#### 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

Baratti, Mariana Ozello, 1980 -

B213v 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.

1. Síndromes mielodisplásicas. 2. Análise em microsséries. 3. Células estromais. 4. Células tronco.

I. Saad, Sara Teresinha Olalla. II. Universidade Estadual

de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III.

Título.

#### 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
- 2. Prof(a). Dr(a). Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille
- 3. Prof(a). Dr(a). François Marie Artiguenave
- 4. Prof(a). Dr(a). Letícia Frohlich Archângelo
- 5. Prof(a). Dr(a). Rodrigo do Tocantins Calado 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.



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.



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 ≤ 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 ≤ 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

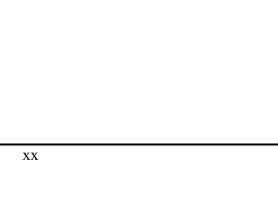


SMD de alto risco/INT-2 e em pacientes com leucemia mieloide aguda (n=19). Ensaios funcionais demonstraram que

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.



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 qPCR72
Tabela 4: Transcritos com expressão alterada em células CD34 <sup>+</sup> de SMD-ARSA 87
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 103
Tabela 7: Transcritos com expressão alterada em células estromais de SMD-ARSA.
117
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 1: Método de amplificação de cRNA e marcação com fluoróforos (Agilent
Technologies).
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. 69
Figura 3: Esquema do mapa do vetor
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 PE81
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)
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
Figura 7: Normalização das amostras RNAs de células CD34 <sup>+</sup> . (A) Intensidade de
fluorescência pela frequência 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 <i>quantil</i> 85
Figura 8: Gráfico do resultado da análise SAM – Significance Analysis of Microarray
- mostrando o índice de significância observado entre pacientes e controles (observero
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%
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 <i>Unweighted Pair-Group</i> , 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
Figura 10: Rede de genes codificadores de proteínas com expressão alterada em
células $\mathrm{CD34}^+$ (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 <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 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
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



um paciente e a barra horizontal representa a mediana de cada grupo. A análise fo
realizada através de qPCR, usando os genes GAPDH e HPRT como controles endógenos e
Mann-Whitney test entre os grupos.
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
$(5/7~p \le 0.05)$ e AREBT $(4/4~p \le 0.05)$ , de acordo com a classificação FAB, em relação aos $(5/7~p \le 0.05)$
indivíduos saudáveis (CTRL). (B) Na classificação IPSS a expressão de <i>DMT1</i> também for
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 $DMTI$ : 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 113
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
Figura 15: Normalização das amostras de células estromais. (A) Intensidade de
fluorescência pela frequência de pontos (sondas) de cada amostra em duplo canal (Cy3
verde e Cy5 vermelho) antes da normalização. (B) Intensidade pela frequência de pontos
após normalização por <i>quantil</i>
Figura 16: Gráfico do resultado da análise SAM - Significance Analysis o
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%

apresentou maior expressão em pacientes com LMA (12/19). Cada ponto representa

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 q	ua
resultou em dois grupos homogêneos: pacientes SMD-ARSA (3 colunas da direita	) (
indivíduos normais (4 colunas da esquerda). O nível de expressão de cada gene e	está
representado pelo número de desvios padrão acima (vermelho) e abaixo (verde) dos valo	res
médios para cada gene em todas as amostras1	117

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 presentes em nossa plataforma de microarranjos: ambos foram integrados computacionalmente pela rede gerada com base em evidências do banco de dados do IPA, indicando uma relevância para esta rede.

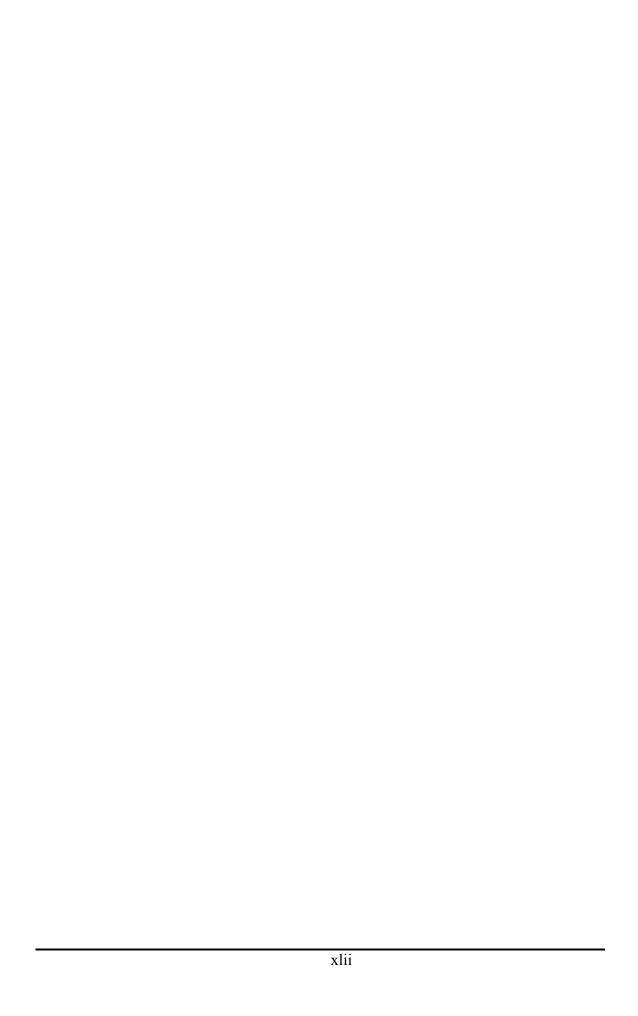
Figura 21: Expressão gênica de *SEMA3A* nos subgrupos de SMD. (A) Expressão de *SEMA3A* foi maior em todos os subgrupos: AR (10/16), ARSA (4/6), AREB (6/7, p < 0,05) e AREB-T (5/5, p < 0,05), de acordo com a classificação FAB, em relação a indivíduos saudáveis (CTRL). (B) Na classificação IPSS a expressão 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)
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)
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
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
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<sup>3+</sup>, o qual é reduzido para Fe<sup>2+</sup> pela ferroredutase Steap3 (seis-transmembrana epitelial antígeno de próstata) e saem do endossomo via transportador DMT1. No citosol o Fe<sup>2+</sup> 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 



# SUMÁRIO

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	57
MATERIAL E MÉTODOS	61
1. Pacientes	61
2. Separação das células CD34 <sup>+</sup> e das células estromai	s66
3. Citometria de Fluxo (FACS)	67
4. Extração do RNA	67
5. Experimento de Microarranjo	68
6. Análise dos dados	69
7. Agrupamentos hierárquicos dos transcritos válidos	70
8. Análise funcional in silico dos genes diferencialme	nte expressos70
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	78



18. Ensaio de Apoptose
RESULTADOS81
1. Caracterização das células CD34 <sup>+</sup> e estromais de medula óssea
2. Perfil de expressão dos transcritos codificadores e não codificadores de proteín
em células CD34 <sup>+</sup> de SMD-ARSA
3. Expressão gênica e protéica do transcrito candidato SLC11A2 em medula ósse
total de pacientes com SMD.
4. Perfil de expressão dos transcritos codificadores e não codificadores em célula
estromais 114
5. Expressão gênica e protéica do transcrito candidato SEMA3A em célula
estromais e de medula óssea total de pacientes com SMD
6. Ensaios funcionais do gene selecionado SEMA3A
DISCUSSÃO
CONCLUSÃO141
REFERÊNCIAS145
ANEXO I
ANEXO II162



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 α-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.





#### 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.

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

Pacientes (n)	Análise da expressão gênica das células CD34 <sup>+</sup>	Análise da expressão gênica das células estromais	Idade (anos)	Gênero	Hgb (g/dL)	Neut (x10 <sup>3</sup> / uL)	Plt (x10 <sup>3</sup> / uL)	blasto s MO (%)	SA (%)
1	Microarranjo	Nenhum	72	F	7,2	0,95	75	2	30
2	Microarranjo, qPCR	Nenhum	78	M	8,3	1,23	136	0	58
3	Microarranjo, qPCR	qPCR	62	M	12,4	0,99	110	2	16
4	Microarranjo, qPCR	Microarranjo, qPCR	70	M	10,2	5,34	322	0	38
5	qPCR	Microarranjo, qPCR	69	F	6,7	0,51	72	0	22
6	qPCR	Microarranjo, qPCR	56	M	8,4	2,81	754	0	91
7	Nenhum	qPCR	75	M	6,3	0,75	216	0	27

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)

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

Idade	Cânara	Diagnástica	Subgrupo	Subgrupo	Subgrupo
(anos)	Genero	Diagnostico	FAB	<b>IPSS</b>	WHO
				baixo	_
62	F	SMD	AR	risco/INT-	CRDM
				1	
				baixo	
74	M	SMD	AR	risco/INT-	CRDM
				1	
				baixo	
37	M	SMD	AR	risco/INT-	CRDM
				1	
				baixo	
77	F	SMD	AR	risco/INT-	CRDM
				1	
				baixo	
49	M	SMD	AR	risco/INT-	CRDM
				1	
				baixo	
62	M	SMD	AR	risco/INT-	CDRU
				1	
				baixo	
62	F	SMD	AR	risco/INT-	CRDM
				1	
	(anos) 62 74 37 77 49	Gênero  62 F  74 M  37 M  77 F  49 M  62 M	Gênero Diagnóstico  62 F SMD  74 M SMD  37 M SMD  77 F SMD  49 M SMD  62 M SMD	(anos)Gênero Diagnóstico FAB62FSMDAR74MSMDAR37MSMDAR77FSMDAR49MSMDAR62MSMDAR	Cânero   Diagnóstico   FAB   IPSS

					baixo	
8	85	M	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	M	SMD	AR	risco/INT-	CRDM
					1	
					baixo	
12	39	F	SMD	AR	risco/INT-	CRDM
					1	
					baixo	
13	63	M	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		ARSA
					1	

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

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

45	53	F	LMA
46	63	F	LMA
47	27	F	LMA
48	75	M	LMA
49	81	F	LMA
50	79	F	LMA
51	39	F	LMA
52	30	F	LMA
53	67	M	LMA
54	29	M	CTRL
55	34	F	CTRL
56	40	F	CTRL
57	47	M	CTRL
58	37	M	CTRL
59	27	M	CTRL
60	32	F	CTRL

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<sup>+</sup> foram isoladas usando colunas magnéticas de separação celular MACS, seguindo as instruções do fabricante. A pureza das células CD34<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>, 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 eqüino (HS), mantidas em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> 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)

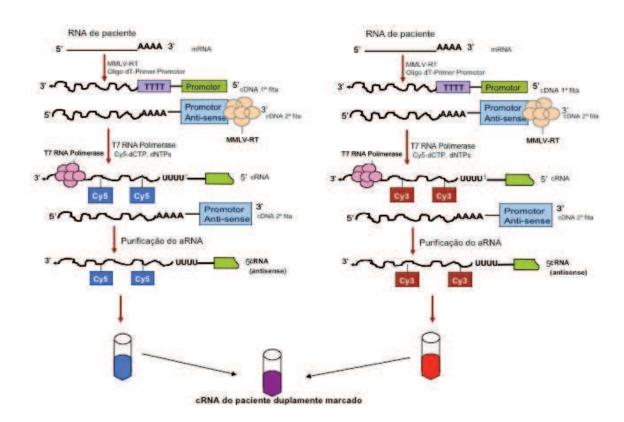
Análises de FACS foram utilizadas para verificar na membrana das células, a presença de antígenos de grupos de diferenciação (CD). As células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos, o botão foi lavado duas vezes em tampão salina fosfato (PBS) (137mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 10mM de Na<sub>2</sub>HPO<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 μL de PBS, em seguida, as células foram incubadas com 2 μL 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

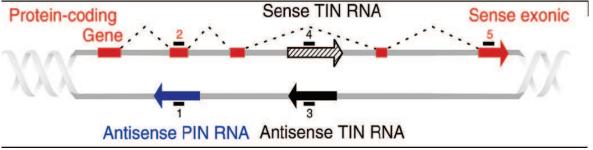
Para cada amostra, 150 ng RNA total foi amplificado e marcado com Cyanina 3 (Cy3) ou Cyanina 5 (Cy5) usando o material *Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit PLUS, two-Color* (Agilent Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante (Figura 1).



**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.



NAKAYA, et al. Genome Biol (2007), 8(3): R43.

**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, <a href="www.ingenuity.com">www.ingenuity.com</a>), 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 (C<sub>t</sub>) 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  $\Delta C_t$  ( $C_{t \text{ alvo}} - C_{t \text{ endógeno}}$ ) (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.

Tabela 3: Sequências de iniciadores utilizados nos ensaios de qPCR

	Sense	antisense	
Transcritos candidatos para validação em células CD34 <sup>+</sup>			
	5'	5'	
ABCB7	TAAGGTAGCCGAACGTGGTACC	TTATCATGGTTCTGCACACGG	
	3'	3'	
COX11	5' CTGCACTGGCGTTTTACAGA	5' TGGGGATTAAGCCTTTGTTC	
	3'	3'	
FLT3	5' CAACTGCTGCTTCACCAGAC	5' TATCAGCTCCTCCTGCCTTG	
	3'	3'	
GCDH_ncRNA	5! A A C C A C C T T C C C T T T T C T	5'	
	5' AAGGAGCTTTGGGTTTTTGT	CGCCTTAGTGACAGCTTCCAG	
	3'	3'	
НСК	5 'GAGTTCATGGCCAAAGGAAG	5' GGAGGTCTCGGTGGATGTAG	
	3'	3'	
MY5OC	5' CGTGGCAGAAGAGGCATACA	5' AGCGAGCCGACACTGTCTTT	
	3'	3'	
NR4A1		5' ACTTGGCGTTTTTCTGCACT	
NK4A1	5' GTGCTGTGTGTGGGGACA 3'	3'	
NR4A1_ncRNA	5'AAACCTCCCCAATGTCTTC 3'	5' ACCGTCCAGATCCTGCTG 3'	
		5'	
NR4A2	5' ACTCCAACCCGGCTATGAC 3'	CATGGAGCCAGTCAGGAGAT	
		3'	
NR4A2_ncRNA	5 ' CTTCCGGGTGTCTGAGAAAG	5' TTTGCATGTGCTAGGAGCTG	
	3'	3'	
NID 4 A 2		5' TGGAGGGGAAGGGCTATATT	
NR4A3	5' TCCGCTCCTCCTACACTCTC 3'	3'	
NR4A3_ncRNA	5' CCGTTAAGACCCTGGTTTTC	5' AGGCGCTGAGAATTATTGGA	

	3'	3'			
	5' ATCGAGCTTTGGGGGTAGAT	5'			
PPIF_ncRNA	3'	AGCAACAGTGTAGCGCAATG			
	3	3'			
	5'	5'			
SLC11A2		GAGCCGATGATAGCCAACTC			
	GTGGTTACTGGGCTGCATCT 3'	3'			
Transcritos cano	didatos para validação em células estron	nais			
		5'			
HLA-E	5' ATCGTGGGCATCATTGCT 3'	GAGTAGCTCCCTCCTTTTCCA			
		3'			
SEMA3A	5' AGGGACCGAAAACAACGTC	5' CGTGGGTCCTCCTGTTTCTA			
	3'	3'			
	5'	5'			
SPINT2	TCTGTTTCTCTGGGAGGTAGGA	CGATCAGCGAGGAAACAACT			
	3'	3'			
	EL TOTTO COTO OTO A CTCTC A C	5'			
TBCD_ncRNA	5' TCTTGCCTGGTGAGTGTGAG	AAGGTGTTGGAAGGGAGGAG			
	3'	3'			
Genes					
endógenos					
	5' ACCCACTCCTCCACCTTTGA	5'			
GAPDH	3'	CTGTGCCTGTAGCCAAATTCGT			
	Ž.	3'			
HPRT	5' TCCAGCAGGTCAGCAAAGAA	5' GAACGTCTTGCTCGAGATGT			
111 101	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 μg/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).

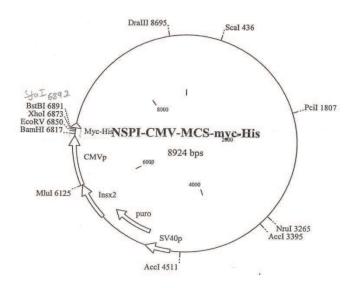


Figura 3: Esquema do mapa do vetor.

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<sup>5</sup> 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<sup>4</sup> células/poço). Após 48 horas, adicionaram-se células leucêmicas (K562 ou NB4 ou U937) em cocultura (4x10<sup>5</sup> 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

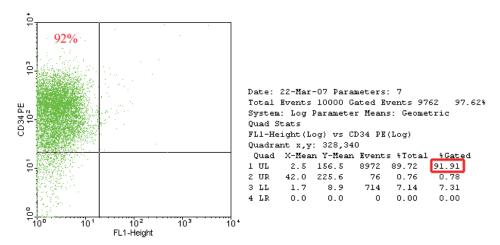
Células HS27-NSPI e HS27-SEMA3AFlag foram cultivadas em placas de 24 poços (1x10<sup>4</sup> células/poço). Após 48 horas foi adicionado células leucêmicas (U937 ou NB4), 1,5x10<sup>5</sup> células/poço, essas células foram previamente sensibilizadas com 100mM de ácido trans-retinoico (ATRA) por 24horas. 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<sup>5</sup> células/poço), em cocultura com células HS27 cultivadas previamente (5x10<sup>4</sup> 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

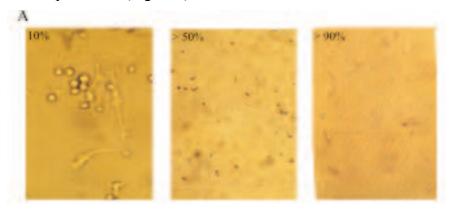
# 1. Caracterização das células CD34<sup>+</sup> e estromais de medula óssea

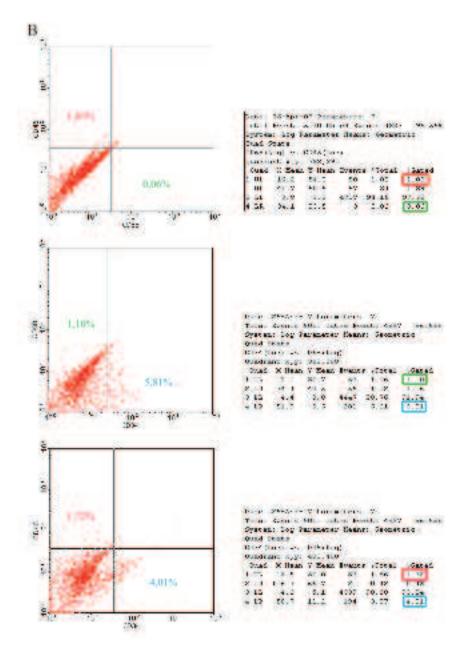
As células CD34<sup>+</sup> de medula óssea purificadas por coluna magnética tiveram pureza superior a 90%, conforme análise por citometria de fluxo (Figura 4).



**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.

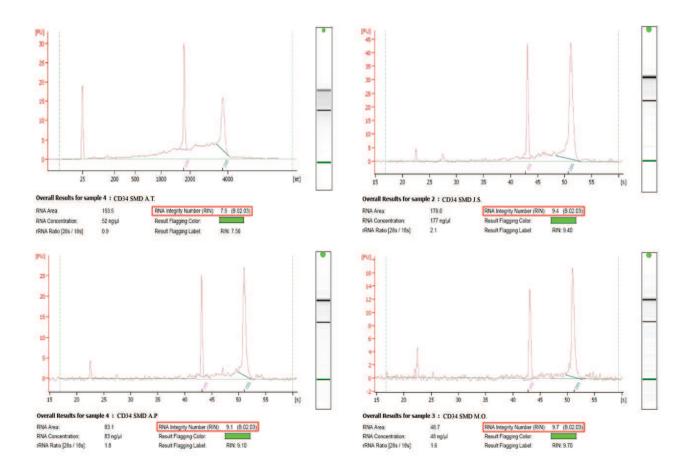
As células estromais cultivadas para extração de RNA mostraram-se livres de células progenitoras (CD34<sup>+</sup>), macrófagos ou linfócitos (CD68<sup>+</sup>) e células hematopoéticas (CD45<sup>+</sup>), analisados por FACS (Figura 5).





**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).



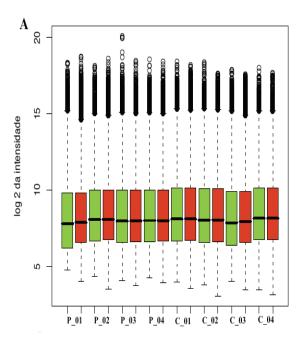
**Figura 6:** Qualidade do RNA por eletroforese. Eletroferograma demonstrando os picos de RNA ribossomais 18S e 28S das amostras de RNA de 4 pacientes SMD, que obtiveram o número de integridade do RNA (destacado no retângulo vermelho) maiores que 7.

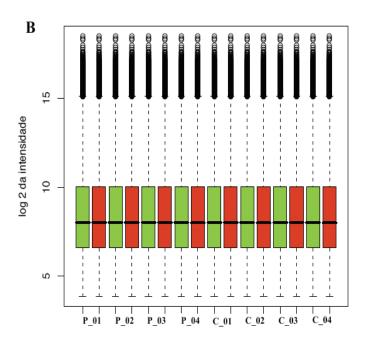
# 2. Perfil de expressão dos transcritos codificadores e não codificadores de proteína em células CD34<sup>+</sup> de SMD-ARSA

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*.

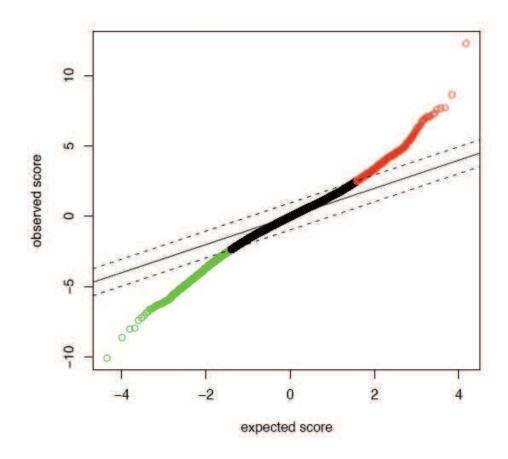
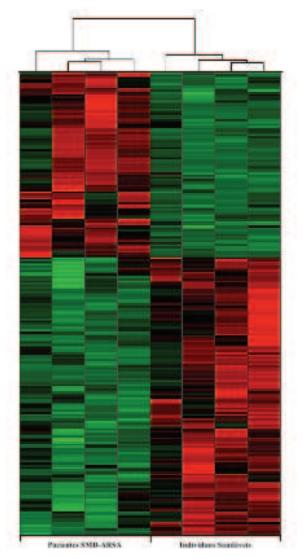


Figura 8: Gráfico do resultado da análise SAM – Significance Analysis of Microarray – mostrando o índice de significância observado entre pacientes e controles (observerd score, eixo y) versus os valores esperados aleatoriamente (expected score, eixo x), com 500 permutações. Em vermelho e em verde estão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

No total foram identificados 216 transcritos diferencialmente expressos (q-value ≤ 0,01 e com variação ≥ 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.

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

Nome Locus Gene <sup>1</sup>	Locus ID	Coordenada do Alvo²	Fita Alvo	Tipo	Orientação em relação ao gene codificador de proteína	q value <sup>3</sup>	Vezes
Hipoexpresso	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

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
ВАСН2	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
C1orf21	81563	chr1:181329653- 181329712	+	Exônico		0,001	-2,62
C5	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
CEP290	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

		56456452					
<i>E2F7</i>	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
<i>ERO1LB</i>	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
ННАТ	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-	+	Exônico		0,000	-3,14
		26000269					
KCNE1L	23630	chrX:108673158-	_	Exônico		0,000	-2,36
		108673217				-,	<b>,</b>
KCNMB3	27094	chr3:180451233-	_	Exônico		0,000	-2,70
HOIVINDS	27091	180451268		L'AOIII CO		0,000	2,70
KCNMB4	27345	chr12:69110890-	+	Exônico		0,001	-2,33
HCIVIND I	27313	69110949	·	LAOMCO		0,001	2,55
KLHL5	51088	chr4:38941503-	+	Exônico		0,004	-2,92
KLIILJ	31000	38941562	'	LAOIIICO		0,004	-2,72
LAMB2	3913	chr3:49133567-		Exônico		0,004	-1,93
LAWID2	3913	49133626	-	Exomeo		0,004	-1,93
LAMC1	3915	chr1:179846063-	+	Exônico		0,003	-1,82
LAMCI	3913	179846122	'	Exomeo		0,003	-1,62
LAYN	143903	chr11:110936670-	+	Exônico		0,001	-2,24
LATIV	143903	110936729	'	Exomeo		0,001	-2,24
LEF1	51176	chr4:109454925-	+	Intergênico	Antisense	0,001	-2,80
LEI I	31170	109454984	'	mergemee	Allusense	0,001	-2,60
LOC400713	400713	chr19:57579855-	+	Exônico		0,003	-1,84
LOC400/13	400/13	57579914	'	Exomeo		0,003	-1,04
LOC441242	441242	chr7:63977853-		Intergênico	Sense	0,003	-1,82
LOC441242	441242	63977912	-	intergenico	Sense	0,003	-1,62
LRIG1	26018	chr3:66512287-		Exônico		0,003	-1,81
LMGI	20018	66512346	-	EXOIIICO		0,003	-1,01
MED12L	116931	chr3:152412757-		Exônico		0,000	2.45
WIED12L	110931	152412816	-	EXOIIICO		0,000	-2,45
MGC29506	51237	chr5:138751442-		Exônico		0,003	-1,77
MGC29300	31237	138751501	-	Exomeo		0,003	-1,//
MMD11	4220	chr22:22450827-	_1	Evânica		0.001	1 70
MMP11	4320	22450886	+	Exônico		0,001	-1,78
MORN1	79906	chr1:2326963-2327014	-	Intrônico	Sense	0,003	-2,15

MPDZ	8777	chr9:13095883- 13095942	-	Exônico		0,001	-3,15
MYO1D	4642	chr17:27843945- 27844004	-	Exônico		0,001	-2,27
MYO5C	55930	chr15:50271936- 50271995	-	Exônico		0,000	-2,48
NASP	4678	chr1:45744001- 45744060	+	Intrônico	Sense	0,001	-2,10
NASP	4678	chr1:45749924- 45750086	+	Exônico		0,001	-1,93
NASP	4678	chr1:45741247- 45741306	+	Exônico		0,002	-1,73
NAV1	89796	chr1:198504378- 198504437	+	Exônico		0,002	-1,74
NEIL1	79661	chr15:73434282- 73434341	+	Intrônico	Sense	0,000	-4,45
NEIL1	79661	chr15:73434051- 73434110	+	Exônico		0,000	-3,72
NEIL1	79661	chr15:73434426- 73434485	+	Exônico		0,001	-3,36
NKD2	85409	chr5:1091719-1091778	+	Exônico		0,004	-2,55
NOL7	51406	chr6:13722339- 13722397	-	Exônico		0,000	-1,75
NPY	4852	chr7:24104524- 24104583	+	Exônico		0,000	-3,88
NPY	4852	chr7:24102358- 24102417	+	Exônico		0,000	-3,08
NSMCE4A	54780	chr10:123717158- 123717201	-	Exônico		0,001	-1,74
NUP153	9972	chr6:17815444- 17815503	+	Intergênico	Sense	0,001	-2,04

PAG1	55824	chr8:82068816- 82068875	-	Intrônico	Sense	0,001	-1,83
РСДН9	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					
<i>SLC39A8</i>	64116	chr4:103540129- 103540188	-	Exônico		0,000	-1,73
SNORA71B	26776	chr20:36482692- 36482751	-	Exônico		0,001	-1,78
SNORA71B	26776	chr20:36482692- 36482751	-	Intergênico	Sense	0,001	-1,77
SOCS2	8835	chr12:92472267- 92472326	+	Exônico		0,000	-1,75
SPATS2	65244	chr12:48204855- 48204914	+	Exônico		0,000	-1,74
ST7OT1	93653	chr7:116186492- 116186551	-	Intergênico	Sense	0,004	-2,13
TLE1	7088	chr9:81478431- 81478490	-	Intrônico	Sense	0,000	-2,30
TLE1	7088	chrX:64411696- 64411755	+	Intrônico	Sense	0,000	-2,12
TLE1	7088	chr9:81478491- 81478550	-	Intrônico	Sense	0,000	-2,10
TLE1	7088	chr9:81428672- 81428731	-	Exônico		0,000	-1,87
TMEM217	221468	chr6:37288040- 37288099	-	Exônico		0,000	-1,84
TNFAIP3	7128	chr6:138230463- 138230522	-	Intrônico	Antisense	0,000	-2,21
TNFRSF21	27242	chr6:47308509- 47308568	-	Exônico		0,001	-2,10
TOM1L1	10040	chr17:50393842- 50393901	+	Exônico		0,001	-1,81
TOP2B	7155	chr3:25661877- 25661936	-	Exônico		0,003	-2,01

TOP2B	7155	chr3:25614718- 25614777	-	Exônico		0,000	-1,85
TOP2B	7155	chr3:25615965- 25616024	-	Exônico		0,000	-1,81
TSPYL5	85453	chr8:98354961- 98355020	-	Exônico		0,000	-2,00
UHRF1	29128	chr19:4913065- 4913124	+	Exônico		0,000	-1,76
UNC13B	10497	chr9:35394491- 35394550	+	Exônico		0,001	-1,81
UQCC	55245	chr20:33353970- 33354029	-	Exônico		0,002	-1,84
ZNF367	195828	chr9:96227967- 96228026	-	Exônico		0,000	-3,00
ZNF711	7552	chrX:84333012- 84333071	+	Exônico		0,000	-2,33
ZNF76	7629	chr6:35364312- 35364371	+	Intrônico	Sense	0,002	-2,02
ZNF91	7644	chr19:23334238- 23334297	-	Exônico		0,000	-2,02
Hiperexpress	os em SMD	)-ARSA					
AADACL1	57552	chr3:173831278- 173831337	-	Exônico		0,002	1,96
ACPP	55	chr3:133551496- 133551544	+	Exônico		0,004	2,46
ADCY7	113	chr16:48907161- 48907220	+	Exônico		0,001	1,92
AKAP13	11214	chr15:84021272- 84021331	+	Exônico		0,003	2,33
ANK3	288	chr10:61625808- 61625867	-	Intrônico	Sense	0,004	2,30

AOAH	313	chr7:36343264- 36343309	-	Exônico		0,004	1,97
ARHGEF10L	55160	chr1:17769433- 17769492	+	Exônico		0,002	5,07
B3GNT5	84002	chr3:184455731- 184455790	+	Intrônico	Sense	0,001	2,21
CALML4	91860	chr15:66273414- 66273473	-	Exônico		0,005	1,72
CC2D1A	54862	chr19:13891701- 13891760	-	Intrônico	Antisense	0,002	1,88
CCDC146	57639	chr7:76467266- 76467325	-	Intrônico	Antisense	0,003	4,03
CD44	960	chr11:35184235- 35184294	-	Intrônico	Antisense	0,000	1,83
COTL1	23406	chr16:83156791- 83156850	-	Exônico		0,004	1,89
CTSH	1512	chr15:77001264- 77001323	-	Exônico		0,002	2,91
CTSH	1512	chr15:77007119- 77007178	-	Exônico		0,000	2,79
CTSS	1520	chr1:147535553- 147535603	-	Exônico		0,000	3,07
CTSS	1520	chr1:147540640- 147540699	-	Exônico		0,000	2,68
CYB5R1	51706	chr1:199642932- 199642991	-	Exônico		0,001	2,34
CYB5R1	51706	chr1:199641923- 199641982	-	Exônico		0,003	1,75
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-	+	Exônico		0,003	1,86
		40963266					
DDX3Y	8653	chrY:13465993-	+	Exônico		0,003	4,26
		13466052					
DHX38	9785	chr16:70696571-	+	Intrônico	Sense	0,000	2,11
		70696630					
EHBP1L1	254102	chr11:65104384-	-	Intrônico	Antisense	0,001	2,38
		65104443					
EHBP1L1	254102	chr11:65114552-	+	Exônico		0,000	1,91
		65114611					
ETV3	2117	chr1:153916337-	-	Exônico		0,002	1,78
		153916396					
FAM50A	9130	chrX:153324988-	+	Intrônico	Antisense	0,002	2,05
		153325047					
FGD6	55785	chr12:93977621-	-	Exônico		0,002	1,75
		93977680					
FGFR1OP2	26127	chr12:27004715-	+	Exônico		0,000	1,97
		27004774					
FN1	2335	chr2:216086310-	+	Intrônico	Antisense	0,000	2,71
		216086369					
FRAS1	80144	chr4:79383367-	+	Intrônico	Sense	0,004	1,85
		79383426					
HCK	3055	chr20:30140061-	+	Exônico		0,001	4,72
		30140108					
HVCN1	84329	chr12:109549467-	-	Exônico		0,003	1,83
IC 41	2202	109549526		Intuênia a	Compo	0.000	1.06
ICA1	3382	chr7:7932382-7932433	-	Intrônico	Sense	0,000	1,86
IFI30	10437	chr19:18147121-	+	Exônico		0,001	5,43
		18147180					

IFI30	10437	chr19:18149840- 18149899	+	Exônico		0,000	4,35
IFI30	10437	chr19:18147121- 18147180	-	Intrônico	Antisense	0,004	2,12
IL10RA	3587	chr11:117375219- 117375278	+	Exônico		0,005	2,61
ITGAX	3687	chr16:31301452- 31301511	+	Exônico		0,002	3,46
JAZF1	221895	chr7:27643617- 27643676	-	Exônico		0,001	1,95
JHDM1D	80853	chr7:139238230- 139238289	-	Exônico		0,000	2,09
LFNG	3955	chr7:2341212-2341271	+	Exônico		0,000	3,76
LRP1	4035	chr12:55892213- 55892272	+	Exônico		0,005	4,03
LY96	23643	chr8:75103765- 75103824	+	Exônico		0,001	2,68
MARCH1.	55016	chr4:164805948- 164806007	-	Intergênico	Sense	0,002	3,77
NCOA3	8202	chr20:45714557- 45714616	-	Intrônico	Antisense	0,003	1,86
NCOA4	8031	chr10:51259279- 51259338	+	Exônico		0,003	2,03
NR4A2	4929	chr2:157011025- 157011084	-	Intrônico	Sense	0,002	4,49
NR4A2	4929	chr2:157008881- 157008940	-	Exônico		0,002	3,51
NR4A2	4929	chr2:157012210- 157012269	+	Intrônico	Antisense	0,004	2,15
NR4A3	8013	chr9:99668743- 99668802	+	Intrônico	Sense	0,001	5,52

NR4A3	8013	chr9:99675306-	+	Exônico		0,002	5,05
MAAJ	8013	99675365	'	LXOIIICO		0,002	3,03
NR4A3	8013	chr9:99668564-	+	Exônico		0,000	4,45
MAAJ	0013	99668623	'	LXOIIICO		0,000	т,т.
OAS1	4938	chr12:111817181-	+	Exônico		0,002	3,80
0/151	4750	111817240	'	LXOIIICO		0,002	5,00
PHLDA2	7262	chr11:2906272-	_	Exônico		0,002	2,61
11120112	7202	2906331		Latineo		0,002	2,01
PKM2	5315	chr15:70288031-	+	Intrônico	Antisense	0,000	1,81
1 10/12	3313	70288090	·	miromeo	7 Hittischise	0,000	1,01
PPIF	10105	chr10:80781110-	_	Intrônico	Antisense	0,001	2,36
	10100	80781169			1 11110 4110 4	0,001	_,5 0
PPIF	10105	chr10:80781110-	+	Intrônico	Sense	0,003	2,29
	10100	80781169			241104	0,002	_,_>
PPP1R15A	23645	chr19:54068439-	_	Intrônico	Antisense	0,002	1,82
		54068498				*,**-	-,
RAD51L1	5890	chr14:67951712-	_	Intrônico	Antisense	0,001	1,77
		67951763				-,	,
RALGPS1	9649	chr9:126945696-	+	Intrônico	Antisense	0,000	2,70
		126945747				-,	,
RP5-	56261	chr20:5491968-	_	Intrônico	Sense	0,002	1,81
1022P6.2		5492027				,	,
RXRA	6256	chr9:134554548-	+	Exônico		0,000	4,04
		134554607				,	,
S100A11	6282	chr1:148818292-	_	Exônico		0,003	2,91
		148818351				,	,
S100A4	6275	chr1:150330268-	+	Intrônico	Antisense	0,001	1,71
		150330327				,	
SERPINA1	5265	chr14:93919199-	_	Exônico		0,001	5,47
		93919258				ŕ	
SERPINA1	5265	chr14:93914544-	-	Exônico		0,001	4,55

		93914603					
SERPINA1	5265	chr14:93919199-	+	Intrônico	Antisense	0,001	2,51
SERI IIVAI	3203	93919258	'	muomeo	Antiscrisc	0,001	2,31
SESTD1	91404	chr2:179802621-	+	Intrônico	Antisense	0,000	1,91
SESTET	71404	179802672	'	muomeo	7 Hittischise	0,000	1,71
SGK1	6446	chr6:134532349-	_	Exônico		0,001	2,96
50111	0110	134532408		Zhomeo		0,001	2,50
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				,	,
SLC43A2	124935	chr17:1440846-	_	Exônico		0,000	3,02
		1440886				,	ĺ
SLC8A1	6546	chr2:40251076-	-	Exônico		0,003	2,01
		40251135				ŕ	ŕ
SNX20	124460	chr16:49264159-	-	Intrônico	Sense	0,000	1,88
		49264218					
THBS1	7057	chr15:37668391-	+	Intrônico	Sense	0,001	2,77
		37668450					
TMBIM6	7009	chr12:48437217-	+	Intrônico	Sense	0,001	1,85
		48437268					
TNFRSF1B	7133	chr1:12202541-	+	Exônico		0,000	4,31
		12202600					
TSPAN14	81619	chr10:82267911-	+	Exônico		0,000	1,97
		82267970					
VCAN	1462	chr5:82912058-	+	Exônico		0,000	5,26
		82912117					
VEGFA	7422	chr6:43854201-	+	Exônico		0,003	2,36
		43854612					

WIPI1	55062	chr17:63936613-		Exônico		0,000	2,38
VV 11 11	33002	63936672	-	EXOMICO		0,000	2,36
WIDII	55062	chr17:63929049-		Exônico		0.004	2 17
WIPI1	55062	63929108	-	EXOIIICO		0,004	2,17
70C (N10	0.400.1	chr16:3082319-		T42	C	0.004	2.24
ZSCAN10	84891	3082378	-	Intrônico	Sense	0,004	2,24

<sup>&</sup>lt;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

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.

**Tabela 5:** Processos biológicos dos genes diferencialmente expressos em células CD34<sup>+</sup> de pacientes 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,				
	$\downarrow$ TNFRSF21, $\uparrow$ TNFRSF1B, $\downarrow$ UNC13B				
coagulação sanguínea	<i>↓SEC63</i> , <i>↑SERPINA1</i>				
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,				

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

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

*↓UHRF1*, *↑VEGFA* 

exocitose  $\downarrow NKD2, \downarrow RIMS3, \downarrow UNC13B$ 

resposta imune  $\downarrow CD19, \uparrow CTSS, \downarrow ERAP1, \uparrow OAS1, \downarrow PXDN$ 

 $\uparrow AOAH, \downarrow C5, \downarrow BLNK, \uparrow LY96$ resposta inflamatória

 $\downarrow ABCB7$ ,  $\downarrow COL5A1$ ,  $\uparrow HVCN1$ ,  $\downarrow KCNE1L$ ,  $\downarrow KCNMB3$ , transporte

> $\downarrow KCNMB4$ ,  $\downarrow NKD2$ ,  $\downarrow NPY$ ,  $\uparrow SGK1$ ,  $\uparrow SGSH$ ,  $\uparrow SLC8A1$ ,  $\uparrow SLC11A2, \downarrow SLC12A2, \uparrow SLC37A2, \downarrow SLC39A8, \uparrow SLC43A2$

redução oxidativa  $\downarrow AASS$ ,  $\uparrow CYB5R1$ ,  $\uparrow IFI30$ ,  $\downarrow PTGR1$ ,  $\downarrow PXDN$ 

 $\downarrow$ FLT3,  $\uparrow$ HCK,  $\uparrow$ SGK1 fosforilação de

aminoácido de proteína

 $\downarrow$ ECHDC2,  $\downarrow$ AEBP1,  $\downarrow$ AFF3,  $\downarrow$ BACH2,  $\downarrow$ CEP290,  $\downarrow$ E2F7, regulação da transcrição

> $\downarrow EBF1$ ,  $\downarrow ELP2$ ,  $\uparrow ETV3$ ,  $\uparrow JAZF1$ ,  $\downarrow LOC400713$ ,  $\uparrow NCOA4$ ,  $\uparrow NR4A2$ ,  $\uparrow NR4A3$ ,  $\downarrow POU2AF1$ ,  $\uparrow RXRA$ ,  $\downarrow TLE1$ ,  $\downarrow UHRF1$ ,

 $\downarrow$ ZNF711,  $\downarrow$ ZNF91

 $\downarrow$ ANK3,  $\uparrow$ ARHGEF10L,  $\downarrow$ C13orf18, $\uparrow$ NR4A2, sinal transmissão  $\downarrow PSD3$ .

 $\uparrow S100A11, \downarrow TLE1, \downarrow TNFRSF21$ 

 $\uparrow AADACLI$ ,  $\downarrow AADAT$ ,  $\uparrow ACPP$ ,  $\downarrow ACSM3$ ,  $\uparrow ADCY7$ ,  $\downarrow AHII$ , outro

> $\downarrow ALS2CR4$ ,  $\downarrow AUTS2$ ,  $\downarrow C16orf67$ ,  $\downarrow C1orf21$ ,  $\downarrow C9orf58$ ,  $\uparrow$ CALML4,  $\downarrow$ CCDC136,  $\downarrow$ CLIP3,  $\uparrow$ COLT1,  $\uparrow$ CTSH,  $\downarrow CYYR1$ .  $\uparrow DDX3X$ .  $\uparrow DDX3Y$ .  $\downarrow DPY19L2$ .  $\downarrow EBF1$ .  $\uparrow$ 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,

 $\downarrow$ TOP2B,  $\uparrow$ TSPAN14,  $\downarrow$ TSPYL5,  $\downarrow$ UQCC,  $\uparrow$ WIPI1

<sup>&</sup>lt;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.

1--10

NTO J.

Grupo	Moléculas no Grupo	Descrição	- log10	Nº de
Funcional	Moleculas no Grupo	Descrição	(p value)	Moléculas
Em células (	CD34 <sup>+</sup> de SMD-ARSA (FDR < 5% e	e alteração ≥ 1.7 vezes	)	
	↓BACH2, Ck2, ↑CREB5,			
	↑CYBB, ↑DUSP1, E2F7,			
	JINK1/2, $\downarrow$ JUN, $\downarrow$ LEF1,			
	↓MMP11, NADPH oxidase,			
	↓NASP, ↑NCOA4, NFkB			
	(complex), ↓NFKBIZ, Notch,	Condições, Doença		
1	↑NR4A2, ↑PPIF, Proteasome,		4.4	2.4
1	↓PXDN, Rxr, ↑RXRA,		44	24
	↑S100A11,	Imunológica		
	↑SERPINA1, ↑SLC11A2,	C		
	↑SMARCD3, Thyroid hormone			
	receptor, ↓TLE1, Top2,			
	↓TOP2B, tyrosine kinase,			
	↓UHRF1, ↑VDR			
	Akt, ALP, ↓ANK3, ↑ASAH1,	Metabolismo de		
2	↓AUTS2, Caspase, ↑CTSS,	Lipídio, Transporte	32	19
	Cytochrome c, \(\frac{1}{DDX3X}\),	Molecular,		

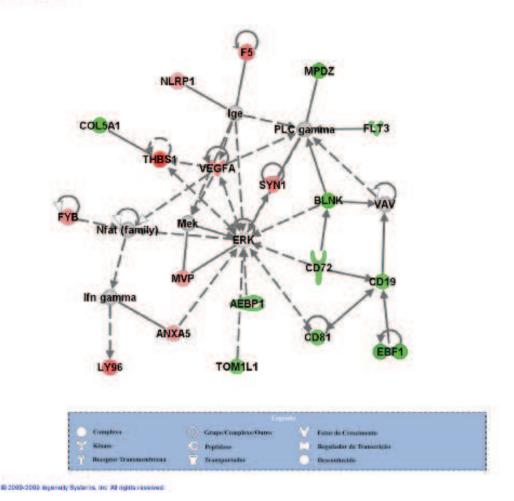
	↓ELP2, Fgf, ↓GRK4, Hsp70,	Bioquímica de		
	Hsp90, IFN Beta, Ikb, IKK, IL1,	Pequenas		
	IL10RA, Interferon alpha,	Moléculas		
	↑ITGAX, LDL, ↑NR4A3,			
	$\uparrow$ OAS1, $\uparrow$ OSBPL6, $\uparrow$ SGK1,			
	$\uparrow$ SLC2A3, $\uparrow$ SNCA, $\uparrow$ SOCS2,			
	↑STAT, ↑STAT1, STAT5a/b,			
	↑TNFSF10, ↑TRAF1, Ubiquitin			
	14-3-3, ↓AEBP1, ↑ANXA5,			
	$\downarrow$ BLNK, $\downarrow$ CD19, $\downarrow$ CD72,			
	↓CD81, ↓COL5A1, ↓EBF1,	Desenvolvimento e		
	ERK, ↓F5, ↓FLT3, ↑FYB, Ifn	Função do Sistema		
2	gamma, Ige, Integrin, †LY96,	Hematológico,	20	10
3	MAP2K1/2, Mek, ↓MPDZ,	Resposta Inume	29	19
	↑MVP, Nfat, ↑NLRP1, Pak,	Humoral,		
	Pdgf, PLC gamma, Rac, Ras,	Morfologia do Tecido		
	Sphk, ↑SYN1, TCR, ↑THBS1,	recido		
	↓TOM1L1, VAV, ↑VEGFA			
	↑AADACL1, ↓AFF3, amino			
	acids, ^ARHGEF10L, beta-			
	estradiol, CDH11, ↓CLIP3,	Doença		
	CTSL1, \(^1\)CYB5R1, CYCS,	Cardiovascular,		
	CYP17A1, ↓DCLK2, ↓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		
	↓MPPED2, ↑MYOF, NR4A1,			
	↑NR4A3, PPP3R1, RARS,			

	↑RXRA, ↓STXBP1, ↑TSHZ3,			
	↓ZNF91			
5	ABL1, ↑AP1S2, ATF4, BRPF3,  ↓CBX2, ↑CPEB4, CREB1,  ↓EMCN, ↑FAM110A, ↓GCDH,  GPR45, GRB2, ↓GTF2IRD1,  ↓HLF, ↓HS3ST1, ↑JAZF1,  MIRN202, MIRN24-1, NAP5,  NEK8, NFS1, NR5A1, NRG1,  ↓PALLD, ↓PLS3, ↑RCBTB2,  retinoic acid, ↓RICH2, SCARF2,  ↓SEC63, SELL, ↑SGSH, SNX8,  TSKS, VPS13A	Expressão Gênica, Desenvolvimento do Tecido, Doença Cardiovascular	25	16
6	ABR, ↑ATXN1, ↓BTG3, C12ORF23, ↓CCDC136, COIL, CPNE3, ↓DIDO1, DST, DVL3, F2, Itga4-Itgb1, ITGB1, ↓JAM2, ↓KIAA1841, ↓LRIG1, MIRN124, MIRN349, MIRN124-1, MIRN134, MIRN212, MIRN298, MYST3, ↓PLEKHG4, ↓PROSAPIP1, RAC1, RBMS1, ↓RIMS3, ↑SLC43A2, ↑SNX22, ↓TNFRSF21, TNRC4, VPS37C, WNK2, ↓ZNF367	•	22	15
7	Actin, \(^\ADCY7\), \(^\AKAP13\), Calmodulin, \(^\CDKN1A\), \(^\CLCN3\), \(^\COTL1\), 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, ↓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,			
	↓LAMC1, Laminin, Mapk,	Doença Oftálmica,		
8	↓MME, Mmp, P38 MAPK,	Movimento Celular,	20	14
	PDGF BB, PI3K, ↑PIK3R5,	Doença		
	Pkc(s), PP2A, $\downarrow$ SLC12A2,	Neurológica		
	↑SLC8A1, Smad, Tgf beta,			
	↑TNFRSF1B, ↑VCAN, Vegf,			
	↓ZBTB10			
	↓AASS, ↓ABCB7, ABL1,			
	↓ACSM3, ASNS, CCNE2,			
	CSTB, ↑CTSH, ↑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	10	10
10	MSH6, ↓MYO1D, ↑MYO1G,	Reparo do DNA,	19	13
	↓NEIL1, PCNA, POLB,	Expressão Gênica, Ciclo Celular		
	↓POU2AF1, progesterone,	Cicio Celulai		
	↓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, \tag{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			

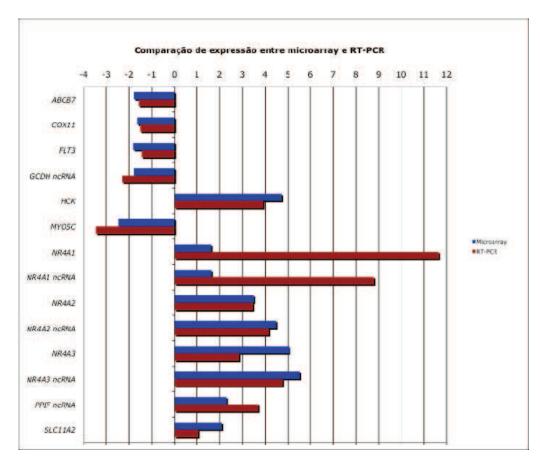
Genes (↑) hiperexpressos ou (↓) hipoexpressos em paciente SMD-ARSA vs. indivíduos saudáveis



**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.

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.

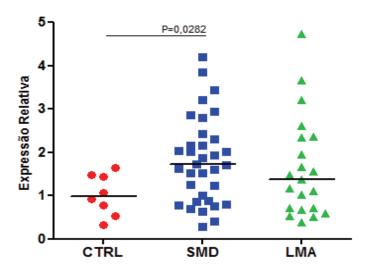
# 3. Expressão gênica e protéica do transcrito candidato *SLC11A2* em medula óssea total de pacientes com SMD.

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].

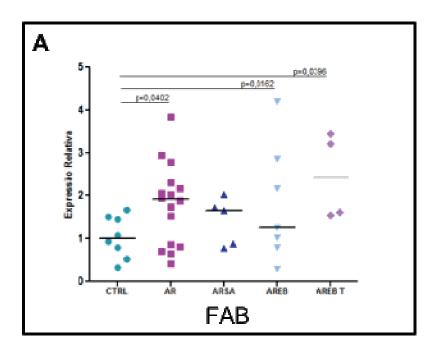
O gene SLC11A2, também conhecido como transportador metal divalente (DMT1), é um importante transportador para a homeostase do ferro. O principal sítio de expressão da proteína DMT1 são as células precursoras hematopoéticas e está localizado na membrana celular participando do ciclo da transferrina, 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.

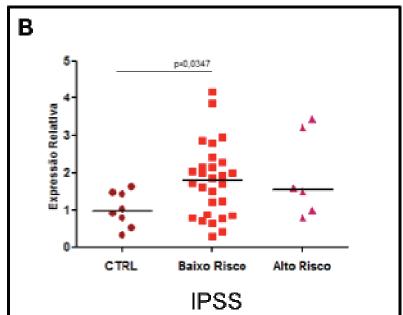
Corroborando os resultados encontrados no ensaio microarranjo em células CD34<sup>+</sup> de pacientes SMD-ARSA, a expressão gênica de *DMT1* foi maior em células de medula óssea total de pacientes com SMD (24/34, p=0,0282) e pacientes com LMA (12/19) em relação a indivíduos normais (n=7), a análise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

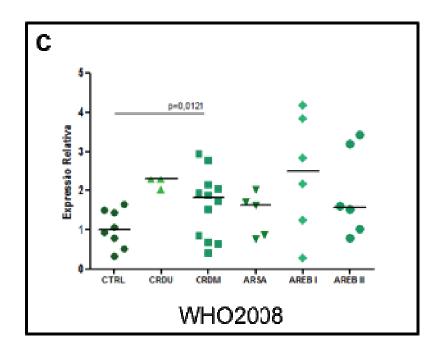


**Figura 12:** Expressão gênica de *DMT1* em células de medula óssea total de pacientes com SMD e LMA. O gráfico de dispersão mostra que *DMT1* foi significantemente maior (p < 0,05) em pacientes com SMD (24/34) em relação aos indivíduos saudáveis e também apresentou maior expressão em pacientes com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

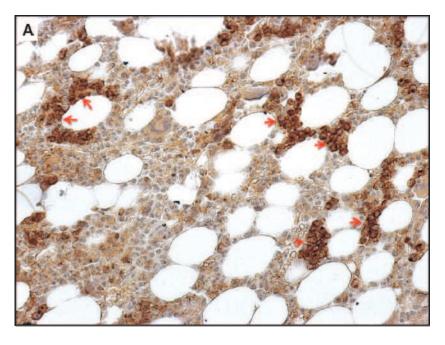


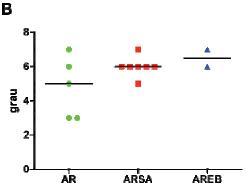




**Figura 13:** Expressão gênica de *DMT1* nos subgrupos de SMD. (A) Expressão de *DMT1* foi aumentada em todos os subgrupos: AR (11/18 p < 0,05), ARSA (3/5), AREB (5/7 p < 0,05) e AREBT (4/4 p < 0,05), de acordo com a classificação FAB, em relação aos indivíduos saudáveis (CTRL). (B) Na classificação 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).



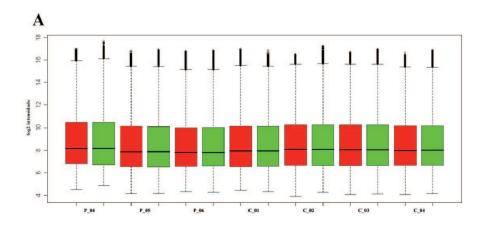


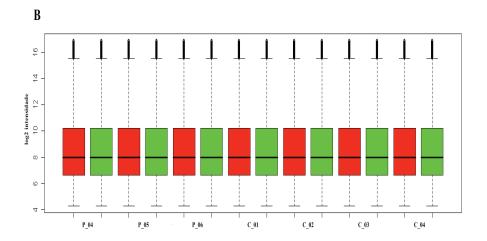
**Figura 14:** Imuno-histoquímicada proteína DMT1 em medula óssea de pacientes com SMD. (A) A imuno-histoquímica de medula óssea de 14 pacientes com SMD revelou expressão protéica de DMT1 principalmente nas linhagens eritroblásticas, indicadas nas setas vermelhas (paciente ARSA, com aumento de 20x). (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

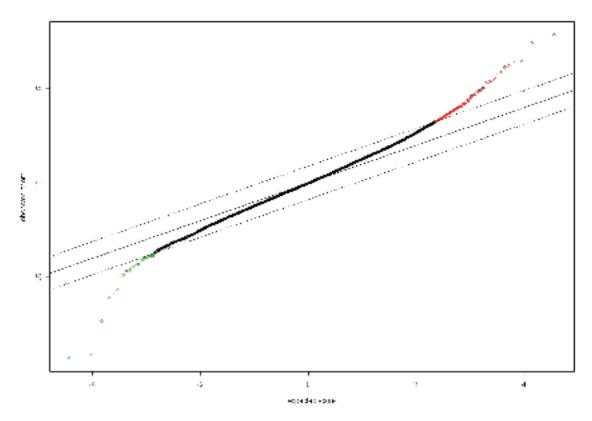
Células estromais obtidas de 3 pacientes SMD-ARSA (n<sup>os</sup> 4-6; Tabela 1) foram comparadas com células estromais de indivíduos saudáveis usando a mesma plataforma customizada de oligoarranjos combinados de íntron-éxon, como também sua análise de

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 $^+$ , p = 10 $^{-5}$ ).

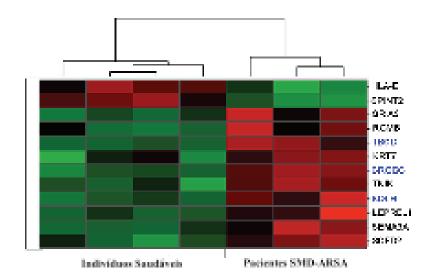




**Figura 15:** Normalização das amostras de células estromais. (A) Intensidade de fluorescência pela freqüência de pontos (sondas) de cada amostra em duplo canal (Cy3 verde e Cy5 vermelho) antes da normalização. (B) Intensidade pela freqüência de pontos após normalização por *quantil*.



**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.

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

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
Hipoexpre	ssos em S	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

SOLH	6650	chr16:529804-529859	+	Intrônico	Sense	0,000	4,35
GRIA3	2892	chrX:122063785- 122063829	+	Exônico		0,015	3,05
CROCC	9696	chr1:16968607- 16968658	+	Intergênico	Sense	0,038	2,43
LEPREL1	55214	chr3:191157346- 191157405	-	Exônico		0,019	2,41
TNIK	23043	chr3:172263055- 172263114	-	Exônico		0,021	2,28
RGMB	285704	chr5:98159978- 98160037	+	Exônico		0,044	2,02
TBCD	6904	chr17:78399392- 78399451	+	Intrônico	Sense	0,042	1,97
KRT7	3855	chr12:50917564- 50917621	+	Exônico		0,039	1,91
SCFD2	152579	chr4:53581096- 53581155	-	Exônico		0,000	1,84

<sup>&</sup>lt;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

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)

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

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

**Tabela 8:** Processos biológicos dos genes diferencialmente expressos em células estromais de pacientes SMD-ARSA.

Due cosse Dielé sie 1	Genes Diferencialmente		
Processo Biológico <sup>1</sup>	Expressos em Células Estromais		
adesão celular	$\uparrow RGMB$		
diferenciação celular	<i>↑SEMA3A</i>		
mobilidade celular	<i>↓SPINT2</i>		
replicação celular	↑ <i>KRT7</i>		
resposta imune	<i>↓HLA-</i> E		
transporte	↑ <i>SCFD2,</i> ↓GRIA3		
redução oxidativa	$\uparrow$ LEPREL1		
fosforilação de aminoácido de	↓TNIK		
proteína			

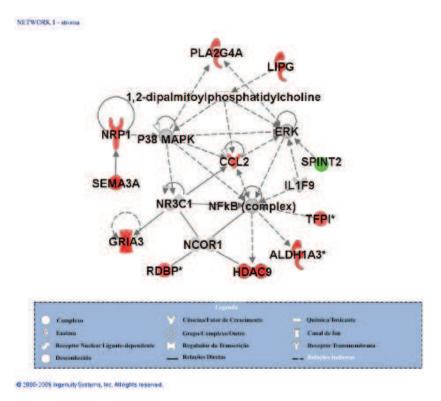
<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> As categorias dos processos biológicos foram obtidos do banco de dados GOA. Genes (↑) hiperexpressos ou (↓) hipoexpressos nos pacientes SMD-ARSA em relação à indivíduos saudáveis.

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.

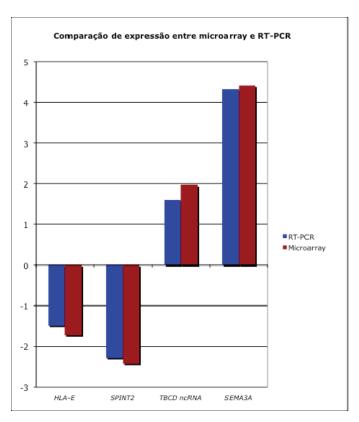
Grupo Funcional	Moléculas no Grupo	Descrição	-log10 (p alue)	Nº de Moléculas
Em célu	ılas estromais de SMD-ARSA (FDR <15% e alt			
	1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine,			
	↑ALDH1A3, ALDH1B1, BCL2L14,	Morfologia da	27	
	CARD14, CASP8AP2, CBFA2T2, ↑CCL2,			
	DNTTIP1, DOK5, ERK, ↑GRIA3,			
	↑HDAC9, IL1F9, LDL, ↑LIPG, MYEF2,	Célula, Dano		
1	NCOR1, Neuropilin, NFkB (complex),	Celular, Doença Neurológica		11
	NR3C1, ↑NRP1, Orm, P38 MAPK,			
	↑PLA2G4A, PLXND1, ↑RDBP, RELT,			
	Sema3, ↑SEMA3A, SEMA3B, SEMA3D,			
	SEMA3E, ↓SPINT2, ↑TFPI			
	ADCY9, ATF6, beta-estradiol, Ca2+,			
	chondroitin sulfate B, CTSH, DEFB1,			
	↑EMR2, ESM1, FKBP7, ↑FKBP1A,	Metabolismo		
	GFM1, ↑GSTM3, HLA-DOA, ↑HLA-	de Carboidratos,		
2	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			
	<b>^</b>		11 / 1	1

Genes (↑) hiperexpressos ou (↓) hipoexpressos em paciente SMD-ARSA vs. indivíduos saudáveis.



**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 presentes em nossa plataforma de microarranjos: ambos foram 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 (nºs 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.

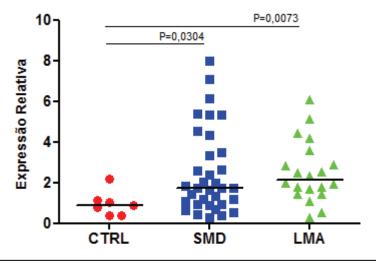
## 5. Expressão gênica e protéica do transcrito candidato *SEMA3A* em células estromais e de medula óssea total de pacientes com SMD

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.

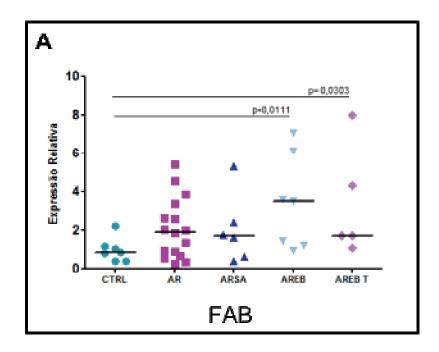
Corroborando os dados encontrados no ensaio de microarranjo, a expressão gênica de *SEMA3A* foi significantemente maior em células de medula óssea total de pacientes com SMD (25/34, p=0,0304) e também foi significativo nos pacientes com LMA (17/19 p=0,0073) em relação a indivíduos normais (n=7). Análise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

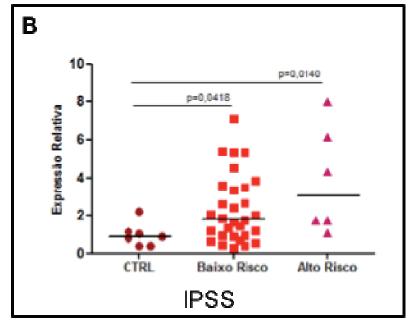


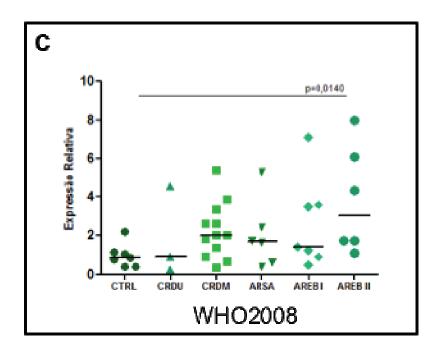
**Figura 20:** Expressão gênica de *SEMA3A* em células de medula óssea total de pacientes com SMD e LMA. *SEMA3A* foi significantemente maior em pacientes com SMD (25/34 p < 0,05) e LMA (17/19 p < 0,01) em relação a indivíduos saudáveis (CTRL). Análise foi realizada através de qPCR, usando os genes *GAPDH* 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).

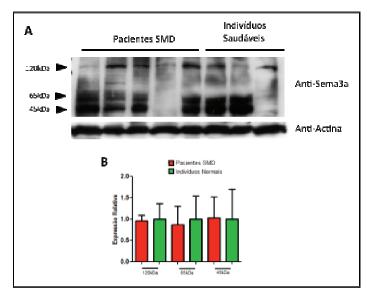


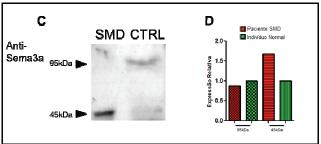




**Figura 21:** Expressão gênica de *SEMA3A* nos subgrupos de SMD. (A) Expressão de *SEMA3A* foi maior em todos os subgrupos: AR (10/16), ARSA (4/6), AREB (6/7, p < 0,05) e AREB-T (5/5, p < 0,05), de acordo com a classificação FAB, em relação a indivíduos saudáveis (CTRL). (B) Na classificação IPSS a 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<sup>TM</sup>, a expressão da actina foi utilizada como normalizadora para os extratos totais.



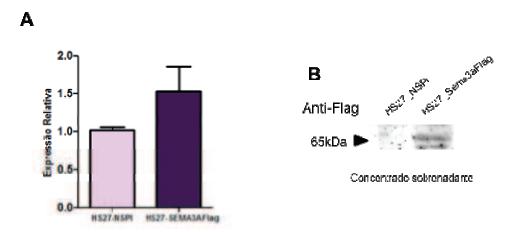


**Figura 22**: Expressão protéica de SEMA3A em pacientes com SMD. (A) O ensaio de WB revelou 3 bandas: 125 kDa, representando proSEMA3A e as 65 e 45 kDa, que correspondem as isoformas proteolíticas. (B) A quantificação das bandas, feita pela média de pixel/área, não houve diferença significativa entre 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

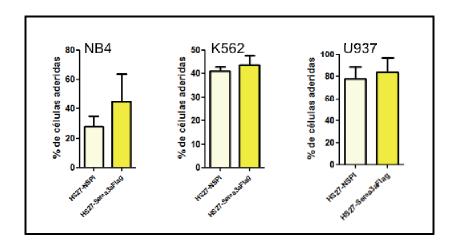
O ensaio de hiperexpressão de *SEMA3A* em células estromais HS27 foi realizado por transfecção de DNA plasmidial NSPI-CMV-MCS-myc-His vazio (NSPI) e o NSPI-CMV-MCS-myc-His contendo o gene SEMA3A fusionado ao epítopo Flag (SEMA3AFlag). As construções foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Ofra Kessler 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).



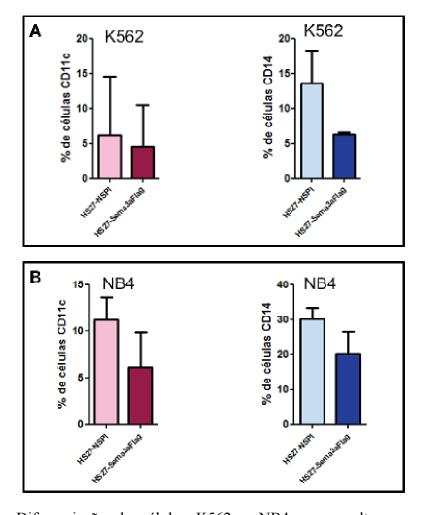
**Figura 23**: Hiperexpressão de SEMA3A em células HS27. (A) Ensaio de qPCR mostrou aumento de expressão gênica de SEMA3A, em células HS27 transfectadas com Sema3aFlag, em relação as células HS27 transfectadas com vetor vazio NSPI, após 72 horas de transfecção. (B) WB de concentrado de sobrenadante, 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).



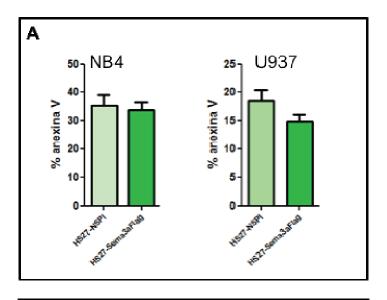
**Figura 24**: Adesão das células leucêmicas em cocultura com HS27 hiperexpressando SEMA3A. Células leucêmicas foram cultivadas em cocultura com células HS27 transfectadas com Sema3aFlag e NSPI como controle. Observou-se uma tendência de aumentar a porcentagem de células leucêmicas aderidas às células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

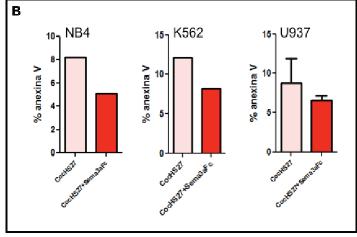
A hiperexpressão de SEMA3A em HS27 alterou a diferenciação das células K562 e NB4 em ensaio de cocultura. Ambas as linhagens apresentaram diminuição da presença do antígeno CD11c, indicativo de monócito e CD14, de macrófago, após 72 horas de cocultura com HS27-Sema3aFlag, em relação ao controle (Figura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

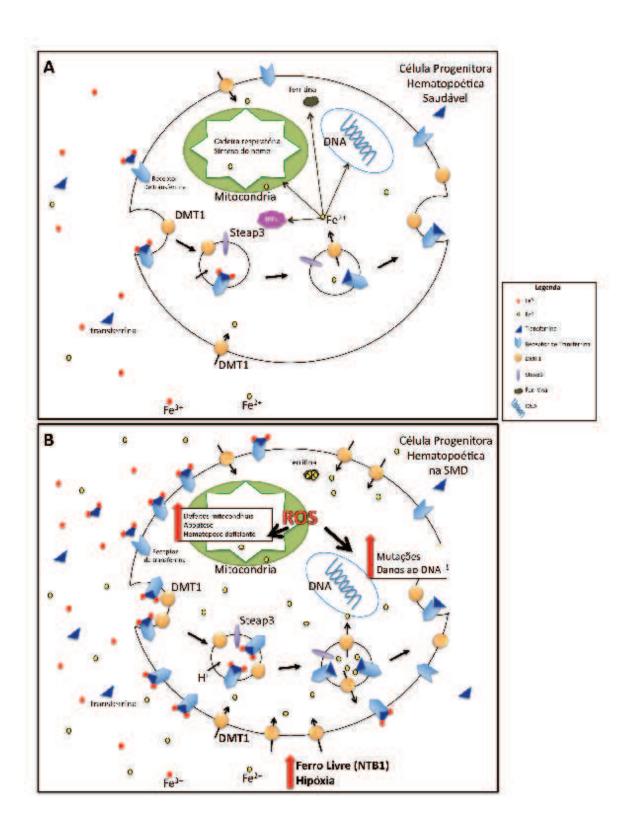


Figura 27: A aquisição do ferro na célula precursora hematopoética saudável (A) e na célula precursora de SMD (B). (A) Na situação normal: A transferrina com duas moléculas de ferro férrico (Fe<sup>3+</sup>) se liga ao receptor de transferrinana membrana celular e este complexo induz o endossomo. O pH do endossomo diminui com a presença da bomba de próton e faz o complexo liberar o Fe<sup>3+</sup>, o qual é reduzido para Fe<sup>2+</sup> pela ferroredutase Steap3 (seis-transmembrana epitelial antígeno de próstata) e saem do endossomo via transportador DMT1. No citosol o Fe<sup>2+</sup> 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<sup>+</sup> e estromais de SMD-ARSA foram claramente distintos dos obtidos de células CD34<sup>+</sup> e estromais de indivíduos saudáveis, representando 30% e 25% do total de transcritos diferencialmente expressos em células CD34<sup>+</sup> 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

## 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 microarray-based 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.
- 19. 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 MDS-pathophysiology, diagnosis, and complications. *Ann Hematol* 2011, **90:**1-10.
- 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.
- 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.
- 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



CEP, 24/05/05 (Grupo I)

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

www.fcm.nncamp.br/pesquisa/etica/index.html

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 subgrupo 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 mínimo, 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 (apenas pacientes com idade acima de 65 anos); tratamenti *in vitro* com agentes terapêuticos em ambiente de células estromais (apenas pacientes com idade acima de 65 anos); extração de DNA para investigação 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

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

## Artigo aceito para publicação

Barano et al: RHC Mindical Genomics 2010, \$101 http://www.biomedcentral.com/1755-6794/4/87



## RESEARCH ARTICLE

**Open Access** 

# Identification of protein-coding and non-coding RNA expression profiles in CD34+ and in stromal cells in refractory anemia with ringed sideroblasts

Manana O Barattii Vian B Moreira' Fabrola Traina' Fernando F Costa' Sergio Wigovskii Almeida' and Sara T Olulla-Saadel

#### Abstract

Background: Wyellodyspiantic syndromen (WD%) are a group of donal hematological deorders characterized by ereflective hematopoiesis with morphological evidence of marrow cell dysplasia resulting in peripheral blood cytopenia. Microartay technology has permitted a refined high-throughput mapping of the transcriptional activity in the human genome. Non-coding BNAs to:dNAs) minocribed from intrusic regions of generale involved in a number of processes related to past-transcriptional currinal of gene expression, and to the regulation of econ-slapping and intron retention. Characteruption of voRNAs in progenitor cells and stromal cells of MES patients could be strategic for understanding gene expression regulation in this disease.

Methods in this study, gene expression profiles of CDS4\* cells of 4-patients with MDS of reflactory anemia with ringed siddicitizats (RARS) subgroup and cromat cells of 3 parients with MDS RARS were compared with fieldfly individuals using 44 Ecompanied intron-mon plagoanays, which included probes for exerts of protein-coding genes, and for noncoding RWs transcribed from imponic regions in either the sense or antiverse triands. Real time RT RCR was performed to confirm the expression levels of selected transmipts.

Results: in CD34\* cells of MD5 HARS patients, 216 gener were agrifuently differentially expressed to value s 081) 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 by value is 0.00 in companion to healthy individuals, of which 2 (25%) were non-ruding transcripts.

Conclusions: These results demonstrated, for the first time, the differential in WAA expression profile between MDS-RARS and healthy individuals, in CT341 calls and dromal orbs, suggesting that ncRNAs may play an important role during the development of meriodysplastic syndromes

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of clonal hematological disorders characterized by ineffective hematopoiesis with morphological evidence of marrow cell dysplasts resulting in perspheral blood sytopeura [1,2]. Low-risk MD5 are characterized by pmfound anemia and transfusion dependency, and a relatively lose risk of progression to acute myeloid leakemia. Refractory anomia with ringed sideroblasts (RARS) is a subtype of low-risk MDS in which an excess of iron accumulates in the perimurlear mitochondria of ringed sideroblasts 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 certain bematelogical disorders, the marrow microenvirocement is abnormal, both in comprsition and function [10]. In MDS, the adherent layer of hone marrow strong is defective in supporting normal

Department of Honoral Mindress, School of Medical Science, I of Fernandering Commit Welcom of Company 1988 Will Company, W.



BioMed Certiful Adaptive stores depotestation of bookes by the which permit unremoved use demotation and improduction of posterior of the permit unremoved use demotation, and improduction of posterior or production of posterior or production of posterior or production of posterior or production or preduction or production or production or production or production

myelopuresis in vitro, presenting a poor maintenance of hematoposetic stem cells [14]. Alteration of stroma 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 human genome, and described that the majority (63%) of transcripts was of long non-coding RNAs incRNAs). These transcripts resided outside GENCODE auministrations, both in interonic (40.9%) and intergenic (22.6%) regions [14]. Non-coding RNAs are known to be involved in different biological processes such as cell survival and regulations of refl-cycle progression [15], transcriptional or post-transcriptional control of gene expression [16,17], genomic imprunting [18] and hiogenesis of mature RNAs through changes in the intron-exon structure of host genes [19-21], in addition, introns is are been thown to be sources of those to cRNAs such as microffNAs [22] and small nucleolar RNAs [23].

Microarray technology has permitted a refined highthroughput mapping of the transcriptional activity in the human persons [25], and has revealed different expression signatures of long introns neRNAs in prostate, liverand kidney [25]. In addition, sets of long introns neRNAsseure found to be responsive to physiological stimuli such as retinoic acid [26] or androgen bormone [27]. Long neRNAs change the interpretation of the functional basis of many diseases [28,29]such as nethaliasemia [30], Pruder-Willi syndrome [31], and cancer [32-35]. Recently, a myelopoiesis-associated regulatory intergence non-coding RNAs transcript has been described [36].

in the present study, expression profiles of CD34° and stromal cells of MD5-RARS patients and healthy individtals were characterized with a 44 k combined introneuon oligoaren platform, allowing the identification of protein-coding and intronic neRNA expression signatures in MD5-RARS patients.

#### Methods

#### Patients

Bone marrow (BSI) samples were collected from 4 healthy subjects and 7 MDS patients, seen at the Hematology and Hemotherapy Center. University of Compens. All patients were diagnosed as RARS according to the french-American-Buttols (FAB) classification and did not present chromosomal abnormalities; they received no growth factors or any facther MDS treatment. Partients characteristics are shown in Table 1. All patients and healthy subjects provided informed written consent and the National Ethical Committee Board of School of Medical Science. University of Campinas approved the study.

#### CD34+ cell and stromal cell selection

BM menumacions calls were isolated by density-gradient centrifugation through Ficoli Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden's, labeled with CDS4 MicroBeads, and CD3F cells were isolated using MACS magnetic cell separation columns (Miltenyr Biotec, Monchengladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. The purity of CD34' cells was at least 92% as determined. by fluorescence-activated cell seeting (FACS), using anti-CD36 antibody (Caltag Laboratories, Burlingame, CA). The mononyclear cells without CD34°, were plated outo Iscore's Dulbeccos (IMDM) (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal boxine serum and 10% horse serum. Supernature with non-adherent cells was removed weekly and replaced with fresh medium. When the monolayer was established 190% confluence) cells were trypsinized 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 absence of CD\$4, CD\$5 and CD68 untigens.

#### BNA extraction

Total BNA was extracted with RNAspin Mini RNA belation Kit (GE Healthcare, Feeburg, Germany). The integrity of RNA was evaluated using Agilent 2100 Electrophicesis Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

#### Microarray experiments and data analysis

Gene expression measurements were performed using 94 k intron-exon oligoarrays that were custom-designed by the group of Vertovski-Almeida and collaborators [25] following Agilent Technologies probe specifications [37] and were printed by Agilent. The array comprises 60-mer oligonucleotide probes for 24.448 long (>500 nt) ncRNAs. mapping to 6,282 unique gene lock with generale coordsnates 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 intergonic regions [38]. The array also comprises 13,220 probes for the respective protein-coding genes (25). Gene locus name annotation for introne ncRNA is that of the proton-coding gone of the same locus; intergenic ocRNA is associated with the name of the nearest protein-coding gone 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 total BNA was amplified and labeled with Cy3 or Cy5 using the Agilent Low BNA Input Phoessent Linear Amplification list PLUS; two-Color (Agilent Technologies) according to the

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

Pattents in	Gene expression cp34' cells	Gene expression analyses for stroyal cets	Age (years)	Cender	Hb (g/dL)	ANC De10FINE	Fluncies count (x10 <sup>2</sup> /uL2	(No.)	RS (%)
1	Airay	None	72		7.2	1.00	rs .	2.	30
2.0	Army, of Cit.	None	39	M	8.8	1.31	186	0	140
	Arrive of Cit.	OFFICE	6.0	M	124	6.99	110	2	16
	Array gPER	Array of Cit	10	M	10.2	9.54	322	0	18
*	qFCII.	Arms of Cit	60		67	8.51	12	0	22
	<b>GPCH</b>	Array, oPCR	200	M	84	2.81	754	0	**
7	None	aPCR	75	M	6.1	8.75	216	0	27

His endicates hemoglobias. MHC, absolute neutrophil account; BM, bons marrow; and KL, resp sides obtain

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

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

Data were normalized among the samples by quantile [29] using Spotlite DecisionSite for Microarray Analysis (TIBCO Software Inc. Somerville, MA, USA), Genes difbrentially expressed between MDS-RARS and healthy individuals were identified with the Significance Analysis of Microarray (SAM) statistical approach [40] followed by a patient horse-one-out cross validation [41], which consisted in comoving one sample and determining a new set of significantly altreed generosing 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 both CD34' and strengl cell samples we used the following parameters: two-class unpaired responses, t-statistic, 500 permutations. We considered as significantly altered those genesthat showed a minimum fold change of 1.7 and moximum 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 CDS4' or 15% for stromal cells) were used for generating a last of altered genes that was upleaded to Ingenuity Pathways Analysis (IPA) software (Ingenuity Systems, https://www.ingenuity.com/ for identification of relevant altered gene networks. The software assigns statistical scores, faking into account the news set of significant genes, network size, and the total number of molecules in lingeauity Knowledge Base. The network score is the negative logarithm of p-value, which reflects the probability of finding the focus molecules in a given network is random charice. The identified network is then presented as a graph, undecating the molecular relationships between gene products. The taw data has been deposited in Gene Expression Omnibus (GEO) http://www.nchi.nlm.nih.gov/geo/ database under accession number GSE 18931.

Gene Outology Annotation (GOA) database <a href="http://www.chr.ac.uk.COA">http://www.chr.ac.uk.COA</a> was used for annotating the basing stal processes of proteins smooded by transcripts that were statistically significantly altered and showed at least 1.7 fold change in expression levels introsic non-coding RNA transcripts were annotated according to the corresponding protein-coding goves transcribed from the same foot. Fuscional descriptions of the genes were obtained from the Online Mendolian Inhoritance in Man (OMIM) database of the National Center for Biotischnelogy information (NCBI) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/.

#### Quantitative real-time ST-PCS

Real-time RT-PCR was performed in occilien expression levels of expression data for selected transcripts. Reverse transcriptom was performed tasing. Superscript 'Ill Reverse Transcriptase (invitrogen Life Technologies)-Priners (Table 2) were designed using PRIMERS software (version 0.400 http://frodo.wi.mit.edu/primeri/with-published sequence data from the NCRI database. For real-time PCR analysis, Power SYMR Green PCR

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

	cores	artisense
ietes selected for validation in CDS	A' cells	
MPSOC -	SCETGGCAGAAGAGGCATACAY	FAGGGAGCCGACACTGTCTTTY
GCDH_AVAMA	S'angiproportingogenteses?	Signifiagram agtitions/
HOK	SGAGTTEATGGECAMAGGAAGE	VGGAGGTCTEGGTBGATGTAGE
MF_notion	S'atopagettipppppppagatif	VagcascaptptagcqcastqY
NWANZ.	S'ACTOCAACCCGGCTHTGACT	SYNTOGROCCAGTEAGGAGATT
MHANZ_RESPAIR	Firthcoppytylctquipmag/	Straggagetaggagetgif
MINERAL	VTECAGATACTUTECCACTGACCY	<b>ETCTGGATACATCAATGGAGGCTS</b>
WWAZ_nc854	S'orginageschypitte?	Expgrompagamenggal'
Genes selected for validation is at	normal cells	
SPINT2	TTCTGTTTCTCTGGGAGGTAGGAS*	SYGATCAGCGAGGAAACAACTT
HCA-6	<b>SWIEGEGGGCATCATTGCTF</b>	FGAGTAGETECCTCCTTTTCCAY
SEASON	E/AGGGACCGAAAACAACGTC#	S'ESTIGNATECTECTOFFTICTAL
TECO_HURSE	STICTION CTOGTGAGTGTGAGT	T'ANGSTETTGGANGGONGONGT
SDEH, noRed	PAGTETCCAGAGTGGCATGTG	TAAAGGTAGGCXGGGGAGGTAY
Endogeneus gene		
weet	STECAGC AGGTE AGC XAAGAAT	VGAACGTCTTGCTCGAGATGTT

Master Mix (Applied Booystom) was used, according to the manufacturer's indirections, and the reactions were run in a 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosepterns) 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 gene, and the relative expression was calculated as  $2^{-64\%}$ , where  $\Delta\Delta$ CT is the  $C_1$  value difference for each patient normalized by the average  $C_1$  difference of tamples from healthy subsects ( $\Delta\Delta$ CT method) (42).

#### Results

#### Protein-coding and non-coding transcripts expression profiles in CDS4° cells

CD34\* cells obtained from 4 patients with MDS-RARS mos. 1-4: Table 11 were compared with CD34\* cells of healthy individuals using custom-designed combined intron-eaten expression oligoarrays [25]. The oligoarray includes probes for protein-coding genes and for both sense and untrense strands of ncRNAs, as described in the Methods. In order to reduce the effect of individual variability, thus promoting the identification of a robust

gene expression signature of MES-RARS, Significance Analysis of Microarrays (SAM) [40] was combined with a patient leave-one-out cross validation [41]. A total of 216 significantly iq-value s 0.011 differentially expressed transcripts between MDS-RARS patients and healthy andviduals were identified (Figure 1), being 129 downregulated and 87 up-regulated in MDS-RARS (Additional file 1). Interestingly, 65 differentially expressed transcripts were ncRNAs, 32 down-regulated and 33 up-regulated (Table 3).

Differentially expressed protein-coding genes were related to cell adhesion, apoptosis, on transport and regulation of transcription (Table 4). Six pentsin-coding genes, namely ABCB?, EBPL IFEO, IL19RA, NPAA2 and VEGF, have been previously shown in the lineature additionentially 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 identifying enriched gene networks and functions among the differentially transcribed protein-coding genes. We identified 11 relevant networks that were significantly

Table 3: miRNAs with significantly abweed CD14P sepression in MDS-RARS patients in relation to healthy individuals.

Same parcer same/	tensill	suttisk Probe Countrales	Probablished	Ige	Desertation relative trapertoin coding gare	CHIN	Feltitlange
Down explana	a MOSTARIS						
MET	1001	(MST0000270000		PROBE	Serve	6,000	16.60
EW.	1000	<b>8V1047814003790340</b>		<b>TOTAL</b>	Sinal	1000	0.30
1313	11005	DISTRIBUTION SERVICE.		1000	Smar	0.004	410
LET T	1100	prendeducti-deserte		<b>CANGES</b>	More	1001	410
LAPR	.011	PATRICIAN COMPANY	4	PARTY.	Amount	2.000	415
met.	TIME	AMERICAN EXCHANGE		napie:	Street	100	0.98
PMAPS	7138	DESTRUCTORS (1997)		<b>FROM</b>	Antonio	8 000	6.21
NOTE:	3010	eventuamie-racinis	14	Pergmit	Sink	1000	4.9
OTHE	11012	INCLUDED CHOICE		1000	Access	81000	0.96
MONT	71906	pv120464257616		Printer.	Series	8008	4.00
041	4611	INCHESTATIONS	- 14	Yelow	Total	100	1278
STREET	1000	<b>BATTERNOOT TENEDO</b>		<b>Margeni</b>	Smar	104	0.0
761	700	(NAMED OF TAXABLE PARTY)	4	Widows.	Serve	6,000	4.0
WAF	4610	\$140M0145W0	.+.	PROFE	Seree	6.001	411
riet .	7066	B40549HI-0-0000		Tribute:	Since	1000	2.11
FMQ :	100	PATRONICH CHIEF.		<b>PARTIE</b>	Series	2000	4.86
N/P/SI	WIL	SECTION OF THE		Parper	Sanac	0.00	4.04
DATE:	1620	(NR.3006012-3036671	*	Indone	Sense	8000	0.03
FROM	14405	04/2028HH-20000H		Yeom	Artonia	1000	1188
(PSPs	11012	\$12576927-\$7648V		nace:	Artistra	1000	-100
4007	171001	MODERNOOD SHOOM		Prices	Since	640	484
Cierti	1111	DATE HAVE THE		1000	Antonia	9.000	100
PROF	910	personne sonner		PROM	Account	1,000	-188
LANS:	2011	gyr) as well to women .		<b>EMPROC</b>	Account	0.000	486
ery .	4200	PATRONIAN MONETON		FROM	Sinse	8.000	100
PACI	19884	(MANAGEMENT ADMINET)		ndow	Sinal	0.001	100
00400	+1147	delication delication.		Distance:	Sector	500	0.02
466	1007	percentage property.	4	Marie .	Artonia	8.001	079

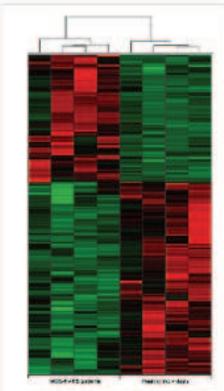


Figure 1 Officientially expensed transcripts in CDS4 calls of MDS-RARS persons and beautify entirely in the parent incomes to expense or many and 2th opens and otherwisely expensed agrees or CDS4 call of MDS RARS options companied to feature in expenses and actually committee of the MDS rate change of the Sartines represent used to personal to expense or expenses and the call of the call of the CDS4 doesnot used to the call of the cal

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, humoral informe response and those morphology.

Eight transcripts were chosen to validate microarray data by real-time RT-PCR, RNA extracted from CDSR cells from 5 MDS-RARS potterns (nos. 2-fc Table 1) was calculated as fold change compared with healthy controls. All transcripts were confirmed by real-time RT-PCR (Figure 3).

#### Protein-coding and ncRNA transcript expression profiles in strengl cells

Stromal cells obtained from three MDS-RARS patients (nos. 4-6; Table 1) were compared with stromal cells of healthy individuals using the same custom-designed combined introp-exon expression oligoarrays and significance analysis. SAM combined with patient leave-oneout cross validation aboutfied 12 significantly (q-value s 0.05) differentially expressed genes (10 up-regulated and 2 down-regulated in stronal 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 dresors (correlation coefficient between all donor and patient stromal samples = 0.93, contrasted to 0.9 of CDS4\* sells, p = 10 5). The signature expression profile of protein-coding transcripts in MDS-RARS stromal-cells revealed genes-related to neveral biological processes, such as cell morility, DNA replication, protein amino acid phosphorylation and protein transport (Table

Ingenuity Pathways Ausiyais (IPA) of stromal cell general statistically differentially expressed between MDS-RARS patients and healthy individuals (fold change > 1.7; q-value < 0.15 in all patient leave-one-out cross-validation analyses) aboutfaed two significantly oriched gene notworks (p-value < 0.001) (Additional file 2). The most agreements of the cell morphology, cellular compromise, and neurological disease (Figure 5).

Four transcripts were chosen to validate microarray data by real-time RT-PCR. RNA extracted from strongal cells from 5 MDS-BARS patients (sps. 3-7; 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 oligicarray and stringent statistical criteria to determine the protein-coding and intronse non-coding transcript expression profiles in CD34° and stromal cells of MDS-RARS potients and healthy individuals. We herem validated the expression of a set of selected transcripts by real time RT-PCB in fise MDS-RARS patients, however future confirmation in a larger group of MDS-RARS cases is warranted. Puth way analyses of differential protein-coding transcripts pointed to new genetic networks that are altered in both

Table 4: Biological processes of genes differentially expressed in CD34: and stromal cells from MD5 RAR5 patients.

	Genes Differentially Expressed				
Stological Process*	to CD34+ Ceffs	in Stromal Cells			
apoptivis.	Астичес, Америчения, Тенкова, Таких, Аврисов, Атминикал, Ттиментив, Актистия				
blood coagulance	LISECKE TIGHARMAN				
pil athesin	LAMPS, LODGES JOYNES THOMS, LINNES, LIAMES, LIAMES, LINCOLN, LINCOLN, LINNESS, LINNE	TROM			
cell cycle	Lezez, Louise, Liannes				
cel differentiation	Endorr, Endorce	THEMPAR			
cel monkty		Lorenty			
of polifester	LCONT, LOUIS, LIVETS, TIMES, LAWSE, LIMES, TSTOCKETT, LLOWERS, TMYCHA				
DNA replication		Terre			
MANAGEMENT .	LINERS LAMBS LUNCY AN				
(Fremune Response	Legra, Terra, Lawer, Towns, Leven	Locat			
milimentary regionar transport	THORRE JCS, LACKE TEVEN				
	LAKORY LODGER, THACHI, LIKOREN, LIKOWARI, LIKOWARI, LIKOZI, LIKEYARI, TISORIA, TISORIA, LIKOWARI, TISORIA, LIKOWARI, TISORIA, LIKOWARI, TISORIA, TI	Тастра Дени			
pridation residences	LANSS, Tomber, Terror, Lender	Tuessor			
protein amino acid phosphosylation	Jeans Twee Tooms	Arrest.			
regulation of transcription	LECHDOS LARMY, LAPER JOACHO, LORRINO LEDEZ LEREZ LINEZ TERRO, TORREZ, LIGICADEZ TA TRICIDA, TARBAR, TARBAR, LINOXOME, TARBA, LINEZ LINEZE LINEZES, SZININE	_			
rition processing					
signal manufaction	LANGE, TAXONERPOR, SCHOOLING, TARGET, SPECIA, TROOPER, STUBE, STONISSESS.				
offers	TANDRES : JANDAY TACHY, JACKHE TADOYY, JANYI JACKER JACHYS, JONAND JONAND JONAND JONAND TOCKER TOTAL TOCKER TOKEN JONAND JONAND TOKEN TOKEN JOHN TOKEN JOHN TANDRES TOKEN TANDRES JANDAY JONAND				

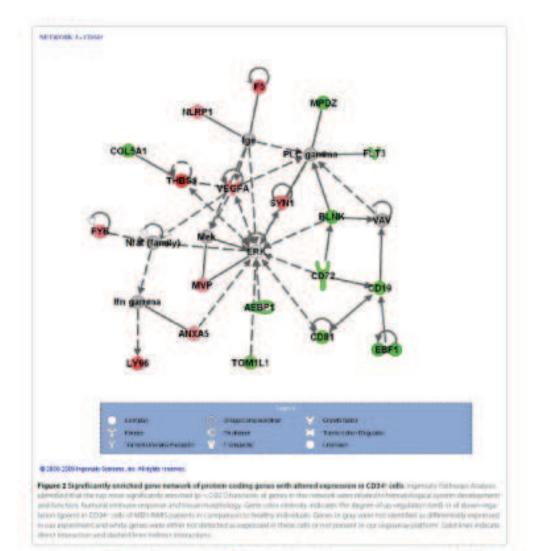
The backgrad processor categories were obtained from the GCA database. Genes (7) up-regulated or (3) down-regulated in MDS-4565 patients with respect to healthy with educin.

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

MDS are characterized by hornatoposetic insufficency associated with cytopenia, leading to sovere merbality in addition to increased risk of leakents transformation [66]. The exact stage of CD34 programme colis involved in the process of MDS and transformation to AML or still in debate. Bone marrow microenvironment contributes to regulate self-renewal, commitment, differentiation, predictation and the dynamics of apoptosis of hornatoposetic progenitors [47], and CD34 progenitor.

cells are known to be severely impacted in MD5 by the composition of micro environmental stimuli [46]. Detection of differentially expressed transcripts in MD5 EARS stromal cells suggests that these transcripts could contribute to maintain CD34° cells.

Pathways analysis of the set of protein-coding teamscripts abreved in CDS4\* cells of MDS-RARS patients revealed an amportant gene network related to bematological disease, including BLNK, CD19 CD72, CD81, EBF1, FS, FLY3, LY96, AFDZ and THRS1. Dosen-regulation in MDS-RARS of genes related to the B cell receptor.



signaling pathway were found in our results (SLNK, CDF) and CDF2), and the low expression of several genes two-local in B lymphocyte development, corroborate the hypothesis that early MDS can be defined by a 8-cell progenitor defect [49].

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

3 different neRNA transcripts with altered expression in the CD34° cells of MDS-RARS patients, from gane loci of matechondrial proteins (AASS, GCDH and PPR) and o modulated misochondrial proteins coding transcripts. In addition, corroborating our findings, the down regulation of iron transporter ARCR7 has been described in CD30° cells of patients MDS-RARS, indicating that low ARCR7 levels would contribute to absocuted mitochondrial aron

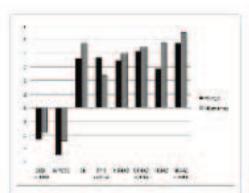


Figure 3 Validation of gene expression data of CD341 cells by real store AT-PCB. Corr process of gene expression benefiting south the MFFC Block transform of gene expressions are recovered, expressions of the MFFC Block transform of the MFFC BLACK patients and the adjustment at burgard in CD342 cells in the order of the adjustment and the adjustment in repair or the adjustment at the adjustment and adjustment and

homeostasis [43]. Furthermore, genes related to hismabiosynthesis pathway and transferrin trafficking (PX/ON and MPUSC, respectively), were down regulated in MDS-BABS CD34: cells. These differentially expressed genes could be related to the iron accumulation observed in mitochonders of BABS patients.

One of the mechanisms that contribute to hypercellular marrow and preipheral blood cytopenia of patients with surly stage MD5 is the significant increase in apoptosis of himatopoietic cells [51]. The higher expression of Fas-Fast, system found in MD8 plays a role in inducing MD8 bone reserves apoptosis and works in both an autocrine thematopoietic cell-himatopoietic cell interaction) in paracrine (betrattopoietic cell-stromal cell interaction) pettern [52]. The protein encoded by SEMA34 (Class 5 semaphorius), a secreted member of the semaphoriu family involved in axional guidance, organogenesis, angio-

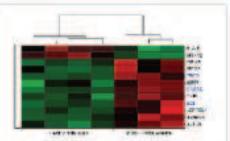


Figure 4 Differentially expressed brancings in strematicells of NDS NAIS patients and healthy endividuals. The particulation the expression makes if Q applicately attended to healthy endividuals (NAI FISK - 10s and hidderlying a L.7). Each rose represents a single given by protection of the strength of particular than a final matter of that, and a matter of that a single given of matters in that, and a matter of that a single given before a single given by a strength of the particular of super-son protection are particular at a single given before a single in two homogeneous proper than Salar at left is expression used of each particular or devictor is a consensual strength of expression given by the number of startistic devotrors at surgion in the particular or expression is a single or each of particular or the average volunter of startists) devotrors at a surgion. In NOS EART particular or that of the given over one or englished.

genesis, and highly expressed in several namor calls [53,54], has recently been demonstrated to be an important determinant of leukemic cells sensitivity to Fesmediated apoptosis signal [55]. Furthermore, Semaila has already been described to act through different signaling pathways to control neural progenitor cell repulsion activating Eck1/2 or apoptosis process involving g38MAPK [56]. Surprisingly, SEMA3M is present in both affected networks of MDS-RARS stromal cells (see Additional file 2), suggesting participation of this gene in diverse abnormalities implicated in the modification of humahopointic cells development and apoptosis in MDS [12,3,3].

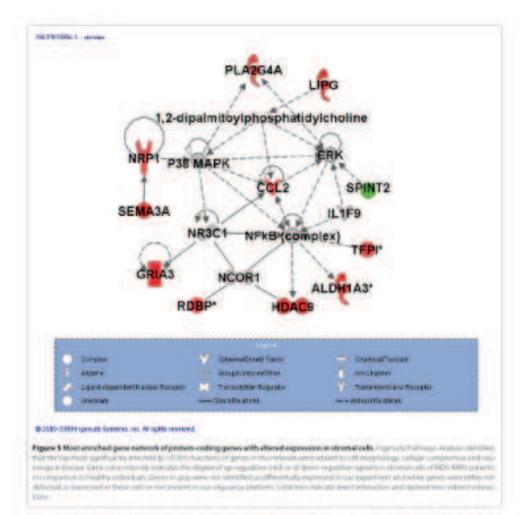
The mon-coding expression profiles of CD34' and stromal cells of MDS RARS were clearly distinct from

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

Seer Locus Name*	Locus ID	nck/sA Probe Courdinates	Strand.	Type	Orientation in relation to protein coding gene	d salon,	Feld Change
Up-regulation	IN MOS AAR						
SOUH	6850	ch/16.529804-529859		Whom:	Sense	0.000	4.60
CHOCC	Sein-	shift \$4968007 16966050		Intergener	Seems	a con-	2.40
TRICES -	6404	chelt:repressy-repress)		monic	Simon	5.042	100

Gene locus name for extranc suffile is that of the proton-coding gene of the same locus, extregenc nufffle is annotated with the name of the newest preten-coding gene in that claim recent

Meanum significance among all patient Leave-one out analysis



those obtained from CD34 and stromal cells of healthy controls, expresenting 39% and 25% of the total associated differentially expressed genes in CD34; and stromal cells of MD5-BAR5 patients, respectively. Currently, evidence of the biological roles played by ncRNA have increased, especially those transcribed from partially tonserved introns of protein-coding genes [57]. Recently, sosinophil granule outogeny (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 13 differentially expressed or RNA transcripts in CD34' cells of MES-RARS gatients for which there was a simultapeous change in expression of the protein-coding gene in the corresponding locus-for 7 of them both the ncRNA and the protein-coding gene were simultaneously driven regulated in MDS-RARS. 5 were up-regulated, and in one gene locus the TIN ncRNA was up-regulated whereas the protein-coding gene was down-regulated whereas the hoth, protein-coding and non-coding pairs in the same locus, suggest that these intermic relibids may set upon its regulatory factors, modulating the stability and/or

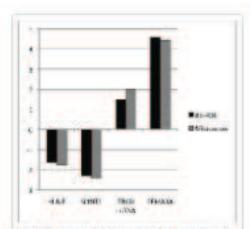


Figure 6 Validation of gene expression data of stromal cells by real-time 87-PCR. Comparison of gene expression advanced from the entering of the PCR. Display hard and entering processing open and the form of the large wide general overtex editioned at further the internal cells of MCS-WAS parkets and major real-major advantage for the entering of the entering of

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 ONR442 e NR443; known to be involved in T-cell apoptions, brain development, and vancular disease [60], and both aboved a simultaneous up-regulation of the protein-coding and the ncRNA from the same locus in hDS-RARS, suggesting that these ncRNAs could be involved in the control of protein coding expression of this gene family in MDS-RARS patients.

#### Conclusion

The presence of introne neRNA transcripts differentially expressed as CD54 and stromal cells may shed light upon the not yet fully understood molecular mechanisms involved in the heterogeneity of myslodyspitatic syndromes and suggest that ocRNAs may play a role during disease development. Characterization of those ncRNA transcripts would contribute to a better understanding of MIS-RARS, or even towards the development of biomarkers and therapsoriic targets.

## Additional material

Additional file 1 Transcripts with alternil expression in CD34 mile of MD5 8A95. The file can be removed with About Account for the

Additional file 2 The genetic estimate of printer-coding transcripts differently expressed of ADS-BARD patients as relation to health and/orders, channel from EM analysis. The fire general and and Access from a business.

Additional file 3 framounts with allowed expression in strengt cells of MDS-ACARS. For the carrier expression is defined as a first and a second cells.

#### Computing retorests

The pullicyt distance that they have to competing exercis-

#### Authors contributions

160 as the principal starting to existing the principal representative the paper 180 performed the crismatoy washes for this study of security the papers. VIC. 160 and 1905 condenged the research 486, 168, 00, was 2001 and 2005 condenged the research 486, 168, 00, was part of the paper. W. addition have replicated by a paper.

#### Acknowledgements

The author's recult starts thank Eugest I. I again to the English resistant of the results for their Cardinal Louder Reports for the transport the preparation of the measurings. This shally was supported by the Cardinal on the preparation of the Paration of the Plant SWIPT and Compillate Business Conferences.

#### Author Dataly

\*\*Department of Improvi Medicine, School of Medical Science Perhapsings and Hemodelings Contex University of Companies, 1988-509 Continues, of Street, and "Reportments de Programme, treducin de Garriaca, Visionisabelle de Silvings Saude Stiffed Will Saud Faults, 17 Stories."

Pedatrick 25 January 2010 Acceptod: 15 Ady 2010 Peditabalt 15 July 2010

#### feferense

- Cat Al. Vacionas I. mar II. Scotters TV: Mystodynyhotto rawahrenen.
- Emission of the former has finger than post of the property of
- avadrame. Res Pass Res Che Nasonatil/ 2004; 12:043-5:77

  8. Aut C. Scheel III. Variation Fellingeness, etailings and epidemiology
- of regularity spatial section of the control of the
- Police III. Secretary, Department Avenue & Milliochandral Berman experience on pythonol cells flow publishes only other Master agencie. (New 2001) 100 vols-2000.
- Security of Case, Jathan Mill Images 6 Month Case, Grant Mills Makes 1, Hardwise 7, Case, John Mills Images 6 Month Mills Indiana 1, Hardwise 7, Case of Case Makes Mills Indiana 1, Hardwise 7, Case of Case Makes Mills Indiana 1, Hardwise 1, Hardw
- Officertally expensed green is adult femilial municipalisatic syndromes. Insurence (ISIA EB-600-408
- Trialogist A, Cossessi M, Geography MA, Materian L, Porto AC, 6040 E. Carrottell L, Washy L, profession Trible E, may Geographical profess of CD 54 collin in capital population syndromes involvement of exteriors of broadcast algorithms and convolution to 6AS subtype and lamprogram. New 2005, 108, 155-165.
- Italizario Afri, de voci i, fice poi i fi fitagge 2: Successio III. Custo Paris III.
   Characterization of gene expression of Q34x calls from normal and myntollygibotic bone marrow. *Proceedings* 100: 110: 2115-2110.
- Cherris Zong W. Weptzer A. Wirtge E. Manapovin JF. Kappyon S. Marris DN Yanguris. Determine gene eagression profession of COM orbit from patients with regold dysplicitic syndrotre chromoterand by genefit chromosomal despensibles. Servi 2004. 1094;1:0-4.18.
- House In Comparison and function of the homopoints. microenvironment in human marked leukering. Income 1999, (B) 101-1014.
- 11 Toward (S. Wayner, Toward, A. Cheunts P. Wille E. Burnett AV. Absurrealities of adherent layer grown from Sone neutron of patients with mystodygissis. In Processor 2001, 9.21-953-952.

- Tears 5-Hopinam MD, Rowert DT. Ryspand Mr. Assessment of assense function, and its potential contribution to devegulation of hemotoposes in the metodyplicits and wres. Homostique DOC MEDICAL HOUSE
- 11 Mayor II is also characterization of homotopoietic microensissament cells from parients with reprint/piplantic sprotrome, 2004 for 2007.
- Bries C. Samprour expectation, (Cotto A. Sange R. Gregory R. Margare Dt. Margare R. Lande M. Derrossido I.T. Brazzari R. et al. development and analysis of functional elements in 1% of the human get one by the DECODE print property furner 2001 481 700 (i.e. Garger MI, Shuar Ab, Cultimore A, Epclich M, MPRo J Guricolo Din
- UF, Econ. IV. A noncoding With is a partential merior of cell fate claring minory gland-development. For NAR-NAS is 1554 DOE BRE-DES
- 10. Greenbrick (A. Bagari / Here-coding BMA regulations of BBA polymoraus & Country to Lawrence 1/ An antonna FNA received in physicism
- maturation is much entireductories with related to differentiate.
- Server VII. Party FN, Harry II, Server DF The function of non-coding 14
- BNA to provide property, Commence (SET 19617) (70) Set ND Francis Co., or ON Chang N. Let VK Chang S. Bertholton and characterization of a coval game fell transcribed from the appoints
- thand of Fas. Preside Carrier 2005, 54:1465-1404. Responsible American SC, Battery F, Brenge and An Barrow on 1904-1904. Region with endogenous unterniar transcripts. ACCCAFFULLIAN
- Brown SV, Marchall DT. Colonomic Int Indiana, nemcoding PMAs and sphora, Perio Perio 2000 18:35
- exce PD manufactor the baseness and function of
- migrafilia. Disciproses 2015, 152-4442-4513.

  The 1-Small nucleotic Wilds on abundance group of executing Milds. 2.5
- with diverse cellular functions. Crit (1772, 100; 14) (16) 34 Superson F. Cauley W. Derricco: | Belanco: T. Schalberg W. France W. This process is transcriptional activity in chromocomus 21 and \$2, however bless years in ord.
- National Committee on A Loyer & Fortier As More to \$1 (in such 26) to 18 of AV, No. 255. Deposit Wireda J. General ranging and supression analyses of Europe reposit, runcoding ISA's reveal Street specific patterns and enrichment in generalisted to regulation of
- Cooley S. Helstone, S. Ng 190 Kapratory P. Seninger CA, Kampa D. . configure A, Senteres Survivo N. Chang v. Williams A), et al. Unbowed Pupperty of Interceptation factor funding also plong human. nes 21 and 22 points to eldergread regulation of mencading MMs. Call Stol. Title-19-190.
- Leave & Makaya HJ, Arrand W, Easter F, Legacyor MC, str Vince AM, Van Kinnestic I, Res EVI. Androgen responsive intractic non-coaling Wido.
- Aprend M. Serieman M.J. Sribner (A. Serieman) I & rece Spotter for molecular medicine nunceday (NA). And in the horizon force 195.1756ch
- 2 Sharking characterist saids in exceptional nation in terms -
- maghtenini disease? Getore vitel 2007 f. 60. Subsett C. Stetley, Jr. Garreli O. Bragie JA. Agyydi'ri, Resett Mil. Fuggetiir. . framespition of intinuous SNA leading to gone alarming and pettyrotom as a rowel cause of human general disease. The large DOOR MADE NOT HAVE
- wale / New coding Wide in reprinted generalistics. The Cal. 335A 100 145-110
- NAME AND DESIGNATION OF THE PARTY OF THE PAR Epigenetic allancing of General suppression gards p.15 by its presentation BNA: Avery 2018-451-010-018
- Britis FM Francisco M. Lissam W. Carbonan FC, Finniscourt AV, Annualis GT, Egypton н DM, Regions AC, Machador AA, Persi T, et al. Antisense intresis; non coding RNA levels correlate to the degree of ramor differentiation in prostate careces. Or coupers 1814 (\$81864-000). Press: SS, House TR, Frictions W. Stadiumer Small NJ. Hollers DK.
- 14 Sampletonic (C. Streeg P.). Smith Distang, abundants expressed name

- coding twentrato we stemd in career, Turn Millione 2006.
- brits GC, fashel All, rotture AL, rignor GA, Gentro ER, Comp. Executal Add, Security-Almenta 5, Roy CM, Edentification of protein coding and record; removiding Wilds down regulated to clear cell
- renal/concessing. New Concessing 2000; 437-257-267.
  Zhang X, Lian Z, Footber C, Gerstein WK, Rapmonty S, Septier M, Geogra D. Caramovi F. Birrachan W. Tawfarger T. A myelapowas associated regulatory intergena; noncoding IRSA transcrapt within the human HORA charter, Front 2009, FEB.2528, 25 in
- Inghes Ti, Marchi, Arrest Wil, Springer J, Matter S of lands OF, James III Indiana III Indian III in a Bancoung politing using microarrays fabricated by oriefs an oligonal leaster synthesizes. No Peterson 2011 19:143 347
- Tang M., Stephen S. Enganism V.S. Taut Addist. Ches M. Waldersett C. anthon S. Hayanaston S. Martini I. Milleddi exotogoribarrane termilar recording IVM database. Notice Restrict 2005
- or M. Control of Company representation methods for high directly objects, being data based on national solid blass. Berkhonson, 2003, 19030–433. Earlier VG. Westmann, China-Vagnahamme analysis of micrograps.
- applied to the ranging reductor response. An item hop/or 154 2011
- son't Verenia De fit, oans de vleuw Mill nor 1D, man Aprillian W. Dwena of where It Marker M. (Misseer All et al. Game approximate profiling predicts clinical extrame of treasi cancer. Nation (60), 415 (1991)
- Total Time grantitudine FER and the 21 DeNa Data OTS Method. Methods 2001, Miletinate
- Hashwood (Polapati & Salpasa N. Funkaran B. Feder C. Catt. (Attenues) 70 Automobil, Cleta from MC, Indexion M, et al. The role of the non-transporter ASCS7 is refractory attents with ring sales about STATE SIDE SHIPE
- resent, title a Yomer title Y. Cher W., Chieft, World T. Komunio F, Karry S. Control & Albert III (BRA-microarray analysis of stage progression machanism in repolodysplastic syndroma. III - Albert II 125/200-200
- Sens W. Massauck, Chen J., Suppost S., Stany H., Wasserhell, P. interferent gamma and could game expension in CD 14 calls. itentification of pathologic cytoline specific signature profiles. (First) 1000 METHAN 175
- mark Communication Court Committee No. Mandanderson and associated autonomizely. clinical and pathophysiologic correspos. So-
- Carrier Coppers I'd Start of Committee Divergence in Welsite City. Structurally specific hope on sulfates support primitive frame hematopoins by to matter of a multitrate rate state cell rache. Stori
- Mande II) Lingering biologic dilemman about the status of the 48. progressor cells in mysterty places. Arth Market 2003, 545-
- Startburg A. Milik J. Littlewood C. Ration G. Presiat A. Smill Library S. mit ( Brown D. Charman Ent of Evolunce for restaured & cell progenitors in early Dow-risk modelly splantic syndrome. How I fill!
- Describes F. Matter T. Growth differentiation factor 15 production is humaniary for normal arptimad differentiation and is increased in macory assems with ong silerations. If //orman/201 MATERIAL PROPERTY.
- Nation 6, Modific Committee Manage A Communicative Program in the region of apoptosis, profile whom, and the Bul-2-related process in the dodyspiete syndromes and a site repetial leakers a scorelary to MDS: (here 2010, 96 (1112) 1110)
- Kingson M. Seriegoch J. Takotseto M. Tangeno T. Hinduroch chicates It Localization of Fee and Fee ligand in State Harmon cells
- demonstrating regularizations. In June 21 No. 12-10-10.
  To regulate (1, 5 or right the Signature to remarkize recognize and
- guidance and Reyond. Needs for the 2000 18 177 (8): Consuglo PM. Tahaganare J. Goodane II. Ressure growth a time wise 14 street for semaptions agreeting, restriction (COS) 5175-5172.

- (ii) Witter S. Duccipio, A.C. Allerto B. Epper DR. Sens R. Marco B. Temapores L. Carriago A. Serraphorino Ringing controls has PLDMS—resoluted apprecia by premising for translocation and ignorality. Phys. 2008.
- D. Both Mr. Promourne In Officeration IAMP Advances exhibition of damage exhibition Mr. exhibition repulsion on apoproose of remark programmer cells, shell for Manusco 2005, 25 (12–13).

  Look E. D. Sand, T. Minago H. Ann DA. Manusco Manusco, Commissed.
- Make expression agratures of amount controlling BBAs transported.

  There further and results lock, General 1998, 92-19-19.

  Stagmen LA, Gresserives CL, Over DM. Springtout Gr. Generalise A. (Billing Lift gain No. 1800, a sevent reproceding 1994 garrin.).
- regulates occurrently granule protein transcript expression. According
- 100(c) (4 CVV)

  (3) Lead (4 Community Volume of Green (a C Long whereas successing 60A transcription regions are received as a community of Green (a CO).
- 450 Per Com. Anta TW, Dicerca FF, de Pisers CF NINA nucleur orginan receptors: protective in vesseland feature? Com Com (and/or 2007 18 415-425)

#### the publication history

he per publicative femory he that paper can be account from: Machine Language Company of the Charge of

DO: 10.1105/1705-0706-3-30

City this article 46 incide at al., direct cases or posterior and non-oping lifet expression profess in (1) bits profes strongs calls to relations promise with regard solver-black tilet. Best or (1) treatings (2) (1) \$10

## Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of: + Thorough peer receive \* We specie constitutes as total figure charges. \* braneduce publication on acceptance \* Inclusion in Publish CAS, Support and Google Scholar \* Research salesh is freely available for redistribution Substitute representative () Machine Coress