 1% NP-40, pH7,4) contendo inibidores de protease (10mM PMSF, 1  $\mu$ g/mL leupeptina, 1mM ortovanadato de sódio e 1 ng/mL pepstatina A) e mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida, os lisados foram centrifugados a 10.000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5 mL e o conteúdo protéico foi quantificado utilizando reagente BreadFord 20% (BioRad), seguindo especificações do fabricante.

#### **12.Western Blot**

Western Blot foi realizado para análise da expressão protéica. Foram utilizados quantidades de extratos protéicos correspondentes a 100 µg e adicionados 5% do volume final de tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditiotreitol e estes foram aquecidos a 100 °C por 10 minutos. Em seguida, foram fracionados em gel de poliacrilamida-SDS 10%. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Millipore) por 2 horas a 120 volts. As membranas foram incubadas por 1 hora em solução de TBS-T (50mM Tris (pH 7,5), 150mM NaCl e 0,1% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida foram incubadas com anticorpo primário de interesse por 16-18 horas a 4 °C. No dia seguinte as membranas foram lavadas em TBS-T por três vezes de 10 minutos e, em seguida, incubadas com anticorpo secundário

conjugado a peroxidase (KPL) por 1 hora a temperatura ambiente. Seguiram-se outras lavagens para retirada do excesso de anticorpo e exposição em filmes fotográficos Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY), utilizando-se o reagente ECL (GE).

Quando houve necessidade de quantificação das bandas de western blot utilizou-se o programa UN-SCAN-IT gel<sup>TM</sup> – 6.1 (Silk Scientific Corporation), que fornece a média de pixel/área de cada banda. As intensidades foram normalizadas pelas bandas correspondentes de  $\beta$ -actina de cada amostra.

#### 13.Imuno-histoquímica

Cortes histológicos de medula óssea de dezoito casos de SMD foram cedidos pelo Prof. Dr. José Vassalo do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas – UNICAMP. As reações de imuno-histoquímica foram realizadas pelo Dr. Paulo Latufi-Filho no Laboratório de Patologia Molecular – CIPED – UNICAMP, que é dirigido pelo Prof. Dr. José Vassalo.

Inicialmente os cortes foram desparafinizados por uma passagem em xilol por 30 minutos a 110 °C, outras duas passagens em xilol à temperatura ambiente, três passagens em cubas contendo etanol absoluto, duas passagens em etanol 80% e etanol 50% e, por fim, uma lavagem em água corrente por 5 minutos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com a passagem dos cortes em três cubas contendo água oxigenada 10% (3 minutos cada passagem), seguida por uma lavagem em água corrente por 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato 10mM (pH 6) em panela a vapor por 30 minutos. Para anticorpo primário policional anti-DMT1 (Sigma-Aldrich, Alemanha) foi utilizado diluição de 1:50. O anticorpo foi incubado em câmara úmida por 16-18 horas a 4°C. Em seguida, foram realizadas três lavagens em PBS. Para o bloqueio pós-incubação com anticorpo primário foi usado o reagente Novocasta Post Primary Block (Novocastra -Novolink<sup>TM</sup> – Leica Inc) por 30 minutos a 37 °C. Novamente, os cortes foram lavados três vezes em PBS por 5 minutos. Seguiu-se a incubação com anticorpo secundário (Novolink<sup>TM</sup> Polymer) por 30 minutos a 37 °C. Após três lavagens em PBS por 5 minutos, as lâminas foram colocadas em solução contendo diamino benzidina (DAB), PBS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e DMSO por 3 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e depois em água destilada. A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Mayer por 10 a 30 segundos,

seguida por lavagens em água corrente e destilada. Ao final as lâminas foram incubadas por 3 minutos em água amoniacal. Seguiram se as últimas lavagens em água corrente, desidratação em xilol e em etanol e montagem das lâminas em resina adequada.

As lâminas foram analisadas e as imagens foram capturadas em microscópio Zeiss acoplado a câmera digital CCD Zeiss. Foi realizada análise semi-quantitativa para amostras marcadas com DMT1, na qual foi estabelecido critérios de porcentagem de células marcadas (nenhuma (0);  $\leq 10\%$  (1); 10-40% (2); 40-70% (3) e  $\geq 70\%$  (4)) e intensidade de marcação (nenhuma (0); leve (1); moderada (2) e intensa (3)), a somatória desses fatores determinou-se o grau de marcação (0 a 7), a análise foi realizada sem prévia identificação das amostras.

#### 14.Linhagens Celulares

Para os ensaios funcionais do gene candidato *SEMA3A* foram utilizadas células de linhagens leucêmicas humanas: K562 (leucemia mieloide crônica), U937 (linfoma monócito leucêmico) e NB4 (leucemia promielocítica aguda) e a linhagem estromal de medula óssea humana HS27, todas adquiridas da Coleção Americana de Tipos de Cultura (ATCC), Filadélfia, USA. Estas linhagens foram mantidas em meio RPMI (Sigma, St Louis, MO, USA) suplementado com 10% SBF e utilizadas entre as passagens 3 a 20.

### 15.Transfecção transitória de DNA plasmidial

O DNA plasmidial NSPI-CMV-MCS-myc-His vazio (NSPI) e o NSPI-CMV-MCS-myc-His contendo o gene *SEMA3A* fusionado ao epítopo Flag (SEMA3AFlag) foram gentilmente cedidos pela Profa Dra. Ofra Kessler do Instituto de Tecnologia de Israel – Technion –Haifa, Israel (Figura 3).



Figura 3: Esquema do mapa do vetor.

Vetor NSPI-CMV-MCS-myc-His cedido pela Profa Dra. Ofra Kessler, SEMA3AFlag foi inserido entre os sítios das enzimas BamH1 e XhoI.

Células HS27 foram cultivadas em placas p100 ( $2x10^5$  células/placa) em meio RPMI com 10% SBF. Após 12 horas, foi retirado o meio e adicionado 3 mL de OptiMem<sup>TM</sup> (Gibco), em seguida foi realizada a transfecção com Lipofectamina LTX (Invitrogen), utilizando 1µg de DNA plasmidial. Após 5 horas o meio foi substituído por meio RPMI com de 10% SBF. Para confirmar a eficiência da transfecção, após 72 horas, foi extraído RNA e proteína das células para o ensaio de qPCR e Western Blot respectivamente. Os ensaios funcionais foram iniciados após 24 horas de transfectado.

#### 16.Ensaio de Adesão

Células HS27-NSPI e HS27-SEMA3AFlag foram cultivadas em placas de 24 poços ( $1x10^4$  células/poço). Após 48 horas, adicionaram-se células leucêmicas (K562 ou NB4 ou U937) em cocultura ( $4x10^5$  células/poço). Após 45 minutos o sobrenadante foi retirado e as células aderidas foram recolhidas após 10 pipetagens com PBS gelado. Em seguida, proferiu-se a marcação com o anticorpo anti-CD45/APC (Caltag Laboratories, Burlingame, CA). A porcentagem de células aderidas foi analisada por FACS. O ensaio foi realizado em duplicata e duas transfecções independentes foram realizadas.

#### 17.Ensaio de Diferenciação

Células HS27-NSPI e HS27-SEMA3AFlag foram cultivadas em placas de 24 poços (1x10<sup>4</sup> células/poço). Após 24 horas, adicionaram-se células leucêmicas (K562 ou NB4) em cocultura (1,5x10<sup>5</sup> células/poço). Após 72 horas de cocultura o sobrenadante foi centrifugado a 1.500 rpm por 5 minutos e lavados duas vezes em PBS para a retirada do meio de cultura, em seguida, proferiu-se a marcação com anticorpos anti-CD11c/APC e anti-CD14/PE-Cy5 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA). A diferenciação das células leucêmicas foi analisada por FACS. Foram realizadas duas transfecções independentes para cada construção.

#### 18.Ensaio de Apoptose

Células HS27-NSPI e HS27-SEMA3AFlag foram cultivadas em placas de 24 poços ( $1x10^4$  células/poço). Após 48 horas foi adicionado células leucêmicas (U937 ou NB4),  $1,5x10^5$  células/poço, essas células foram previamente sensibilizadas com 100mM de ácido trans-retinoico (ATRA) por 24horas. Após 24 horas de cocultivo as células do sobrenadante foram coletas e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos. O botão de células foi lavado duas vezes em tampão de ligação (0,1M Hepes/NaOH (pH 7,4), 1,4M NaCl e 25mM CaCl<sub>2</sub>) e marcado com 5 µL de anexina V conjugada com APC e 5 µL Iodeto de propídio (PI) (BD Bioscience) por 15 minutos e, em seguida, foi analisado por FACS.

Células leucêmicas (K562 ou NB4 ou U937) foram cultivadas em placas de 12 poços ( $1x10^5$  células/poço), em cocultura com células HS27 cultivadas previamente ( $5x10^4$  células/poço). Em seguida, foi adicionado 100 ng/mL de proteína recombinante Sema3A-Fc Chimera (R&D Systems, Minneapolis USA). Após 24 horas as células do sobrenadante foram coletas e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos. O botão de células foi lavado duas vezes em tampão de ligação (0,1M Hepes/NaOH (pH 7,4), 1,4M NaCl e 25mM CaCl<sub>2</sub>) e marcado com 5 µL de anexina V conjugada com APC e 5 µL Iodeto de propídio (PI) (BD Bioscience) por 15 minutos e, em seguida, foi analisado por FACS.

## Resultados

#### 1. Caracterização das células CD34<sup>+</sup> e estromais de medula óssea

As células CD34<sup>+</sup> de medula óssea purificadas por coluna magnética tiveram pureza superior a 90%, conforme análise por citometria de fluxo (Figura 4).



**Figura 4:** Separação das células CD34<sup>+</sup>. A eficiência da separação das células CD34<sup>+</sup> foi confirmada por citometria de fluxo utilizando anticorpo contra antígenos CD34 conjugado com PE.

As células estromais cultivadas para extração de RNA mostraram-se livres de células progenitoras (CD34<sup>+</sup>), macrófagos ou linfócitos (CD68<sup>+</sup>) e células hematopoéticas (CD45<sup>+</sup>), analisados por FACS (Figura 5).





**Figura 5:** Cultura das células estromais de medula óssea. (A) Aparência das células aderentes usando microscópio invertido, nos primeiros dias após incubação com 10% de confluência (aumento 40x), com duas semanas atingindo confluência > 50% (aumento 10x), na terceira a quarta semana, ao atingem confluência maior que 90% (aumento 10x) as células foram tripsinizadas e utilizadas após a quarta passagem. (B) Utilizamos citometria de fluxo para demonstrar a ausência de células não-estromais, o resultado foi considerado satisfatório sendo encontrado apenas 5% de células precursoras hematopoiéticas (marcadas com anticorpo anti-CD34/PE-Cy5.5); 1,8% de células hematopoiéticas (marcadas com anticorpo anti-CD45/PE) e 1% de macrófagos ou linfócitos (marcados com anticorpo anti-CD68/FITC).

O RNA total foi extraído e a integridade foi verificada usando o equipamento Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), o qual forneceu o eletroferograma de unidade de fluorescência dos RNAs ribossomais 18S e 28S e também número de integridade do RNA (RIN), considerando-se um RNA de boa qualidade as amostras com RIN superior a 7 (Figura 7).



**Figura 6:** Qualidade do RNA por eletroforese. Eletroferograma demonstrando os picos de RNA ribossomais 18S e 28S das amostras de RNA de 4 pacientes SMD, que obtiveram o número de integridade do RNA (destacado no retângulo vermelho) maiores que 7.

# 2. Perfil de expressão dos transcritos codificadores e não codificadores de proteína em células CD34<sup>+</sup> de SMD-ARSA

Células CD34<sup>+</sup> obtidas de 4 pacientes com SMD-ARSA (n<sup>os.</sup> 1-4; Tabela I) foram comparadas com células CD34<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis usando uma plataforma com

44.000 oligoarranjos customizados de expressão combinada íntron-éxon [50]. Os oligoarranjos incluem genes codificadores e fitas sense e antisense de ncRNAs, como descrito em Material e Métodos.

Cada lâmina foi hibridizada com uma amostra, duplamente marcada com Cy5 e com Cy3 [79, 80]. Os dados foram normalizados por *quantl* (Figura 7), usando como referência os valores de intensidade do conjunto inteiro de amostras. Com a intenção de reduzir o efeito de variabilidade individual, promovemos uma identificação robusta dos sinais de expressão gênica de SMD-ARSA, combinando-se a análise SAM [75] com validação sem uma amostra [76]. A Figura 8 mostra os índices dos transcritos significantes observados entre pacientes e controles versus o que seria observado aleatoriamente, computado através de permutações entre os grupos, neste estudo usamos 500 permutações.





**Figura 7:** Normalização das amostras RNAs de células CD34<sup>+</sup>. (A) Intensidade de fluorescência pela freqüência de pontos (sondas) de cada amostra em duplo canal (Cy3 verde e Cy5 vermelho) antes da normalização. (B) Intensidade pela freqüência de pontos após normalização por *quantil*.



Figura 8: Gráfico do resultado da análise SAM – Significance Analysis of Microarray – mostrando o índice de significância observado entre pacientes e controles (*observerd score*, eixo y) versus os valores esperados aleatoriamente (*expected score*, eixo x), com 500 permutações. Em vermelho e em verde estão os transcritos selecionados significativamente hiperexpressos (vermelho) e hipoexpressos (verde), com taxa de FDR  $\leq 1\%$ .

No total foram identificados 216 transcritos diferencialmente expressos (qvalue  $\leq 0,01$  e com variação  $\geq 1,7$  vezes) entre pacientes SMD-ARSA e indivíduos saudáveis, dos quais 129 eram hipoexpressos e 87 hiperexpressos em SMD-ARSA (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**), 65 transcritos diferencialmente expressos eram ncRNA, sendo 32 hipoexpressos e 33 hiperexpressos (Tabela IV).



**Figura 9:** Transcritos diferencialmente expressos em células CD34<sup>+</sup> de pacientes SMD-ARSA e indivíduos normais. Os pacientes foram agrupados de acordo com a correlação do perfil de expressão usando o método *Unweighted Pair-Group*, o qual resultou em dois grupos homogêneos: pacientes SMD-ARSA (4 colunas da esquerda) e indivíduos normais (4 colunas da direita). O nível de expressão de cada gene está representado pelo número de desvios padrão acima (vermelho) e abaixo (verde) dos valores médios para cada gene em todas as amostras.

Nome Locus Gene <sup>1</sup>	Locus ID	Coordenada do Alvo <sup>2</sup>	Fita Alvo	Тіро	Orientação em relação ao gene codificador de proteína	q value <sup>3</sup>	Vezes
Hipoexpressos	s em SMI	D-ARSA					
AADAT	51166	chr4:171356547- 171356606	-	Exônico		0,001	-2,38
AASS	10157	chr7:121310573- 121310613	-	Exônico		0,000	-2,99
AASS	10157	chr7:121332812- 121332871	+	Intrônico	Antisense	0,001	-1,79
ABCB7	22	chrX:74056355- 74056414	-	Exônico		0,000	-1,75
ACSM3	6296	chr16:20700539- 20700598	+	Exônico		0,000	-2,07
ACSM3		chr16:20715193- 20715252	+	Exônico		0,000	-2,00
AEBP1	165	chr7:43927062- 43927121	+	Exônico		0,000	-2,05
AFF1	4299	chr4:88268668- 88268724	+	Intrônico	Sense	0,000	-1,83
AFF3	3899	chr2:99640471- 99640526	-	Exônico		0,001	-2,48

Tabela 4: Transcritos com expressão alterada em células CD34<sup>+</sup> de SMD-ARSA

AFF3	3899	chr2:99698165- 99698216	-	Intrônico	Sense	0,004	-1,76
AHII	54806	chr6:135791459- 135791499	-	Exônico		0,000	-2,07
ALS2CR4	65062	chr2:202310578- 202310637	-	Exônico		0,001	-1,81
ANK3	288	chr10:61459558- 61459591	-	Exônico		0,000	-3,01
ASAP2	8853	chr2:9299234-9299293	+	Intrônico	Sense	0,003	-2,14
ASXL1	171023	chr20:30410722- 30410781	+	Intrônico	Sense	0,001	-1,94
AUTS2	26053	chr7:69200166- 69200225	+	Exônico		0,000	-3,33
AUTS2	26053	chr7:69702065- 69702124	+	Exônico		0,001	-2,67
BACH2	60468	chr6:90693326- 90693385	-	Exônico		0,001	-3,28
BLNK	29760	chr10:97961400- 97961459	-	Intrônico	Sense	0,000	-3,59
BLNK	29760	chr10:97946676- 97946735	-	Exônico		0,000	-2,88
C13orf18	80183	chr13:45816907- 45816966	-	Exônico		0,003	-2,06
C16orf67	79014	chr16:31625733- 31625792	+	Exônico		0,000	-2,83
C16orf67	79014	chr16:31624199- 31624258	+	Exônico		0,001	-1,91
Clorf21	81563	chr1:181329653- 181329712	+	Exônico		0,001	-2,62
С5	727	chr9:120794621- 120794680	-	Exônico		0,001	-1,86

C5orf13	9315	chr5:111094583- 111094642	+	Intrônico	Antisense	0,000	-1,86
C9orf58	83543	chr9:131027887- 131027946	+	Exônico		0,001	-1,92
CCDC136	64753	chr7:128049619- 128049675	+	Exônico		0,003	-4,12
CCDC136	64753	chr7:128048785- 128048844	+	Exônico		0,004	-2,10
CD19	930	chr16:28858101- 28858160	+	Exônico		0,002	-1,92
CD81	975	chr11:2374760- 2374819	+	Exônico		0,000	-1,77
<i>CEP290</i>	80184	chr12:87007495- 87007554	-	Exônico		0,001	-1,81
CLIP3	25999	chr19:41197577- 41197636	-	Exônico		0,003	-2,00
COL5A1	1289	chr9:134960497- 134960556	+	Exônico		0,000	-2,24
CPSF6	11052	chr12:67954327- 67954386	-	Intrônico	Antisense	0,000	-2,16
CPSF6	11052	chr12:67954327- 67954386	-	Intrônico	Antisense	0,000	-1,97
CYFIP2	26999	chr5:156754713- 156754772	+	Exônico		0,000	-1,78
CYYR1	116159	chr21:26760551- 26760610	-	Exônico		0,002	-2,01
DLG3	1741	chrX:69508275- 69508334	+	Exônico		0,000	-2,63
DPY19L2	283417	chr12:62260709- 62260753	-	Exônico		0,000	-1,86
DST	667	chr6:56456393-	-	Exônico		0,001	-2,42

#### 

E2F7	144455	chr12:75917988- 75918047	-	Exônico		0,000	-2,19
EBF1	1879	chr5:158058593- 158058652	-	Exônico		0,003	-3,53
ECHDC2	55268	chr1:53073926- 53073985	-	Exônico		0,001	-1,80
ELP2	55250	chr18:32008518- 32008577	+	Exônico		0,001	-1,76
ERAP1	51752	chr5:96279013- 96279072	+	Exônico		0,004	-9,47
ERO1LB	56605	chr1:232705155- 232705214	-	Intrônico	Antisense	0,000	-1,98
FAAH	2166	chr1:46588511- 46588546	+	Exônico		0,000	-2,40
FLT3	2322	chr13:27475993- 27476051	-	Exônico		0,000	-1,82
GABPB1	2553	chr15:48447272- 48447331	+	Exônico		0,000	-2,55
GABPB1	2553	chr15:48448783- 48448842	+	Intergênico	Antisense	0,003	-1,85
GABPB1	2553	chr16:11871200- 11871259	-	Intergênico	Antisense	0,003	-1,79
GCDH	2639	chr19:12871038- 12871097	-	Intrônico	Antisense	0,000	-1,79
HHAT	55733	chr1:207237736- 207237795	+	Exônico		0,000	-2,29
HS3ST1	9957	chr4:11076939- 11076998	-	Exônico		0,000	-2,09
IGSF10	285313	chr3:152637104- 152637163	+	Intergênico	Sense	0,000	-2,19

JAM2	58494	chr21:26000228- 26000269	+	Exônico		0,000	-3,14
KCNE1L	23630	chrX:108673158-	-	Exônico		0,000	-2,36
VCNU(D)	27004	108673217 chr3:180451233-				0.000	2 70
KCNMB3	27094	180451268	-	Exonico		0,000	-2,70
KCNMB4	27345	chr12:69110890- 69110949	+	Exônico		0,001	-2,33
KLHL5	51088	chr4:38941503- 38941562	+	Exônico		0,004	-2,92
LAMB2	3913	chr3:49133567- 49133626	-	Exônico		0,004	-1,93
LAMC1	3915	chr1:179846063- 179846122	+	Exônico		0,003	-1,82
LAYN	143903	chr11:110936670- 110936729	+	Exônico		0,001	-2,24
LEF1	51176	chr4:109454925- 109454984	+	Intergênico	Antisense	0,001	-2,80
LOC400713	400713	chr19:57579855- 57579914	+	Exônico		0,003	-1,84
LOC441242	441242	chr7:63977853- 63977912	-	Intergênico	Sense	0,003	-1,82
LRIGI	26018	chr3:66512287- 66512346	-	Exônico		0,003	-1,81
MED12L	116931	chr3:152412757- 152412816	-	Exônico		0,000	-2,45
MGC29506	51237	chr5:138751442- 138751501	-	Exônico		0,003	-1,77
MMP11	4320	chr22:22450827- 22450886	+	Exônico		0,001	-1,78
MORNI	79906	chr1:2326963-2327014	-	Intrônico	Sense	0,003	-2,15

MDDZ	<b>8777</b>	chr9:13095883-		Evônico		0.001	2 1 5
	0///	13095942	-	Exonico		0,001	-3,15
Μνοιρ	1612	chr17:27843945-		Exônico		0.001	2 27
MIOID	4042	27844004	-	Exonico		0,001	-2,27
MVO5C	55930	chr15:50271936-	_	Exônico		0.000	-2.48
MIOJC	55950	50271995	-	Exonico		0,000	-2,40
ΝΑϚΡ	4678	chr1:45744001-	+	Intrônico	Sense	0.001	-2 10
IVADI	4078	45744060	I	muomeo	belibe	0,001	-2,10
ΝΑϚΡ	4678	chr1:45749924-	+	Exônico		0.001	_1 03
IVASI	4078	45750086	I	Exonico		0,001	-1,95
NASP	4678	chr1:45741247-	+	Fxônico		0.002	-1 73
111101	4070	45741306		LX0IIIC0		0,002	1,75
NAVI	89796	chr1:198504378-	+	Exônico		0.002	-1 74
1111/1	07770	198504437		LX0IIICO		0,002	1,71
NEIL1	<i>NEILI</i> 79661	chr15:73434282-	+	Intrônico	Sense	0.000	-4 45
	77001	73434341		muomeo	Sense	0,000	1,10
NEIL1	79661	chr15:73434051-	+	Exônico		0 000	-3 72
		73434110				-,	-,
NEIL1	79661	chr15:73434426-	+	Exônico		0.001	-3.36
		73434485				-,	-,
NKD2	85409	chr5:1091719-1091778	+	Exônico		0,004	-2,55
NOL7	51406	chr6:13722339-	_	Exônico		0.000	-1,75
		13722397				,	,
NPY	4852	chr7:24104524-	+	Exônico		0,000	-3,88
		24104583				,	,
NPY	4852	chr7:24102358-	+	Exônico		0,000	-3,08
		24102417				,	,
NSMCE4A	54780	chr10:123717158-	-	Exônico		0,001	-1,74
		123717201				,	,
NUP153	9972	chr6:17815444-	+	Intergênico	Sense	0,001	-2.04
		17815503		0		)	2

PAGI	55824	chr8:82068816- 82068875	-	Intrônico	Sense	0,001	-1,83
PCDH9	5101	chr13:66698353- 66698412	-	Exônico		0,004	-2,33
PDZD2	23037	chr5:32146500- 32146559	+	Exônico		0,000	-1,81
PIAS2	9063	chr18:42643244- 42643303	-	Intergênico	Sense	0,000	-2,05
PLS3	5358	chrX:114707296- 114707355	+	Exônico		0,000	-2,22
POU2AF1	5450	chr11:110728214- 110728273	-	Exônico		0,002	-2,31
PRG4	10216	chr1:183013558- 183013617	-	Intrônico	Antisense	0,000	-1,86
PSD3	23362	chr8:18429333- 18429388	-	Exônico		0,003	-2,06
PTGR1	22949	chr9:111420724- 111420783	-	Exônico		0,003	-1,81
PXDN	7837	chr2:1607456-1607515	-	Exônico		0,000	-4,14
PXDN	7837	chr2:1606432-1606473	-	Exônico		0,001	-4,14
RBM4B	83759	chr11:66192338- 66192397	+	Intrônico	Sense	0,001	-1,73
RIMS3	9783	chr1:40755662- 40755721	-	Exônico		0,000	-2,17
ROBO1	6091	chr3:78729485- 78729544	-	Exônico		0,000	-4,86
SEC63	11231	chr6:108329351- 108329410	-	Exônico		0,000	-1,77
SH2D4B	387694	chr10:82393858- 82393917	+	Exônico		0,001	-2,86
SLC12A2	6558	chr5:127550303-	+	Exônico		0,000	-1,94

#### 127550362 chr4:103540129-*SLC39A8* 64116 Exônico 0,000 -1,73\_ 103540188 chr20:36482692-SNORA71B 26776 Exônico 0,001 -1,78\_ 36482751 chr20:36482692-SNORA71B 26776 Intergênico Sense 0,001 -1,77 \_ 36482751 chr12:92472267-SOCS2 8835 +Exônico 0,000 -1,75 92472326 chr12:48204855-SPATS2 65244 Exônico 0,000 -1,74+48204914 chr7:116186492-ST7OT1 93653 Intergênico Sense 0,004 -2,13116186551 chr9:81478431-TLE1 7088 Intrônico 0,000 -2,30Sense 81478490 chrX:64411696-TLE1 7088 Intrônico Sense 0,000 -2,12+64411755 chr9:81478491-TLE1 7088 0,000 -2,10Intrônico Sense 81478550 chr9:81428672-TLE1 7088 Exônico 0,000 -1,8781428731 chr6:37288040-*TMEM217* 221468 Exônico 0,000 -1,8437288099 chr6:138230463-TNFAIP3 7128 Intrônico Antisense 0,000 -2,21 138230522 chr6:47308509-TNFRSF21 27242 Exônico 0,001 -2,1047308568 chr17:50393842-TOM1L1 10040 Exônico 0,001 -1,81 +50393901 chr3:25661877-TOP2B 7155 Exônico 0.003 -2.0125661936

TOP2R	7155	chr3:25614718-	_	Exônico		0.000	-1 85
10120	/155	25614777		LAOIICO		0,000	1,00
$T \cap P^{\gamma} R$	7155	chr3:25615965-	_	Exônico		0.000	-1 81
10120	/155	25616024	_			0,000	-1,01
TSPVI 5	85153	chr8:98354961-		Exônico		0.000	2 00
151 1LJ	03433	98355020	-	Exonico		0,000	-2,00
THPF1	20128	chr19:4913065-	+	Exônico		0.000	1 76
OIIMT	27120	4913124	Ι	LAOIIICO		0,000	-1,70
UNC12P	10407	chr9:35394491-	Т	Exônico		0.001	1 Q 1
UNCISD	10497	35394550	Ι	Exonico		0,001	-1,01
UOCC	55745	chr20:33353970-		Exônico		0.002	1 9/
υχιι	<i>UQCC</i> 55245	33354029	-	EXOIIICO		0,002	-1,04
ZNE267	ZNF367 195828	chr9:96227967-		Evônico		0.000	2.00
ZINF 30/		96228026	-	Exonico		0,000	-3,00
711711	7550	chrX:84333012-	I	Evânico		0.000	<b>२</b> २२
ZINF / I I	1552	84333071	Ŧ	Exonico		0,000	-2,33
711576	7620	chr6:35364312-	I	Intrânico	Canaa	0.002	2.02
ZINF / O	/629	35364371	+	Intronico	Sense	0,002	-2,02
	7644	chr19:23334238-		<b>F^i</b>		0.000	2.02
ZINF91	/044	23334297	-	Exonico		0,000	-2,02
Hiperexpress	os em SMD	-ARSA					
	57550	chr3:173831278-		Evânico		0.002	1.06
AADACLI	37332	173831337	-	Exonico		0,002	1,90
	<i>E E</i>	chr3:133551496-	1	<b>FAi</b>		0.004	2.46
ACPP	22	133551544	+	Exonico		0,004	2,40
	112	chr16:48907161-				0.001	1.02
ADCY/	113	48907220	+	Exonico		0,001	1,92
112 1010	11014	chr15:84021272-				0.002	0.00
AKAPI3	11214	84021331	+	Exônico		0,003	2,33
(1)120	200	chr10:61625808-		T . A .	G	0.004	2 20
ANK3	288	61625867	-	Intronico	Sense	0,004	2,30

AOAH	313	chr7:36343264-	-	Exônico		0,004	1.97
		36343309				- )	<u> </u>
ARHGEF10L	55160	chr1:17769433-	+	Exônico		0.002	5.07
		17769492				-,	-,.,
B3GNT5	84002	chr3:184455731-	+	Intrônico	Sense	0.001	2.21
		184455790				.,	_,
CALML4	91860	chr15:66273414-	_	Exônico		0.005	1.72
		66273473				- )	
CC2D1A	54862	chr19:13891701-	-	Intrônico	Antisense	0.002	1.88
		13891760				-,	-,
CCDC146	57639	chr7:76467266-	-	Intrônico	Antisense	0.003	4.03
		76467325				,	,
<i>CD44</i>	960	chr11:35184235-	-	Intrônico	Antisense	0,000	1,83
		35184294				,	,
COTL1	23406	chr16:83156791-	-	Exônico		0,004	1.89
		83156850				- )	y
CTSH	1512	chr15:77001264-	-	Exônico		0,002	2,91
		77001323				,	,
CTSH	1512	chr15:77007119-	-	Exônico		0.000	2.79
	-	77007178				- )	
CTSS	1520	chr1:147535553-	-	Exônico		0.000	3.07
		147535603				- )	- )
CTSS	1520	chr1:147540640-	-	Exônico		0.000	2.68
		147540699				- )	<u> </u>
CYB5R1	51706	chr1:199642932-	_	Exônico		0.001	2.34
		199642991				- )	9-
CYB5R1	51706	chr1:199641923-	-	Exônico		0,003	1,75
		199641982				- )	
CYBASC3	220002	chr11:60883741- 60883792	-	Intrônico	Sense	0,002	2,21
DAGLBETA	221955	chr7:6274325-6274384	+	Intrônico	Antisense	0,003	1,78

DDX3X	1654	chrX:40963266- 40963325	+	Exônico		0,002	2,77
DDX3X	1654	chrX:40963207- 40963266	+	Exônico		0,003	1,86
DDX3Y	8653	chrY:13465993- 13466052	+	Exônico		0,003	4,26
DHX38	9785	chr16:70696571- 70696630	+	Intrônico	Sense	0,000	2,11
EHBP1L1	254102	chr11:65104384- 65104443	-	Intrônico	Antisense	0,001	2,38
EHBP1L1	254102	chr11:65114552- 65114611	+	Exônico		0,000	1,91
ETV3	2117	chr1:153916337- 153916396	-	Exônico		0,002	1,78
FAM50A	9130	chrX:153324988- 153325047	+	Intrônico	Antisense	0,002	2,05
FGD6	55785	chr12:93977621- 93977680	-	Exônico		0,002	1,75
FGFR10P2	26127	chr12:27004715- 27004774	+	Exônico		0,000	1,97
FNI	2335	chr2:216086310- 216086369	+	Intrônico	Antisense	0,000	2,71
FRASI	80144	chr4:79383367- 79383426	+	Intrônico	Sense	0,004	1,85
НСК	3055	chr20:30140061- 30140108	+	Exônico		0,001	4,72
HVCN1	84329	chr12:109549467- 109549526	-	Exônico		0,003	1,83
ICA1	3382	chr7:7932382-7932433	-	Intrônico	Sense	0,000	1,86
IFI30	10437	chr19:18147121- 18147180	+	Exônico		0,001	5,43

IFI30	10437	chr19:18149840-	+	Exônico		0.000	4.35
•		18149899				.,	.,
IFI30	10437	chr19:18147121-	_	Intrônico	Antisense	0 004	2 12
11 100	10.07	18147180			1	0,001	_,
ILIORA	3587	chr11:117375219-	+	Exônico		0.005	2.61
	5507	117375278		Litoliico		0,005	2,01
ITGAX	3687	chr16:31301452-	+	Exônico		0.002	3 46
11 01111	2007	31301511				0,002	5,10
IAZE1	221895	chr7:27643617-	_	Exônico		0.001	1 95
<i>07121</i> 1	221075	27643676		LAOINCO		0,001	1,75
IHDM1D	80853	chr7:139238230-	_	Exônico		0.000	2 09
UIDMID	00025	139238289		Lixonico		0,000	2,09
LFNG	3955	chr7:2341212-2341271	+	Exônico		0,000	3,76
LRP1	4035	chr12:55892213-	+	Exônico		0.005	4 03
	4055	55892272		LX0IIIC0		0,005	7,05
LY96	23643	chr8:75103765-	+	Exônico		0.001	2 68
2170	25045	75103824		LAOINCO		0,001	2,00
MARCH1	55016	chr4:164805948-	_	Intergênico	Sense	0.002	3 77
Minterii.	22010	164806007		Intergenieo	561156	0,002	5,11
NCO43	8202	chr20:45714557-	_	Intrônico	Antisense	0.003	1 86
WCOM5	0202	45714616		mitomeo	7 museuse	0,005	1,00
NCO44	8031	chr10:51259279-	+	Exônico		0.003	2.03
WCOM	0051	51259338		LAOINCO		0,005	2,05
NR442	4929	chr2:157011025-	_	Intrônico	Sense	0.002	<i>A 4</i> 9
11114/12	4727	157011084	-	muomeo	Sense	0,002	<del>т,т</del> )
NRAA?	1070	chr2:157008881-	_	Exônico		0.002	3 51
11114/12	4727	157008940	-	LAOIIICO		0,002	5,51
NP117	1070	chr2:157012210-	+	Intrônico	Anticanca	0.004	2 1 5
1114/12	4929	157012269	I	muomeo	Antiscuse	0,004	2,15
ND / / 2	8012	chr9:99668743-	<b>_</b> L	Intrônico	Songo	0.001	5 50
ΙΝΛ4ΑΟ	0013	99668802	Ŧ	muomeo	Sense	0,001	5,52

NR4A3	8013	chr9:99675306- 99675365	+	Exônico		0,002	5,05
NR4A3	8013	chr9:99668564- 99668623	+	Exônico		0,000	4,45
OAS1	4938	chr12:111817181- 111817240	+	Exônico		0,002	3,80
PHLDA2	7262	chr11:2906272- 2906331	-	Exônico		0,002	2,61
PKM2	5315	chr15:70288031- 70288090	+	Intrônico	Antisense	0,000	1,81
PPIF	10105	chr10:80781110- 80781169	-	Intrônico	Antisense	0,001	2,36
PPIF	10105	chr10:80781110- 80781169	+	Intrônico	Sense	0,003	2,29
PPP1R15A	23645	chr19:54068439- 54068498	-	Intrônico	Antisense	0,002	1,82
RAD51L1	5890	chr14:67951712- 67951763	-	Intrônico	Antisense	0,001	1,77
RALGPS1	9649	chr9:126945696- 126945747	+	Intrônico	Antisense	0,000	2,70
RP5- 1022P6.2	56261	chr20:5491968- 5492027	-	Intrônico	Sense	0,002	1,81
RXRA	6256	chr9:134554548- 134554607	+	Exônico		0,000	4,04
S100A11	6282	chr1:148818292- 148818351	-	Exônico		0,003	2,91
S100A4	6275	chr1:150330268- 150330327	+	Intrônico	Antisense	0,001	1,71
SERPINA1	5265	chr14:93919199- 93919258	-	Exônico		0,001	5,47
SERPINA1	5265	chr14:93914544-	-	Exônico		0,001	4,55

#### 

SERPINA I	5265	chr14:93919199-	+	Intrônico	Antisense	0,001	2,51
		93919258					
SESTD1	91404	chr2:1/9802621-	+	Intrônico	Antisense	0,000	1,91
		179802672					
SGK1	6446	chr6:134532349-	-	Exônico		0,001	2,96
		134532408					
SGSH	6448	chr17:75797932-	-	Exônico		0,001	3,04
		75797991					
SLC11A2	4891	chr12:49679406-	_	Exônico		0,000	2,09
		49679465				,	
SLC37A2	219855	chr11:124464243-	+	Exônico		0,001	4,06
		124464302				,	,
<i>SLC43A2</i>	124935	chr17:1440846-	_	Exônico		0.000	3.02
		1440886					-,
SI C841	6546	chr2:40251076-	-	Exônico		0,003	2.01
520011		40251135					2,01
SNX20	124460	chr16:49264159-	-	Intrônico	Sense	0.000	1 88
5117120		49264218			Sense	0,000	1,00
THRS1	7057	chr15:37668391-	Т	Intrônico	Sanca	0.001	2 77
IIIDSI	1051	37668450	I	muomeo	Selise	0,001	2,11
TMRIM6	7000	chr12:48437217-	+	Intrônico	Sanca	0.001	1 05
TMDIWO	7009	48437268	I	muomeo	561156	0,001	1,05
TNEDCEID	7122	chr1:12202541-	Т	Evônico		0.000	4 2 1
ΙΝΓΚΟΓΙΟ	/155	12202600	+	Exonico		0,000	4,31
τς ρανια	91610	chr10:82267911-		Evânico		0.000	1.07
ISPAN14	81019	82267970	Ŧ	Exonico		0,000	1,97
VCAN	14(2)	chr5:82912058-		Exônico		0.000	5.00
VCAN	1462	82912117	+			0,000	5,26
VECEA	7400	chr6:43854201-		Exônico		0.002	2.26
VEGFA	7422	43854612	+			0,003	2,36

WIPI1	55062	chr17:63936613-	-	Evônico		0.000	2 28
		63936672		Exonico		0,000	2,38
WIPI1	55062	chr17:63929049-	-	Evônico		0.004	2 17
		63929108		EXOIIICO		0,004	2,17
ZSCAN10	84891	chr16:3082319-	-	Intrônico	Comeo	0.004	2.24
		3082378			Sense	0,004	2,24

<sup>1</sup> Nome do Gene locus para Intrônico ncRNA é o mesmo locus do gene codificador de proteína; Intergênico ncRNA é anotado com o nome do gene codificador de proteína mais próximo no cromossomo

<sup>2</sup> Coordenadas extraídas do Banco do Genoma Humano de Maio de 2004

<sup>3</sup> Significância mínima entre todas as validações sem uma amostra.

Os genes codificadores de proteína diferencialmente expressos foram relacionados com adesão celular, apoptose, transporte de íon e reguladores da transcrição (Tabela V). Seis genes, nomeados *ABCB7, EBF1, IFI30, IL10RA, NR4A2* e *VEGF*, foram anteriormente descritos na literatura como diferencialmente expressos em SMD-ARSA [20, 33, 81, 82]. Além disto, identificamos transcritos codificadores de proteína que ainda não foram descritos como alterados nas SMD-ARSA.

Processo Biológico <sup>1</sup>	Genes Diferencialmente Expressos em Células CD34 <sup>+</sup>					
apoptose	$\downarrow CYFIP2$ , $\downarrow MGC29506$ , $\uparrow PHLDA2$ , $\uparrow SGK1$ , $\downarrow SOCS2$ ,					
	$\downarrow$ <i>TNFRSF21</i> , $\uparrow$ <i>TNFRSF1B</i> , $\downarrow$ <i>UNC13B</i>					
coagulação sanguínea	$\downarrow$ SEC63, $\uparrow$ SERPINA1					
adesão celular	$\downarrow AEBP1, \downarrow COL5A1, \downarrow CYFIP2, \uparrow ITGAX, \downarrow JAM2, \downarrow LAMB2,$					
	$\downarrow$ LAMC1, $\downarrow$ PCDH9, $\downarrow$ PDZD2, $\downarrow$ ROBO1, $\uparrow$ VCAN					
ciclo celular	$\downarrow E2F7, \downarrow NASP, \downarrow UHRF1$					
diferenciação celular	$\downarrow NAVI, \downarrow ROBOI$					
proliferação celular	$\downarrow CD81, \downarrow DLG3, \downarrow FLT3, \uparrow LRP1, \downarrow NASP, \downarrow NPY, \uparrow S100A11,$					

**Tabela 5:** Processos biológicos dos genes diferencialmente expressos em células CD34<sup>+</sup> de pacientes SMD-ARSA.

	$\downarrow UHRF1, \uparrow VEGFA$
exocitose	$\downarrow NKD2, \downarrow RIMS3, \downarrow UNC13B$
resposta imune	$\downarrow$ CD19, $\uparrow$ CTSS, $\downarrow$ ERAP1, $\uparrow$ OAS1, $\downarrow$ PXDN
resposta inflamatória	$\uparrow AOAH, \downarrow C5, \downarrow BLNK, \uparrow LY96$
transporte	$\downarrow ABCB7$ , $\downarrow COL5A1$ , $\uparrow HVCN1$ , $\downarrow KCNE1L$ , $\downarrow KCNMB3$ ,
	$\downarrow$ <i>KCNMB4</i> , $\downarrow$ <i>NKD2</i> , $\downarrow$ <i>NPY</i> , $\uparrow$ <i>SGK1</i> , $\uparrow$ <i>SGSH</i> , $\uparrow$ <i>SLC8A1</i> ,
	$\uparrow$ SLC11A2, $\downarrow$ SLC12A2, $\uparrow$ SLC37A2, $\downarrow$ SLC39A8, $\uparrow$ SLC43A2
redução oxidativa	$\downarrow AASS, \uparrow CYB5R1, \uparrow IFI30, \downarrow PTGR1, \downarrow PXDN$
fosforilação de	$\downarrow$ <i>FLT3</i> , $\uparrow$ <i>HCK</i> , $\uparrow$ <i>SGK1</i>
aminoácido de proteína	
regulação da transcrição	$\downarrow$ <i>ECHDC2</i> , $\downarrow$ <i>AEBP1</i> , $\downarrow$ <i>AFF3</i> , $\downarrow$ <i>BACH2</i> , $\downarrow$ <i>CEP290</i> , $\downarrow$ <i>E2F7</i> ,
	$\downarrow EBF1$ , $\downarrow ELP2$ , $\uparrow ETV3$ , $\uparrow JAZF1$ , $\downarrow LOC400713$ , $\uparrow NCOA4$ ,
	$\uparrow$ NR4A2, $\uparrow$ NR4A3, $\downarrow$ POU2AF1, $\uparrow$ RXRA, $\downarrow$ TLE1, $\downarrow$ UHRF1,
	$\downarrow$ ZNF711, $\downarrow$ ZNF91
sinal transmissão	$\downarrow$ <i>ANK3</i> , $\uparrow$ <i>ARHGEF10L</i> , $\downarrow$ <i>C13orf18</i> , $\uparrow$ <i>NR4A2</i> , $\downarrow$ <i>PSD3</i> ,
	$\uparrow$ S100A11, $\downarrow$ TLE1, $\downarrow$ TNFRSF21
outro	$\uparrow AADACLI, \downarrow AADAT, \uparrow ACPP, \downarrow ACSM3, \uparrow ADCY7, \downarrow AHII,$
	$\downarrow$ ALS2CR4, $\downarrow$ AUTS2, $\downarrow$ C16orf67, $\downarrow$ C1orf21, $\downarrow$ C9orf58,
	$\uparrow CALML4,  \downarrow CCDC136,  \downarrow CLIP3,  \uparrow COLT1,  \uparrow CTSH,$
	$\downarrow CYYRI$ , $\uparrow DDX3X$ , $\uparrow DDX3Y$ , $\downarrow DPY19L2$ , $\downarrow EBF1$ ,
	$\uparrow EHBP1L1,  \downarrow FAAH,  \uparrow FGD6,  \uparrow FGFR1OP2,  \downarrow HHAT,$
	$\downarrow$ HS3ST1, $\uparrow$ IL10RA, $\uparrow$ JHDM1D, $\downarrow$ LAYN, $\uparrow$ LFNG, $\downarrow$ LRIG1,
	$\downarrow$ MMP11, $\downarrow$ MPDZ, $\downarrow$ MYO1D, $\downarrow$ MYO5C, $\downarrow$ NEIL1, $\downarrow$ PLS3,
	$\downarrow$ SH2D4B, $\downarrow$ SNORA71B, $\downarrow$ SPATS2, $\downarrow$ ST7OT1, $\downarrow$ TMEM217,
	$\downarrow$ <i>TOP2B</i> , $\uparrow$ <i>TSPAN14</i> , $\downarrow$ <i>TSPYL5</i> , $\downarrow$ <i>UQCC</i> , $\uparrow$ <i>WIP11</i>

<sup>1</sup> As categorias dos processos biológicos foram obtidos do banco de dados GOA. Genes (↑) hiperexpressos ou (↓) hipoexpressos nos pacientes SMD-ARSA em relação à indivíduos saudáveis. Análise das vias pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (Ingenuity® Systems) foi usada para identificar redes funcionais enriquecidas entre os transcritos codificadores de proteína diferencialmente expressos nas células CD34<sup>+</sup> de SMD-ARSA. Identificamos 11 redes funcionais relevantes que foram significantemente enriquecidas (p-value < 0,001) (Tabela VI). A Figura 10 mostra a rede de genes funcionais envolvidos com a função e o desenvolvimento do sistema hematopoético, resposta imune humoral e morfologia do tecido.

**Tabela 6:** Redes gênicas de transcritos codificadores de proteína diferencialmente expressos em células CD34<sup>+</sup> de SMD-ARSA, obtidos na análise de IPA.

Grupo	Maláaulas na Cuuna	Deserieão	- log10	Nº de				
Funcional	woleculas no Grupo	po Descrição		Moléculas				
Em células	Em células CD34 <sup>+</sup> de SMD-ARSA (FDR < 5% e alteração $\geq$ 1.7 vezes)							
	↓BACH2, Ck2, $\uparrow$ CREB5, $\uparrow$ CYBB, $\uparrow$ DUSP1, E2F7,							
	JINK1/2, $\downarrow$ JUN, $\downarrow$ LEF1,							
	↓MMP11, NADPH oxidase,	Doença Dermatológicas e Condições Doguça		24				
	$\downarrow$ NASP, $\uparrow$ NCOA4, NFkB		44					
	(complex), $\downarrow$ NFKBIZ, Notch,							
1	↑NR4A2, ↑PPIF, Proteasome,							
1	$\downarrow$ PXDN, Rxr, $\uparrow$ RXRA,	Genética Doença						
	↑S100A11, ↑SAT1,	Imunológica						
	$\uparrow$ SERPINA1, $\uparrow$ SLC11A2,							
	↑SMARCD3, Thyroid hormone							
	receptor, $\downarrow$ TLE1, Top2,							
	$\downarrow$ TOP2B, tyrosine kinase,							
	↓UHRF1, ↑VDR							
	Akt, ALP, $\downarrow$ ANK3, $\uparrow$ ASAH1,	Metabolismo de						
2	↓AUTS2, Caspase, ↑CTSS,	Lipídio, Transporte	32	19				
	Cytochrome c, ^DDX3X,	Molecular,						

	$\downarrow$ ELP2, Fgf, $\downarrow$ GRK4, Hsp70,	Bioquímica de		
	Hsp90, IFN Beta, Ikb, IKK, IL1,	Pequenas		
	IL10RA, Interferon alpha,	Moléculas		
	1TGAX, LDL, 1NR4A3,			
	OAS1, OSBPL6, SGK1,			
	$\uparrow$ SLC2A3, $\uparrow$ SNCA, $\uparrow$ SOCS2,			
	↑STAT, ↑STAT1, STAT5a/b,			
	↑TNFSF10, ↑TRAF1, Ubiquitin			
	14-3-3, ↓AEBP1, ↑ANXA5,			
	$\downarrow$ BLNK, $\downarrow$ CD19, $\downarrow$ CD72,			
	$\downarrow$ CD81, $\downarrow$ COL5A1, $\downarrow$ EBF1,	Desenvolvimento e		
	ERK, $\downarrow$ F5, $\downarrow$ FLT3, $\uparrow$ FYB, Ifn	Função do Sistema		
2	gamma, Ige, Integrin, ↑LY96,	Resposto Inumo	20	10
C	MAP2K1/2, Mek, $\downarrow$ MPDZ,	Humoral	29	19
	↑MVP, Nfat, ↑NLRP1, Pak,	Morfologia do		
	Pdgf, PLC gamma, Rac, Ras,	Tecido		
	Sphk, ↑SYN1, TCR, ↑THBS1,			
	↓TOM1L1, VAV, ↑VEGFA			
	↑AADACL1, $\downarrow$ AFF3, amino			
	acids, <b>^</b> ARHGEF10L, beta-			
	estradiol, CDH11, $\downarrow$ CLIP3,	Doença		
	CTSL1, <sup>†</sup> CYB5R1, CYCS,	Cardiovascular,		
	CYP17A1, $\downarrow$ DCLK2, $\downarrow$ DLG3,	Ciclo Celular,		
4	↑FGD6, glutamine, GRIN2C,	Desenvolvimento e	27	17
	HDL, HUNK, IRS1, KCNMA1,	Função do Sistema		
	↓KCNMB3, ↓KCNMB4,	Auditivo e		
	MIRN295, MIRN292, MPO,	Vestibular		
	MODED $\uparrow$ $\uparrow$ MVOE ND 4 A 1			
	WIPPEDZ, IMTOF, NR4AI,			

	↑RXRA, ↓STXBP1, ↑TSHZ3,			
	↓ZNF91			
5	ABL1, $\uparrow$ AP1S2, ATF4, BRPF3, $\downarrow$ CBX2, $\uparrow$ CPEB4, CREB1, $\downarrow$ EMCN, $\uparrow$ FAM110A, $\downarrow$ GCDH, GPR45, GRB2, $\downarrow$ GTF2IRD1, $\downarrow$ HLF, $\downarrow$ HS3ST1, $\uparrow$ JAZF1, MIRN202, MIRN24-1, NAP5, NEK8, NFS1, NR5A1, NRG1, $\downarrow$ PALLD, $\downarrow$ PLS3, $\uparrow$ RCBTB2, retinoic acid, $\downarrow$ RICH2, SCARF2, $\downarrow$ SEC63, SELL, $\uparrow$ SGSH, SNX8, TSKS, VPS13A	Expressão Gênica, Desenvolvimento do Tecido, Doença Cardiovascular	25	16
6	ABR, $\uparrow$ ATXN1, $\downarrow$ BTG3, C12ORF23, $\downarrow$ CCDC136, COIL, CPNE3, $\downarrow$ DIDO1, DST, DVL3, F2, Itga4-Itgb1, ITGB1, $\downarrow$ JAM2, $\downarrow$ KIAA1841, $\downarrow$ LRIG1, MIRN124, MIRN349, MIRN124-1, MIRN134, MIRN212, MIRN298, MYST3, $\downarrow$ PLEKHG4, $\downarrow$ PROSAPIP1, RAC1, RBMS1, $\downarrow$ RIMS3, $\uparrow$ SLC43A2, $\uparrow$ SNX22, $\downarrow$ TNFRSF21, TNRC4, VPS37C, WNK2, $\downarrow$ ZNF367	Organização Celular, Desenvolvimento e Função do Sistema Nervoso, Interação e Sinalização Célula-Célula	22	15
7	Actin, <sup>↑</sup> ADCY7, <sup>↑</sup> AKAP13, Calmodulin, <sup>↑</sup> CDKN1A, <sup>↑</sup> CLCN3, <sup>↑</sup> COTL1, Cyclin A,	Desenvolvimento e Função de Conectividade do	21	14

	↓CYFIP2, F Actin, FSH, GHRL,	Tecido, Morfologia		
	HCRTR1, Histone h4, Insulin,	do Tecido,		
	↑KCNQ1, ↑LRP1, ↓NPY,	Comportamento		
	NPY1R, NPY2R, Pka, ↑PLEC1,			
	PMCH, ↓PPP1R9A, ↑PSAP,			
	PYY, Ras homolog, $\downarrow$ RASAL2,			
	Rb, RNA polymerase II,			
	SMARCA4, STMN1, TTK,			
	TYMS, ↓UNC13B			
	Ap1, C5, Calpain, CaMKII,			
	↑CCL4, Creb, ERK1/2, ↓FAAH,			
	↑FOSL2, hCG, ↑HCK, Histone			
	h3, Igm, IL12, Jnk, LAMB2,	Doença Oftálmica, Movimento Celular, Doença Neurológica		
	↓LAMC1, Laminin, Mapk,			
8	↓MME, Mmp, P38 MAPK,		20	14
	PDGF BB, PI3K, ↑PIK3R5,			
	Pkc(s), PP2A, $\downarrow$ SLC12A2,			
	↑SLC8A1, Smad, Tgf beta,			
	↑TNFRSF1B, ↑VCAN, Vegf,			
	↓ZBTB10			
	↓AASS, ↓ABCB7, ABL1,			
	↓ACSM3, ASNS, CCNE2,			
	CSTB, <sup>↑</sup> CTSH, <sup>↑</sup> DPYD,	Câncer,		
	EIF4A1, EIF4E, FNG, IFI30,	Crescimento e		
9	↓ITM2C, JAK1, ↑JAKMIP1,	Proliferação	19	13
	↑LFNG, MSH6, MYC,	Celular, Ciclo		
	↓MYO5C, NOP5/NOP58,	Celular		
	NOTCH1, NOTCH2, ↑PHLDA2,			
	↓PLS3, RBL2, RBMS1,			

	SERTAD1, SFTPB, ↓SLC39A8,			
	SMARCA4, SMC4, STMN1,			
	TGFB1, TYMS			
	ACOT1, ↓AIF1L, BARD1,			
	BAZ1B, BRIP1, ↓CEP290,			
	CSF1, ↓DYNC2H1, DYNC2LI1,			
	↑ETV3, GHRH, HNF4A,			
	HSD17B4, HUNK,	Replicação		
10	↓MGC29506, MLH1, MSH3,	Recombinação e	19	13
10	MSH6, ↓MYO1D, ↑MYO1G,	Reparo do DNA,		
	↓NEIL1, PCNA, POLB,	Ciclo Celular		
	$\downarrow$ POU2AF1, progesterone,	Ciclo Celular		
	↓PSD3, RBP1, ↓RIOK1, RIPK3,			
	S100G, SMC1A, SPP1,			
	↑TSPAN14, ↓UQCC, XRCC1			
	3 BETA HSD, ABCD2, ↑AOAH,			
	ARPP-21, ↓COBL, ↑DDX3Y,			
	↑EHBP1L1, ↑FAM65B, GHRL,	Metabolismo de		
	HMGN3, HTT, IFITM1, IFNB1,	Carboidratos,		
	L-triiodothyronine, <sup>↑</sup> LMCD1,	Transporte		
11	LTBP2, MFGE8, MGP,	Molecular,	17	12
	MYBPH, ↓NPY, PACSIN1,	Bioquímica de		
	↓PDZD2, ↓ROBO1, SEPP1,	Pequenas		
	↑SLC16A5, SLC27A1, SLC2A4,	Moléculas		
	STMN1, TNF, TNNC1, ↓TPP2,			
	TRIP10, TUBB, UCP1, UCP3			
Genes (1)	hiperexpressos ou $(\downarrow)$ hipoexpress	sos em paciente SMI	D-ARSA v	s. indivíduos

saudáveis

NETWORK 3 - CD24+





**Figura 10:** Rede de genes codificadores de proteínas com expressão alterada em células  $CD34^+$  (p < 0,001). As principais funções dos genes desta rede estão relacionadas com desenvolvimento e função do sistema hematológico, resposta humoral e morfologia do tecido. A intensidade das cores dos genes indica o grau de hiperexpressão (vermelho) ou hipoexpressão (verde) em células  $CD34^+$  de pacientes SMD-ARSA em comparação com indivíduos normais. Genes em cinza não foram identificados diferencialmente expressos em nossos experimentos e em branco não estão presentes em nossa plataforma de microarranjo: ambos foram integrados computacionalmente pela rede gerada com base em evidências armazenadas no banco de dados do IPA, indicando relevância para esta rede.

Quatorze transcritos foram selecionados para a validação do ensaio de microarranjo por PCR em tempo real (qPCR), que estão relacionados mitocondria (*COX11*, GCDH ncRNA e PPIF ncRNA), homeostase do ferro (*ABCB7, MYO5C* e *SLC11A2*), importantes para o crescimento e diferenciação das células precursoras hematopoéticas (*FLT3* e *HCK*) e transcritos codificadores de proteína e o ncRNA do mesmo *locus*
simultaneamente modulados (*NR4A1*, NR4A1 ncRNA, *NR4A2*, NR4A2 ncRNA, *NR4A3* e NR4A3 ncRNA). A expressão relativa dos RNAs extraídos de células CD34<sup>+</sup> de 5 pacientes SMD-ARSA (n<sup>os</sup> 2-6; Tabela I) foram comparados com células CD34<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis. Os resultados da validação confirmaram os obtidos na análise de microarranjo (Figura 11).



**Figura 11:** Validação da expressão gênica em células CD34<sup>+</sup> por qPCR. Comparação da expressão gênica obtida por qPCR (vermelho) e em experimentos de microarranjos (azul), em células CD34<sup>+</sup> de pacientes SMD-ARSA em relação à média de expressão de indivíduos normais. Os valores positivos e negativos indicam genes hiper ou hipoexpressos em pacientes SMD-ARSA, respectivamente.

**3. Expressão gênica e protéica do transcrito candidato** *SLC11A2* em medula óssea total de pacientes com SMD.

As síndromes mielodisplásicas do subtipo anemia refratária com sideroblastos em anel são caracterizadas por possuírem acúmulo ferro nas mitocôndrias, que formam um anel ao redor do núcleo [12, 13]. O excesso de ferro nas células é potencialmente danoso, pois tem habilidade de catalisar a conversão de peróxido de hidrogênio em radicais livres tóxicos [83]. Expressão anormal de genes codificadores de proteínas mitocondriais envolvidas no metabolismo de ferro tem sido descritos em SMD-ARSA [20, 84].

O gene SLC11A2, também conhecido como transportador metal divalente (DMT1), é um importante transportador para a homeostase do ferro. O principal sítio de expressão da proteína DMT1 são as células precursoras hematopoéticas e está localizado na membrana celular participando do ciclo da transferrina, através dos endossomos acidificados, transportando o ferro reduzido (Fe<sup>+2</sup>) para dentro do citoplasma [85]. São descritas 4 isoformas de DMT1: isoforma 1 e isoforma 2, que diferem na porção N terminal por possuírem promotores diferentes no éxons 1 e 2 e cada isoforma pode se diferir na porção C terminal, possuindo ou não um elemento responsivo ao ferro (+IRE ou -IRE) [86]. A hiperexpressão de DMT1 em células MES23.5 (células de neuroblastoma-glima murina) aponta para o aumento intracelular de íons ferroso, os quais causam disfunção na mitocôndria, indicado pela diminuição do potencial de membrana da mitocôndria, geração de ROS e ativação de caspase-3, a qual leva à apoptose [87]. Neste estudo, o gene DMT1 foi encontrado 2.09 vezes mais expresso em células CD34<sup>+</sup> de pacientes com SMD-ARSA em relação aos indivíduos saudáveis (Tabela IV), portanto estudos mais detalhados da expressão gênica de DMT1 em pacientes com SMD poderá auxiliar no entendimento desta doença.

Corroborando os resultados encontrados no ensaio microarranjo em células  $CD34^+$  de pacientes SMD-ARSA, a expressão gênica de *DMT1* foi maior em células de medula óssea total de pacientes com SMD (24/34, p=0,0282) e pacientes com LMA (12/19) em relação a indivíduos normais (n=7), a análise foi realizada através de qPCR, usando os genes *GAPDH* e *HPRT* como controles endógenos e *Mann-Whitney test* entre os grupos (Figura 12).



**Figura 12:** Expressão gênica de *DMT1* em células de medula óssea total de pacientes com SMD e LMA. O gráfico de dispersão mostra que *DMT1* foi significantemente maior (p < 0,05) em pacientes com SMD (24/34) em relação aos indivíduos saudáveis e também apresentou maior expressão em pacientes com LMA (12/19). Cada ponto representa um paciente e a barra horizontal representa a mediana de cada grupo. A análise foi realizada através de qPCR, usando os genes *GAPDH* e *HPRT* como controles endógenos e *Mann-Whitney test* entre os grupos.

Entre os subgrupos de pacientes SMD, de acordo com a classificação FAB, DMT1 apresentou maior expressão nos pacientes AR (11/18 p=0,0402), AREB (5/7 p=0,0162) e AREB T (4/4 p=0,0396) (Figura 13A). Na classificação IPSS em pacientes de baixo risco/INT-1, DMT1 foi significantemente mais expresso em relação a indivíduos saudáveis (p=0,0347) (Figura 13B). E na classificação WHO2008, todos os subgrupos apresentaram expressão de DMT1 aumenta em relação aos indivíduos saudáveis, sendo significativo o subgrupo CRDM (8/12 p=0,0121) (Figura 13C).







**Figura 13:** Expressão gênica de *DMT1* nos subgrupos de SMD. (A) Expressão de *DMT1* foi aumentada em todos os subgrupos: AR (11/18 p < 0,05), ARSA (3/5), AREB (5/7 p < 0,05) e AREBT (4/4 p < 0,05), de acordo com a classificação FAB, em relação aos indivíduos saudáveis (CTRL). (B) Na classificação IPSS a expressão de *DMT1* também foi maior nos pacientes SMDs em relação a indivíduos saudáveis (baixo risco/INT-1 (20/28 p < 0,05) e alto risco/INT-2 (5/6)). (C) Na classificação WHO2008, todos os subgrupos apresentaram aumento de expressão de *DMT1*: CRDU (3/3), CRDM (8/12 p < 0,05), ARSA (3/5), AREB I (5/6) e AREB II (5/6), em relação aos indivíduos saudáveis.

Ensaio de imuno-histoquímica em cortes de medula óssea de pacientes com SMD revelou expressão protéica de DMT1 principalmente nas linhagens eritroblásticas (Figura 14A), foi realizado uma comparação semi-quantitativa entre as amostras, a maioria apresentaram grau elevado de expressão (≥ 4, grau máximo de 7), a maior expressão de DMT1 foi encontrada nos pacientes do subgrupo ARSA e AREB de acordo com a classificação FAB (Figura 14B).



**Figura 14:** Imuno-histoquímicada proteína DMT1 em medula óssea de pacientes com SMD. (A) A imuno-histoquímica de medula óssea de 14 pacientes com SMD revelou expressão protéica de DMT1 principalmente nas linhagens eritroblásticas, indicadas nas setas vermelhas (paciente ARSA, com aumento de 20x). (B) A análise semi-quantitativa demonstrou os maiores graus (intensidade + porcentagem de células marcadas) de DMT1 em pacientes do subgrupo ARSA e AREB, de acordo com a classificação FAB. Cada ponto representa um paciente e a barra horizontal representa a mediana de cada grupo.

## 4. Perfil de expressão dos transcritos codificadores e não codificadores em células estromais

Células estromais obtidas de 3 pacientes SMD-ARSA (n<sup>os</sup> 4-6; Tabela 1) foram comparadas com células estromais de indivíduos saudáveis usando a mesma plataforma customizada de oligoarranjos combinados de íntron-éxon, como também sua análise de

significância (Figura 15 e Figura 16). SAM combinado com validação sem uma amostra identificou 12 transcritos significantemente expressos (q-value  $\leq 0,05$  e variação > 1,7 vezes) (10 hiperexpressos e 2 hipoexpressos) (Figura 17), dos quais 3 foram ncRNAs (todos hiperexpressos em pacientes SMD-ARSA) (Tavela VII). O baixo número de transcritos diferencialmente expressos ocorreu devido à alta homogeneidade das células estromais dos pacientes e controles (coeficiente de correlação entre todos pacientes e controles das amostras de células estromais = 0,93, em contraste com 0,9 das células CD34<sup>+</sup>, p = 10<sup>-5</sup>).



**Figura 15:** Normalização das amostras de células estromais. (A) Intensidade de fluorescência pela freqüência de pontos (sondas) de cada amostra em duplo canal (Cy3 verde e Cy5 vermelho) antes da normalização. (B) Intensidade pela freqüência de pontos após normalização por *quantil*.



**Figura 16:** Gráfico do resultado da análise SAM – *Significance Analysis of Microarray* – mostrando o índice de significância observado entre pacientes e controles (*observerd score*, eixo y) versus os valores esperados aleatoriamente (*expected score*, eixo x), com 500 permutações. Em vermelho e em verde estão os transcritos selecionados significativamente hiperexpressos e hipoexpressos, respectivamente, com taxa de FDR de 5%.



**Figura 17:** Transcritos diferencialmente expressos em células estromais de pacientes SMD-ARSA e indivíduos saudáveis. Os pacientes foram agrupados de acordo com a correlação do perfil de expressão usando o método *Unweighted Pair-Group*, o qual resultou em dois grupos homogêneos: pacientes SMD-ARSA (3 colunas da direita) e indivíduos normais (4 colunas da esquerda). O nível de expressão de cada gene está representado pelo número de desvios padrão acima (vermelho) e abaixo (verde) dos valores médios para cada gene em todas as amostras.

Nome Locus Gene <sup>1</sup>	Locus ID	Coordenada do Alvo <sup>2</sup>	Fita Alvo	Tipo	Orientação em relação ao gene codificador de proteína	q value <sup>3</sup>	Vezes	
Hipoexpressos em SMD-ARSA								
SPINT2	10653	chr19:43474699- 43474758	+	Exônico		0,000	-2,43	
HLA-E	3133	chr6:30567339- 30567398	+	Exônico		0,007	-1,73	
Hiperexpressos em SMD-ARSA								
SEMA3A	10371	chr7:83235208- 83235267	-	Exônico		0,021	4,42	

Tabela 7: Transcritos com expressão alterada em células estromais de SMD-ARSA.

6650	chr16:529804-529859	+	Intrônico	Sense	0,000	4,35
2892	chrX:122063785-	т	Exônico		0,015	3,05
	122063829	I				
9696	chr1:16968607-	т	Intergênico	Sense	0,038	2,43
	16968658	т				
55214	chr3:191157346-		Exônico		0,019	2,41
	191157405	-				
23043	chr3:172263055-		Exônico		0,021	2,28
	172263114	-				
285704	chr5:98159978-	Ŧ	Exônico		0,044	2,02
	98160037	т				
6904	chr17:78399392-	Ŧ	Intrônico	Sense	0,042	1,97
	78399451	т				
3855	chr12:50917564-		Exônico		0,039	1,91
	50917621	Ŧ				
152579	chr4:53581096-		Exônico		0,000	1,84
	53581155	-				
	6650 2892 9696 55214 23043 285704 6904 3855 152579	6650       chr16:529804-529859         2892       chrX:122063785-         122063829       122063829         9696       chr1:16968607-         16968658       16968658         55214       chr3:191157346-         191157405       191157405         23043       chr3:172263055-         172263114       chr5:98159978-         285704       chr17:78399392-         6904       chr12:50917564-         3855       chr12:50917564-         50917621       chr4:53581096-         152579       chr4:53581096-	$\begin{array}{c} 6650 & \mathrm{chr16:529804-529859} & + \\ \\ 2892 & \frac{\mathrm{chrX:122063785-}}{122063829} & + \\ \\ 122063829 & + \\ 122063829 & + \\ \\ 122063829 & + \\ 16968658 & + \\ 16968658 & - \\ 16968658 & - \\ 191157405 & - \\ 191157405 & - \\ 191157405 & - \\ 191157405 & - \\ 191157405 & - \\ 191157405 & - \\ 191157405 & - \\ 191157405 & - \\ 191157405 & - \\ 191157405 & - \\ 191157405 & - \\ 191157405 & - \\ 191157405 & - \\ 10000000000000000000000000000000000$	6650 $chr16:529804-529859$ +Intrônico $2892$ $chrX:122063785-$ 122063829+ $Exônico$ $9696$ $chr1:16968607-$ 16968658+Intergênico $55214$ $chr3:191157346-$ 191157405- $Exônico$ $23043$ $chr3:172263055-$ 172263114- $Exônico$ $285704$ $chr5:98159978-$ 98160037+Exônico $6904$ $chr17:78399392-$ 7839451+Exônico $3855$ $chr12:50917564-$ 50917621+Exônico $152579$ $chr4:53581096-$ 53581155-Exônico	6650chr16:529804-529859+IntrônicoSense $2892$ $chrX:122063785-$ 122063829+ $Exônico$ $9696$ $chr1:16968607-$ 16968658+IntergênicoSense $55214$ $chr3:191157346-$ 191157405- $Exônico$ $23043$ $chr3:172263055-$ 172263114- $Exônico$ $285704$ $chr5:98159978-$ 98160037+ $Exônico$ $6904$ $chr17:78399392-$ 78399451+ $Exônico$ $3855$ $chr12:50917564-$ 50917621+ $Exônico$ $152579$ $chr4:53581096-$ 53581155- $Exônico$	6650       chr16:529804-529859       +       Intrônico       Sense       0,000         2892       chrX:122063785-       +       Exônico       0,015         122063829       +       Intergênico       Sense       0,038         9696       chr1:16968607-       +       Intergênico       Sense       0,038         55214       chr3:191157346-       +       Exônico       0,019         191157405       -       Exônico       0,019         23043       chr3:172263055-       -       Exônico       0,021         172263114       -       Exônico       0,021         285704       chr5:98159978-       +       Exônico       0,044         6904       chr17:78399392-       +       Intrônico       Sense       0,042         3855       chr12:50917564-       +       Intrônico       Sense       0,042         3855       chr4:53581096-       +       Exônico       0,039         152579       chr4:53581096-       -       Exônico       0,000

<sup>1</sup>Nome do Gene locus para Intrônico ncRNA é o mesmo locus do gene codificador de proteína; Intergênico ncRNA é anotado com o nome do gene codificador de proteína mais próximo no cromossomo

<sup>2</sup> Coordenadas extraídas do Banco do Genoma Humano de Maio de 2004

<sup>3</sup> Significância mínima entre todas as validações sem uma amostra.

O perfil de expressão dos transcritos significativos codificadores de proteína em células estromais de SMD-ARSA está relacionado com vários processos biológicos, como mobilidade celular, replicação do DNA, fosforilação de proteínas e transporte de proteínas (Tabela VIII)

Genes Diferencialmente Expressos em Células Estromais		
<i>↑SEMA3A</i>		
$\downarrow$ SPINT2		
$\uparrow KRT7$		
$\downarrow$ <i>HLA</i> -E		
↑ <i>SCFD2,</i> ↓GRIA3		
<i>↑LEPREL1</i>		
↓TNIK		

 Tabela 8: Processos biológicos dos genes diferencialmente expressos em células

 estromais de pacientes SMD-ARSA.

<sup>1</sup> As categorias dos processos biológicos foram obtidos do banco de dados GOA. Genes ( $\uparrow$ ) hiperexpressos ou ( $\downarrow$ ) hipoexpressos nos pacientes SMD-ARSA em relação à indivíduos saudáveis.

O IPA dos genes significativos diferencialmente expressos entre pacientes SMD-ARSA e indivíduos saudáveis (alteração  $\geq 1,7$  vezes; q-value  $\leq 0,15$  em todas as análises de validação sem uma amostra) identificou 2 redes funcionais enriquecidas significativas (p-value < 0,001) (Tabela IX). A rede funcional mais significativa está relacionada à morfologia celular, dano celular e doença neurológica (Figura 18). **Tabela 9:** Rede gênica dos transcritos codificadores diferencialmente expressos em células estromais de SMD-ARSA, obtidos na análise de IPA.

Grupo	Maléaulas no Cruno	Decerieão	-log10	N° de	
Funcional	Moleculas no Grupo	Descrição	(p alue)	Moléculas	
Em células estromais de SMD-ARSA (FDR <15% e alteração ≥1.7 vezes)					
	1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine,				
1	↑ALDH1A3, ALDH1B1, BCL2L14,				
	CARD14, CASP8AP2, CBFA2T2, <sup>↑</sup> CCL2,				
	DNTTIP1, DOK5, ERK, ↑GRIA3,	Mortologia da			
	↑HDAC9, IL1F9, LDL, ↑LIPG, MYEF2,	Célula, Dano	27	11	
	NCOR1, Neuropilin, NFkB (complex),	Celular, Doença Neurológica	27	11	
	NR3C1, ↑NRP1, Orm, P38 MAPK,				
	↑PLA2G4A, PLXND1, ↑RDBP, RELT,				
	Sema3, ↑SEMA3A, SEMA3B, SEMA3D,				
	SEMA3E, ↓SPINT2, ↑TFPI				
	ADCY9, ATF6, beta-estradiol, Ca2+,				
2	chondroitin sulfate B, CTSH, DEFB1,				
	↑EMR2, ESM1, FKBP7, ↑FKBP1A,	Metabolismo			
	GFM1, ↑GSTM3, HLA-DOA, ↑HLA-	de Carboidratos,			
	DPB1, ↓HLA-E, IFI30, IFNG, KDELR3,	Sinalização da	24	10	
	↑KRT7, KRT13, KRT81, LOXL1,	Célula, Transporte			
	MAPK1, MBTPS, ↑MBTPS2, METAP2,	Molecular			
	PPIH, RYR3, ↑SEMA3A, ↑SOLH, TGFB1,				
	↑TNIK, TTC28, WISP1				

Genes ( $\uparrow$ ) hiperexpressos ou ( $\downarrow$ ) hipoexpressos em paciente SMD-ARSA vs. indivíduos saudáveis.

NETWORK 1 - strong



@ 2000-2009 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 18: Rede de genes codificadores de proteínas com expressão alterada em células estromais (p < 0.001). As principais funções dos genes desta rede estão relacionadas com morfologia celular e doença neurológica. A intensidade das cores dos genes indica o grau de hiperexpressão (vermelho) ou hipoexpressão (verde) em células estromais de pacientes SMD-ARSA em comparação com indivíduos saudáveis. Genes em cinza não foram identificados diferencialmente expressos em nossos experimentos e em branco não estão nossa plataforma de microarranjos: ambos foram presentes em integrados computacionalmente pela rede gerada com base em evidências do banco de dados do IPA, indicando uma relevância para esta rede.

Quatro transcritos foram selecionados para validar o ensaio de microarranjo por qPCR, são transcritos relacionados com a estabilização da beta-tubilina no fuso mitótico (TBCD ncRNA), supressor tumoral e células neoplásicas hematopoéticas (*SPINT2* e *HLA-E*) e envolvido com angiogênese (*SEMA3A*). A expressão relativa dos RNAs extraídos de células estromais de 5 pacientes SMD-ARSA (n<sup>os</sup> 3-7; Tavela I) foram comparados com células estromais de indivíduos saudáveis. Todos os transcritos foram confirmados por qPCR (Figura 19).



**Figura 19:** Validação da expressão gênica em células estromais por qPCR. Comparação da expressão gênica obtida por qPCR (azul) e experimentos de microarranjos (vermelho), em células estromais de pacientes SMD-ARSA em relação à média de expressão em indivíduos saudáveis. Os valores positivos e negativos indicam hiper ou hipoexpressão em pacientes SMD-ARSA, respectivamente.

# 5. Expressão gênica e protéica do transcrito candidato *SEMA3A* em células estromais e de medula óssea total de pacientes com SMD

O microambiente anormal parece participar da progressão das leucemias por contribuírem para a expansão seletiva de clones malignos, favorecendo a proliferação das células neoplásicas e inibindo o crescimento das células progenitoras normais [88, 89]. Nas SMDs, as células estromais se mostraramdeficientes na capacidade de diferenciação e manutenção das células progenitoras hematopoéticas em relação às células estromais de indivíduos saudáveis [27, 90].

A proteína codificada por *SEMA3A* (Class 3 semaphorins), um membro da família das semaforinas, é secretada pelas células cancerígenas e está envolvido na migração celular, progressão de tumor e indução da apoptose concomitante com a expressão de p38MAPK e Fas [91-94]. No ensaio de microarranjo *SEMA3A* foi encontrado

4,42 vezes mais expresso em células estromais de pacientes SMD-ARSA em relação aos indivíduos saudáveis (Tavela VIII) e surpreendentemente, *SEMA3A* está presente em ambas as redes afetadas em células estromais de SMD-ARSA (Tabela IX), sugerindo a participação deste gene em diversas anormalidades implicadas na modificação do desenvolvimento das células hematopoéticas em SMDs.

Corroborando os dados encontrados no ensaio de microarranjo, a expressão gênica de *SEMA3A* foi significantemente maior em células de medula óssea total de pacientes com SMD (25/34, p=0,0304) e também foi significativo nos pacientes com LMA (17/19 p=0,0073) em relação a indivíduos normais (n=7). Análise foi realizada através de qPCR, usando os genes *GAPDH* e *HPRT* como controles endógenos e *Mann-Whitney test* entre os grupos (Figura 20).



**Figura 20:** Expressão gênica de *SEMA3A* em células de medula óssea total de pacientes com SMD e LMA. *SEMA3A* foi significantemente maior em pacientes com SMD (25/34 p < 0,05) e LMA (17/19 p < 0,01) em relação a indivíduos saudáveis (CTRL). Análise foi realizada através de qPCR, usando os genes *GAPDH* e *HPRT* como controles endógenos e *Mann-Whitney test* entre os grupos. Cada ponto representa um paciente e a barra horizontal representa a mediana de cada grupo.

Entre os subgrupos de pacientes SMD, de acordo com a classificação FAB, *SEMA3A* apresentou maior expressão nos pacientes AREB (6/7 p=0,0111) e AREBT (5/5 p=0,0303) (Figura 21A). Na classificação IPSS, *SEMA3A* foi significantemente mais expresso em ambos ossubgrupos, baixo risco/INT-1 (p=0,0418) e alto risco/INT-2

(p=0,014), em relação a indivíduos saudáveis (Figura 21B). E na classificação WHO2008, todos os subgrupos apresentaram expressão de *SEMA3A* aumentada em relação aos indivíduos saudáveis, sendo mais significativo o subgrupo AREB II (6/6 p=0,014) (Figura 21C).







**Figura 21:** Expressão gênica de *SEMA3A* nos subgrupos de SMD. (A) Expressão de *SEMA3A* foi maior em todos os subgrupos: AR (10/16), ARSA (4/6), AREB (6/7, p < 0,05) e AREB-T (5/5, p < 0,05), de acordo com a classificação FAB, em relação a indivíduos saudáveis (CTRL). (B) Na classificação IPSS a expressão de *SEMA3A* foi significantemente maior em ambos ossubgrupos (p < 0,05), baixo risco/INT-1 (21/28) e alto risco/INT-2 (6/6), em relação a indivíduos saudáveis (CTRL). (C) Na classificação WHO2008, todos os subgrupos apresentaram expressão de *SEMA3A* aumentada: CRDU (1/3), CRDM (9/12), ARSA (4/6), AREB I (6/7) e AREB II (6/6 p < 0,05), em relação aos indivíduos saudáveis (CTRL).

Análise protéica de SEMA3A em extratos totais de células estromais, utilizando anticorpo anti-SEMA3A (Santa Cruz Biotechnology), detectou três bandas uma correspondendo ao peso molecular de 125 kDa, representando proSEMA3A e as de 65 e 45 kDa, que correspondem as isoformas proteolíticas. Não houve diferença significativa entre pacientes SMD e indivíduos saudáveis (Figura 22A). Entretanto no concentrado de proteínas do sobrenadante de células estromais do paciente SMD-AR, a isoforma proteolítica de 45 kDa foi encontrada 2,4 vezes maisexpresso em relação ao sobrenadante do indivíduo saudável (Figura 22B). A quantificação do ensaio de WB foi realizada no programa UN-SCAN-IT gel™, a expressão da actina foi utilizada como normalizadora para os extratos totais.



**Figura 22**: Expressão protéica de SEMA3A em pacientes com SMD. (A) O ensaio de WB revelou 3 bandas: 125 kDa, representando proSEMA3A e as 65 e 45 kDa, que correspondem as isoformas proteolíticas. (B) A quantificação das bandas, feita pela média de pixel/área, não houve diferença significativa entre as amostras (C) O concentrado de proteínas do sobrenadante de células estromais revelou 2 bandas, a de 95kDa que corresponde a isoforma ativa e a proteolítica de 45kDa. (D) A quantificação demonstrou que no paciente SMD-AR, a isoforma proteolítica de 45 kDa está 2,4 vezes mais expresso em relação ao sobrenadante do indivíduo saudável (CTRL).

#### 6. Ensaios funcionais do gene selecionado SEMA3A

O ensaio de hiperexpressão de *SEMA3A* em células estromais HS27 foi realizado por transfecção de DNA plasmidial NSPI-CMV-MCS-myc-His vazio (NSPI) e o NSPI-CMV-MCS-myc-His contendo o gene SEMA3A fusionado ao epítopo Flag (SEMA3AFlag). As construções foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Ofra Kessler do Instituto de Tecnologia de Israel – Technio – Haifa, Israel. A eficiência da transfecção foi comprovada por qPCR com aumento da expressão gênica de SEMA3A (Figura 23A) nas células transfectadas com SEMA3AFlag e por WB utilizando anticorpo contra o

epítopo Flag, o aumento de SEMA3AFlag foi detectado no concentrado do sobrenadante, após 72 horas de transfecção (Figura 23B).



**Figura 23**: Hiperexpressão de SEMA3A em células HS27. (A) Ensaio de qPCR mostrou aumento de expressão gênica de SEMA3A, em células HS27 transfectadas com Sema3aFlag, em relação as células HS27 transfectadas com vetor vazio NSPI, após 72 horas de transfecção. (B) WB de concentrado de sobrenadante, utilizando anticorpo anti-Flag (Sigma), mostrou aumento de expressão protéica da isoforma proteolítica (65kDa) de SEMA3A em células transfectadas HS27\_Sema3aFlag.

Em ensaio de coculturade células estromais com células leucêmicas, a hiperexpressão de SEMA3A em células HS27 aumentou a adesão em todas as linhagens, principalmente nas células NB4, em relação àcocultura com células HS27-NSPI controle (Figura 24).



**Figura 24**: Adesão das células leucêmicas em cocultura com HS27 hiperexpressando SEMA3A. Células leucêmicas foram cultivadas em cocultura com células HS27 transfectadas com Sema3aFlag e NSPI como controle. Observou-se uma tendência de aumentar a porcentagem de células leucêmicas aderidas às células HS27-Sema3aFlag em relação às células HS27-NSPI, mais evidente nas células NB4.

A hiperexpressão de SEMA3A em HS27 alterou a diferenciação das células K562 e NB4 em ensaio de cocultura. Ambas as linhagens apresentaram diminuição da presença do antígeno CD11c, indicativo de monócito e CD14, de macrófago, após 72 horas de cocultura com HS27-Sema3aFlag, em relação ao controle (Figura 25A e B).



**Figura 25:** Diferenciação de células K562 e NB4 em cocultura com HS27. A hiperexpressão de SEMA3A em células HS27 colocadas em cocultura com células leucêmicas mieloides K562 e NB4 (A e B, respectivamente) diminuiu a presença dos antígenos de diferenciação, tanto de diferenciação para monócito (CD11c), quanto de diferenciação para macrófago (CD14).

Para verificar se a hiperexpressão de SEMA3A em células HS27 altera a taxa de apoptose das células leucêmicas, foi realizado ensaio de apoptose, sensibilizando previamente células U937 e NB4 com 100mM de ácido trans-retinoico (ATRA) por 24 horas, para induzir a morte celular, em seguida as células foram colocadas em cocultura com células HS27 transfectadas com SEMA3A. Após 24 horas, as células positivas para apoptose foram marcadas com anexina V. Houve uma pequena diminuição da taxa deapoptose das células NB4 (2%) e U937 (3%) em cocultura com HS27-Sema3aFlag (Figura 26A). O mesmo efeito foi verificado quando se adicionou proteína recombinante de Sema3a (100ng/ml, Sema3aFc) em cocultura de HS27 e células leucêmicas sem tratamento com ATRA (Figura 26B). Os ensaios foram realizados com duas transfecções independentes e dois experimentos independentes para U937 tratada com Sema3aFc.



**Figura 26:** Taxa de apoptose em hiperexpressão de SEMA3A. (A) Células HS27 hiperexpressando SEMA3A: células NB4 e U937 foram tratadas previamente com ATRA por 24 horas, e cocultivadas com células HS27 transfectadas com Sema3aFlag, para hiperexpressar SEMA3A e o vetor vazio NSPI como controle. Houve pequena diminuição da taxa de apoptose das células leucêmicas. (B) Células induzidas com Sema3aFc (R&D): células NB4, K562 e U937 foram colocas em cocultura com HS27 e 100ng/mL de Sema3aFc foram acrescentados ao meio por 24 horas. As taxas de apoptose também foram discretamente diminuídas.

### Discussão

### DISCUSSÃO

Neste estudo, foi determinado o perfil de expressão de transcritos codificadores e não codificadores (ncRNA) em células CD34<sup>+</sup> e estromais de pacientes com Síndrome Mielodisplásica do subgrupo anemia refratária com sideroblastos em anel (SMD-ARSA) e indivíduos saudáveis, utilizando oligoarranjo de 44.000 sequências combinando íntronéxon e critério estatístico estringente. Análises de vias de transcritos codificadores apontam para novas redes gênicas que estão alteradas em ambas as células CD34<sup>+</sup> e estromais de pacientes com SMD-ARSA.

A análise das vias de transcritos codificadores alterados em células CD34<sup>+</sup> de pacientes SMD-ARSA revelou uma rede de genes importantes para doenças hematológicas, como *BLNK, CD19, CD72, CD81, EBF1, F5, FLT3, LY96, MPDZ* e *THBS1.* A baixa expressão em SMD-ARSA de genes relacionados com via de sinalização de receptor de célula B (*BLNK, CD19* e *CD72*) e genes envolvidos com o desenvolvimento de linfócitos B, corrobora a hipótese que a SMD de baixo risco pode ser definida por defeitos em progenitores de células B [95].

A expressão anormal de genes codificadores de proteínas mitocondriais envolvidos com o metabolismo do ferro tem sido caracterizada em SMD-ARSA [20, 84]. O presente estudo encontrou modulação de três diferentes transcritos ncRNA localizados em *loci* de proteínas mitocondriais como amino adipate-semialdeído sintase (*AASS*), dehidrogenase glutaril-CoA (*GCDH*) e peptidilprolil isomerase F (*PPIF*) e sete transcritos codificadores de proteínas mitocondriais como aminoadipate aminotransferase (*AADAT*), *AASS*, cassete de ligação à ATP, subfamília B, membro 7 (*ABCB7*), acyl-CoA sintetase família de cadeia-média, membro 3 (*ACSM3*), citocromo c oxidase de montagem homólogo (*COX11*), citocromo b5 redutase 1 (*CYB5R1*) e enoyl CoA hidratase contendo domínio 2 (*ECHD2*). Corroborando nossos achados, a baixa expressão do transportador de ferro *ABCB7* tem sido descrita em células CD34<sup>+</sup> de pacientes com SMD-ARSA, indicando que a redução de *ABCB7* pode contribuir para a anormal homeostase do ferro mitocondrial [81]. Além disso, genes relacionados com a via da biosíntese do heme e transporte de transferrina (*PXDN* e *MYO5C*, respectivamente) foram hipoexpressos em células CD34<sup>+</sup> de SMD-ARSA. Estes genes diferencialmente expressos podem estar relacionados com o acúmulo de ferro observado em mitocôndrias de pacientes com ARSA.

O gene SLC11A2, também conhecido como transportador metal bivalente (DMT1) foi encontrado hiperexpresso em células CD34<sup>+</sup> de pacientes SMD-ARSA. A análise da expressão gênica em medula óssea total de 34 pacientes com SMD demonstrou que DMT1 está aumentado em todos os subgrupos, principalmente em pacientes de baixo risco/INT-1. Ensaios de imuno-histoquímica em medula óssea de pacientes com SMD corroboram os dados encontrados na análise de expressão gênica e demonstram que DMT1 se encontra mais expresso nas células eritroblásticas. A proteína DMT1 transporta o ferro reduzido (Fe<sup>2+</sup>) do endossomo para dentro da célula [85] e estudos descreveram que DMT1 transporta o ferro não ligado à transferrina (NTBI) diretamente do meio extracelular para o citoplasma de enterócitos [96, 97]. Os NTBIs têm sido encontrados em excesso em plasma de pacientes com SMD [98] e o ferro livre ativo citoplasmático (LCI) foi encontrado aumentado em células eritroides de SMDs [99]. O ferro reduzido livreé potencialmente danoso, pois tem habilidade de catalisar a conversão de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em radicais livres tóxicos altamente reativos (ROS). O aumento de ROS leva à instabilidade genômica promovendo a quebra do DNA fita dupla e erros no reparo [83]. Nas SMDs o estresse oxidativo contribui para a instabilidade genômica e consequentemente aumenta o risco de transformação para LMA. Além disto, nas células CD34<sup>+</sup> de pacientes SMD, a produção de ROS exerce um papel na patogênese da hematopoese ineficiente e causa danos à mitocôndria, aumentado a atividade apoptótica que são frequentemente observada em precursores hematopoéticos de pacientes SMD de baixo risco [100, 101], esses dados sugerem a participação ativa de DMT1 no estresse oxidativo nas SMDs (Figura 27).

Recentes estudos mostraram que a hipóxia aumenta o ferro intracelular através do aumento da expressão de *DMT1* [102]; em SMD há aumento da hipóxia, que estimula a produção de eritropoetina para a maturação dos precursores eritroides, devido à hematopoese ineficaz [103]. Portanto, esses dados indicam que a modulação de *DMT1* em SMD pode ocorrer devido à hipóxia.



Figura 27: A aquisição do ferro na célula precursora hematopoética saudável (A) e na célula precursora de SMD (B). (A) Na situação normal: A transferrina com duas moléculas de ferro férrico ( $Fe^{3+}$ ) se liga ao receptor de transferrinana membrana celular e este complexo induz o endossomo. O pH do endossomo diminui com a presença da bomba de próton e faz o complexo liberar o  $Fe^{3+}$ , o qual é reduzido para  $Fe^{2+}$  pela ferroredutase Steap3 (seis-transmembrana epitelial antígeno de próstata) e saem do endossomo via transportador DMT1. No citosol o  $Fe^{2+}$  livre pode ser direcionado para o núcleo, para a mitocôndria, onde participada cadeia respiratória e da biosíntese do heme, para regular proteínas regulatórias-ferro (IRP1 e IRP2), ou para ser armazenado na ferritina, onde será estocado e reutilizado. O endossomo com o complexo (transferrina + receptor de transferrina) e DMT1 são redirecionados para membrana e o pH neutro libera a transferrina do receptor [104]. O DMT1 também importa diretamente o NTBI (ferro não ligado à transferrina) para dentro da célula [96]. (B) Defeitos putativos causados na célula hematopoética de SMD devido ao aumento de DMT1: com o aumento da hipóxia e do ferro livre aumenta DMT1 na membrana da célula, aumentando o transporte do ferro livre e a endocitose do ferro férrico. O aumento do ferro contribui para a geração de ROS (espécies reativas de oxigênio) na mitocôndria, causando hematopoese deficiente e efeitos genotóxicos ao DNA nuclear e mitocondrial causando danos no reparo do DNA e mutações [101]. Além disto, na mitocôndria, o aumento de ROS causa peroxidação lipídica e abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, diminuindo o potencial de membrana, podendo levar à liberação do citocromo c, ativando caspases e consequentemente aumento da apoptose [105].

O microambiente contribui para a regulação da auto-renovação, manutenção, diferenciação, proliferação e dinâmica da apoptose das progenitoras hematopoéticas [106] e as células progenitoras CD34<sup>+</sup> são gravemente comprometidas em SMD pela composição de estímulos do microambiente [107]. Detecção de diferentes transcritos expressos em células estromais de SMD-ARSA sugere que os mesmos possam contribuir para a manutenção das células CD34<sup>+</sup>.

Surpreendentemente o gene *SEMA3A* está presente em ambas as redes gênicas afetadas e foi encontrado hiperexpresso em células estromais de pacientes SMD-ARSA. A análise da expressão gênica em medula óssea total demonstrou que *SEMA3A* está mais expresso em pacientes com SMD de alto risco e LMA, sugerindo sua participação na progressão da doença. A hiperexpressão de *SEMA3A* em células estromais HS27 alterou a adesão, apoptose e diferenciação das células leucêmicas cocultivadas, sugerindo que *SEMA3A* pode modular de maneira parácrina (interação células hematopoéticas – células estromais) as células progenitoras da medula óssea nas SMDs e LMAs. Proteína codificada por *SEMA3A* (Semaforina classe 3), um membro secretado da família semaforina, está

envolvido na guia axonal, organogênese, angiogênese, altamente expresso em várias células tumorais e tem sido recentemente demonstrado ser um importante determinante na sensibilidade de células leucêmicas para sinais de apoptose mediado por Fas (superfamília de receptor TNF, membro 6) e por p38MAPK (p38 proteína quinase mitogênica-ativada) [91-94]. Um dos mecanismos que contribuem para medula óssea hipercelular e citopenia do sangue periférico de pacientes em estágios iniciais de SMD é o significante aumento da apoptose das células hematopoéticas, devido à produção de citocinas pró-apoptóticas pelas células estromais e pelas células hematopoéticas [108], entretanto em SMD avançada e LMA, essas células produzem moléculas anti-apoptóticas, aumentando a porcentagem de blastos na medula [90]. A diminuição da diferenciação e apoptose das células leucêmicas cocultivadas com HS27 hiperexpressando *SEMA3A* sugere que este gene pode contribuir para a disfunção encontrada em SMD de alto risco e LMAs.

SEMA3A inibe efeitos angiogênicos em tumores, por competir pelo mesmo receptor do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA), a neutrofilina 1 (NRP1) [109]. VEGFA é um potente peptídeo angiogênico, que participa da progressão de diversos tumores [110]. Interessantemente, a hiperexpressão de VEGFA em células CD34<sup>+</sup> de SMD-ARSA foi confirmada em nosso microarranjo e a rede funcional mais significativaem células estromais demonstrou aumento do receptor NRP1. Nas SMDs a angiogênese é maior em pacientes de alto risco, juntamente com o aumento da expressão de VEGFA [111], este aumento também é observado em pacientes com LMA, sugerindo SEMA3A participar do controle da angiogênese via receptor NRP1 nas SMDs e LMAs.

O perfil de expressão de ncRNA de células  $CD34^+$  e estromais de SMD-ARSA foram claramente distintos dos obtidos de células  $CD34^+$  e estromais de indivíduos saudáveis, representando 30% e 25% do total de transcritos diferencialmente expressos em células  $CD34^+$  e estromais de pacientes SMD-ARSA, respectivamente. Atualmentehá evidências do papel biológico dos ncRNAs, especialmente aqueles transcritos vindos de íntrons conservados [51, 55].

Interessantemente, nossos resultados mostraram 13 transcritos diferencialmente expressos em células CD34<sup>+</sup> de pacientes SMD-ARSA, os quais foram alterados simultaneamente o transcrito codificador e o ncRNA do *locus* correspondente: 7 deles, ambos, ncRNA e o gene codificador foram simultaneamente hipoexpressos em SMD- ARSA, 5 foram hiperexpressos e um o ncRNA esteve hiperexpresso enquanto o gene codificador foi hipoexpresso. A expressão de ambos os pares, codificador de proteína e ncRNA do mesmo *locus*, sugere que este intrônico ncRNA pode atuar como fator de regulação *cis*, modulando a estabilidade e/ou o processo de transcrição da proteína correspondente, ou mesmo afetando os níveis e/ou quebra de isoformas de proteínas codificadas [47, 48]. Muitos RNAs codificadores de proteína instáveis de mamíferos contêm muitas adeninas e uracilas (AU-rich), elementos que determinam sua meia vida. Em células B de linfoma que exibem translocação cromossômica 14/18, um ncRNA antisense ncRNA bcl-2/high contribui para a hiperexpressão do gene *BCL2* provavelmente por mascarar regiões AU-rich presentes na 3'UTR do RNA codificador da proteína BCL-2 [48, 112].

Encontramos 3 genes alterados de receptor nuclear da subfamília 4, grupo A (NR4A1 e NR4A2 e NR4A3), conhecidos por estarem envolvidos na apoptose de célula T, desenvolvimento cerebral e doença vascular [113], e na SMD-ARSA todos mostraram hiperexpressão simultânea do codificador e do ncRNA, sugerindo que estes ncRNA também possam estar envolvidos no controle da expressão do codificador de proteína.

O cenário atual argumenta que a complexidade da expressão encontra-se temporariamente e espacialmente controlados por redes de ncRNAs. Até recentemente, o nível de complexidade da programação genética em organismos superiores foi subestimada, simplesmente apontando a proteínas como reguladores da expressão gênica. A visão atualizada do dogma central da biologia molecular destaca o papel de RNAbase na regulação, somado aos possíveis mecanismos de ação de ncRNAs intrônicos [48].

### Conclusão

### CONCLUSÃO

Neste estudo identificamos pela primeira vez redes funcionais desreguladas em pacientes com SMD-ARSA. Demonstramos que o transportador de ferro *DMT1* está mais expresso em medula óssea de pacientes com SMD de todos os subgrupos e sua expressão é mais evidente nas células eritroblásticas da medula óssea, estes dados sugerem a participação deste gene nas disfunções do ferro encontradas SMDs e que pode ser um alvo terapêutico.

A participação do estroma medular nas doenças hematológicas está cada vez mais evidente e o perfil diferencial destas células encontrado nas SMD-ARSA sustenta esses dados. A hiperexpressão de *SEMA3A* é maior em pacientes com SMD de alto risco e leucemias, e nossos ensaios funcionais demonstraram que *SEMA3A* está envolvido com aumento daadesão, diminuição da diferenciação e apoptose das células leucêmicas e age de maneira parácrina sobre as células precursoras.

A presença de transcritos intrônicos ncRNA diferencialmente expressos em células CD34<sup>+</sup> e estromais pode ser o início do entendimento do mecanismo molecular ainda não esclarecido da heterogeneidade que envolve as síndromes mielodisplásicas e sugere que ncRNA possam participardo desenvolvimento da doença. A caracterização destes transcritos ncRNA poderá contribuir para o melhor entendimento das SMD-ARSA, ou mesmo para o desenvolvimento de biomarcadores e alvos terapêuticos.

# Referências
1. List AF, Vardiman J, Issa JP, DeWitte TM: **Myelodysplastic syndromes.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004:297-317.

2. Mufti GJ: Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004, **17:**543-557.

3. Jadersten M, Malcovati L, Dybedal I, Della Porta MG, Invernizzi R, Montgomery SM, Pascutto C, Porwit A, Cazzola M, Hellstrom-Lindberg E: Erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor treatment associated with improved survival in myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 2008, **26**:3607-3613.

4. Khan AM, Komrokji RS, Haddad RY: **Myelodysplastic syndromes: what** a primary care physician needs to know. *Dis Mon* 2010, **56:**468-478.

5. Goldberg SL, Chen E, Corral M, Guo A, Mody-Patel N, Pecora AL, Laouri M: Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States Medicare beneficiaries. *J Clin Oncol* 2010, **28**:2847-2852.

6. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: **Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes.** *Br J Haematol* 1982, **51:**189-199.

7. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD: **The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.** *Blood* 2009, **114**:937-951.

8. Greenberg PL: Current therapeutic approaches for patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2010, **150**:131-143.

9. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, et al: International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997, **89**:2079-2088.

10. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Hildebrandt B, Kundgen A, Lubbert M, Kunzmann R, Giagounidis AA, 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* 2007, 110:4385-4395.

11. Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino E, Passamonti F, Arcaini L, Maffioli M, Bernasconi P, et al: **Prognostic factors and life** expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol* 2005, 23:7594-7603.

12. Aul C, Bowen DT, Yoshida Y: **Pathogenesis, etiology and epidemiology** of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 1998, **83:**71-86.

13. Cazzola M, Invernizzi R, Bergamaschi G, Levi S, Corsi B, Travaglino E, Rolandi V, Biasiotto G, Drysdale J, Arosio P: Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia. *Blood* 2003, **101**:1996-2000.

14. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, et al: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999, **286:**531-537.

15. Ebert BL, Galili N, Tamayo P, Bosco J, Mak R, Pretz J, Tanguturi S, Ladd-Acosta C, Stone R, Golub TR, Raza A: An erythroid differentiation signature predicts response to lenalidomide in myelodysplastic syndrome. *PLoS Med* 2008, **5:**e35.

16. Haferlach T, Kohlmann A, Wieczorek L, Basso G, Kronnie GT, Bene MC, De Vos J, Hernandez JM, Hofmann WK, Mills KI, et al: Clinical utility of microarraybased gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2010, **28**:2529-2537.

17. Mills KI, Kohlmann A, Williams PM, Wieczorek L, Liu WM, Li R, Wei W, Bowen DT, Loeffler H, Hernandez JM, et al: Microarray-based classifiers and prognosis models identify subgroups with distinct clinical outcomes and high risk of AML transformation of myelodysplastic syndrome. *Blood* 2009, **114**:1063-1072.

18. Bacher U, Kohlmann A, Haferlach T: Gene expression profiling for diagnosis and therapy in acute leukaemia and other haematologic malignancies. *Cancer Treat Rev* 2010, **36**:637-646.

 Pradhan A, Mijovic A, Mills K, Cumber P, Westwood N, Mufti GJ, Rassool
 FV: Differentially expressed genes in adult familial myelodysplastic syndromes. Leukemia 2004, 18:449-459. 20. Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis AA, Malcovati L, Porta MG, Killick S, Campbell LJ, Wang L, Langford CF, Fidler C, et al: Gene expression profiles of CD34+ cells in myelodysplastic syndromes: involvement of interferon-stimulated genes and correlation to FAB subtype and karyotype. *Blood* 2006, 108:337-345.

21. Hofmann WK, de Vos S, Komor M, Hoelzer D, Wachsman W, Koeffler HP: Characterization of gene expression of CD34+ cells from normal and myelodysplastic bone marrow. *Blood* 2002, 100:3553-3560.

22. Chen G, Zeng W, Miyazato A, Billings E, Maciejewski JP, Kajigaya S, Sloand EM, Young NS: Distinctive gene expression profiles of CD34 cells from patients with myelodysplastic syndrome characterized by specific chromosomal abnormalities. *Blood* 2004, **104**:4210-4218.

23. Sridhar K, Ross DT, Tibshirani R, Butte AJ, Greenberg PL: **Relationship of** differential gene expression profiles in CD34+ myelodysplastic syndrome marrow cells to disease subtype and progression. *Blood* 2009, 114:4847-4858.

24. Prall WC, Czibere A, Grall F, Spentzos D, Steidl U, Giagounidis AA, Kuendgen A, Otu H, Rong A, Libermann TA, et al: Differential gene expression of bone marrow-derived CD34+ cells is associated with survival of patients suffering from myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 2009, **89**:173-187.

25. Pellagatti A, Marafioti T, Paterson JC, Malcovati L, Della Porta MG, Jadersten M, Pushkaran B, George TI, Arber DA, Killick S, et al: Marked downregulation of the granulopoiesis regulator LEF1 is associated with disease progression in the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2009, 146:86-90.

26. Mayani H: Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia* 1996, **10**:1041-1047.

27. Tennant GB, Walsh V, Truran LN, Edwards P, Mills KI, Burnett AK: Abnormalities of adherent layers grown from bone marrow of patients with myelodysplasia. *Br J Haematol* 2000, 111:853-862.

28. Tauro S, Hepburn MD, Bowen DT, Pippard MJ: Assessment of stromal function, and its potential contribution to deregulation of hematopoiesis in the myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2001, **86**:1038-1045.

29. Flores-Figueroa E, Gutierrez-Espindola G, Montesinos JJ, Arana-Trejo RM, Mayani H: In vitro characterization of hematopoietic microenvironment cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2002, **26**:677-686.

30. Kastrinaki MC, Pontikoglou C, Klaus M, Stavroulaki E, Pavlaki K, Papadaki HA: Biologic Characteristics of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Myelodysplastic Syndromes. *Curr Stem Cell Res Ther* 2011, 6:122-130.

31. Roela RA, Carraro DM, Brentani HP, Kaiano JH, Simao DF, Guarnieiro R, Lopes LF, Borojevic R, Brentani MM: Gene stage-specific expression in the microenvironment of pediatric myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2007, **31**:579-589.

32. Borojevic R, Roela RA, Rodarte RS, Thiago LS, Pasini FS, Conti FM, Rossi MI, Reis LF, Lopes LF, Brentani MM: Bone marrow stroma in childhood myelodysplastic syndrome: composition, ability to sustain hematopoiesis in vitro, and altered gene expression. *Leuk Res* 2004, **28**:831-844.

33. Zeng W, Miyazato A, Chen G, Kajigaya S, Young NS, Maciejewski JP: Interferon-gamma-induced gene expression in CD34 cells: identification of pathologic cytokine-specific signature profiles. *Blood* 2006, **107**:167-175.

34. Esquela-Kerscher A, Slack FJ: Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006, **6**:259-269.

35. Li Z, Lu J, Sun M, Mi S, Zhang H, Luo RT, Chen P, Wang Y, Yan M, Qian Z, et al: Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:15535-15540.

36. Chen Q: Modeling Conserved Structure Patterns for Functional Noncoding RNA. *IEEE Trans Biomed Eng* 2011, **58**:1528-1533.

37. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE, et al: Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 2007, 447:799-816.

38. Conley AB, Miller WJ, Jordan IK: Human cis natural antisense transcripts initiated by transposable elements. *Trends Genet* 2008, **24:**53-56.

39. Turner AM, Morris KV: Controlling transcription with noncoding RNAs in mammalian cells. *Biotechniques* 2010, **48**:ix-xvi.

40. Royo H, Cavaille J: Non-coding RNAs in imprinted gene clusters. *Biol Cell* 2008, **100**:149-166.

41. Mancini-Dinardo D, Steele SJ, Levorse JM, Ingram RS, Tilghman SM: Elongation of the Kcnq1ot1 transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes. *Genes Dev* 2006, **20**:1268-1282.

42. Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Rivea Morales D, Thomas K, Presser A, Bernstein BE, van Oudenaarden A, et al: Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:11667-11672.

43. Ogawa Y, Sun BK, Lee JT: Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. *Science* 2008, **320**:1336-1341.

44. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS: Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol* 2010, 220:126-139.

45. Forrest AR, Abdelhamid RF, Carninci P: Annotating non-coding transcription using functional genomics strategies. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2009, 8:437-443.

46. Cawley S, Bekiranov S, Ng HH, Kapranov P, Sekinger EA, Kampa D, Piccolboni A, Sementchenko V, Cheng J, Williams AJ, et al: Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* 2004, 116:499-509.

47. Louro R, Nakaya HI, Amaral PP, Festa F, Sogayar MC, da Silva AM, Verjovski-Almeida S, Reis EM: Androgen responsive intronic non-coding RNAs. *BMC Biol* 2007, **5**:4.

48. Louro R, Smirnova AS, Verjovski-Almeida S: Long intronic noncoding RNA transcription: expression noise or expression choice? *Genomics* 2009, **93**:291-298.

49. Reis EM, Louro R, Nakaya HI, Verjovski-Almeida S: As antisense RNA gets intronic. *OMICS* 2005, 9:2-12.

50. Nakaya HI, Amaral PP, Louro R, Lopes A, Fachel AA, Moreira YB, El-Jundi TA, da Silva AM, Reis EM, Verjovski-Almeida S: Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. Genome Biol 2007, 8:R43.

51. Louro R, El-Jundi T, Nakaya HI, Reis EM, Verjovski-Almeida S: Conserved tissue expression signatures of intronic noncoding RNAs transcribed from human and mouse loci. *Genomics* 2008, **92:**18-25.

52. Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, Haussler D: **Ultraconserved elements in the human genome.** *Science* 2004, **304:**1321-1325.

53. Katzman S, Kern AD, Bejerano G, Fewell G, Fulton L, Wilson RK, Salama SR, Haussler D: Human genome ultraconserved elements are ultraselected. *Science* 2007, **317:**915.

54. Braconi C, Valeri N, Kogure T, Gasparini P, Huang N, Nuovo GJ, Terracciano L, Croce CM, Patel T: Expression and functional role of a transcribed noncoding RNA with an ultraconserved element in hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:786-791.

55. Wagner LA, Christensen CJ, Dunn DM, Spangrude GJ, Georgelas A, Kelley L, Esplin MS, Weiss RB, Gleich GJ: **EGO**, a novel, noncoding **RNA** gene, regulates eosinophil granule protein transcript expression. *Blood* 2007, **109**:5191-5198.

56. Aoki K, Harashima A, Sano M, Yokoi T, Nakamura S, Kibata M, Hirose T: A thymus-specific noncoding RNA, Thy-ncR1, is a cytoplasmic riboregulator of MFAP4 mRNA in immature T-cell lines. *BMC Mol Biol* 2010, 11:99.

57. Kapranov P, Cawley SE, Drenkow J, Bekiranov S, Strausberg RL, Fodor SP, Gingeras TR: Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22. *Science* 2002, 296:916-919.

58. Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA, Barciszewski J: A new frontier for molecular medicine: noncoding RNAs. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1756:65-75.

59. Kapranov P: Studying chromosome-wide transcriptional networks: new insights into disease? *Genome Med* 2009, 1:50.

60. Ishii N, Ozaki K, Sato H, Mizuno H, Saito S, Takahashi A, Miyamoto Y, Ikegawa S, Kamatani N, Hori M, et al: Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction. *J Hum Genet* 2006, **51**:1087-1099.

61. Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG, Higgs DR: Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet* 2003, **34:**157-165.

62. Zhang X, Lian Z, Padden C, Gerstein MB, Rozowsky J, Snyder M, Gingeras TR, Kapranov P, Weissman SM, Newburger PE: A myelopoiesis-associated regulatory intergenic noncoding RNA transcript within the human HOXA cluster. *Blood* 2009, 113:2526-2534.

63. Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE, Finch CE, St Laurent G, 3rd, Kenny PJ, Wahlestedt C: **Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase.** *Nat Med* 2008, **14**:723-730.

64. Lin R, Maeda S, Liu C, Karin M, Edgington TS: A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas. *Oncogene* 2007, **26**:851-858.

65. Yu W, Gius D, Onyango P, Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg AP, Cui H: Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature* 2008, 451:202-206.

66. Reis EM, Nakaya HI, Louro R, Canavez FC, Flatschart AV, Almeida GT, Egidio CM, Paquola AC, Machado AA, Festa F, et al: Antisense intronic non-coding **RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer.** *Oncogene* 2004, **23**:6684-6692.

67. Perez DS, Hoage TR, Pritchett JR, Ducharme-Smith AL, Halling ML, Ganapathiraju SC, Streng PS, Smith DI: Long, abundantly expressed non-coding transcripts are altered in cancer. *Hum Mol Genet* 2008, **17**:642-655.

68. Brito GC, Fachel AA, Vettore AL, Vignal GM, Gimba ER, Campos FS, Barcinski MA, Verjovski-Almeida S, Reis EM: Identification of protein-coding and intronic noncoding RNAs down-regulated in clear cell renal carcinoma. *Mol Carcinog* 2008, **47:**757-767.

69. Khochbin S, Lawrence JJ: An antisense RNA involved in p53 mRNA maturation in murine erythroleukemia cells induced to differentiate. *EMBO J* 1989, 8:4107-4114.

70. Krystal GW, Armstrong BC, Battey JF: N-myc mRNA forms an RNA-RNA duplex with endogenous antisense transcripts. *Mol Cell Biol* 1990, **10**:4180-4191.

71. Huarte M, Guttman M, Feldser D, Garber M, Koziol MJ, Kenzelmann-Broz D, Khalil AM, Zuk O, Amit I, Rabani M, et al: A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell* 2010, 142:409-419.

72. Rinn JL, Euskirchen G, Bertone P, Martone R, Luscombe NM, Hartman S, Harrison PM, Nelson FK, Miller P, Gerstein M, et al: **The transcriptional activity of human Chromosome 22.** *Genes Dev* 2003, **17:**529-540.

73. Kampa D, Cheng J, Kapranov P, Yamanaka M, Brubaker S, Cawley S, Drenkow J, Piccolboni A, Bekiranov S, Helt G, et al: Novel RNAs identified from an indepth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res* 2004, 14:331-342.

74. Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, et al: Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol* 2001, 19:342-347.

75. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:5116-5121.

76. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, et al: **Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.** *Nature* 2002, **415**:530-536.

77. Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG: Analysis of microarray data using Z score transformation. *J Mol Diagn* 2003, **5**:73-81.

78. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25:402-408.

79. Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, et al: Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol* 2002, **3**:research0062.

80. Papini-Terzi FS, Rocha FR, Vencio RZ, Oliveira KC, Felix Jde M, Vicentini R, Rocha Cde S, Simoes AC, Ulian EC, di Mauro SM, et al: **Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues.** *DNA Res* 2005, **12:**27-38.

81. Boultwood J, Pellagatti A, Nikpour M, Pushkaran B, Fidler C, Cattan H, Littlewood TJ, Malcovati L, Della Porta MG, Jadersten M, et al: The role of the iron transporter ABCB7 in refractory anemia with ring sideroblasts. *PLoS ONE* 2008, **3:**e1970.

82. Ueda M, Ota J, Yamashita Y, Choi YL, Ohki R, Wada T, Koinuma K, Kano Y, Ozawa K, Mano H: **DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome.** *Br J Haematol* 2003, **123**:288-296.

83. Ishizaka N, Saito K, Furuta K, Matsuzaki G, Koike K, Noiri E, Nagai R: Angiotensin II-induced regulation of the expression and localization of iron metabolism-related genes in the rat kidney. *Hypertens Res* 2007, **30**:195-202.

84. Ramirez JM, Schaad O, Durual S, Cossali D, Docquier M, Beris P, Descombes P, Matthes T: Growth differentiation factor 15 production is necessary for normal erythroid differentiation and is increased in refractory anaemia with ring-sideroblasts. *Br J Haematol* 2009, 144:251-262.

85. Canonne-Hergaux F, Zhang AS, Ponka P, Gros P: Characterization of the iron transporter DMT1 (NRAMP2/DCT1) in red blood cells of normal and anemic mk/mk mice. *Blood* 2001, **98**:3823-3830.

86. Garrick MD, Singleton ST, Vargas F, Kuo HC, Zhao L, Knopfel M, Davidson T, Costa M, Paradkar P, Roth JA, Garrick LM: **DMT1: which metals does it transport?** *Biol Res* 2006, **39:**79-85.

87. Zhang S, Wang J, Song N, Xie J, Jiang H: **Up-regulation of divalent metal transporter 1 is involved in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP(+))-induced apoptosis in MES23.5 cells.** *Neurobiol Aging* 2009, **30:**1466-1476.

88. Scadden DT: The stem-cell niche as an entity of action. Nature 2006,441:1075-1079.

89. Mayani H: Abnormal stromal cells in myelodysplastic syndromes: genomics presents further evidence. *Leuk Res* 2007, **31:**577-578.

90. Kitagawa M, Kurata M, Yamamoto K, Abe S, Suzuki S, Umeda S: Molecular pathology of myelodysplastic syndromes: Biology of medullary stromal and hematopoietic cells (Review). *Mol Med Report* 2011, **4**:591-596.

91. Bagnard D, Sainturet N, Meyronet D, Perraut M, Miehe M, Roussel G, Aunis D, Belin MF, Thomasset N: Differential MAP kinases activation during semaphorin3A-induced repulsion or apoptosis of neural progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 2004, 25:722-731.

92. Roche J, Boldog F, Robinson M, Robinson L, Varella-Garcia M, Swanton M, Waggoner B, Fishel R, Franklin W, Gemmill R, Drabkin H: **Distinct 3p21.3 deletions** in lung cancer and identification of a new human semaphorin. *Oncogene* 1996, 12:1289-1297.

93. Christensen CR, Klingelhofer J, Tarabykina S, Hulgaard EF, Kramerov D, Lukanidin E: Transcription of a novel mouse semaphorin gene, M-semaH, correlates with the metastatic ability of mouse tumor cell lines. *Cancer Res* 1998, **58**:1238-1244.

94. Moretti S, Procopio A, Lazzarini R, Rippo MR, Testa R, Marra M, Tamagnone L, Catalano A: Semaphorin3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis by promoting Fas translocation into lipid rafts. *Blood* 2008, 111:2290-2299.

95. Sternberg A, Killick S, Littlewood T, Hatton C, Peniket A, Seidl T, Soneji S, Leach J, Bowen D, Chapman C, et al: Evidence for reduced B-cell progenitors in early (low-risk) myelodysplastic syndrome. *Blood* 2005, 106:2982-2991.

96. Shindo M, Torimoto Y, Saito H, Motomura W, Ikuta K, Sato K, Fujimoto Y, Kohgo Y: Functional role of DMT1 in transferrin-independent iron uptake by human hepatocyte and hepatocellular carcinoma cell, HLF. *Hepatol Res* 2006, **35**:152-162.

97. Garrick MD, Garrick LM: Cellular iron transport. *Biochim Biophys Acta* 2009, **1790**:309-325.

98. Cortelezzi A, Cattaneo C, Cristiani S, Duca L, Sarina B, Deliliers GL, Fiorelli G, Cappellini MD: Non-transferrin-bound iron in myelodysplastic syndromes: a marker of ineffective erythropoiesis? *Hematol J* 2000, 1:153-158. 99. Ghoti H, Fibach E, Merkel D, Perez-Avraham G, Grisariu S, Rachmilewitz EA: Changes in parameters of oxidative stress and free iron biomarkers during treatment with deferasirox in iron-overloaded patients with myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2010, **95**:1433-1434.

100. Richardson DR, Lane DJ, Becker EM, Huang ML, Whitnall M, Rahmanto YS, Sheftel AD, Ponka P: Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107:10775-10782.

101. Gattermann N, Rachmilewitz EA: Iron overload in MDSpathophysiology, diagnosis, and complications. *Ann Hematol* 2011, **90:**1-10.

102. Wang D, Wang LH, Zhao Y, Lu YP, Zhu L: **Hypoxia regulates the ferrous iron uptake and reactive oxygen species level via divalent metal transporter 1 (DMT1) Exon1B by hypoxia-inducible factor-1.** *IUBMB Life* 2010, **62:**629-636.

103. Jacobs A, Janowska-Wieczorek A, Caro J, Bowen DT, Lewis T: Circulating erythropoietin in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1989, **73**:36-39.

104. Conrad ME, Umbreit JN: **Pathways of iron absorption**. *Blood Cells Mol Dis* 2002, **29:**336-355.

105. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE: Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009, 47:333-343.

106. Gupta P, Oegema TR, Jr., Brazil JJ, Dudek AZ, Slungaard A, Verfaillie CM: Structurally specific heparan sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche. *Blood* 1998, **92**:4641-4651.

107. Mundle SD: Lingering biologic dilemmas about the status of the progenitor cells in myelodysplasia. Arch Med Res 2003, 34:515-519.

108. Parker JE, Mufti GJ, Rasool F, Mijovic A, Devereux S, Pagliuca A: The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood* 2000, **96**:3932-3938.

109. Narazaki M, Tosato G: Ligand-induced internalization selects use of common receptor neuropilin-1 by VEGF165 and semaphorin3A. *Blood* 2006, 107:3892-3901.

110. Folkman J: Angiogenesis. Annu Rev Med 2006, 57:1-18.

111. Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, Carboni N, Cortelezzi A, Ferrucci PF, Buffa R, Lambertenghi-Deliliers G, Pezzella F: Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer* 1999, **81:**1398-1401.

112. Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, Nicolin A: **Post-transcriptional** regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol* 2003, 195:356-372.

113. Pols TW, Bonta PI, de Vries CJ: NR4A nuclear orphan receptors: protective in vascular disease? *Curr Opin Lipidol* 2007, 18:515-520.

# Anexos

### Parecer do Comitê de Ética

FACULDADE DE CIÊNCIAS MEDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP (0\_19) 3788-8936 FAX (0\_19) 3788-8925 (0\_19) 3788-8

CEP, 24/05/05. (Grupo I)

PARECER PROJETO: Nº 124/2005

### I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL E CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE NOVOS GENES ALVO E NOVAS TERAPÊUTICAS NAS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS E EM LINHAGENS LEUCÊMICAS" PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Terezinha Olalla Saad INSTITUIÇÃO: Centro de Hematologia e Hemoterapia - UNICAMP APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/05/2005 APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/05/06

### **II - OBJETIVOS**

O projeto visa a investigação funcional de novos genes alvo e novas terapêuticas nas mielodisplasias. Em vista de não haver modelos de células ou animais com mielodisplasias, para cumprimento de alguns objetivos serão utilizados linhagens leucêmicas. Analisar a regulação da expressão dos genes ARHGAP10, MASK em linhagens leucêmicas submetidas a diferentes agentes terapêuticos cultivadas em suspensão. Analisar a expressão diferencial dos genes ARHGAP10 e MASK em células de pacientes com SMDs cultivadas em suspensão e um ambiente de células estromais submetidas a diferentes terapias anti-tumorais. Huperxpressar MASK e ARHGAP10 em células hematopoéticas e verificar o perfil de expressão gênica por microarray. Induzir Ros e verificar a expressão de MASK, ARHFGAP10, formita, APAF e FLIP. Verificar a expressão das isofarmas de APAF e FLIP em células de medula óssea de pacientes com mielodisplasias e correlacionar com subgrupo e IPSS. Verificar a expressão de formita em células linfóides de pacientes com SMD e correlacionar com padrão de celularidade da medula óssea, grau de anemia, subgrupo de SMD e IPSS. Verificar a expressão de WT1 e PRAME e correlacionar com su'bgrupo de SMD e IPSS. Verificar o crescimento de colônias a partir de células precursoras de medula óssea de pacientes com SMD, em culturas de longa duração, submetidas a tratamento com diferentes drogas. Verificar a expressão de citocinas e moléculas de adesão em células aderente da cultura de longa duração. Verificar o perfil de expressão gênica de células CD34 + de pacientes co SMD, utilizando conjunto de genes conhecidos e transcritos humanos novos, imobilizados em lâminas de microarrays. Verificar a capacidade da célula dendritica de SMD, derivada de célula mononuclear, induzir imunogenicidade quando transformada com mRNA de WT1. Investigar mutações nos genes PTPN11, AML-1, FLT3 e GATA-1 e verificara se estas mutações se relacionam com subgrupo de SMD, IPSS, progressão para leucemia.

### **III - SUMÁRIO**

Para esse estudo participarão, no minimo, 34 pacientes, 23 mulheres, 11 homens, com idade entre 18 e 89 anos; sendo que pacientes novos admitidos no serviço serão convidados a participar. Serão incluídos no estudo os pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica, acompanhados no Ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp por pelo menos 6 meses. o diagnóstico será feito com base em critérios clínicos e morfológicos, utilizados no serviço há pelo menos 15 anos, com exclusão de causas como carências vitamínicas, doenças inflamatórias, infecciosas, hepáticas, renais, endócrinas e outras neoplasias. Os pacientes e controles que aceitarem voluntariamente em participar do estudo serão submetidos a coleta de 5ml de medula óssea para extração de mRNA; citometriade fluxo para análise de PRAME, formina em leucócitos e células dendríticas; cultivo de células estromais (apenas em pacientes com idade acima de 65 anos); tratamento *in vitro* de células em suspensão com agentes terapêuticos em ambiente de células estromais (apenas pacientes com idade acima de 65 anos); tratamento sertação das mutações.

### **IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

É um projeto bem elaborado, condizente com as normas do CEP e do CONEP. Apresenta bibliografia atualizada; o orçamento tem como fonte financiadora a FAPESP, no valor de R\$ 250.000,00. Após modificações o TCLE ficou adequado.

### **V-PARECER DO CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro

- 2 -

centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

### VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de maio de 2005.

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FCM / UNICAMP

- 3 -

## Artigo aceito para publicação



Manana D Baratti<sup>1</sup>, Yazi B Moreina<sup>2</sup>, Fabrola Traina<sup>1</sup>, Fernando F Costa<sup>1</sup>, Sieglo Wejovski-Almeida<sup>2</sup> and Sara T Olalla-Saadel

cells in refractory anemia with ringed sideroblasts

### Abstract

Background: Wyellodysplastic syndromen (WDW) are a group of closes hematological deorders characterized by eleffective hematopolesis with morphological evidence of manow cell dysplasia resulting in peripheral blood cytopenia. Microanay technology has permitted a refined high-throughput mapping of the transcriptional activity in the human genome hun-coding BNAs (hcRNAs) manucribed from intranic regions of genes are involved in a number of processes related to past-transcriptional cantrol of gene expression, and in the regulation of econ-slopping and intron retention. Characterutation of indRNAs in progenitor cells and strumal cells of MEIS patients could be strategic for understanding gene expression regulation in this disease.

Methods in this study, gene expression profiles of CD34\* cells of 4-patients with MD5 of reflactory anema with ringed sidelubilities (RAR5) subgroup and itrumal cells of 3 patients with MD5 RAR5 were compared with feathly individuals using 44 I combined intron-mon signarrays, which included probes for exerts of protein-coding genes, and for noncoding RMs stanscribed from intronic regions in other the sense or antivense strands. Real-time RT PCR was performed to confirm the expression levels of selected transmipts.

Results: in CD34\* cells of MD54AR5 patients, 216 generowerr significantly differentially expressed to value \$ 0811 in comparison to healthy individuals, of which 65 (30%) were non-coding transcripts. In stromal cells of MDS-RARS, 12 genes were significantly differentially expressed (q-value is 0.00) in companion to healthy individuals, of which 2.02%) were non-cuding bankright

Conclusions: These results demonstrated, for the first time, the differenced in RNA expression profile between MDS-RARS and healthy individuals, in CD341 calls and shomal cells, suggesting that incRNAs may play an important role during the development of mellodylplastic syndromes

### Background

Myslodysplastic syndromes (MDS) are a hoterogeneous group of cloud hematological disorders characterized by ineffective hematopoiesis with morphological evidence of marrow cell dysplasts resulting in peripheral blood sytopenta [1,2]. Low-risk MDS are characterized by profound anemia and transfusion dependency, and a relatively lose risk of progression to acute mychaid leakernia. Refractory anomia with ringed sideroblasts (RARS) is a

Department of Kney of Medican Scholar of Medical Linesce. of Herroritations Correct (Weivenits) of Company, 19583-073 Company, W stration is contable of this and their product

subtype of low-risk MDS in which an eacess of iron accumulates in the perimaclear mitechondria of ringed sidersblasts in the form of mitochondrial ferritin (MtF) [3-5]. However, the molecular genetic basis of RARS remains unknown.

Gene expression profile of homatopoietic progenitor cells of MDS patients demonstrates the involvement of genes related to differentiation and proliferation of progenitor cells [6-9]. Furthermore, there is increasing evidence that, in cretain hematological disorders, the marmy microanyirocasent is absornal, both in composition and function [10]. In MDS, the adherent layer of bone marrow stroma is defective in supporting normal

O STOR BALER of all transmissioned Builded Constant 102. This is an Open Accord and the distribution of the Grantes of the Constant BioMed Central Antiperior of the second seco Baratto et al. AMC Abstical Generatics 2010, 8:00 http://www.lacaroub.com/1755-0256/3/10

myslopoiesis in vitro, presenting a poor maintenance of larmatoposetic stem cells [11]. Alteration of strong components can be implicated in the modification of the development and apoptosis of hematopoietic cells [12,13].

The ENCODE project identified and characterized the transcriptionally active regions in 1% of the burson genome, and discribed that the majority (63%) of transcripts was of long non-coding RNAs (ncfR/As). These transcripts resided outside GENCODE aurorations, both in informit (40.9%) and intergenic (22.6%) regions [14]. Non-coding RNAs are innown to be modeed in different biological processes such as cell survival and regulation of cells-cycle progression [15], transcriptional or pose-transcriptional control of gene expression [16,17], genomic important [18] and biogenesis of mature RNAs through changes in the infron-exons structure of host genes [19-21]. In addition, inframe base being theories in the summers of thert in RNAs auch as microfiNAs [22] and small nucleolar RNAs [23].

Microarmy technology has permitted a refined highthroughput mapping of the transcriptional activity in the harman genome [24], and has revealed different exprestion signatures of long intrumic neBNAs in prostate, liver and kidney [25]. In addition, sets of long intrumic neBNAs were found to be responsive in physiological stimuli such as refined as an expensive in physiological stimuli such as refined as an expensive in physiological stimuli such as refined as a standard to be responsive in physiological stimuli such as refined as an expensive in physiological stimuli such as refined as an expensive in physiological stimuli were found to be responsive in physiological stimuli such as refined with syndrome [11], and cancer [32–3], Recently, a myelopoiesis-assectated regulatory intregemic non-coding RNA transcript has been described [36].

In the present study, expression profiles of CD34° and streamd cells of MDS-RARS patients and healthy individtals were characterized with a 44 k combined infroneuon aligoarcu platform, allowing the identification of protein-coding and infronce neRNA expression signatures in MDS-RARS patients.

### Methods

#### Patients

Bone marrow (BSB) camples were collected from 4 healthy subjects and 7 MDS patients, seen at the Hematology and Hemotherapy Canter. University of Campirus, All patients were diagnosed as IEARS according to the French-American British (FAB) closefleation and thit ner present chromosomial abnormalities: they received no growth factors or any facther MDS treatment. Patients' characteristics are shown in Table 1. All patients and healthy subjects previded informative document and the National Ethical Committee Board of School of Medical Science - University of Campinas approved the study.

### CD34+ cell and stromal cell selection

BM menomation cells were isolated by density-gradient centrifugation through Ficoll Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden); labeled with CD34 MicroBeads, and CD39° cells were isolated using MACS magnetic cell separation columns (Milterry) Biotoc, Monchengladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. The parity of CD34' cells was at least 92% as determined. by fluorescence-activated cell sorting (FACS), using anti-CD36 antibody (Caltag Laboratories, Burlingame, CA). The mononuclear cells without CD34\*, were plated outo Iscove's Dulbeccos (IMDM) (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal boxine serum and 10% horse serum. Supernatant with non-adherent cells was removed weekly and replaced with fresh mediam. When the monolayer was established (90% confluence) cells were trypninized and plated under the same conditions. After three re-platings, a homogeneous cell population was obtained and the strongl cells were evaluated by EACS for the absonce of CD54, CD45 and CD68 antigens.

#### **BNA** extraction

Total BNA was extracted with RNAspin Mini RNA bolation Kit (GE Hodthcore, Freiburg, Germany). The integrity of RNA was evaluated using Agilent 2100 Electrophonesis Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

### Microarray experiments and data analysis

Gene expression measurements were performed using #4 k intron-exon oligoarrays that were custom-designed by the group of Vertovski-Almeida and collaboratory [25] following Agilent Technologies probe specifications [37] and were printed by Agilent. The array comprises 60-mer alignmucleotide probes for 24,448 long (>500 m) neRNAs. mapping to 6,282 unique gene loci, with genemic coordinates of the Human Genome May 2004 Assembly (hg17). Non-coding RNAs probed on the array are transcribed from either intronic regions in both the sense or the antisense strands with respect to a protein-coding gree [25] or from 1.124 intergenic regions [38]. The array also comprises 11,220 probes for the respective protein-coding genes [25]. Gene locus name annotation for introme acRNA is that of the protein-coding gone of the same locus; intergenic ocRNA is annotated with the name of the nearest protein-coding gene in that chromosome. All annotations were updated as of December 2009. The array design is deposited in the GEO platform under accession number GPL9193.

For each individual sample, 150 ng tutal BNA was amplified and labeled with Cy3 or Cy5 using the Agdent Low RNA Input Phonessent Laseas Amplification kit PLUS, two-Color (Agitent Technologies) according to the Rearts et al. AMC Advicat Generates 2010, 8:00 http://www.boomedicentiat.com/1755-0254/3/30

Table 1: Characteristics of MDS-RARS patients at the time of BM collection.

Patients (n)	Gens expression analyses for CD34 <sup>+</sup> cells	Gens expression analyses for stromal cells	Age (years)	Gender	Hb (g/dL)	ANC Dr10 <sup>4</sup> 160	Flansien count (x10 <sup>2</sup> /uL)	Bill blants (%)	RSIN
	Array	Tions	12		7.2	8.55		2.	30
2.2	Array, oFCH	North	18	64	8.8	1.23	1.86		1.0
	Arrien, gPCR	OFCE	64	M.	12.4	6.95	110	2	14
	Array of Cit	Array of Cit	10		10.2	15.24	822	0	18
	QFCII.	Array of CR			6.7	8.51	12	0	22
	OPCH	Array of th	24	84	84	2.81	154		**
7	Norte	4708	15	141	6.1	# 25	216		27

He indicates hemoglobies, MiC, alteolute neutrophil account; RM, bone marrow, and RS, mig-sideroblam

manufacturer's recommendations. Labeled cBNA was hybridized using Gene Expression Hybridization Kit (Agilent).

Slides were washed and processed according to the Agilent Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis protocol (Version 5.5) and scanned on a GenePix 4000 B scanner (Molecular Devices, Samyyule, CA, USA). Fluorescence intensities were extracted using feature Estraction (EE) software (version 9.0) Agilenti. A gene was considered expressed I probe intensity was significantly (p. > 0.05) higher than the local background intensity, as calculated by the FE software. The software then applied local hackground subtraction and corrected unequal divi incorporation using the default LOWESS lincally weighted linear regression method. We have included into further stinistical analyses only those genes that were detected as expressed in all samples.

Data were normalized among the samples by quantile [39] using Spotfite DoctsionSite for Microarray Analysis (TIBCO Software Inc. Somerville, MA, USA), Genes differentially expressed between MDS-RARS and healthy individuals were identified with the Significance Analysis of Microarray (SAM) statistical approach [40] followed by a patient leave-one-out cross validation [41], which consisted in removing one sample and determining a new set of significantly altered genes using the remaining samples. This procedure was repeated for each sample, computing the statistical significance of each gene in the various leave-one-out datasets. For hoth CD34' and streamal cell samples we used the following parameters: two-class unpaired empenses, t-statistic, 500 permutations. We considered as significantly altered those genes that showed a minimum fold change of 1.7 and maximum take discovery rate (FDR) of 1% for CD34: or 5% for stromal cells among all leave-one-out datasets. Less strongent parameters (5% FDR for CD54' or 15% for stromal cellist were used for generating a list of altered genes that was upleaded to largenaity Pathways Analysis (IPA) software (logennity Systems, http://www.ingenuity.com) for identification of relevant altered gene networks. The software assigns statistical scores, taking into account the user's set of significant genes, network size, and the total number of realecules in ligenaity Knowledge Base. The network score is the negative logarithm of p-value, which reflects the probability of finding the focus moleculas in a given network by random charice. The identified network is then presented as a graph, evaluating the molecular relationships between gene products. The naw data has been deposited in Gene Expression Ornsibus (GEO) http://www.mchi.uhm.nih.gov/gen/ data/lase under accession number GSE18911.

Gene Outology Annotation (GOA) database <u>http:// www.elu.ac.uk/GOA/</u> was used for annotating the biological processes of proteins encoded by transcripts that were statistically significantly altered and showed of least 1.7 fold change in expression levels. Intronic non-coding RNA transcripts were annotated according to the corresponding protein-coding genes transcribed from the same *loci*. Functional descriptions of the genes were obtained from the Online Mendolian Inheritance in Man (OM1M) database of the National Center for Biotischnology Information (NCBI) <u>http://www.ncbi.nlm.aih.gov/</u>.

### Quantitative real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR was performed to confirm expression levels of expression data for selected transcripts. Revense transcription was performed using. Superscript 'III Reverse Transcriptase thremesges Life Technologiest Primers (Table 2) were designed using PRIMERS software (version 0.400 http://frodo.sei.mit.edu/primer.l/ with published sequence data from the NCRI datafase. For real-time PCR analysis, Power SYMR Green PCR Recetto et al. AMC Advanced Genoretes 2010, 8:00 http://www.lacomedicented.com/1755-0254/3/30 Page 4 of 15

### Table 2: Sequences of primers for real-time RT-PCR assays.

CONS.	anticence
SCEPGGCAGAAGAGGGCATACAF	SAGEGAGCEGACACTGTCTTTy
S'angjargettigpgtttige3'	Sigeriagramagteterag7
S GAGTTE ATOGECANAGGAAGT	SIGGAGE/CTEGG76GAT6/7AGF
S' and garget the population of the	Vagcascagtgtagcgcastg5
SACTOCAADCCOGCTATGACT	SXATOGAGECAGTEAGGAGATT
Fettergggtijtetginganing	Strigenigtgebuggigespit
VTECAGATACTOTECCACTGACCY	STCTGGATACATCAATGGAGGCT1
S'cergitangenering getter I	Fapg-grtgagaattettogga3'
refls	
TTCTGTTTCTCTGGGAGGTAGGAS	SICGATCAGCGAGGAAACAACTT
SWIEGIGGGGCATEATIGETY	FGAGTAGEFCCCTCCTTTTCCAF
*AGGUACCGAAAACAACGTC#	NUMBER
STOTIGE CTGGTGAGTGTGAGT	TAAGGTGTTGGAAGGGAGGAGT
PAGTETCEAGAGTGGCATGTGP	* AAAGGTAGGCAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG

Master Mix (Applied Biosystems) was used, according to the manufacturer's indituctions, and the reactions were run in a 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) for 40 cycles. Each sample measurement was performed in triplicate and a negative control. 'No Template Control', was included for each primer pair. Expression of transcripts was normalized to the HPRT endogenous gens, and the relative expression was calculated as  $2^{-0.027}$ , where  $\delta\Delta CT$  is the  $C_T$  value difference for each patient memilized by the average  $C_T$  difference of tamples from healthy wheets ( $\Delta\Delta CT$  method) [42].

### Results

### Protein-coding and non-coding transcripts expression profiles in CD34\* cells

CD34<sup>o</sup> cells obtained from 4 patients with MDS-RARS (nos. 1-4: Table 11 were compared with CD34<sup>o</sup> cells of healthy individuals using custom-designed combined intron-ston expression oligoarrays [25]. The oligoarray includes probes for protein-coding genes and for both sense and antisensis strands of ncRNAs, as described in the Methods. In order to reduce the effect of individual variability, thus promoting the identification of a robust game expression signature of MDS-RARS, Significance Analysis of Microarrays (SAM) [40] was combined with a patient leave-one-out cross validation [41]. A total of 216 significantly tq-value v 0.011 differentially expressed transcripts between MDS-RARS patients and healthy and valuals were identified (Figure 11, being 129 downregulated and 87 up regulated in MDS-RARS (Additional file 1). Interestingly, 66 differentially expressed transcripts were incRNAs, 32 down-regulated and 33 up-regulated (Table 3).

Differentially expressed protein-coding genes were related to cell adhesion, apoptosis, ion transport and regulation of transcription (Table 4). Six protein-coding genes, namely ABC 87, EBF1, IF10, IL10RA, NR4A2 and VEGP, have been previously shown in the literature as differentially expressed in MDS-RARS (7.43-45). In addition, we identified a number of protein-coding transcripts not previously described as altered in MDS-RARS.

Ingenuity Pathways Analysis (IPA) was used for identilying enriched gave networks and functions among the differentially transcribed protein-coding genra. We identified 11 relevant networks that were significantly C. La Colorado

and a state of the state of the

### Table 3: withits with significantly alweed CD34: sepression in HD3 ABAS patients in relation to healthy individuals.

Kana Lacat	tentD	schilde Frobe Counditable	Protocideated	Inte	Desertation relative to perform coding game	enter'	Feld Dange
Down explained	- MOSTARS						
MET	1000	BVISTORIA 200000	1.0	PROM.	10100	8.000	4.65
R.M	31555	EV104783406-87963409		rdow	Serve	8.000	0.10
KENES .	11065	du43041525-384(06)		1010	Series	0.004	40
1871	1100	policies and a second		in the spectrum to	Artista	6.001	4.00
LAPS		Photo 40441212-40481101	+	energies.	Among	8.000	4.95
TAPE .	7588	AND/DED EXME		FROM .	Series	1000	0.00
IN APP	1138	0401003040-1003031		Vitrom-	deline a	8.000	421
REPT/R	3010	eventarine-100798	10	Vergenic .	Sine	8.000	4.8
0576	11012	INTERVIENCE CHIMIN		1000	Antonio	8.000	4.4
MORE .	71966	dw1202mini 2027k14		vities .	Serve:	1000	4.00
1963	4411	INCOMPACT ADDRESS	14	neore.	Terrat .	101	4.14
11010	1011	AVT IN TAXABLE IT IS INCOME.		a segura	Served	104	0.0
161	100	put out tops add (1735	4	widowe.	Serve	8.000	4.0
MAR <sup>®</sup>	4110	(hr) 4214621 4574835		a provent	Serve	6.001	4.0
1111	1066	211214261-01020		TRUE .	Server	1001	2.00
PHER -	1042	PV10404D4L404001		Postanie.	Series	1000	4.85
NOTES .	wit	discount of the		Pringerse .	Same	1000	4.84
247.14	1120	(INCOMPLETATION (CONTENT)		reos	Seree	8.002	0.00
<b>FROM</b>	1000	INTERPRETATION OF		Vitrom.	Artonia	1.000	1.00
17579	1982	pr125793427-476488		Record.	Antoine	1000	4.00
1001	THEF	INCOMPANY CONTRACTOR		PROFE-	Serve	0.001	494
Gieffé	111	Description (1994)		1000	Antonia	9.000	1.00
PROF	11116	AVE AND THE WAY THAT		rim.	Among	1,000	-188
LANK	2111	DALE-01-01-01-01-01-01-01-01-01-01-01-01-01-		energies:	denormal land	1000	-189
677	4299	Printing and the		Yane.	Serve	8.000	100
PACE	11114	mex200811-4294811		TOTAL	Same	101	-100
00000	-	duranther-doubled		Dampers,	Series	100	0.82
401	100	example and		rares.	Antonia	8.001	10

Bacarto et al ANC Abstical Generaties 2010, \$100 http://www.bacartedi.entral.com/1705.0796/3/101



with diff balance that is in the second

Figure 1 Differentially expressed transcripts or CD34\* calls of MD5 FUARS persons and healthy individuals. The party induces the representer warm of 2116 approximately differentially expressed or representation of MD5 FUERS outcome of the statistic methodals. DAMI OD4 in the MD5 FUERS outcome of the Hubble end watch as an disgence period of H1 proteins and region of individual end watch as an disperiod according to the control to the Hubble end watch contents memory efficient of H2164. Called a statistic end watch contents memory and the segmetic 22164. Some campite borns satisfies were due to address and better and region of individual end watch contents memory and the AUS protect and the differentiation and the Unterpreter H2164. For the control and the different to the transcription optimum H2164. For the control of observations are then and the address and the Unterpreter H2164. For protect and the address prime is represented by the individual of the data data in the transcription of the data prime prime watch for the address and the prime of watch and the address and the data of the address prime of watch and address watch address and address and the M205 HUPS partners. A HUE (1917) general scene and and 100 data of 100 data of the partners.

enriched (p-value = 0.001) with genes belonging to the MDS-RARS gene expression signature in CD34° cells (Additional file 2). Figure 2 shows a gene network involved in hematological system development and function, burneral interance response and taske morphology.

Eight transcripts were chosen to validate microarray data by real-time RT-PCR, RNA extracted from CD38 cells from 5 MDS-RARS patients (nos. 2-fc Table I) was calculated as fold change compared with healthy controls. All transcripts were condirmed by real-time RZ-PCR (Figure 3).

### Protein coding and ncRNA transcript expression profiles in stromal cells

Stromal cells obtained from three MDS-RARS patients inos. 4-6: Table 1) were compared with stromal cells of healthy individuals using the same custom-designed combined intron-exon expression oligoarrays and significance analysis. SAM combined with patient leave-oneout cross validation aboutfied 12 significantly (q-value 4 0.05) differentially expressed genes (10 up-regulated and 2 down-regulated in stromal cells of MDS-RARS patients) (Figure 4: Additional file 3), of which 3 were ncRNAs (up-regulated in MDS-RARS patients) (Table 5). The low number of differentially expressed genes was mostly due to the high homogeneity of stromal cells from patients and dresses (correlation coefficient between all donor and patient stromal samples = 0.93, contrasted to 0.9 of CD34\* cells, p = 10.5). The signature expression profile of protein-coding transcripts in MDS-RARS stromal-cells revealed genes related to several biological processes, such as cell motility, DNA replication, protein amino acid phosphorylation and protein transport (Table 41.

Ingenuity Puthways Analysis (IPA) of strand cell genesis statistically differentially expressed between MDS-RARS patients and bealthy individuals (fold change > 1.7; qvalue < 0.15 in all patient leave-one-out cross-validation analyses) identified two significantly enriched gene rotworks (p-value < 0.001) (Additional file 2). The most siginficantly enriched gene network involves genes related to cell morphology, cellular compromise, and neurologiral disease (Figure 5).

Four transcripts were chosen to validate microarray data by real-time RT-PCR. RNA extracted from stromal cells from 5 MDS-BARS patients (nos. 3-2; Table 1) was used for validation studies; all transcripts were confirmed by real-time RT-PCR (Figure 6).

### Discussion

In this study, we used the 44 k intrum-exon oligizarray and stringent statistical criteria to determine the protein-coding and intronac non-ording transcript expression prolifes in CD34<sup>2</sup> and strong cells of MD5-EARS patients and healthy individuals. We herem validated the expression of a set of selected transcripts by real time RT-PCB in five MD5-RARS patients, however future confirmation in a larger group of MD5-RARS cases is warranted. Pathway analyses of differential protein-coding transcripts pointed to new genetic networks that are altered in both Barletto et al: 400C Meetical Generaties 2010, 8:00 http://www.bournedicentral.com/1705.0764/3/101

### Fage 9 of 15

### Table 4: Biological processes of genes differentially expressed in CD34<sup>-</sup> and stromal cells from MDS RARS patients.

	Genes Differentially Expressed				
Biological Process <sup>1</sup>	to CD14+ Cells	in Stronal Cells			
apogravita.	Levens, Landerson, Тенкола, Такит, Ladena, Limenaran, Tinangaran, Levenan	_			
blood chigulaton	LISECRA TARABANAN				
pilathesin	LAMPT, LODESK, LOWPE THORK LIAND, LIANE, LIANE, LIANE, LPCONG LPCZDD, LINDROF, THORN				
call cycle	LE2977, LANASE, LEANNER				
cell differentiation	Livery Ladeos	THEMANA			
cel motility	the second second second second second	Lineary			
off proliferation	LONG, LOUDE LIVER, TIMP, LAND, LAND, TOTOMER, LINNER, THEORY	2.00			
DNA replication		Taure			
waxyfeet.	LINED LINES LONCING				
(Internative Respectrice)	Lepre, Terrs, Lawer, Tonar, Leven	locad			
reflectional organization transport	THOMME LCS, LALIME TLYMP				
	Баксит Борски, Такони, Билини, Билини, Билини, Билод, Били Торин, Тэрэн Тэрски, Тэрстир, Барстир, Тэрстир, Барстир,	TSCFD2 JGRM			
petdation radia tion	Louiss Tomper Term: Lenner Lenner	TLEMELT			
protein-amino acid phosphorylation	Journ Treek Taske	LTNM.			
regulation of transmitten	LECHNOLD LARENT LAREN LAREND, LORENDO, LEDET LEDET, LELEN TOATET, LECENDOTES TRECOM, TREMES, TREMES, LECENDET, TREME, LEVERT, LEVENTE, LEMENT	-			
ritiki, processing	The second secon				
signal manufaction	LANKS, TANNARPIN, JCTENNA, THERE, LANDER TERMAN, LIDER, LIDERSER,				
atters	Такрась с Бакрал Тасля, Баскан в Тарсии, Баки, Баскан Бакила, Больмин, Больми Токлана, Босретон, Болик, Теорги Толик, Болико, Торлик, Торлик, Биликова, Баки, Билан, Теори, Тирингол, Бакра, Бакрал, Теория, Такран, Бакан, Телик, Болон Бакило, Бакра, Бакрал, Теория, Такран, Бисан, Бакран, Бакралик, Биликов, Бакрал, Бакрал, Бирал, Бисан, Бисан, Бакраник, Бакило, Бакрал, Бакрал, Бирал, Бисан, Бисан, Бакран, Бакраник, Бакило, Бакрал, Бакрал, Бирал, Бисан, Бисан, Бакраник, Бакило, Бакрал, Бакрал, Бирал, Тирина, Бирас, Такил	_			

The backgood processes categories were obtained from the GDA databasis. Genes (7) up-regulated or (1) down regulated in MDE-UNES patients with respect to healthy individuals.

CD34\* and stromal cells of MDS-RARS patients (Additional file 2).

MDS are characterized by bematopoietic insufficiency associated with cytopenia, leading to sovere merbidity in addition to increased triak of Jeskemia transformation (66). The exact stage of CD34' progenitor cells involved in the process of MDS and transformation to AML are still in debate. Bore marrow microenvironment contributes to regulate self-renewal, commitment, differentiation, prediferation and the dynamics of apoptose of hematopositic progenitors [47], and CD34' progenitor cells are known to be asseredy impacted in MDS by the composition of micro environmental stimuli [40]. Detection of differentially expressed transcripts in MDS RARS atronal cells suggests that these transcripts could contribute to maintain CD34° cells.

Pathways analysis of the set of protein-coding transcripts altered in CD34<sup>+</sup> cells of MDS-RARS patients revealed an amportant gene network related to hematological disease, including BLNK, CD19, CD72, CD81, EBF1, F5, FLT3, LY96, MPD2 and THBS1, Down-regulation in MDS-RARS of genes related to the B cell receptor Reports of all AMC Advanced Generatives 2010, \$100 http://www.docarinelicenteidicentei

### Page 10 of 15

NETWORK A. COMP. NLRP1 COL5A1 PLEON FST3 No at (lamily) In gan ANXAS TOMILI GINTING ...... CO. PROFESSION NAMES --Tarmento - Digente 1 VITERALINE the restaurant C.C.C. @ 2000 2000 Ingersally Generate, ins. All ApMe reserves.

Figure 2 Superlicantly entriched game network of protein coding games with altered expression of CD34 dollar represent to the team of a game of the team of a game of the team of team of the team of team

signaling publicay were found in our results (BLNK, CD19 and CD72), and the low expression of several genes involved in B lymphocyte development, corrobserate the hypothesis that early MDS can be defined by a B-cell progenitor defect [49].

The abnormal expression of genes encoding monochondrial proteins involved in iron metabolism has been characterized in MDS-BARS [7,50]. The present study found

3 different tacRNA transcripts with altered expression in the CD34<sup>+</sup> cells of MD5-RARS patients, from gene loci of mutochomitrial proteins (AASS, GCDH and PPR) and 6 modulated mitochomitrial protein-coding transcripts. In iddition, costroborning our findings, the down regulation of iron transporter ARCR7 has been described in CD34<sup>+</sup> cells of patients MD5-RARS, indicating that low ARCR7 levels would contribute to absorbial mitochondrial area Barletto et al: 400C Meetical Generaties 2010, 8:00 http://www.bournedicentral.com/1705.0764/3/101

#### Page 11 of 15



Figure 3 Validation of gene expression data of CD341 cells by read-time 87-PCB. Comparison of gene expression data of CD341 cells by PLPC block front area measured over expression spectra for expresions gene increase indicates a between PLD341 cells of the PLPC 4449 patients cells address indicates a between PLD341 cells of the PLPC 4449 patients cells address indicates a between and regarisment 44, many cell and indicate the up- or down regulation of expression in MD2-8449 patients in regarism for Aspension intentity indicates region and patients are regarisment for the approxime intentity indicates region and patients.

humeostasis [43]. Furthermore, genes related to heme hosynthesis pathway and transferrin trafficking (PSZN) and ADYOSC, respectively), were doner regulated in RDS-BARS CD34<sup>+</sup> cells. These differentially expressed genes could be related to the iron accumulation observed in mitochembra of BARS patients.

One of the mechanisms that contribute to hypercellular marrow and peripheral blood cytopenia of patients with early stage MDS is the significant increase in apoptosis of hermatopoietic cells [31]. The higher expression of Fas-Fasl, system found in MDS piece a role in inducing MDS bene marrow apoptosis and works in both an autocrime (hermatopoietic cell-hermatopoietic cell interaction) or paraceine (hermatopoietic cell-interaction) or paraceine (hermatopoietic cell-interaction) or paraceine (hermatopoietic cell-interaction) pattern [52]. The postein encoded by SEMASA (Class 3 semaphotins), a secreted member of the semaphorin family involved in aconal guidance, organogenesis, anglo-



Figure 4 Differentially expressed transcripts in strential cells of NDS-KNDS patients and healthy endividuals. The parent from the memory and the MNDS-KNDS patients compared to healthy individuals (AAM-FDR - Bits and health lange of 17). Each row expression array of the strength of patients of the strength transmission of the strength (AAM-FDR - Bits and health lange of 17). Each row expression array of the strength of the strength of the strength of the strength (AAM-FDR - Bits and health lange of 17). Each row expression array of the strength of the strength

genesis, and highly expressed in several tumor calls [53:54], has recently been demonstrated to be an important determinant of landomic cells semilitely to Fasmediated apoptosis signal [55]. Furthermore, Semi37A has already been described to act through different signaling pathways to control neural progenitor cell repaision activating Tek1/2 or apoptosis process involving p38MAPK [56]. Surpersingly, SEMA324 is present in both affected networks of MDS RARS streaml cells like Additional file 21, suggesting portacipation of this gene in diverse abnormalities implicated in the modification of hematoponetic cells development and apoptosis in MDS [12,13].

The non-coding expression profiles of CD34' and stromal cells of MDS-RARS were clearly distinct from

### Table 5: ncRNAs differentially expressed in strumal cells of MD5 BARS patients in comparison to healthy individuals.

Gene Locus Name <sup>1</sup>	Locus D	ocilità Probe Coordinates	Fraise Strand	Type	Orientation in relation to protein coding gene	g value*	Feld Change
Up-regulation	IN NOS AAR						
SOLH	4850	dv16.529804-529809		Wears.	Senar	0.060	4.40
CROCC	10.04	shi114368807-18868918		Intergretari	Some	0.018	2.40
TREED	0404	chell:reneway-renewast		monic	Same	6.642	100

<sup>1</sup> Gene locus name for interior softlin is that of the protein coding gene of the same locus, intergenci nutWA is annotated with the name of the nearest protein colling gene in that chromosome

1 Meanum significance among all patient Leave-one-out analyses

### Page 12 of 15

Bacarto et al: AMC Abstical Generatics 2010, 8-80 http://www.bacartodi.com/1705.0764/3/101



these obtained from CD34<sup>2</sup> and strongal cells of healthy controls, representing 20% and 25% of the total associat of differentially expressed genes in CD34<sup>2</sup> and strongal cells of MD5-8.A.R.S patients, respectively. Currently, eridence of the biological roles played by mRNA have increased, especially those transcribed from partially converved interons of protein-coding genes [57], Recently, ossimphil granule ontogeny (EGO) has been shown to involve an ncRNA expressed during IL-5 stimulation, whose function is to regulate MBP granule protein and EDN mRNA levels [58]. Interestingly, our results showed E1 differentially expressed noRNA transcripts in CD34<sup>5</sup> cells of MES-RARS patients for which there was a simultaneous change in expression of the protein coding genu in the corresponding locus: for 7 of them both the ncRNA and the protein coding gene were simultaneously driven regalated in MDS-RARS. 5 were up-regulated, and in one gene locus the TIN ncRNA was up-regulated whereas the protein-coding gene was driven-regulated. Expression of both, protein-coding and non-coding pairs in the units linear suggest that those intrumic ncRNAs may act upon cis regulatory factors, meshdating the stability and/or Barsetti er al: 600C Aberlical Genomics 2010, 8 00 http://www.bourneli.com/d.201.0764/3/101



#### Figure 6 Validation of gene expression data of stromal cets by real-time 87-PCR Comparison of gree expression shared from

manimum (FCI bits there and manage expression again familtering which grow mannes obtained at temperature densed with al-MOS with callest and of teather reducidatis. The poster and register field change external care agoing their regulation of recenting in AGS-SWC patients in relation to the expression of teather relation in accention.

processing of the corresponding protein-coding transcript, or even directly affecting the levels and/or the splicing of protein-coding isoforms [27,59]. We found 2 altered genes of the nuclear receptor subfamily 4, group A 0/8642 e NR4435, known to be involved in T-cell apoptosis, brain development, and vascular disease [60]; and both aboved a simultaneous up-regulation of the protein-coding and the ncRNA from the same locat in MDS-8.ARS, suggesting that these nellNAs could be invelved in the control of protein coding expression of this gene famity in MDS-8.ARS patients.

### Conclusion

The presence of introna: ncRNA transcripts differentially expressed in CD34<sup>2</sup> and stromal cells may shed light upon the not yet fully understood molecular mechaniams involved in the heterogeneity of myolodysplastic syndromes and suggest that ocRNAs may play a role during disease development. Characterization of those ncRNA transcripts would contribute to a better understanding of MD5-RARS, or even trowards the development of biomarkers and therapsutic targets.

### Additional material

Additional file 1 Transcepts with abund expression in CD34 rails of MD5 8495 Thinks on the resentantik Alastic Audio Reserve

Additional No. 2 The genetic research of protein-coding transcripts differently expressed of ADS-ADE patients in relation to beatthe archivelash, elimated frame IPA analysis The TV and ensured with Augree interest basis

Additional file 3 Transcripts with alternel expression in strenal cells at MDS-KARS. Per Els car Le second order Addite-Residential Reside

#### Computing interests

The pathony divisor that they have be conjusted a second

### Authors' contributions

Mills and the previous interception and takes the previous representative to the paper (TMP percentised the microsoftep and performing the study (T) technologic the papers. (TML, 100 and 100 considerable the microsofte Mills, 100), (W) and 1011, and the paper AV addition takes real and approved the boat matter previous.

#### Acknowledgements.

The author's reaction to end thank Rappells, furging to the Brighth watcom of the reaction for most Deviced a source approximative for the parameters of the reaction per The study was supported by the Division to Arepure a Netman dis President II will a flavor. SWITT and Constitute Has loss the Divisions reaction Devices in reacting on DMPs.

#### Author Dutals

"Department of Improve Medicine, Schwai of Medical Science, Permanising and Herroritonian Canter Lawrenian of Computer, 1988; 2000 Contenan, 54, Rodand Tepartments de Response, Permanent de Carriero, Verstandade de San Fauls, Statut de Carriero facilitation de Fault

Pecalived: 25 January 2010 Accepted: 15 July 2010 Published: 15 July 2018

#### Enformance:

- Can AF, Vanderwan L, man JP. Combins TW. Myelindysplastic specificery, neurosciego, ees Sp. Hermani Equ. Physics. 2019 (2017)
   Might Ga Philhologing, classification, and diagnosis of meetindysplastic.
- Math. Co. Redinationary, Constitution, and despination of impaction/parameter syndhesise. Inter-Prace Res Clin Con Assessment/ 2016; 12(512):557 Aug. C. docsen: UT. Versious 1: Pathogeneous, etailogy and epidemiology.
- Ag C, Rosen DT, Yonkita Y. Pathogenesis, etuilogy and epidemiology of reprint/puplicity, generatives, computing as 1978, 62-11 (8).
- Cappine M. Hennesen R. Breggemachtida, 1993 S. Zone B. Nevogilen E. Printerst V. Smorthe (E. Deprinter, Aroun P. Alfanchandral Remote expension for organized caffe from patients with outer illustic aprena. West 2003, 100: 100: 100: 2000.
- Gavernauer 2000, 1999 Serie Johnson Miller, Harryson III (Monol P), Sainy G, Tarry M, Sainteen T, Harryson J, Karry D, Harry D, Harry M, Sainteen T, Harryson J, Harryson JJ, H
- Prodition A, Millow A, Millo G. Carentari P. Weiters and N. Malto GLI Assessed TV Differentially expressed genes in adult familial implicitly splantic synchrones. Locatorics 2020. E8:440–455.
- Holigani A, Cassala R, Gosponento AA, Matervan L, Porta AG, Mitolo E, Garaphel L, Wang L, Langhort DY: Tribin E, mak: Gene expenditual profiles of CD344 - online experied/patients unredomment of enterferom-shirocated agrees and consistence to FAB addrpse and longeopages. *Trad.* 2005, 108, 157–195.
- Entropy 20, device 5 April 10, foreget 2, Machines 6, April 10, Conversion 20, April 10, and the PC Conversion of give expression of Q204 c cdb how resentation marked page with bone markow. (Near 2001, 100, 2013, 110)
- Church, Deng W, Westerner A, Wirrigh T, Malenerweik JP, Sagnaw S, Ehrand DH, Yugun HS, Betencture gene enamerical antibite of COM antibities patients with regularizations grant regulations characterized by specific characterization descentifications. 30:00(10):1108(1):0-42.15
- Maxim In Campinston and function of the homopolets, microsomerosen in human merical hydroma, Instance 1998, 100 pp. add.
- Towaret (B) Wattery Toward S, Cheands P. Wite Et Burner AV Abstraction of addressed layers grown from Some neurons of patients unity repetiodogalanas. In *Proceeding 2010*, 117:073–002.

Banarti et al AMC Abstical Generatics 2010, 8:00 http://www.balaniadi.evenal.com/1755.0754/b/101

- Tears 5 Hugham MD, dowers OT, Facework MI: Assessment of accord function, and its potential contribution to devegulation of he matopolesis in the machodysplicite syndromes. However, the man an hinter shat
- 10 C. Galarino Davis of St. House Trees Web. Frank Fickard Mayor H is alto characterigation of hematospecietic macroenvironment cells from patients with meriodysplastic sproteeme, 2004 for 2007 Sec. 71 start
- Brives E. Spectrospectro (K. Dotto A. Suspette R. Dispetter R. Dispett 14 developments and analysis of functional elements in 1% of the human pression by the DECODE prior property forum 2001 487 200 016 Groups MB, Share Ab, Continents A, Epstein M, Miller J, Gradader De
- UP, Know IV. A researching WAR is a partential marker of cell fate through nmory gland-development, The NARA and Solars DOR tage-res-
- 10 Gaudrate (A. Repai // Net-coding BMA regulators of BBA polymoram & monversphare, -the flow instituted are 2006, 2004 (2014) Charles in Lawrence (2) Are antinense FWA resolved in pN3 million
- maturation in musical orythesischemis with metacod to differentiate. and property distance in the
- Reprint Mill Parker FM, Harry R, Karcos GF, Die Fanchen of networking 14 BMAs in generating segretting, Construction (2011-106) 771-1733 Bei ND Trong CC, Lar ON Cheng K, Ler VK Churry JF, Berthadan
- and chieschergetion of a novel gene Self transcribed from the opposite strand of Figs. How York Carton 2005, 54 (1995) 1475 Encoded GW, Antonicing SC, Barbey JF, Nortage and NA Ramo an EDA 4004
- Regies with endogeneous antisense transcripts. All Col Rol 1940.
- Brown NY, Marshall DT. L'Owners M. Infrance warcoding PMAs and spheres. Perste Pare Ser 2008, 18:325
- our PD manufather the baseness and furction of
- microfifia, construction 2015, ES24647-4512 Inc. 1: Lend nucleolar Blake an abundant group of executing Blake 18
- with diverse cellular functions. Col 2012; 100(14): Hit 34 Recember F. Caulty W. Derminser J. Belleving, T. Handstorg, H. Finite W.
- IP Large scale transcriptional activity in streencoorner 21 and 22. Annual Math. 200, 10, 010
- National Constant Processing and a speech factor An Alexens W. Drawell 76. to later AV, the SH, Verynold Almenda S, Garcerne magging and expression analyses of Earner retries non-juding IBAs mined to see specific patterns and enrichment is genes rolided in regulation of severaption, Generic Rel 2007 (\$14)
- Casiley Schetcorow S. Ny 191 Kate attack to D. Senanger DA, Karapa D. . in altern A. Senteric Service V. Change. Williams Alter & Undersond stappanto of instruction factor farables also deres bureat res 21 and 22 points to eithespecial regulation of manageding Wilds, Car 2004, 198, 405-500
- Louise & Makayar HL Arrand 20, Easta F. Support MC, do Viron AM, Ver Kinnish I, Res DAL Andropes responsive intrasts, non-pailing 2006. No. 101 YOF WALKS
- Representate M. Recommender M.J. Prinners VA. Barragementals 1 & reason -Venter for entropy medicine numbering INAs. Routine Deeter Acc. 101.17Mcci-
- " Sharying chorecourse onde instocrational retiner in res--
- exagencies disease? Genoe US/2005 8-00 Subject C. Sacray, JR. Genolo D. Stappe & Appellin, Benet MG, Pagge DR. . frame-replace of industries RVA leading to gene identity and methylation as a rewel cause of history genetic diverse. The Const Distant and the low
- analy / New coding Mills in reprinted gave chatters. But Cal. 3324, 100 146-108
- NAW GALLED Departure & NAMESON SECTION & BALLED DATES AND CALIF. Epigenetis, silencing of General suppressor gene p.13 by its enterests ENA, Acces 2018 451 (12-20)
- Beis FM Franzes Hullaum R, Calman FC Franchart AV. Arrenta GT 15php 11 CA, Pagama AZ, Machada AA, Penta Y, etcar. Antesense intronis, non coding RNA levels correlate to the degree of turnor differentiation in
- prestate casces. Concepto 1814, 201864-0000 News DS, Name TR, Pettherr & Dasharese Sector AL, Padros DE, 14 Comparisons (C, Streng P). Sovie Di Long, abundanda expressed man-

coding to example are altered in cancer, inter Walfacture 2018.

- brits GC, fachel Ale, notices AL, stapper GAL Centre (R. Camp 15 Received Add, Second & Alexandrich, New FM, Edward Calling of proteincoding and terrorial researching Wile down regulated to clear cell renalization and Automatics 200 47:357-367 Diang 3 (Juni 2, Fachler C, Gerstein WK, Kasterley S, Statter M, Gerger
- 14 D. Consumed P. Namertan W. Tawfunger V. A repringerence associated regulatory intergena; noncoding INA transcript within the human HORA charles, Broar 2020 BLB 2028, 2114
- Paughets TH, Marc'H, Avenue AVE, Burchmeill J, Martins B optimized (10), Zeropic tel Schertor (10), Marcin (20), et al. Esperannen profiling, uning relationarings fabricated by smirik jut of genuic limitale symbolization. Not Protoctional 2011 198-143 (sel-
- Tang M., Stephen S. Drepton W., Taul Actinik, Chen W. Weldersecht C. antrant's, Happings P. Martini II, Mildde antergenhammer 18 Nammahan moncording IPUA databases. Across Note Hit 2008
- and P. Acompany 15 old at WUISSARY RA, Ask reconsideration endowed is for high density obgenacionate amay data based on nationer and base. *Beneformatics*, 2003, 190305-455 Tachin VG, Minterare R, Oscila Significance: analysis of microarmy.
- . applied to the sorting radiation response. An -healthcop/lectrid-2011 Marcheslag.
- user's Very Li, Da. H. controls days hill new 1D, mars 44, Naco W, Deservant story & Martin M. Ottower Al. et al Gave approximiter profiling predicts throat extreme of treast cancer. Nature 2002, 415(270-37
- 40 I and H4 to here gain TD Analysis of relative gains expression data using real-time gainstitutive FCR and the 2t Delta Data OTD Nethod. Abstrack 2001 (Host 2-408
- -Handsteined & Dellagation, Subgran 38, Funktioner & Feder C, Catt (Attracted 7) Materical (Cells Forta MC, tadwiner M, et al. Therefore of the non-transporter ABCD7 in refractory attents with ring indexaliants. STATE AND AND AN IAPO
- rede III, Cita A, Yornanti La Y, Qina W, Ohio P, Walls T, Komunis P, Kamp K, Cleave 4. Altern 11 ORA microarray analysis of stage progression machanism in repaindpipilatic spectromia. In Colombia 2008. 1210203-2367
- Seno W. Massenson, A. Cherrilly, Suppose 3, Warny HT, Warnerstein IP 41 Interfeter gavere enduced processpirates in CD 14 only identification of pathologic cytokine specific suprature profiles. (Jun) 1000 MEP-147-175
- the M. Supervall, Start, Specific & Marindrastian associated autoinvestarily. clinical and pathophysiologic concepts. For and Allow Selectory Parts
- Carriell Concerns I'll Grant of Contents? Designed & Weighte Cit. . Grocturally specific teparan sulfates support provides have International states and a multitude also state collection. Final 1000 92-00-01 00001
- Mandle ID Lorgering biologic discover about the status of the 48. property cells in Tydelphian. Activity 201, 345
- -Startburg A. Allek L. Littleweist F. Hatton C. Parmit A. Smid J. Song L. such ( Brown D. Orannia - Electric Evolution fat sectored & cell progenitors in early (low-risk) repole type lastic syndrome. Hus 1 (11) 104 116.2 (101)
- Parameter Int. (charalle), Cashad 5, Co. Descardure P. Mattree T. Growth differentiation-Partice 15 periduction in instantiary for resimal septimosi differentiation and to increased in mactory assertes with ong oderoblasts. It //Genate/2011 144111-00
- Partiel & Moth Grithwest P. Marrie A. Convenants, Replace & Thereford apaptors, phillenature, and the Tch2-related primetry in the designations synchronics and assure regarded bookeress secondary to MDL. (Pare 2013, 96-001) 1018
- Kingssouhl Terreports J. Taketsetts W. Tangeros T. Hindsevelt entries in Excelosition of the and the legend in bothe marrow cells demonstrating regelectropics, in since a list 12-446-450 Tenagtione (, ) are up to the Signating by remarkant receptors, cell
- guidance and layers). And, Set Aut 2010, 10(171-10) Consults PM, Tahagnamir I, Goodani I, Hennes growth: a tank wite
- 14. street for sensptores signaling, scentrettine 2006 & 155-5152

Bacatto et al: AMC Abolical Genoretics 2010, 8:30 http://www.datariadi.entral.com/1755-0294/3/33

- Wennert S, Prouriguo A, Satzpereis B, Epper 199. Terrat-J: Marcold Terrategoview Catalyses: A: Samaghoetics& Japaning condition has SCDMS: exactanced apagetesis by presenting file transformation entralignet radius, 50xx10005 EFE (2008) 2000.
  Barriell D, Samaget R, Mingheer TD Perture M, Alterter M, Personal G, Alexen D, Barriell M, Protessan ED, Mingheer ED, Personal G, Mingheer D, Barriell M, Personal C, Samaget R, Mingheer A, Alterter M, Personal G, Barriell D, Store MJ, Personal M, Berneritat MMP Research extremiser extension on the condition of the second englishes on a group mote of research programmer only. Intel CMM-research 2008 (2014) (2014)
  Donni A, Chand T, Stearan H, Pers DA, Magnete M, Mingheer M, Committed Material exploration of programmer condition of the second second model bases exploration of the second english (2014) (2014)
  Donni A, Chand T, Stearan H, Pers DA, Magnete M, Mingheer M, Committed M, Minghee M, Channel T, Stearan H, Pers DA, Magnete M, Mingheer M, Committed M, Magnete N, Channel Y, et al. (2014) (2014)
  Dogene M, Channel Y, Kingheer M, Berner MM, Barrad A, Barrier M, Mingheer M, Stearan M, Barrad M, Stearan M, Barrad M, Stearan M, Barrad M, Mingheer M, Stearan M, Barrad M, Stearan M, Barrad M, Barrad

  - regulates connepted granule protein transcript expression, Roser 2021
  - 1935 (14) 5 (14) (14) 5 (14) 5 (14) (14) 5
  - 48.50 Zella Polit TW, Parita PL, de State CJ NINA reachese orginare receptors 10. protective in vessilar disease? Car Onin (autor 2007 1811), 201

The publication history The one publication feature for the paper carlos accorded from: The classic best and a construction of the public property

### 01110-110-1105-0796-3-30

Che this service as Assists 4.4. Institutions of contrast-radius, and have colored bills on service and reflect and (2014) and a strange distance language assess with regard value of an ABC institution (resurse). (2015), \$10

Page 15 of 15

e charges
and Google Schular
for redshifted instances
() mathed Gress