

ANDRÉ FATTORI

**“PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE LEUCEMIAS
AGUDAS POR TÉCNICA DE MICROARRANJO
(MICROARRAY)”**

CAMPINAS

2006

ANDRÉ FATTORI

**“PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE LEUCEMIAS
AGUDAS POR TÉCNICA DE MICROARRANJO
(MICROARRAY)”**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor
em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica*

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

UNIDADE	BC
CHAMADA:	TIUNICAMP
	F269p
Ed.	
DMBO BC/	73007
ROC.	16145-07
<input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>	
REÇO	1400
ATA	2010667
B-ID	413811

F296p

Fattori, André

“Perfil de expressão gênica de leucemias agudas por técnica de microarranjo (microarray)” / André Fattori. Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Fernando Ferreira Costa

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia Aguda. 2. Expressão Gênica. 3. Apoptose.
4. Proliferação celular. I. Costa, Fernando Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: “Study of gene expression profile in acute leukemias by microarray assay”

Keywords: • Acute Leukemia

- Gene expression
- Apoptosis
- Cell proliferation

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutorado em Clínica Médica

Banca examinadora: Prof Dr Fernando Ferreira Costa

Profa. Dra. Belinda Pinto Simões

Prof Dr Cármino Antonio de Souza

Profa. Dra. Kátia Borgia Barbosa Pagnano

Profa. Dra. Maria de Lourdes Chauffaille

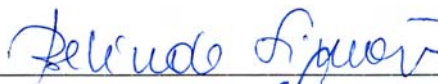
Data da defesa: 24-02-2006

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador(a): Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Belinda Pinto Simões



2. Prof(a). Dr(a). Maria de Lourdes Lopes F. Chauffaille



3. Prof(a). Dr(a). Kátia Barbosa Pagnano



4. Prof(a). Dr(a). Cármino Antônio de Souza



5. Prof(a). Dr(a). Fernando Ferreira Costa



**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 24/02/2006

Às mulheres de minha vida:

Elza Maria Penteado

Hilda Helena Penteado

Helena R Almeida Penteado

Maria da Conceição Senger Fattori (in memoriam)

Ao Professor José Antunes Rodrigues,
que me ensinou a ciência e
o exercício digno da medicina.

“...não fora para tão longo amor, tão curta a vida.”

Luís de Camões

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xxvii</i>
ABSTRACT.....	<i>xxxi</i>
1- INTRODUÇÃO.....	35
2- OBJETIVOS.....	51
3- PACIENTES E MÉTODOS.....	55
3.1- Pacientes e extração de RNA.....	57
3.2- Procedimentos diagnósticos.....	58
3.3- Produção dos microarranjos de cDNA.....	59
3.4- Hibridização e aquisição das imagens.....	60
3.5- Sequenciamento.....	60
3.6- PCR quantitativo em tempo real (Real-Time PCR).....	61
3.7- Análise estatística.....	63
3.8- Análise fatorial.....	64
4- RESULTADOS.....	67
5- DISCUSSÃO.....	95
6- CONCLUSÕES.....	111
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
8- APÊNDICES.....	131

[α-³³P]dCTP	dNTP marcado com ³³ P em alfa
ATP	adenina trifosfato
cDNA	DNA complementar
DNA	dupla fita de ácidos desoxiaminonucleicos
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfato
DO	densidade óptica
DTT	ditiotreitól
EST	fragmentos de seqüências expressas
G-CSF	fator estimulante de crescimento de colônias
GTP	guanina trifosfato
LA	leucemia aguda
LLA	leucemia linfóide aguda
LMA	leucemia mielóide aguda
MixdNTP	mistura de iguais concentrações dos desoxirribonucleotídeos trifosfato
PAS	ácido periódico de Schiff
PCR	reação de cadeia de polimerase
Primers	oligonucleotídeos iniciadores
RNA	fita simples de ácidos ribonucleicos
Spot	ponto individualizado na membrana de microarranjo

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Alterações citogenéticas em Leucemias Mielóides Agudas e sua relação com o prognóstico clínico.....	40
Tabela 2 Alterações citogenéticas em Leucemias Linfóides Agudas e sua relação com esquemas terapêuticos risco-adaptados.....	44
Tabela 3 Relação dos genes selecionados com menor valor p de significância pelo teste de Wilcoxon, na comparação <u>controle vs LMA</u> , após reseqüenciamento para confirmação de sua identidade. (código: posição do gene no microarranjo; clone: clone do Projeto Genoma do Câncer utilizado na produção da membrana; descrição: acesso do gene em www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez , pesquisa em <i>Gene</i>).....	75
Tabela 4 Relação dos genes selecionados com menor valor p de significância pelo teste de Wilcoxon, na comparação <u>controle vs LLA</u>	76
Tabela 5 Relação dos genes selecionados com menor valor p de significância pelo teste de Wilcoxon, na comparação <u>LLA vs LMA</u>	77
Tabela 6 Relação numérica dos genes diferencialmente expressos, distribuídos segundo sua relação funcional utilizando a classificação <i>Gene Ontology</i> (www.geneontology.org) (programa <i>GOMiner</i> , http://discover.nci.nih.gov/gomine).....	78

Tabela 7	Relação nominal dos genes diferencialmente expressos, distribuídos segundo sua relação funcional, utilizando a classificação Gene Ontology (www.geneontology.org) (programa GOMiner, http://discover.nci.nih.gov/gominer/).....	79
Tabela 8	Descrição e resultado do re-seqüenciamento dos genes que compuseram o primeiro e segundo componentes, respectivamente, da Análise Fatorial (Análise dos Componentes Principais).....	88
Tabela 9	Descrição e resultado do re-seqüenciamento dos genes que compuseram o primeiro e segundo componentes, respectivamente, da Análise Fatorial (Análise dos Componentes Principais).....	88
Tabela 10	Resultados obtidos nos microarranjos com membranas 4.7K Instituto Ludwig/FAPESP, pela análise da expressão gênica por PCR em tempo real dos genes SERINC3, CTSB, PRDX5, EIF5 e CTNNB1. As amostras tiveram expressão normalizada tendo como referência a média geométrica entre dois genes constitutivos (β -actina e GAPDH).....	93

	<i>Pág.</i>
Figura 1 Distribuição dos oncogenes gerados por translocações envolvidas na leucemogênese em adultos e crianças. A grande variabilidade de translocações.....	45
Figura 2 Exemplo de membranas 4.7K Instituto Ludwig/FAPESP hibridizadas, marcada por [α - ³³ P]dCTP, com exposição de 48 horas. As imagens foram adquiridas em aparelho STORM PhosphorImager® e analisadas pelo programa ArrayPro®.....	70
Figura 3 Análise do resultado das hibridizações por clusterização hierárquica não-supervisionada das medidas de expressão de todas as membranas individualmente. Notar que a maioria das membranas referentes à mesma amostra clusterizaram conjuntamente, reconhecendo as triplicatas. (os programas de análise foram <i>Cluster</i> e <i>Tree View</i>).....	71
Figura 4 Distribuição dos valores p de significância, na base logarítmica 10, após análise pelo teste de Wilcoxon, nas 3 comparações efetuadas (<u>controle vs LMA</u> , <u>controle vs LLA</u> e <u>LLA vs LMA</u>). Os valores negativos referem-se aos genes hipoexpressos. Os valores que mais se distanciam do ponto central correspondem aos genes que, positiva ou negativamente, obtiveram os valores <i>p</i> de diferença estatística menores, ou seja, os genes provavelmente mais interessantes para a análise.....	72

Figura 5	Resultado da clusterização hierárquica dos 100 genes selecionados pelo teste de Wilcoxon com menor valor de p de significância. As intensidades de expressão são transformadas em tonalidades de verde e vermelho a partir da mediana estabelecida para cada um, sendo o mais vermelho correspondente ao maior valor de expressão e o mais verde ao menor valor de expressão.....	73
Figura 6	Dendograma ampliado do resultado da clusterização hierárquica dos 100 genes selecionados pelo teste de Wilcoxon com menor valor de p de significância. Notar que os casos de LLA e as LMA-M3 foram agrupados conjuntamente, a partir do grau de similaridade de expressão que o programa estabeleceu. Houve sobreposição de alguns casos de LMA entre os controles.....	74
Figura 7	Dendograma ampliado do resultado da clusterização hierárquica de 129 genes selecionados pelo teste de Wilcoxon com menor valor de p de significância, na comparação LMA-não-M3 vs LMA-M3. A análise permitiu a classificação dos casos de LMA-M3 como um perfil específico.....	86
Figura 8	Curva de dispersão de alguns genes que compuseram os componentes principais, distribuídos de acordo com o diagnóstico. Em (A) a curva foi constituída pelos valores de expressão normalizados dos genes ROBO2, MAL2 e FKBP5 e em (B) FKBP5, HYAL2 e GLB1, todos participando do primeiro componente. Em (C) foram utilizados os valores de expressão de genes do segundo componente, o DDX46, HERC4 e SEP/PLXNB1.....	89

Figura 9	Validação dos resultados obtidos nos microarranjos com membranas 4.7K Instituto Ludwig/FAPESP, pela análise da expressão gênica por PCR em tempo real dos genes SERINC3, CTSB, PRDX5, EIF5 e CTNNB1. As amostras tiveram expressão normalizada tendo como referência a média geométrica entre dois genes constitutivos (β -actina e GAPDH).....	91
Figura 10	Vias Ras e Rho das <i>small GTPases</i> , que diretamente afetam a progressão para o ciclo celular da fase G1 para S nas leucemias agudas. Dentro da via os genes hiperexpressos nas membranas 4,7Kb Instituto Ludwig/FAPESP foram ressaltados em vermelho, e os hipoexpressos em verde.....	102
Figura 11	Provável influência das vias Ras e Rho das <i>small GTPases</i> na ativação transcricional nas leucemias agudas. A via Ras/Raf/ERK provoca a fosforilação do Elk1, induzindo assim o início da transcrição. Esta via transcricional é conhecida como SER (<i>serum element response</i>). Dentro da via os genes hiperexpressos nas membranas 4,7Kb Instituto Ludwig/FAPESP foram ressaltados em vermelho.....	104



RESUMO

No presente estudo analisou-se a expressão gênica por *microarray* em 17 casos de Leucemia Mielóide Aguda (LMA), 5 casos de Leucemia Linfóide Aguda (LLA), tendo como controle 4 amostras de células progenitoras de sangue periférico coletadas de doadores de transplante de medula óssea após estimulação com G-CSF. Para isto foram utilizadas membranas de *microarray* contendo cerca de 4700 fragmentos de cDNA correspondendo a genes conhecidos ou a ESTs, construídas no Instituto Ludwig de Pesquisa do Câncer/FAPESP a partir dos clones de cDNA gerados pelo Projeto Genoma Humano do Câncer. Suas principais vantagens são (1) a utilização da metodologia ORESTES na construção da biblioteca de ESTs, o que a torna mais representativa da parte central dos genes; (2) ser desenvolvida com clones cDNA provenientes do Projeto Genoma Humano do Câncer e, portanto, com potencial de conter genes não disponíveis nas membranas comerciais e, (3) sendo produzida a partir de tecidos neoplásicos variados, teoricamente pode apresentar seqüências relacionadas à tumorigênese.

A metodologia foi eficiente na caracterização de um conjunto de genes diferencialmente expressos nas amostras de LMA, LLA, LMA subtipo M3 e dos casos-controle, pela análise estatística pelo método de Wilcoxon e clusterização hierárquica supervisionada e não-supervisionada desenvolvidas por Eisen. Na comparação entre LMA e LLA, sob o aspecto funcional, foi possível observar genes particularmente afetados relacionados a processos celulares específicos, como as vias de regulação do metabolismo de nucleotídeos, adesão e sinalização celulares (SS2XIP, MUC4, THBS1 e RGL2), transdução de sinal especialmente pela via Wnt e via Ras e Rho das “small GTPases” (RGL2, ARGHAP1 e CDKN1B e beta-catenina) entre as LMA, e um conjunto de genes reguladores apoptóticos como os genes BIRC6, SH3GLB1, PSEN1 e NFKB1 entre as LLA.

Os *microarrays* evidenciaram resultados importantes na separação de genes relacionados às LMA-M3 e às LMA-não M3, mostrando expressão diferencial de genes antes não associados ao subtipo específico M3, tais como TLE1, PSCDBP, SMG1, TALDO1, CUL1, TBX1 e UBXD8), alguns relacionados à regulação do ciclo celular e morte programada, e componentes do complexo Groucho/TLE que funciona como repressor da atividade transcricional induzida pela via Wnt.

Os resultados foram validados através da utilização de PCR em tempo real em 5 genes selecionados e testados em uma população maior de casos (n=50 amostras de leucemias). Em 4 destes genes, os resultados foram completamente confirmados, demonstrando que a tecnologia de *microarrays* foi eficiente no rastreamento de genes potencialmente relacionados aos de subtipos de Leucemias Agudas, em especial as LLA e as LMA-M3, nesta membrana 3.7K do Instituto Ludwig/FAPESP.

Assim, a utilização da metodologia de *microarray* com seqüências derivadas do Projeto genoma do Câncer (Instituto Ludwig/FAPESP) permitiu a discriminação de vias metabólicas importantes no processo de tumorigênese, alguns até mesmo associados a tipos leucêmicos específicos, e o reconhecimento de genes diferencialmente expressos antes não descritos na literatura.



ABSTRACT

The development of gene expression assays, such as cDNA microarrays, has permitted the simultaneous study of several genes; one of this methods is the cDNA microarrays. These investigations contribute to the classification of diseases, comprehension of tumoral biology and, finally, the determination of genetically related prognostic factors. In this present study, the gene expression profiles were analysed for 17 cases of Acute Myeloid Leukemia (AML), 5 cases of Acute Lymphocytic Leukemia (ALL) and 4 samples of peripheral blood apheresis, after stimulation with G-CSF for allogenic transplantation donors. For the microarray assays, membranes containing approximately 4700 spots were developed by the Ludwig Institute for Cancer Research, with contribution and financial support of FAPESP, using cDNA cloned from the Human Cancer Genome Project. The main advantages of these membranes include (1) availability of a cDNA library constructed by the ORESTES methodology, which makes the cDNA clones more representative of the whole transcriptome, (2) the non-commercial characterization of human transcripts, which may be advantageous for finding new genes and/or ESTs not diffusely disponible in large-scale production and, (3) since the library is constructed from different tumoral tissues, it may constitute the best representation of the tumorigenesis process.

The methodology efficiently distinguished a group of genes, supporting the identification of the ALL, AML and control samples by the Wilcoxon Statistical Analysis and the supervised and non-supervised Hierarchical Clusterization developed by Eisen. Among the genes that were differentially expressed when comparing AML and ALL, it was possible to observe genes related to specific cellular processes such as: in the AML group nucleotides metabolism regulation pathways, adhesion and cell signaling (SS2XIP, MUC4, THBS1 e RGL2), signal transduction, especially in the Wnt pathway and Ras and Rho from the “Small GTPases” pathway (RGL2, ARGHAP1, CDKN1B and beta-catenin), and in the ALL a group of apoptotic regulators genes such as BIRC6, SH3GLB1, PSEN1 e NFKB1 among.

The microarray efficiently distinguished genes related to M3-AML and non-M3-AML, showing differentially expressed genes not previously described in the literature to be related to the specific sbtype M3-AML, such as TLE1, PSCDBP, SMG1, TALDO1, CUL1, TBX1, UBXD8, genes associated with programmed cell death and cell cycle, and components of

Groucho/TLE complex, which functions like a repressor of transcriptional activity induced by the Wnt pathway.

The results were validated through the utilization of Real Time PCR in five selected genes, tested in a greater number of cases (n=50 acute leukemia samples). In 4 of these genes the results were completely confirmed, demonstrating that the microarray technology with the 3.7K Ludwig Institut/FAPESP membranes was efficient for screening genes possibly related to specific leukemias subtypes, particularly the ALL and M3-AML groups.

As such, the utilization of microarray methodology with sequences derived from the Cancer Genome Project (Ludwig Institut/FAPESP) permitted the distinction of important metabolic pathways for the tumorigenesis process, some of them associated to specific leukemic subtypes, and the recognition of differentially expressed genes not before described in the literature.

1- INTRODUÇÃO

A hematopoese normal acontece a partir da célula-tronco pluripotencial, que possui importantes propriedades de auto-renovação e capacidade proliferativa. Através de um processo de comprometimento com a diferenciação celular, provavelmente controlado em nível transcricional, originam-se então as células-progenitoras hematopoéticas, caracterizadas pelo decréscimo da capacidade de auto-renovação e expressão de alguns marcadores fenotípicos linhagem-específicos (VIRTANEVA et al., 2001; GILLILAND et al., 2004).

O bloqueio da diferenciação celular normal, o aumento da capacidade proliferativa e a aquisição do potencial de auto-renovação são eventos importantes relacionados à expansão e acúmulo da população de progenitores hematopoéticos e ao desenvolvimento das Leucemias Agudas (LA). Estes processos são observáveis pelo aumento da contagem de blastos na medula óssea (valores acima de 20%, para termos de definição) e falência medular, responsáveis pelas principais manifestações clínicas da doença (HARRIS et al., 1999; FOA et al., 2005).

As LA constituem um grupo bastante heterogêneo de doenças, o que pode ser observado tanto do ponto-de-vista fenotípico como por suas características de expressão gênica. As classificações atuais levam em consideração os parâmetros do sistema de classificação FAB (*French-American-British*), porém incorporam interpretações recentes baseadas no conhecimento de novos mecanismos fisiopatagênicos associados à progressão neoplásica, características citogenéticas e fatores de risco para a transformação leucêmica e evolução clínica (*WHO-World Health Organization Classification of Tumors*) (HARRIS et al., 1999). Este grande espectro de subgrupos e tipos individuais de LA é reflexo da heterogeneidade da doença e sugere a possibilidade de variados processos envolvidos na transição entre as célula-tronco/célula-progenitora hematopoética normal e sua contra-partida, a célula leucêmica.

De fato, estudos citogenéticos e moleculares têm demonstrado que as células leucêmicas podem carregar simultaneamente mutações múltiplas tais como mutações de ponto, rearranjos gênicos e translocações cromossômicas (FROHLING et al., 2005). Em estudos com animais transgênicos a expressão do PML-RAR α , associado à t(15;17) na

leucemia pró-mielocítica, resultou em longos períodos de latência para a transformação leucêmica e penetrância incompleta, sugerindo que a introdução desta mutação isoladamente poderia não ser o único fato envolvido no processo de leucemogênese (GILLILAND et al., 2004). Ainda, o conhecimento de aspectos clínicos e moleculares de algumas síndromes pré-leucêmicas reforçam a idéia da necessidade do envolvimento de múltiplas alterações genéticas acumulativas até a transformação leucêmica final. É o que ocorre, por exemplo, na Síndrome Plaquetária Familiar, uma doença associada à perda de função do gene regulador do fator de transcrição hematopoético RUNX1(AML1), caracterizada por evolução tardia para leucemia, geralmente em associação com o desenvolvimento de alterações cariotípicas (SONG et al., 1999); ou na Síndrome Mielodisplásica, que também se relaciona a alterações citogenéticas múltiplas.

Assim, tanto as evidências experimentais em modelos transgênicos como a observação de certas síndromes predisponentes à leucemia aguda em seres humanos têm sugerido que a leucemogênese seja um processo de aquisição aditiva de defeitos genéticos. A análise dos eventos oncogênicos já conhecidos e relacionados às LA sugerem a necessidade da co-existência de dois tipos fundamentais de mutações que se complementam no desenvolvimento da leucemia (GILLILAND et al., 2004). A primeira classe de mutações pode ser exemplificada pelas alterações do gene FLT3 (*internal tandem duplication*) ou RAS que conferem, como consequência das alterações de elementos das vias de sinalização e transdução, vantagens proliferativas ou de sobrevivência aos progenitores hematopoéticos; uma outra classe está envolvida com a desregulação dos fatores de transcrição ou dos componentes do complexo de co-ativação transcricional e, por conseguinte, interrupção da diferenciação em estágios específicos do desenvolvimento hematopético e imortalização celular (STIREWALT e RADICH, 2003; GILLILAND et al., 2004). As alterações dos fatores de transcrição nos blastos leucêmicos ocorrem por dois mecanismos básicos e distintos: pela expressão anormal de genes intactos, ou pela produção de proteínas quiméricas decorrentes da fusão de genes diferentes. Tais eventos foram descritos nas leucemias mielóides agudas envolvendo, por exemplo, o produto da fusão gênica PML/RAR α , ou os componentes do CBF (*core binding factor*), um fator de transcrição heterodimérico composto pelo RUNX1 e a subunidade CBF β , freqüentemente relacionados a translocações e fusões gênicas específicas tais como

RUNX1/ETO, CBF β /SMMHC e TEL/RUNX1 (DASH e GILLILAND, 2001; GILLILAND e TALLMAN, 2002).

A definição de fatores predisponentes de recaída que permitam a estratificação de pacientes com menor chances de cura e, conseqüentemente, demanda de intensificação terapêutica, tem sido objeto de interesse de inúmeros pesquisadores: esforços têm convergido no desenvolvimento de parâmetros morfológicos, citogenéticos e moleculares que apóiem esta estratificação de risco.

Alguns aspectos clínicos e de acesso laboratorial mais simplificados foram inicialmente utilizados como parâmetros indicativos de comportamento clínico das LMA. Assim, idade superior a 60 anos, baixo índice de *performance-status* (índice de Kanofsky, por exemplo), elevação do LDH (lactato desidrogenase sérica), albumina sérica diminuída e contagens de leucócitos acima de 20.000/mm³ foram variáveis associadas a baixos índices de remissão completa e curta duração de remissão hematológica. As características citogenéticas, contudo, constituem o mais importante fator prognóstico independente para a indução e duração de remissão nas LMA (CHESON et al., 2003). Anomalias citogenéticas favoráveis tais como a t(8;21), a inv(16) e a t(15;17) estão significativamente associadas a remissões mais duradouras e aumento da sobrevida global, enquanto que alterações dos cromossomos -5/del(5q), 7, 11q, 3q e cariótipos complexos têm sido associados a pior resposta terapêutica e diminuição da sobrevida global (DASH e GILLILAND, 2001; BYRD et al., 2002). Embora existam algumas poucas diferenças entre os parâmetros citogenéticos utilizados nos diversos estudos realizados, a **tabela 1** sumariza as principais alterações nas LMA e sua relação com o prognóstico e mostra que algumas delas são, em geral, consensuais quanto ao seu valor preditivo de risco de recaída e resposta ao tratamento (FROHLING et al., 2005).

Tabela 1- Alterações citogenéticas em Leucemias Mielóides Agudas e sua relação com o prognóstico clínico

Sistemas de Classificação Citogenética utilizados para definição de Grupos Prognósticos em adultos jovens com LMA			
Categoria de Risco	MRC	SWOG/ECOG	CALGB*
Favorável	t(8;21) inv(16)/t(16;16) t(15;17)	t(8;21) sem del(9q) ou cariótipo complexo inv(16)/t(16;16)/del(16q) t(15;17)	t(8;21) inv(16)/t(16;16) del(9q)
Intermediário	Cariótipo Normal del(7q) +8 del(9q) Alterações (11q23) +21 +22 Todas outras alterações.	Cariótipo Normal -Y +6 +8 del(12q)	Cariótipo Normal -Y del(5q) del(7q) t(9;11) +11 del(11q) Alterações (12p) +13 del(20q) +21
Ruim	Alterações (3q) -5/del(5q) -7 ≥5alterações cromossômicas	Alterações (3q) -5/del(5q) t(6;9) -7/del(7q) t(9;22) Alterações (9q) Alterações(11q) Alterações (17p) Alterações (20q) Alterações (21q) ≥3 alterações cromossômicas	inv(3)/t(3;3) t(6;9) t(6;11) -7 +8 isoladamente ou com alterações adicionais t(11;19) ≥3 alterações cromossômicas

Adaptado de Frohling et al, 2005.

Abreviações: MRC, Medical Research Council; SWOG/ECOG, Southwest Oncology Group/ Eastern Cooperative Oncology Group; CALGB, Cancer and Leukemia Group B.

*Pacientes com t(15;17) não foram incluídos nesta análise.

O reconhecimento de características moleculares - antes não observáveis pelas técnicas de citogenética convencional - envolvidas na leucemogênese, também permitiu um amplo campo de estudo sobre fatores de transcrição e alterações de vias de sinalização e transdução, e as implicações nas taxas de resposta e nos mecanismos de quimio-sensibilidade. Assim, alguns marcadores moleculares dão os primeiros indícios de que as técnicas de biologia molecular podem desempenhar um papel relevante no diagnóstico, classificação e estratificação de risco para as LA. Mutações relacionadas ao gene FLT3 estão presentes em cerca de 30%-35% dos casos LMA e constituem a mais comum alteração molecular nesta doença (STIREWALT e RADICH, 2003). Em aproximadamente 20%-25% dos pacientes ocorre uma duplicação interna *in tandem* do domínio-justamembrana do FLT3, o que acarreta na perda de sua função auto-inibitória e conseqüente ativação da atividade tirosina-quinase. Em outros 5%-10% dos pacientes observam-se mutações na alça de ativação do gene FLT3 o que, *per se*, também induz o aumento da atividade tirosina-quinase (FROHLING et al., 2005). Todas estas anormalidades relacionadas ao gene FLT3 têm sido especuladas como de relevância prognóstica, com impacto negativo na sobrevida livre de doença e na sobrevida global (WHITMAN et al., 2001; FROHLING et al., 2002). Também a expressão do gene MDR1, presente em cerca de 20% dos casos de LMA *de novo* e em 75% dos casos de LMA secundárias, é sugerida como um fator de mau prognóstico. O MDR1 codifica uma proteína transmembrana responsável pela extrusão celular de componentes tóxicos, entre eles drogas anti-neoplásicas como as antraciclinas (MAHADEVAN e LIST, 2004; DAOUST, 2005; KENNETH B MILLER, 2005).

Uma das mais marcantes evidências da importância clínica do desenvolvimento de terapias adaptadas a fatores risco-específicos advém de resultados obtidos com o tratamento das LLA. Esta abordagem terapêutica desenvolveu-se a partir da observação de que as LLA são heterogêneas e compõem vários subtipos de leucemia que diferem acentuadamente quanto à resposta quimioterápica (PUI e EVANS, 1998; YEOH et al., 2002). Observam-se, por exemplo, taxas de cura de até cerca de 80% entre os casos de LLA pediátricos, resultados significativamente melhores que os 30%-40% de chances de cura encontrados na população adulta (PUI e EVANS, 1998).

Parâmetros como elevada leucometria (acima de 30.000/ mm³), idade superior a 60 anos ou inferior a 1 ano de vida e longos períodos para a obtenção de remissão completa (contagem de blastos na medula óssea no 28º. dia pós-quimioterapia) foram implicados com índices de mau prognóstico em grupos com demanda de intensificação terapêutica; por outro lado, faixa etária entre 3-7 anos de idade e cariótipo hiperdiploide tanto adultos como em crianças portadores de LLA associam-se a períodos de remissão mais prolongados e melhores índices de sobrevida que outros grupos citogenéticos (RAIMONDI et al., 1992).

Subseqüentemente, através das análises imunofenotípica e citogenética sistemáticas, e clonagem molecular de genes marcadores de rearranjos moleculares característicos das LLA, inúmeros subtipos de leucemias geneticamente distintos e com valor prognóstico puderam ser identificados (LOOK, 1997) (**Figura 1**). A fusão do gene E2A do cromossomo 19 com o gene *homeobox* PBX1 do cromossomo 1, por exemplo, produz inúmeras oncoproteínas híbridas com atividade funcional transcricional. A presença ao diagnóstico da fusão E2A/PBX1 têm sido relacionada a má resposta aos regimes de terapia anti-metabólica convencionais (CRIST et al., 1990; FLETCHER et al., 1991). Do mesmo modo, a expressão do gene quimérico BCR/ABL, produto da t(9;22), mostrou-se associado ao aumento da atividade tirosina-quinase e ativação de vias metabólicas tais como RAS/MAPK, fosfatidil-inositol-3-quinase e JUN-quinase, JAK/STAT, fator nuclear κ B (NF κ B) e ciclina D1. Um dos efeitos da onco-proteína BCR/ABL é a indução de resistência celular a agentes provocadores de lesão do DNA, tais como drogas citostáticas e irradiação, e sua presença associa-se a um prognóstico extremamente ruim mesmo apesar dos regimes de intensificação quimioterápica (FLETCHER et al., 1991).

Nas LLA com imunofenotipo T (LLA-T) os pontos de quebra cromossômicos muito freqüentemente envolvem a região promotora do gene TCR, importante na diferenciação linfóide T, o que pode desregular a expressão de fatores de transcrição como TAL1 (alterado na t(1;14), tem expressão aberrante em 60% e 45% dos casos de LLA-T da infância e da população adulta, respectivamente) e dos genes *homeobox* HOX11 e HOX11L2 (BASH et al., 1995). Os genes HOX11 e HOX11L2 possuem alto grau de

homologia quanto à sequência de aminoácidos, especialmente no domínio *homeobox*, onde as seqüências diferem em apenas 3 aminoácidos. O elevado grau de homologia estrutural nos domínios de ligação ao DNA suporta a hipótese de que o HOX11 e HOX11L2 podem induzir a transformação leucêmica através da regulação dos mesmos marcadores transcricionais; entretanto, a ativação do HOX11 e do HOX11L2 parece associar-se com diferenças clinicamente relevantes que resultam, pelo menos em parte, de diferenças em seus mecanismos de ação. A expressão do HOX11 tem sido enumerada como um indicador de bom prognóstico tanto em adultos como crianças, enquanto a expressão do HOX11L2 relaciona-se a altos índices de recaída em crianças com LLA-T (FERRANDO e LOOK, 2000; BALLERINI et al., 2002).

A mutação envolvendo o componente do fator transcricional CBF- β (*core binding factor- β*) e o gene RUNX1 como resultado da t(8;21) é preditiva de excelente resposta clínica, com taxas de sobrevida livre de doença de até 90% em alguns estudos. Assim, a expressão do TEL/RUNX1 identifica um importante subgrupo antes não reconhecido de pacientes com LLA de imunofenotipo B candidatos a esquemas de tratamento menos intensos (FERRANDO e LOOK, 2000).

A **tabela 2** sumariza os atuais fatores de risco para as LLA utilizados na prática clínica e sua interferência nas propostas terapêuticas.

Tabela 2- Alterações citogenéticas em Leucemias Linfóides Agudas e sua relação com esquemas terapêuticos risco-adaptados

Avaliação Clínica de Risco na Leucemia Linfóide Aguda.			
Grupo de Risco	Características	Pacientes Afetados	Terapia Recomendada
Baixo Risco	-Hiperdiploidia	20%	Quimioterapia convencional anti-metabólica
	-Fusão TEL/RUNX1	20%	
Risco Intermediário	-Risco padrão de idade e leucometria, sem fatores genéticos clinicamente significantes	15%	Quimioterapia anti-metabólica intensificada
Alto Risco	-Fusão E2A/PBX1	6%	Quimioterapia intensificada com múltiplos agentes
	-LLA-T	15%	
	-Alto risco relacionado a idade e leucometria, sem fatores genéticos clinicamente significantes	15%	
Altíssimo Risco	-Fusão BCR/ABL	3%	Transplante de medula óssea em primeira remissão completa
	-Rearranjo MLL	4%	
	-Falha de indução	2%	

Adaptado de Ferrando e Look, 2005

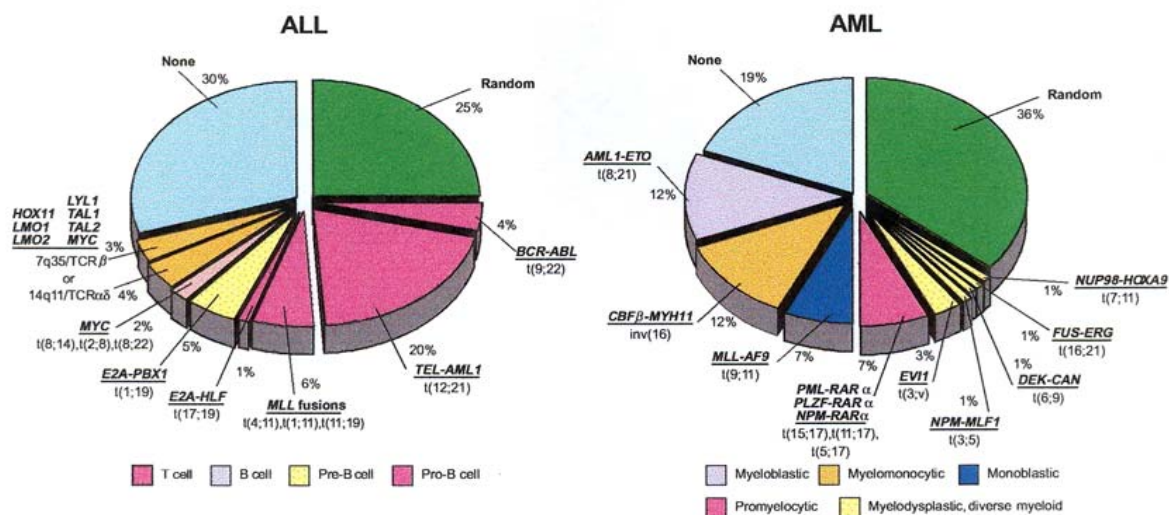


Figura 1- Distribuição dos oncogenes gerados por translocações envolvidas na leucemogênese em adultos e crianças. A grande variabilidade de translocações sugere mecanismos moleculares diversos que culminam na transformação leucêmica.

Recentes avanços na tecnologia de sequenciamento de DNA e o desenvolvimento de ensaios de expressão quantitativa e qualitativa gênica possibilitaram aos pesquisadores métodos de estudo da expressão de milhares de genes em paralelo (ZHANG et al., 1997). Essas pesquisas estão revolucionando a investigação de marcadores específicos de tumor, a classificação de doenças, compreensão da biologia tumoral e das principais vias metabólicas envolvidas na tumorigênese e avaliação de fatores prognósticos geneticamente determinados. Para a análise de larga escala da expressão gênica, duas metodologias tiveram grande impacto sobre a possibilidade de uma visão global dos processos celulares, os *Gene Expression Arrays/microarrays* (microarranjos) e o *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) (BRENTANI et al., 2005).

Os microarranjos são definidos por sua elevada densidade (variando de 4.000 até cerca de 50.000 probes) e são tecnicamente divididos em dois grupos: aqueles que utilizam oligonucleotídeos sintéticos e os compostos por fragmentos de cDNA. No primeiro

caso, as plataformas de *arrays* são obtidas a partir na síntese *in situ* de pequenos oligonucleotídeos de aproximadamente 25 bases por uma tecnologia conhecida como fotolitografia, ou por deposição robótica de fragmentos maiores variando de 50-80mers. Os microarranjos de cDNA são obtidos a partir de deposição do produto de PCR sobre uma matriz sólida de vidro tratado ou filtro de nylon, também com auxílio de um braço robótico (BRENTANI et al., 2005).

A placa/filtro do *array* é hibridizado(a) com o cDNA marcado obtido a partir do mRNA do tecido de interesse. Em termos de definição, é usual a designação “*probe*” para os oligonucleotídeos, cDNA ou ESTs de seqüências conhecidas imobilizados na placa, e “*target*” a denominação dada ao cDNA obtido por transcrição reversa e que será testado na hibridização. A leitura é produzida por scanners de fluorescência ou por fosforeveladores, quando as amostras são marcadas radioativamente (DERISI et al., 1996; BRENTANI et al., 2005).

Uma vantagem reconhecida dos microarranjos de oligonucleotídeos consiste no controle de qualidade das seqüências depositadas, o que é realizado durante a própria síntese da plataforma e torna desnecessária a verificação da identidade dos probes, um passo fundamental quando os filtros são construídos a partir de cDNA. Aspectos de críticas aos microarranjos de oligonucleotídeos, entretanto, surgem do fato de que seqüências conservadas de genes funcionalmente relacionados podem ser suficientemente freqüentes para possibilitar a hibridização cruzada. E ainda, os oligos (costumeiramente não maiores que 80 nucleotídeos) podem apresentar redução da intensidade do sinal quando comparados aos probes de cDNA, que promovem hibridizações mais estáveis e permitem o uso de condições mais estridentes, reduzindo as interferências no sinal. Não obstante, as evidências da literatura mostram um elevado grau de concordância entre os dados obtidos com plataformas de oligonucleotídeos e de cDNA (STILLMAN e TONKINSON, 2001; BRENTANI et al., 2005).

DeRisi et cols. realizaram em 1996 um dos primeiros trabalhos utilizando a técnica microarranjos para a procura de diferenças moleculares em tecidos normais e neoplásicos. Neste projeto foram realizados microarranjos de uma linhagem de células de melanoma, a UCAA-903, e de uma linhagem de propriedades tumorigênicas suprimidas

pela introdução de um cromossomo 6 humano normal, descrita como UACC-903(+6). Para a estratificação dos genes diferencialmente expressos utilizou-se uma metodologia baseada na verificação das razões entre os sinais das amostras, marcadas com nucleotídeos fluorescentes em verde ou vermelho. Foram considerados diferencialmente expressos os genes cuja relação de fluorescência entre as amostras variasse em mais que 3 desvios-padrões em relação à média de expressão de um painel de genes endógenos (*housekeeping genes*). Concluiu-se pelo estudo de 1.161 seqüências cDNA que os níveis de mRNA eram diminuídos em 1,7% dos genes, ou aumentados em 7,3% dos genes da linhagem de supressão tumorigênica (UACC-903(+6)). A tradução fenotípica desses achados foi a descoberta de elevada expressão da proteína TRP1/melanoma antigen gp75 e da myelin PLP/DM20, esta última com funções de sinalização intercelular durante o desenvolvimento (DERISI et al., 1996).

Desde então, houve pronunciado aumento do número de estudos com aplicação em hematologia, com ênfase na distinção de subgrupos de doenças, correlação com índices prognósticos e resposta terapêutica. Simultaneamente ao aumento do número de *probes* utilizadas na construção das plataformas de microarranjos e à complexidade dos dados obtidos, metodologias estatísticas mais aprimoradas foram desenvolvidas para que a informação da expressão gênica não somente fosse baseada na análise de intensidades de sinal, mas que também pudesse apreciar possíveis interações funcionais entre os genes. Estas novas tecnologias permitiram que os dados obtidos das hibridizações de microarranjos deixassem de ser interpretados de uma maneira primariamente descritiva, abrindo campo para uma verificação analítica e consistente de relações funcionais e predição de marcadores de eventos (diagnóstico, linhagem e resposta a estímulos, por exemplo) (GOLUB et al., 1999; ALIZADEH et al., 2000; HUANG et al., 2002).

Golub et cols. publicaram o estudo pioneiro da aplicação do perfil de expressão gênica em hematologia analisando leucemias agudas. Neste trabalho desenvolvem a técnica de predição analítica denominada “*neighborhood analysis*”, pela qual estabelecem uma lista de genes mais fortemente correlacionados com a diferenciação entre as LMA e LLA. Em um segundo momento, ainda, propõe a metodologia SOM (*Self Organizing Maps*) para a classificação das LA, atingindo um elevado grau (porém não completamente eficaz)

de distinção entre os subtipos leucêmicos, o que permitiu o reconhecimento de 50 genes preditivos dos grupos LMA, LLA-T e dois subgrupos de LLA-B (GOLUB et al., 1999).

Staudt et cols. em 2000 publicaram um estudo da aplicação do perfil de expressão gênica analisando o Linfoma Difuso de Grandes Células B (DLBCL). Os autores utilizaram genes conhecidos ou suspeitos de estarem envolvidos na resposta imune ou na transformação tumoral. Para chegar à construção de um sistema especializado primeiro foram analisados 12.069 clones cDNA disponíveis de bibliotecas referentes ao centro germinativo B, 2.338 clones cDNA referentes aos DLBCL, Linfoma Folicular, Linfoma de Células do Manto e Leucemia Linfóide Crônica e, ainda, 3.186 clones cDNA referentes à biologia tumoral (marcadores da proliferação celular, apoptose, síntese de DNA, entre outros) (ALIZADEH et al., 2000).

A pesquisa revelou que os genes que diferenciam a célula do centro germinativo B de outros estágios da evolução ontogênica da célula B são expressos de maneira diversa entre os vários pacientes com DLBCL, sugerindo que o padrão de expressão gênica possa ser útil na distinção dos vários tumores analisados. Este estudo levou à individualização de um primeiro grupo de linfomas que apresenta perfil gênico similar àqueles dos linfócitos B do centro germinativo, e um segundo grupo de linfomas que tem um perfil gênico típico do linfócito B ativado (“GC B-like DLBCL” e “activated B-like DLBCL”).

Os dois tipos de linfomas, diversos no perfil molecular, mostraram ainda uma sobrevida estatisticamente diferente. A sobrevida global na amostra de pacientes foi de 52% e, frente ao mesmo tratamento, a sobrevida global em 5 anos foi de 76% para o grupo “GC B-like DLBCL” contra 16% no “activated B-like” DLBCL. Posteriormente demonstrou-se que a t(14;18)(q32;q21), associada ao rearranjo do gene BCL2, relaciona-se ao perfil do “GC B-like” linfoma (ALIZADEH et al., 2000).

Neste trabalho a análise dos dados aplica o algoritmo de clusterização hierárquica, que consiste de uma metodologia de agrupamento de genes e casos segundo padrões de similaridades baseados nos índices de correlação, assumindo que perfis semelhantes de expressão com elevado poder de correlação possam também carregar

intrinsecamente similaridades funcionais relacionadas aos processos celulares Este modelo desenvolvido em 1998 por Eisen et cols. tem sido amplamente utilizado em diversas linhas de pesquisa com microarranjos ainda hoje (EISEN et al., 1998).

As linhas de pesquisa em microarranjos têm fornecido informações não somente taxonômicas, mas também da biologia tumoral e dos prováveis mecanismos envolvidos na gênese e manutenção de tumores específicos. Usando uma estratégia diferente da usada no trabalho do grupo de Staudt, Golub também definiu dois grupos distintos de expressão gênica em Linfomas Difusos de Grandes Células B, partindo porém da separação prévia em pacientes curados e pacientes com doença refratária. A análise do perfil de expressão diferencial entre estes grupos permitiu não somente o reconhecimento de dois grupos distintos em seu padrão molecular, como principalmente criou uma nova linha de investigação por microarranjos que permite a caracterização dos processos biológicos da tumorigênese (SHIPP et al., 2002).

O estudo pioneiro de microarranjos em leucemias agudas foi realizado em 1999, no qual os autores demonstraram a técnica como eficaz no diagnóstico diferencial de subtipos de leucemia (mielóide ou linfóide) e na definição de marcadores gênicos preditivos do diagnóstico (GOLUB et al., 1999). O mesmo grupo identificou um novo perfil de leucemia caracterizado pela presença de translocações envolvendo o gene MLL, antes classificado entre as LLA-B; estes casos de LA demonstraram possuir um perfil de expressão distinto tanto das leucemias linfóides como mielóides, compatível com um progenitor hematopoético mais precoce com expressão de marcadores mielóides e superexpressão dos “HOX genes”, o que pode relacionar-se com perda da regulação do desenvolvimento hematopoético normal (ARMSTRONG et al., 2002).

Outras linhas de pesquisa evoluíram através da tecnologia de microarranjos, permitindo melhor compreensão da diferenciação hematopoética, estratificação de grupos de risco e predição de resistência a drogas. Ferrando et cols. em 2003, estudando LLA-T, estabeleceram estreita correlação entre o perfil de expressão gênica e estágios específicos da diferenciação linfóide T. Assim, verificaram que a hiperexpressão do fator de transcrição LYL1 associou-se à expressão de genes relacionados às fases mais precoces da diferenciação T (CD34, BCL2 e L-selectina), enquanto a hiperexpressão do HOX11

manteve correlação com genes expressos na fase cortical precoce do desenvolvimento do timócito (CD1 e CD10) e, por fim, a expressão do TAL1 indicou maturação da fase cortical tardia com marcadores gênicos relacionados ao TCR (CD3 e LCK) (FERRANDO et al., 2003). Chiaretti et cols. analisando o perfil de expressão de LLA-T do adulto e a sobrevida dos doentes estabeleceram importantes indicadores preditivos de manutenção de remissão ou recaída da doença: os genes BUB1B, TTK e CD2 apresentaram-se hiperexpressos nos casos de pacientes com remissão prolongada, enquanto que a hiperexpressão do gene AHNAK (funcionalmente pouco conhecido) foi indicativo de recaída em 10 de 11 pacientes de uma população de casos selecionados para validação desse achados. Este foi um dos primeiros trabalhos a estabelecer correlações entre o perfil de expressão gênica por microarranjo e evolução/prognóstico de doença (CHIARETTI et al., 2004).

Estes dados são importantes indicadores de que marcadores moleculares e metologias como os microarranjos possam ser necessários para estratificação de subtipos de LA, reconhecimento de vias metabólicas envolvidas na tumorigênese para possível intervenção terapêutica e identificação de fatores prognósticos.

2- OBJETIVOS

- 1) Distinguir grupos específicos de leucemias agudas, linfóides ou mielóides, de acordo com o perfil de expressão gênica;
- 2) Estabelecer correlações entre perfis de expressão gênica e dados da caracterização citogenética convencional;
- 3) Identificar possíveis genes relacionados à leucemogênese, tanto pela caracterização dos processos biológicos como pelo reconhecimento de EST's de identidade ainda não estabelecida, pela comparação de amostras de LA's com o padrão da célula progenitora hematopoiética normal.

3- PACIENTES E MÉTODOS

3.1- Pacientes e extração de RNA

As amostras dos pacientes foram coletadas no momento da punção e/ou biopsia, procedimentos rotineiramente utilizados na abordagem diagnóstica dos casos suspeitos de Leucemia Aguda, com consentimento e aprovação do Comitê de Ética Médica em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. O material biológico utilizado foi preferencialmente o aspirado de medula óssea total, porém nos casos em que houve dificuldades técnicas para a obtenção do conteúdo medular, concomitante a porcentagem de blastos superior a 60% no sangue periférico, optou-se pela utilização deste material. Foram selecionadas para estudo as amostras dos pacientes que apresentaram o diagnóstico efetivo de Leucemia Linfóide Aguda ou Leucemia Mielóide Aguda, após serem submetidos à seqüência de exames laboratoriais confirmatórios, mais precisamente abaixo descritos. As hibridizações foram realizadas em 4 amostras controles (células progenitoras de sangue periférico, estimuladas in vivo com G-CSF), 5 amostras de LLA e 17 amostras de LMA, todas coletadas em tubo contendo anticoagulante EDTA.

O RNA foi isolado utilizando-se o TRIzol Reagent® (Life Technologies). O TRIzol® é um reagente que apresenta uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina e o procedimento de extração é uma adaptação do método desenvolvido por Chomczinski e Sacchi (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987).

A quantificação do RNA foi obtida através da leitura de uma alíquota da amostra no espectrofotômetro em comprimento de onda equivalente a 260nm, considerando que 1DO à 260nm equivale a 40µg/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280nm é utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas e varia normalmente entre 1,6 e 1,8.

Para avaliar a qualidade do RNA extraído todas as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% e formaldeído, ou seja, em condições desnaturantes. A análise da integridade do RNA baseou-se na relação entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S.

3.2- Procedimentos diagnósticos

Morfologia: A avaliação preliminar diagnóstica das amostras consistiu da observação morfológica convencional pela coloração de Leishmann, bem como pelas colorações citoquímicas P.A.S. (*Schiff's Periodic Acid*), peroxidase, Sudan Black e alfa-naftil-acetato-esterase, de acordo com as necessidades pertinentes a cada caso e os protocolos do Laboratório de Hematologia do Hemocentro da UNICAMP. Foram utilizados para a classificação das leucemias os critérios de classificação FAB e WHO (BENNETT et al., 1976; HARRIS et al., 1999).

Nested PCR para pesquisa de PML-RAR α : Os casos suspeitos de LMA-M3 (promielocítica) foram caracterizados pela pesquisa molecular da fusão dos genes PML e RAR α , decorrente da translocação entre os cromossomos 15 e 17. A técnica foi a de *nested PCR*, que utiliza a amplificação do gene por um conjunto de pares *primers*, seguido de novos ciclos de amplificação com conjuntos de *primers* internos às regiões do RNAm utilizadas anteriormente, o que aumenta a sua sensibilidade. A visualização do amplificado foi realizada em gel de agarose contendo brometo de etídeo para coloração.

Imunofenotipagem: Para todas as leucemias foi realizado um primeiro painel fixo de anticorpos monoclonais utilizando em todos os tubos o CD45 PerCP, para compor a janela dos blastos, e os seguintes pares de anticorpos: CD19 FITC/CD3 PE, CD7 FITC/CD33 PE, HLA-DR FITC/CD13 PE e CD2 FITC/CD13 PE.

De acordo com o resultado do primeiro painel, procedeu-se um segundo painel específico para cada linhagem celular no qual, para a linhagem B, utilizou-se o CD19 PerCP em todos os tubos para a determinação da janela dos blastos (CD19+), seguido dos pares de anticorpos CD10 FITC/CD20 PE, KAPPA FITC/LAMBDA PE com marcação citoplasmática e de membrana; para a linhagem mielóide, o CD45 PerCP foi associado aos pares CD56 FITC/CD14 PE, CD15 FITC/CD34 PE, MPO FITC e CD2 FITC.

A técnica para preparo do material consistiu na lavagem em meio de cultura RPMI 1680 e diluição para uma concentração final de 5×10^6 /ml de leucócitos. A amostra foi incubada (100ul) com 10ul de anticorpo conjugado com fluorocromo por 20 minutos à

temperatura ambiente protegida da luz, e em seguida submetida à lise de hemácias com solução específica por cerca de 10 minutos, centrifugação por 5 minutos à 1500 RPM, lavagem em tampão PBS e ressuspensão em 1ml do mesmo (LACOMBE et al., 1997; BASSO et al., 2001).

O exame de Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo foi realizado no citômetro FACS Calibur[®] (Becton Dickinson), calibrado através do FacsComp[®] (Becton Dickinson). O programa usado para aquisição e análise dos dados foi o CellQuest[®] (Becton Dickinson).

3.3- Produção dos microarranjos de cDNA

As membranas de microarranjos foram produzidas utilizando fragmentos ORESTES gerados a partir do Projeto FAPESP/Instituto Ludwig do Genoma Humano do Câncer. A metodologia ORESTES (*Open Reading Frames EST Sequences*) consiste na geração de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), ou seja, seqüências complementares ao mRNA, através do seqüenciamento preferencial da área central do cDNA. Esta metodologia difere substancialmente de outras técnicas de geração de ESTs que seqüenciam, predominantemente, a partir das extremidades 3' e 5' do cDNA.

Cerca de 4700 ESTs foram imobilizados em membranas de nylon HybondN[®] (Amersham Life Science) utilizando metodologia informatizada e robotizada através do aparelho Flexys robot[®] (Genomic Solutions), padronizando 96 blocos ou grids de 49 spots cada um (7x7 spots). Os insertos de cada EST foram construídos em clones de bactérias PUC18 e mantidos em meio de cultura LB contendo 7,5% de glicerol, e a amplificação foi realizada por reação de cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) através de *primers* M13 *forward* e *reverse* em um volume final de 100µl. De todos os produtos de PCR, cerca de 5µl foram utilizados para verificação da qualidade amplificado em gel de agarose 1,5%, enquanto que os 95µl restantes foram purificados com QIAquick 96 PCR Purification Kit[®] (Qiagen) ou Sephadex G50[®] (Amersham Biosciences) para a posterior construção das membranas de microarranjo (MEIRELES et al., 2004; GOMES et al., 2005).

3.4- Hibridização e Aquisição das Imagens

A reação de transcrição reversa foi realizada a partir de 30µg de RNA total, utilizando para um volume final de 50µl a enzima Superscript II 200UI/µl (Invitrogen) por 2 horas a 43°C. Nesta fase da reação foram adicionados 10,0µl de 5Xfirst Strand Buffer, 1,5µl do mixdNTP (dATP, dGTP e dTTP 10,0mM), 3,5µl de dCTP 16,6µM, 5,0µl de DTT 0,1M (Invitrogen), 1,0µl de RNAsin® 40UI/µl (Promega) e 5,0µl de [α -³³P]dCTP (10,0mCi/ml). Subseqüentemente, o RNA foi hidrolisado por 20 minutos à 70°C e 15 minutos em temperatura ambiente, com adição inicial de 1,5µl de SDS 1%, 1,5µl de EDTA 0,5M e 1,5 µl de NaOH 3M. A solução foi neutralizada em seguida com 1,5µl de Tris-HCl 1M (pH8,0) e 4,5µl de HCl 2M, e as sondas purificadas em colunas de gel de cromatografia BioSpin6® (Bio-Rad). As membranas de microarranjo foram pré-hibridizadas por 1 hora em Na₂HPO₄ 0,25M (pH7,2), SDS 7%, BSA 1% e EDTA 1mM. Após desnaturação, as amostras foram adicionadas à solução-tampão e hibridizadas por cerca de 16 horas em triplicada (ou seja, no mesmo recipiente, 3 diferentes membranas foram expostas à mesma sonda).

Após lavagem por 30 minutos em uma solução Na₂HPO₄ 0,5M (pH7,2), SDS 1% e EDTA 1mM a fim de retirar radioisótopos não incorporados ou hibridizações inespecíficas, os sinais gerados nos filtros são capturados no aparelho Phosphorimager STORM 840® (Molecular Dynamics) e cada *spot* de c-DNA com sinal de hibridização é identificado por um programa computacional (ArrayPro Software®, Media Cybernetics). Os parâmetros introduzidos no programa ArrayPro Software® foram *default* com o *background* tipo *global from image*.

3.5- Seqüenciamento

O seqüenciamento automático das amostras foi realizado por meio do Dye Terminator Cycle Sequencing Kit® (Amersham Biosciences). Para a primeira reação de amplificação aplicou-se aproximadamente 1,0µl do clone referente ao *spot* de interesse, segundo a metodologia utilizada no Projeto Genoma do Câncer Ludwig/FAPESP, que utilizou insertos com vetor pUC18 em bactérias competentes

DH5 α . Para os passos seguintes foi tomado 1,0 μ l do amplificado, para o qual foi então adicionado 1,0 μ l de primer pUC18 forward ou reverse 5 μ M, 4,0 μ l de Dyenamic ET Terminator reagent pre-mix[®] e água destilada estéril suficiente para um volume final de 15,0 μ l. O programa foi iniciado por 94°C/2min, seguindo-se 35 ciclos: 94°C(20s), 57°C(15s) e 72°C(1min).

O produto foi precipitado adicionando-se 2 μ l de 7,5M acetato de amônio e 50 μ l de etanol absoluto. Após homogeneização e incubação por 15min à temperatura ambiente, protegidas da luz, as amostras foram centrifugadas (4000rpm, 30 minutos, 4°C). O sobrenadante foi removido por inversão e a seguir adicionaram-se 100 μ l de 70% etanol. Posteriormente o material foi centrifugado (4000rpm, 15 minutos, 4°C) e novamente o sobrenadante foi desprezado por inversão. Para completa remoção do etanol, as amostras foram submetidas à centrifugação invertida (200rpm, 7s, 4°C) e finalmente aquecidas a 65°C por 5 min para a secagem. O produto da purificação foi então analisado em sequenciador MEGA BACE 1000 DNA Analysis System[®] (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences), segundo as recomendações dos fabricantes. O resultado foi analisado com auxílio do programa Chromas[®] (Technelysium Pty Ltd.) (BRENTANI et al., 2005).

3.6- PCR quantitativo em tempo real (Real-Time PCR)

A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR através da ligação de uma sonda específica ou um corante na fita recém sintetizada (HIGUCHI et al., 1993; BUSTIN, 2000).

A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System[®] (Applied Biosystems) utilizando o reagente SYBRGreen PCR Master Mix[®] (Applied Biosystems), que além de conter todos os reagentes necessários para a realização de uma reação de PCR (dNTPs, MgCl, tampão, Taq Ampli-Gold[®]), contém também o corante SYBRGreen[®], componente intercalante de DNA dupla fita, necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo.

Para a quantificação da expressão gênica foi utilizada a denominada “análise relativa dos dados”, onde a expressão dos genes analisados foi quantificada em relação a situações consideradas como referências, que constituíram as amostras calibradoras. Todos os dados obtidos foram normalizados a partir da expressão de genes constitutivos utilizados como controles endógenos, neste caso a β -actina e o GAPDH.

Para a realização desta técnica foram desenhados primers específicos para os genes estudados (seqüência dos primers utilizados demonstrada abaixo), bem como para os genes da β -actina e GAPDH, utilizando o software Primer Express® (Applied Biosystems).

Seqüência dos primers dos genes CTNNB1, CTSB, EIF5, ERBB4 e SERINC3, que foram utilizados para a validação dos microarranjos através do PCR em tempo real.

Gene	Seqüência Forward	Seqüência reverse
CTNNB1	ACTAAATACCATTC ATTGTTTGTG	TTCACAGAGGACCCCTGCA
CTSB	ACCTACAAACAGGACAAGCACTAC	GCCATGATGTCCTTCTCGCT
EIF5	CATCATCAGCTGGTCGGAAA	ATGGTTCTGCTTTGACACGAATC
ERBB4	AGAGCTGGATGAGGAAGGTTACA	ACAAAAGGGTTCTCCTCCACTG
SERINC3	TGTTCTCTGCCTCTTGTATTCTAGC	GGATGACGCTGTCACTCCCT

As concentrações utilizadas dos *primers* foram otimizadas testando-se as ampliações obtidas de várias concentrações, em diluições seriadas (logarítmicas) de cDNA. Foram feitas quatro diluições: 2ng (2×10^0), 6,32ng ($2 \times 10^{0,5}$), 20ng (2×10^1) e 63,26ng ($2 \times 10^{1,5}$).

Todas as amostras foram quantificadas em placas de 96 poços (Sorenson®, BioScience Inc) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. As reações foram preparadas para um volume total de 25µl contendo 10ng de cDNA das amostras analisadas e 12,5 µl de SYBR Green Master Mix PCR® (Applied Biosystems).

Estes dados foram exportados para uma planilha de Excell (Microsoft Corporation) e as amostras normalizadas com os dados do controle de expressão endógena, o que consiste o primeiro passo da derivação aritmética denominado ΔCt (Ct da amostra com gene alvo menos Ct da amostra com gene de controle endógeno). Após a normalização dos dados, foi realizada a calibração dos mesmos utilizando as situações consideradas como referências, as amostras calibradoras mencionadas anteriormente, levando ao segundo passo da derivação aritmética denominada $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt da amostra a ser quantificada menos ΔCt da amostra calibradora). Os dados foram então normalizados, calibrados e convertidos em níveis de expressão pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde estima-se que a situação calibradora tem valor 1 (um) de expressão (VANDESOMPELE et al., 2002).

3.7- Análise Estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o programa computacional R, que consiste em uma ferramenta computacional de acesso livre para cálculos estatísticos e análise gráfica. Após a aquisição e quantificação das imagens, os pontos cuja intensidade foi menor ou igual à intensidade de background foram excluídos da análise. A seguir, os sinais foram definidos e determinados como a subtração (intensidade do spot)-(intensidade do background), e normalizados segundo a expressão mediana global. Através deste procedimento considera-se que a relação entre a intensidade individual média dos pontos e a intensidade global da membrana (soma das intensidades de todos os pontos ou pontos do filtro) não deve apresentar grande variabilidade entre si quando as amostras apresentam as mesmas características e são hibridizadas nas mesmas condições. Dessa forma, através de correções baseadas na intensidade global da membrana, permite-se a comparação de valores de sinais de diferentes amostras, a despeito da variabilidade que a imagem possa ter por diferenças circunstanciais de hibridização (SCHUCHHARDT et al., 2000; QUACKENBUSH, 2002). As réplicas de cada ponto dentro das triplicatas foram identificadas e as médias determinadas para posterior análise estatística.

A procura dos genes diferencialmente expressos foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico Wilcoxon que permitiu a identificação de p-valores de significância para cada gene estudado, em análises comparativas dois a dois. Assim, determinaram-se os níveis de significância da expressão diferencial para cada gene nas condições LLA vs LMA, controle vs LMA e controle vs LLA.

3.8- Análise Fatorial

A análise fatorial foi empregada para comparar o perfil de expressão gênica das amostras de LMA, LLA e células progenitoras de sangue periférico coletadas para transplante de medula óssea, estas aqui consideradas como representação de uma população hematopoética não neoplásica.

O fundamento da metodologia consiste em definir fatores que são combinações lineares de diversas aferências iniciais, de modo que este produto (fatores) possua características que o definam e o torne representativo das variáveis originais. Uma das características desejáveis é o elevado valor de *eigenvalue*, que avalia a contribuição do fator na explicação das variações das medidas originais, isto é, na representação dos dados originais.

A análise fatorial utiliza a técnica dos componentes principais para derivar os fatores a partir das variáveis correlacionadas. Essa técnica consiste em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. Inicialmente identifica-se a função que melhor discrimina os objetos e, em seguida, a função ortogonal (sistema de coordenadas submetidos a uma rotação) dessa primeira rotação é derivada. No novo sistema de coordenadas, a distinção entre objetos se fará por suas medidas nos novos eixos e as unidades de medida serão abstratas, nem x nem y das medidas originais. O passo final da técnica consiste em verificar se os fatores podem ser interpretados de forma coerente com a natureza dos fenômenos estudados. Para isso, analisa-se a matriz fatorial para identificar, pelos *factors loading* (coeficientes de correlação), quais as variáveis que melhor se correlacionam com cada fator. Essas relações são obtidas na matriz fatorial rodada pela estratégia de rotação do método *varimax*.

O pacote estatístico SPSS para *Windows* versão 10.0[®] foi utilizado para realizar a análise fatorial, que aplicou a técnica dos componentes principais para a determinação da matriz fatorial.

A análise fatorial foi empregada em quatro etapas distintas para a obtenção de fatores com o menor número de genes possível. Inicialmente, a cada 110 ou 50 genes foram realizadas análises com os seguintes critérios: formação de cinco fatores, *eigenvalues* >1 e *factor loading* (r) >0,50. Tendo como base os maiores *eigenvalues*, de cinco fatores da série de primeiras análises, somente o primeiro fator foi selecionado. Subseqüentemente o procedimento foi repetido tomando-se sempre os genes selecionados no primeiro fator até a obtenção de um conjunto de 123 genes que foram levados à análise final. Para melhor avaliação, os clones destes 123 genes foram re-seqüenciados e identificados, sendo que para a estatística final somente foram submetidos os genes cujas identidade e qualidade de seqüenciamento foram confiavelmente estabelecidas (PEREIRA, 2001; GOMES et al., 2005).

4- RESULTADOS

As 26 amostras (compreendendo 5 casos de LLA, 17 de LMA e 4 controles de células mononucleares de sangue periférico) foram hibridizadas em triplicata, perfazendo um total de 78 membranas analisáveis (**figura 2**). Após a aquisição da imagem com exposição de 48h, através do aparelho *Storm Phosphorimager*[®], o sinal de cada ponto foi mensurado pela subtração da intensidade menos o background local (*background global from image*). Para uma análise inicial da qualidade da hibridização, o resultado dos sinais de cada membrana individualmente foi submetido ao processo de clusterização hierárquica não supervisionada pelos programas *Cluster* e *Tree View* de acesso livre, e as imagens demonstradas na **figura 3** (EISEN et al., 1998). O procedimento de clusterização hierárquica agrupa as membranas e os genes segundo o grau de similaridade estabelecido pelo índice de correlação de Pearson. Visualmente, ele distribui as intensidades de expressão em tonalidades de verde e vermelho a partir da mediana estabelecida para cada um, sendo o mais vermelho correspondente ao maior valor de expressão e o mais verde ao menor valor de expressão. Pôde-se observar que, de modo geral, o programa permitiu o reconhecimento das triplicatas, o que é interpretado como uma boa reprodutibilidade das hibridizações para a mesma amostra, porém nem todas as triplicatas foram agrupadas conjuntamente, resultado de certo grau de variabilidade intrínseca ao método. Para atenuação destas diferenças e prosseguimento da análise estatística, estabeleceram-se as médias da triplicata para cada gene.

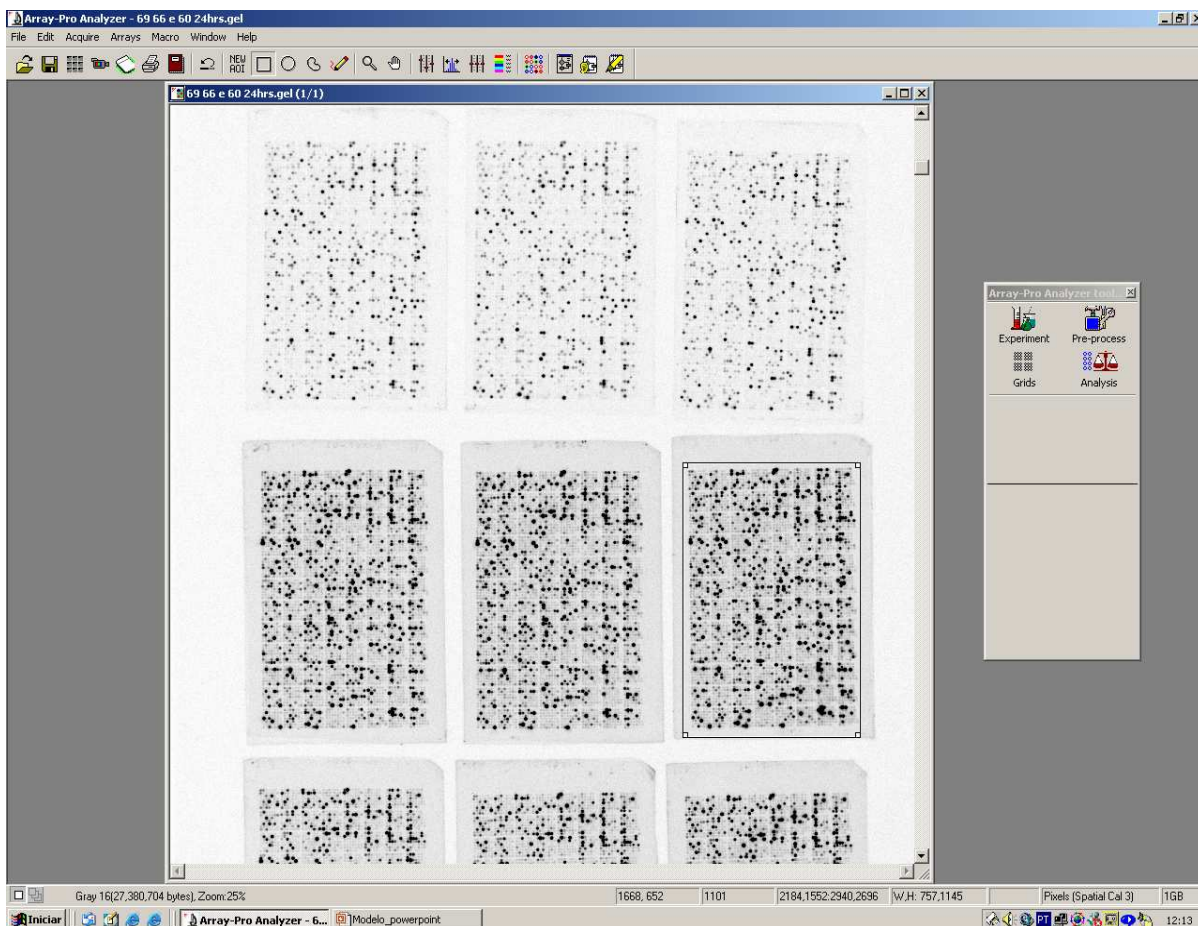


Figura 2- Exemplo de membranas 4.7K Instituto Ludwig/FAPESP hibridizadas, marcada por $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{dCTP}$, com exposição de 48 horas. As imagens foram adquiridas em aparelho STORM PhosphoroImager[®] e analisadas pelo programa ArrayPro[®].

Os valores normalizados das médias da triplicata de cada gene foram submetidos à análise estatística pelo teste de Wilcoxon, sendo que os p-valores extraídos permitiram agrupá-los em ordem crescente de significância em cada grupo de comparação, ou seja, controle vs LMA, controle vs LLA e LLA vs LMA (**figura 4**).

Destas comparações foram selecionados cerca de 100 genes com menores p-valores (ou seja, os representantes com maior relevância estatística, todos com $p < 0,05$) para posterior seqüenciamento dos clone e confirmação de sua identidade.



Figura 3- Análise do resultado das hibridizações por clusterização hierárquica não-supervisionada das medidas de expressão de todas as membranas individualmente. Notar que a maioria das membranas referentes à mesma amostra clusterizaram conjuntamente, reconhecendo as triplicatas. (os programas de análise foram *Cluster* e *Tree View*)

O conjunto de genes assim identificados está relacionado nas **tabelas 3, 4 e 5**, acompanhado pelos respectivos valores p de significância. Os genes com menores índices de p -valor foram utilizados para a clusterização hierárquica supervisionada. Este procedimento permitiu que os casos diagnosticados como LLA fossem agrupados conjuntamente, bem como os casos de LMA subtipo M3 pela classificação da FAB, demonstrando como a seleção de genes a partir dos valores p mais expressivos da análise estatística permitiu o reconhecimento de perfis de similaridade entre grupos bastante característicos de LA (**figuras 5 e 6**). Apesar de a clusterização reconhecer os grupos de LLA e LMA-M3, a metodologia não foi eficiente na diferenciação entre LLA-B e LLA-T. Do mesmo modo, observou-se que alguns casos de LMA se sobrepuseram aos casos controle, achados que serão discutidos *a posteriori*.

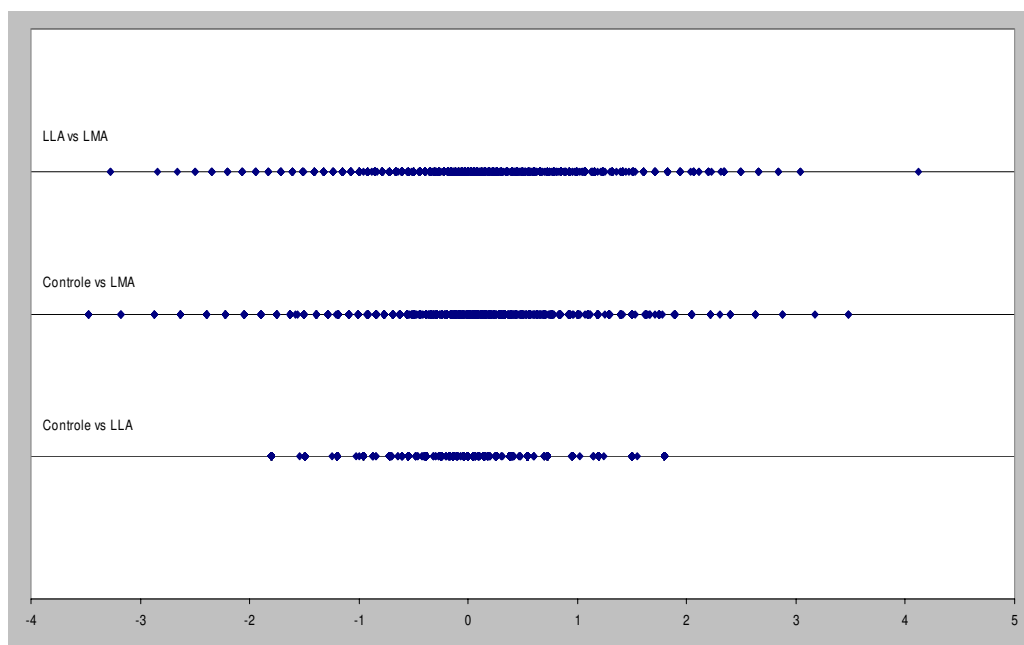


Figura 4- Distribuição dos valores p de significância, na base logarítmica 10, após análise pelo teste de Wilcoxon, nas 3 comparações efetuadas (controle vs LMA, controle vs LLA e LLA vs LMA). Os valores negativos referem-se aos genes hipoexpressos. Os valores que mais se distanciam do ponto central correspondem aos genes que, positiva ou negativamente, obtiveram os valores p de diferença estatística menores, ou seja, os genes provavelmente mais interessantes para a análise.

Os genes identificados pelo re-seqüenciamento foram analisados quanto aos seus aspectos funcionais através do programa de acesso livre *GOMiner* (<http://discover.nci.nih.gov/gomine>), que classifica segundo a nomenclatura amplamente utilizada do *Gene Ontology* (www.geneontology.org). Assim, nas **tabelas 6 e 7** resumizamos os principais processos celulares envolvidos em cada comparação. A análise revelou algumas prováveis diferenças de perfil de expressão entre as comparações que podem ser importantes no entendimento dos processos celulares envolvidos com o comportamento individual de cada grupo de leucemias.

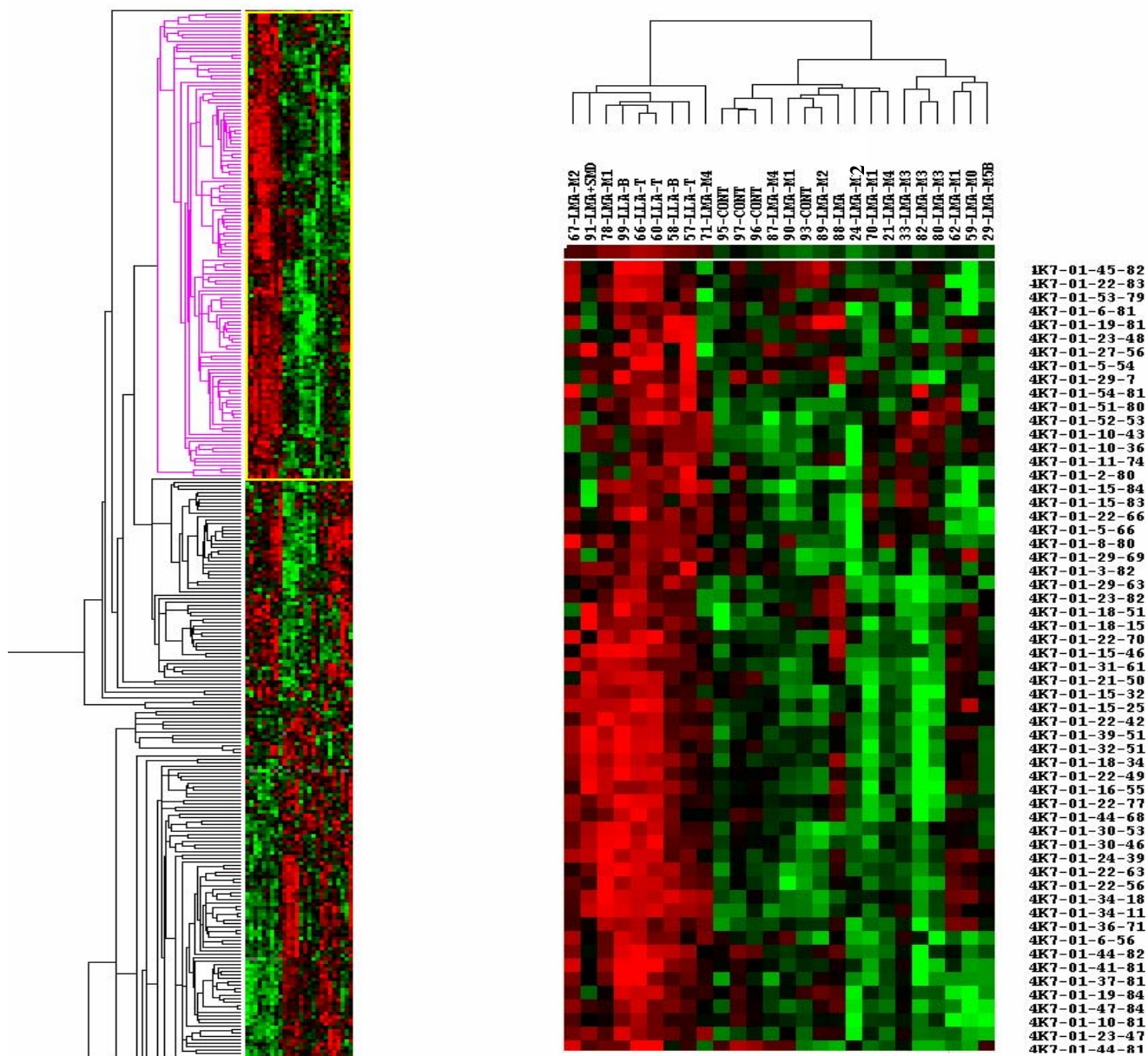


Figura 5- Resultado da clusterização hierárquica dos 100 genes selecionados pelo teste de Wilcoxon com menor valor de p de significância. As intensidades de expressão são transformadas em tonalidades de verde e vermelho a partir da mediana estabelecida para cada um, sendo o mais vermelho correspondente ao maior valor de expressão e o mais verde ao menor valor de expressão

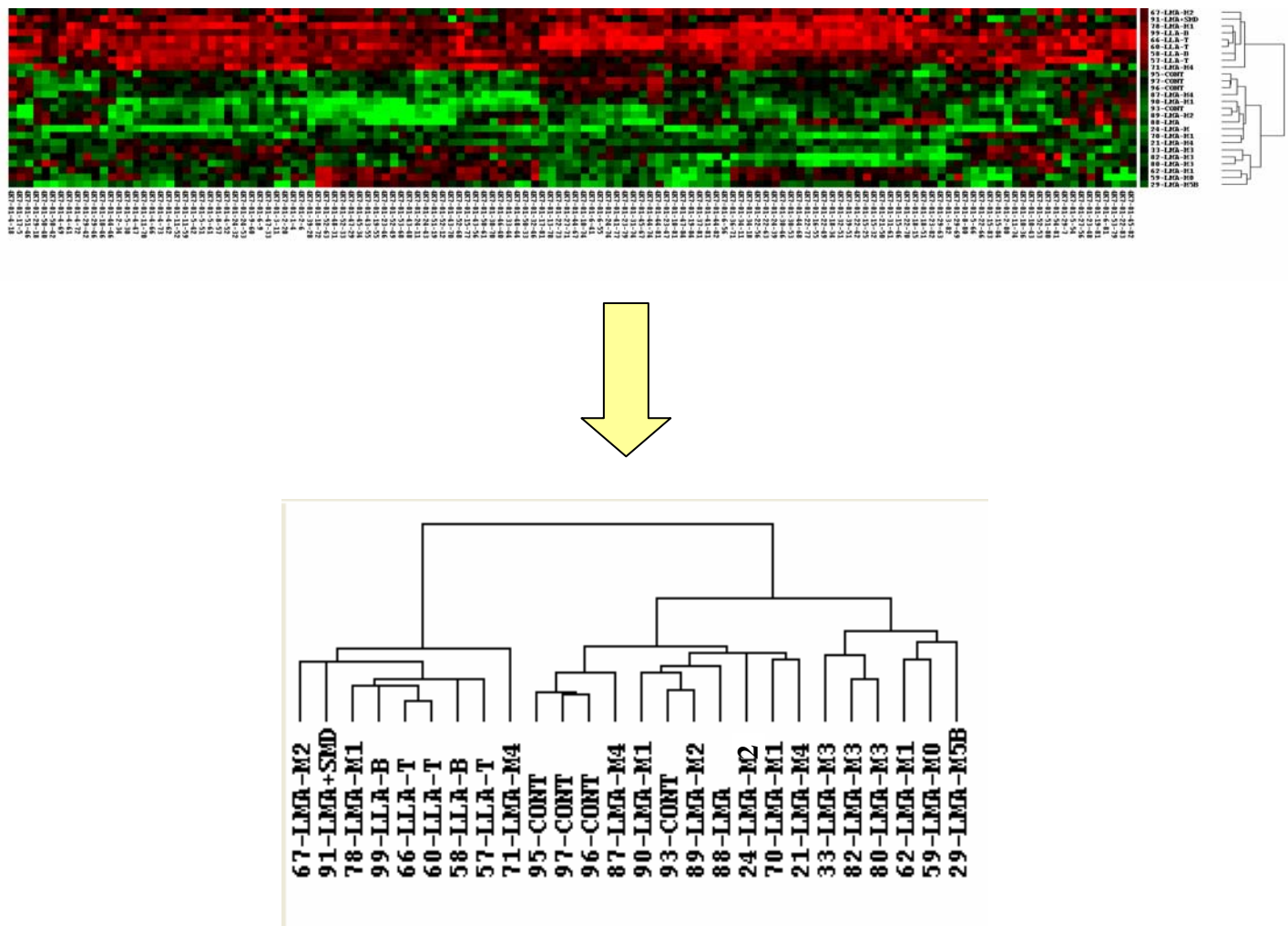


Figura 6- Dendrograma ampliado do resultado da clusterização hierárquica dos 100 genes selecionados pelo teste de Wilcoxon com menor valor de p de significância. Notar que os casos de LLA e as LMA-M3 foram agrupados conjuntamente, a partir do grau de similaridade de expressão que o programa estabeleceu. Houve sobreposição de alguns casos de LMA entre os controles.

Tabela 3- Relação dos genes selecionados com menor valor p de significância pelo teste de Wilcoxon, na comparação controle vs LMA, após reseqüenciamento para confirmação de sua identidade. (código: posição do gene no microarranjo; clone: clone do Projeto Genoma do Câncer utilizado na produção da membrana; descrição: acesso do gene em www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez, pesquisa em *Gene*)

Código	Clone(Ludwig)	p-value	log2(p_value) - signed	Descrição	Gene
4K7-01-10-1	RC3-BT0046-310899-002-F08	0,000334169	11,54713553	NIT1	nitrilase 1
4K7-01-12-51	RC3-ST0302-261299-011-B12	0,000334169	-11,54713553	HADHA	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit
4K7-01-41-79	MR3-SN0011-010400-101-H02	0,000334169	-11,54713553	LARS2	leucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial
4K7-01-10-8	RC3-BT0046-310899-002-F09	0,000668338	10,54713553	BUB1	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)
4K7-01-54-39	MR3-ST0220-110100-026-G05	0,000668338	-10,54713553	sat	
4K7-01-21-79	RC5-HT0442-201299-031-E07	0,001336675	-9,547135532	SDCBP	syndecan binding protein (syntenin)
4K7-01-23-44	PM4-BT0548-201299-002-B06	0,001336675	-9,547135532	CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
4K7-01-52-48	CM1-ST0181-261099-026-C10	0,001336675	9,547135532	TDE1	tumor differentially expressed 1
4K7-01-12-57	RC0-ST0280-271199-011-D11	0,002339181	-8,73978061	DBNL	drebrin-like
4K7-01-19-76	MR3-ST0203-070100-024-F08	0,002339181	-8,73978061	CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
4K7-01-31-43	RC5-BT0503-081299-011-G12	0,002339181	8,73978061	C12orf14	chromosome 12 open reading frame 4
4K7-01-31-53	PM1-ST0260-061299-001-G07	0,002339181	-8,73978061	PSCDBP	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein
4K7-01-5-76	MR3-ST0192-290100-015-E05	0,002339181	-8,73978061	LBR	lamin B receptor
4K7-01-7-23	RC5-HT0410-061299-031-B10	0,002339181	-8,73978061	MTPN	myotrophin
4K7-01-9-32	QV3-BT0537-060100-057-F11	0,002339181	-8,73978061	RAB27A	RAB27A, member RAS oncogene family
4K7-01-18-18	RC0-SN0044-040400-011-B05	0,004010025	-7,962173031	FCER1G	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide
4K7-01-20-1	MR3-SN0009-060400-101-E12	0,004010025	-7,962173031	NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
4K7-01-23-37	PM4-BT0548-201299-002-B04	0,004010025	-7,962173031	C10orf104	chromosome 10 open reading frame 104
4K7-01-28-72	RC5-HT0506-280200-012-C11	0,004010025	-7,962173031	CDC2L2	cell division cycle 2-like 2 (PITSLRE proteins)
4K7-01-30-1	PM0-BT0531-081299-001-H04	0,004010025	7,962173031	TAF9L	TAF9-like RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
4K7-01-52-74	QV4-ST0234-121199-032-G05	0,004010025	-7,962173031	MID1	midline 1 (Opitz/BBB syndrome)
4K7-01-16-81	QV3-BT0537-221299-047-E07	0,006015038	-7,37721053	FLJ21919	
4K7-01-2-72	PM3-BT0068-230899-002-C07	0,006015038	-7,37721053	CIZ1	CDKN1A interacting zinc finger protein 1
4K7-01-28-65	RC5-HT0506-280200-012-C05	0,006015038	-7,37721053	UBQLN1	ubiquilin 1
4K7-01-50-7	PM0-BT0275-211099-001-E03	0,006015038	7,37721053	FMNL2	formin-like 2
4K7-01-51-49	RC3-BT0046-310899-002-A11	0,006015038	7,37721053	RAB2L	RAS oncogene family-like member RAB2
4K7-01-6-29	MR3-ST0220-261199-011-B07	0,006015038	-7,37721053	DKFZp434L142	
4K7-01-11-73	RC5-ST0178-181099-011-G08	0,009022556	6,79224803	IMPDH2	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2
4K7-01-17-11	MR1-ST0111-091299-017-B06	0,009022556	6,79224803	CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)
4K7-01-1-76	IL0-BT0234-221099-116-F05	0,009022556	-6,79224803	PPIF	peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)
4K7-01-34-22	RC2-ST0256-220200-017-F11	0,009022556	-6,79224803	LAPTM5	lysosomal associated multispinning membrane protein 5
4K7-01-45-69	CM1-ST0181-261099-026-A02	0,009022556	-6,79224803	CYP4X1	cytochrome P450, family 4, subfamily X, polypeptide 1
4K7-01-49-44	RC5-HT0507-300100-011-G01	0,009022556	6,79224803	NME1	non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in
4K7-01-5-27	MR3-ST0192-290100-211-F06	0,009022556	-6,79224803	ZNF403	zinc finger protein 403
4K7-01-6-78	MR3-ST0220-261199-011-F10	0,009022556	-6,79224803	TUBGCP3	tubulin, gamma complex associated protein 3
4K7-01-8-50	CM0-BT0282-081199-088-A09	0,009022556	-6,79224803	COG2	component of oligomeric golgi complex 2
4K7-01-9-65	PM4-BT0548-171299-001-A12	0,009022556	-6,79224803	HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
4K7-01-26-29	MR3-SN0010-030700-105-G11	0,012698413	6,299208018	FLJ12806	
4K7-01-34-43	MR3-SN0010-240300-102-A09	0,012698413	-6,299208018	MUC4	mucin 4, tracheobronchial
4K7-01-38-60	PM2-ST0012-170899-001-B01	0,012698413	-6,299208018	HERPUD1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1
4K7-01-46-49	CM0-ST0137-240999-061-F01	0,012698413	-6,299208018	ANXA11	annexin A11
4K7-01-47-10	MR3-ST0191-290100-210-G11	0,012698413	6,299208018	IPO9	importin 9
4K7-01-7-46	RC5-HT0582-170300-011-F04	0,012698413	-6,299208018	B2M	beta-2-microglobulin
4K7-01-7-65	RC5-HT0410-071299-031-E01	0,012698413	-6,299208018	ERBB4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)

Tabela 4- Relação dos genes selecionados com menor valor p de significância pelo teste de Wilcoxon, na comparação controle vs LLA.

Código	Clone(Ludwig)	p-value	log2(p_value) - signed	Descrição	Gene
4K7-01-10-1	RC3-BT0046-310899-002-F08	0,015873016	5,977279923	NIT1	nitrilase 1
4K7-01-10-8	RC3-BT0046-310899-002-F09	0,015873016	5,977279923	BUB1B	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast) nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)
4K7-01-11-40	RC2-ST0173-201099-011-G07	0,015873016	-5,977279923	NFKB1	
4K7-01-11-47	RC2-ST0173-201099-011-G08	0,015873016	5,977279923	SS18L1	synovial sarcoma translocation gene on chromosome 18-like 1
4K7-01-11-59	RC5-ST0178-181099-011-G03	0,015873016	5,977279923	RALY	RNA binding protein (autoantigenic, hnRNP-associated with lethal yellow)
4K7-01-12-51	RC3-ST0302-261299-011-B12	0,015873016	-5,977279923	HADHA	enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit
4K7-01-12-57	RC0-ST0280-271199-011-D11	0,015873016	-5,977279923	DBNL	drebrin-like
4K7-01-13-22	MR3-ST0220-261199-011-H03	0,015873016	-5,977279923	LARP	likely ortholog of mouse la related protein
4K7-01-13-23	MR3-SN0010-030700-105-G11	0,015873016	-5,977279923	FLJ12806	hypothetical protein FLJ12806
4K7-01-1-53	CM2-BT0305-171199-034-A03	0,015873016	-5,977279923	Rpl13	ribosomal protein L13
4K7-01-16-44	PM4-BT0548-171299-001-E08	0,015873016	-5,977279923	C13orf23	chromosome 13 open reading frame 23
4K7-01-16-81	QV3-BT0537-221299-047-E07	0,015873016	-5,977279923	FLJ21919	hypothetical protein FLJ21919
4K7-01-17-11	MR1-ST0111-091299-017-B06	0,015873016	5,977279923	CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)
4K7-01-17-23	IL0-ST0162-280999-123-B04	0,015873016	-5,977279923	NDUFB1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 1, 7kDa
4K7-01-1-76	IL0-BT0234-221099-116-F05	0,015873016	-5,977279923	PPIF	peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)
4K7-01-18-18	RC0-SN0044-040400-011-B05	0,015873016	-5,977279923	FCER1G	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide
4K7-01-18-45	RC5-ST0171-201099-012-B06	0,015873016	-5,977279923	DIS3	
4K7-01-18-74	RC0-SN0045-040400-011-C01	0,015873016	-5,977279923	DNCL2A	dynein, cytoplasmic, light polypeptide 2A
4K7-01-19-76	MR3-ST0203-070100-024-F08	0,015873016	-5,977279923	CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
4K7-01-20-1	MR3-SN0009-060400-101-E12	0,015873016	-5,977279923	NFKBIA	
4K7-01-21-67	RC5-HT0582-280300-012-C10	0,015873016	-5,977279923	APLP2	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2
4K7-01-21-79	RC5-HT0442-201299-031-E07	0,015873016	-5,977279923	SDCBP	syndecan binding protein (syntenin)
4K7-01-23-29	PM0-BT0531-081299-001-F07	0,015873016	5,977279923	BIRC6	baculoviral IAP repeat-containing 6 (apollon)
4K7-01-23-30	PM4-BT0548-201299-002-A12	0,015873016	-5,977279923	EIF3S6IP	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein
4K7-01-23-37	PM4-BT0548-201299-002-B04	0,015873016	-5,977279923	C10orf104	chromosome 10 open reading frame 104
4K7-01-23-44	PM4-BT0548-201299-002-B06	0,015873016	-5,977279923	CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
4K7-01-23-76	RC0-BT0561-070100-011-C03	0,015873016	-5,977279923	PHF20	PHD finger protein 20
4K7-01-2-41	RC0-BT0522-071299-011-A03	0,015873016	-5,977279923	DHX38	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 38
4K7-01-25-46	RC6-ST0198-071199-011-E10	0,015873016	5,977279923	POLR2A	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A
4K7-01-26-2	RC4-ST0185-191099-012-F06	0,015873016	-5,977279923	PRO1073	PRO1073 protein
4K7-01-26-74	MR3-ST0218-040100-015-H05	0,015873016	-5,977279923	IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1
4K7-01-28-38	RC5-HT0580-100500-022-G09	0,015873016	-5,977279923	SPTBN1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1
4K7-01-29-50	CM0-BT0306-221299-138-D10	0,015873016	5,977279923	MDS028	uncharacterized hematopoietic stem/progenitor cells protein MDS028
4K7-01-31-36	RC5-BT0503-081299-011-G05	0,015873016	5,977279923	SH3GLB1	SH3-domain GRB2-like endophilin B1
4K7-01-31-43	RC5-BT0503-081299-011-G12	0,015873016	5,977279923	C12orf4	chromosome 12 open reading frame 4
4K7-01-31-61	MR2-ST0131-131099-011-B10	0,015873016	5,977279923	SSH1	slingshot homolog 1 (Drosophila)
4K7-01-3-17	MR0-ST0032-280999-002-D10	0,015873016	-5,977279923	182-FIP	82-kD FMRP Interacting Protein
4K7-01-33-19	MR3-ST0220-110100-012-F10	0,015873016	5,977279923	TTC17	tetratricopeptide repeat domain 17
4K7-01-33-44	RC2-ST0171-271099-031-C03	0,015873016	5,977279923	PLCG2	phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)
4K7-01-33-79	RC2-ST0165-271099-011-E11	0,015873016	-5,977279923	COX15	COX15 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)
4K7-01-34-22	RC2-ST0256-220200-017-F11	0,015873016	-5,977279923	LAPTM5	lysosomal associated multispinning membrane protein 5
4K7-01-34-43	MR3-SN0010-240300-102-A09	0,015873016	-5,977279923	MUC4	mucin 4, tracheobronchial
4K7-01-35-31	RC5-HT0581-210300-021-A11	0,015873016	-5,977279923	C1orf43	chromosome 1 open reading frame 43
4K7-01-35-37	RC5-HT0506-300100-011-C01	0,015873016	-5,977279923	PFN1	profilin 1
4K7-01-38-13	CM1-ST0277-161299-070-A07	0,015873016	-5,977279923	PSEN1	presenilin 1 (Alzheimer disease 3)
4K7-01-38-60	PM2-ST0012-170899-001-B01	0,015873016	-5,977279923	HERPUD1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1
4K7-01-39-13	CM0-ST0179-071099-071-H12	0,015873016	-5,977279923	ITM1	integral membrane protein 1

Tabela 5- Relação dos genes selecionados com menor valor p de significância pelo teste de Wilcoxon, na comparação LLA vs LMA.

Código	Clone(Ludwig)	p-value	log2(p value) - signed	Descrição	Gene
4K7-01-51-42	RC3-BT0046-310899-002-A10	0,002202476	8,82665806	FAM20B	family with sequence similarity 20, member B
4K7-01-52-20	CM1-ST0181-261099-026-C02	0,002202476	8,82665806	ABI1	abl-interactor 1
4K7-01-25-1	MR2-ST0129-061099-009-D12	0,003189793	8,292321633	TALDO1	transaldolase 1
4K7-01-29-23	CM1-BT0280-121199-044-A09	0,003189793	8,292321633	NDUFS2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2, 49kDa
4K7-01-54-64	MR3-SN0011-010400-101-G02	0,003189793	8,292321633	ARHGAP1	Rho GTPase activating protein 1
4K7-01-3-17	MR0-ST0032-280999-002-D10	0,004556847	7,77774846	182-FIP	82-kD FMRP Interacting Protein
4K7-01-37-13	RC0-BT0561-210100-012-B03	0,004556847	7,77774846	CHCHD6	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6
4K7-01-9-60	QV3-BT0537-060100-057-H08	0,004556847	-7,77774846	C17orf27	chromosome 17 open reading frame 27
4K7-01-35-37	RC5-HT0506-300100-011-C01	0,006303638	7,309599624	PFN1	profilin 1
4K7-01-45-70	CM4-ST0134-290999-018-E11	0,006303638	7,309599624	FLJ20297	hypothetical protein
4K7-01-56-51	RC5-HT0547-180200-011-E09	0,006303638	7,309599624	CTSB	cathepsin B
4K7-01-11-59	RC5-ST0178-181099-011-G03	0,008582061	-6,864460093	RALY	RNA binding protein (autoantigenic, hnRNP-associated with lethal yellow)
4K7-01-23-44	PM4-BT0548-201299-002-B06	0,008582061	6,864460093	CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
4K7-01-23-76	RC0-BT0561-070100-011-C03	0,008582061	6,864460093	PHF20	PHD finger protein 20
4K7-01-26-2	RC4-ST0185-191099-012-F06	0,008582061	6,864460093	PRO1073	PRO1073 protein
4K7-01-46-27	CMD-ST0227-121199-094-D08	0,008582061	6,864460093	NPC2	Niemann-Pick disease, type C2
4K7-01-4-73	RC5-ST0178-081099-011-G01	0,008582061	-6,864460093	FAM48A	family with sequence similarity 48, member A
4K7-01-13-78	CM3-ST0179-051099-019-G08	0,011392117	-6,455820365	EIF5	eukaryotic translation initiation factor 5
4K7-01-19-58	RC4-ST0185-191099-012-D05	0,011392117	6,455820365	HSD17B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4
4K7-01-21-67	RC5-HT0582-280300-012-C10	0,011392117	6,455820365	APLP2	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2
4K7-01-23-77	RC1-BT0385-151299-011-F01	0,011392117	6,455820365	ZNF638	zinc finger protein 638
4K7-01-31-51	IL3-ST0023-110899-005-G07	0,011392117	6,455820365	NSEP1	nuclease sensitive element binding protein 1
4K7-01-42-30	RC5-HT0507-180200-031-A08	0,011392117	6,455820365	PRDX5	peroxiredoxin 5
4K7-01-45-69	CM1-ST0181-261099-026-A02	0,011392117	6,455820365	CYP4X1	cytochrome P450, family 4, subfamily X, polypeptide 1
4K7-01-51-28	RC3-BT0046-310899-002-A05	0,011392117	6,455820365	RTN3	reticulon 3
4K7-01-5-54	MR3-ST0220-100100-023-B05	0,011392117	-6,455820365	SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
4K7-01-1-45	CM1-BT0592-110100-090-D03	0,014961647	6,062587236	HNRPL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
4K7-01-18-74	RC0-SN0045-040400-011-C01	0,014961647	6,062587236	DNCL2A	dynein, cytoplasmic, light polypeptide 2A
4K7-01-23-30	PM4-BT0548-201299-002-A12	0,014961647	6,062587236	EIF3S61P	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein
4K7-01-23-71	PM0-BT0531-081299-001-G07	0,014961647	6,062587236	PFKP	phosphofructokinase, platelet
4K7-01-42-2	RC5-HT0507-100300-012-C07	0,014961647	6,062587236	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A
4K7-01-45-12	MR2-ST0129-221099-013-F04	0,014961647	6,062587236	copA	copper-transporting ATPase copA
4K7-01-55-65	CM3-ST0179-051099-019-F07	0,014961647	6,062587236	Rai3	retinoic acid induced 3

Tabela 6- Relação numérica dos genes diferencialmente expressos, distribuídos segundo sua relação funcional utilizando a classificação *Gene Ontology* (www.geneontology.org) (programa *GOMiner*, <http://discover.nci.nih.gov/gomine>)

PROCESSOS CELULARES	Controle X LMA n=50	Controle X LLA n=41	LLA X LMA n=38
Comunicação celular	14	13	8
Adesão celular	5	3	1
Sinalização celular	3	2	2
Transdução de sinal	9	11	7
Transdução de sinal relacionada a receptor de superfície celular	5	6	4
- via de sinalização “G-protein coupled receptor”	2	2	2
- via de sinalização Wnt	1	2	1
- via de sinalização Notch	-	1	-
- via de sinalização enzimática	2	1	1
Cascata de sinalização intracelular	6	7	2
Cascata de sinalização via proteína-quinase	3	3	1
Cascata via I-kappaB-quinase/NF-kappaB-quinase	1	1	-
Cascata da via MAPKKK	2	2	1
Transdução de sinal mediada pela “small GTPase”	5	4	1
- transdução de sinal via proteína Rac	1	1	-
- transdução de sinal via proteína Ras	2	1	-
- transdução de sinal via proteína Rho	1	1	1
Via de sinalização proteína-quinase ativada por “stress”	2	2	-
Diferenciação celular	4	3	3
Processos celulares fisiológicos	38	34	30
Ciclo celular	9	5	1
Morte celular	3	7	3
Divisão celular	4	2	-
Crescimento celular	3	2	1
Motilidade celular	5	4	1
Organização celular e biogênese	13	8	6
- biogênese ribossomal	2	2	-
- biogênese cromossomal	-	1	1
- organização e biogênese de organelas citoplasmáticas	11	8	6
- organização e biogênese do citoesqueleto	7	6	4
- organização do peroxissomo	-	-	1
Proliferação celular	8	4	3
Metabolismo celular	29	28	24
- biosíntese celular	9	9	3
- catabolismo celular	3	3	4
- metabolismo de macromoléculas	17	16	11
Metabolismo de nucleotídeos	12	9	11
- metabolismo do DNA	2	-	2
- metabolismo do RNA	4	3	2
- regulação do metabolismo dos ácidos nucleicos	8	6	7
- transcrição	8	6	7

Tabela 7- Relação nominal dos genes diferencialmente expressos, distribuídos segundo sua relação funcional, utilizando a classificação Gene Ontology (www.geneontology.org) (programa GOMiner, <http://discover.nci.nih.gov/gominer/>).

				ControlexLMA	ControlexLLA	LLAxLMA
PROCESSOS CELULARES						
Comunicação celular	Adesão celular ▼ ▲			▼ CTNNB1 ▲ SSX2IP ▼ THBS1 ▼ MUC4 ▼ PSCDBP	▼ CTNNB1 ▼ DIS3 ▼ MUC4	▲ CTNNB1
	Sinalização celular			▼ SAT ▼ CTNNB1 ▼ PSDCBP	▼ CTNNB1 ▼ PSDCBP	▲ CTNNB1 ▼ SCD
	Transdução de sinal			▼ FCER1G ▲ RGL2	▼ FCER1G ▼ IQGAP1 ▼ NFKB1 ▲ PLCG2	▲ PDIA3 ▼ TRB2
		Transdução de sinal relacionada a receptor de superfície celular			▼ FCER1G	
			Via de sinalização “G- protein coupled receptor”	▲ CDC42 ▲ RGL2	▼ APLP2	▲ APLP2 ▼ TRB2
			Via de sinalização Notch		▼ PICG2	
			Via de sinalização Wnt	▼ CTNBB1	▼ CTNNB1 ▼ PSEN1	▲ CTNNB1
			Via de sinalização enzimática	▲ CDC42 (via proteína treonina/serina-quinase por receptor transmembrana) ▲ ERBB4 (via proteína tirosina-quinase por receptor transmembrana)	▲ CDC42	▲ ABL1
		Cascata de sinalização intracelular		▲ RGL2 ▼ PSDCBP	▲ PICG2 ▼ PSEN1 ▼ PSDCBP	

			Cascatas de sinalização via proteína-quinase	Cascata via I-kappaB-quinase/ NF-kappaB-quinase	▼ NFKBIA	▼ NFKBIA	
				Cascata da via MAPKKK	cascata da via JNK ▲ CDC42 ▼ DBNL	▲ CDC42 ▼ DBNL	▲ TRAF7
			Transdução de sinal mediada pela “small GTPase”		▲ CDC42 ▼ RAB27 ▲ RGL2	▲ CDC42 ▼ IQGAP1	▲ ARHGAR1
				Transdução de sinal via proteína Rac	▼ DBNL	▼ DBNL	
				Transdução de sinal via proteína Ras	▲ RGL2 ▼ PSDCBP	▼ PSDCBP	
				Transdução de sinal via proteína Rho	▲ CDC42	▲ CDC42	▲ ARHGAR1
			Via de sinalização proteína-quinase ativada por “stress”		▲ CDC42 ▼ DBNL	▲ CDC42 ▼ DBNL	
			Diferenciação celular				
Processos celulares fisiológicos						▼ CTNNB1	▲ ABL1 ▲ CTNNB1
	Ciclo celular				▲ BUB1B ▼ CDKN1B ▼ Q5QPQ9_Human ▼ TUBGCP3 ▼ CIZ1 ▲ NME1 ▲ NME2	▲ BUB1B ▼ CDKN1B ▼ DIS3 ▲ CDC42 ▼ CIZ1	▼ SMARCB1

	Morte celular		▼ BID ▼ NFKBIA ▼ Q5QPQ9_Human	▼ PFN1 ▲ BIRC6 ▼ NFKB1 ▼ NFKBIA ▼ PSEN1 ▲ SH3GLB1 ▼ LARP	▲ PFN1 ▲ CASP4_Human ▲ TRAF7
	Divisão celular		▲ CDC42 ▲ BUB1B ▼ MID1 ▼ Q5QPQ9_Human	▲ CDC42 ▲ BUB1B	
	Crescimento celular		▼ MTPN ▼ Q5QPQ9_Human ▲ CDC42	▲ CDC42 ▼ PFN1	▲ PFN1
	Motilidade celular		▼ THBS ▲ CDC42 ▼ FCER1 ▲ ABCC9 ▼ PSDCBP	▲ CDC42 ▼ FCER1G ▼ PSEN1 ▼ PSDCBP	▼ CAPZA2
	Organização celular e biogênese		▲ Q96PY5_Human ▲ CDC42 ▼ MTPN ▼ Q5QPQ9_Human	▲ CDC42 ▼ PFN1	▲ PFN
		Biogênese ribossomal	▲ IPO9 ▲ NME1	▼ RPL13 ▼ DIS3	
		Biogênese cromossomal			▼ SMARCB1
		Organização e biogênese de organelas citoplasmáticas	▼ COG2 ▼ SAT	▼ PSEN1	
		Organização e biogênese do citoesqueleto	▲ CDC42 ▲ Q96PY5_Human ▼ PSDCBP ▲ SSX2IP ▼ MID1 ▼ TUBGCP3	▲ CDC42 ▼ PFN1 ▼ PSDCBP ▼ DBNL ▼ DIS3 ▼ DNCL2A	▲ ARHGAP1 ▲ PFN1 ▲ DNCL2A ▲ CAPZA2

		Organização do peroxissomo					▲ PRDX5
Proliferação celular					▲ BUB1B ▼ ERBB4 ▼ CDKN1B ▲ NME1 ▲ NME2 ▼ CTNNB1 ▼ NFKBIA	▲ BUB1B ▼ CTNNB1 ▼ NFKBIA ▼ CDKN1B	▲ ABL1 ▲ S100a11 ▲ CTNNB1
Metabolismo celular	Metabolismo de nucleotídeos	Metabolismo do DNA			▼ SAT ▼ MID1		<SMARCB1 ▲ S100A11
		Metabolismo do RNA			▼ LARS2 ▼ CIZ1 ▼ Q5QPQ9 ▲ NME1	▼ DIS3 ▼ DHX38 ▼ CIZ1	▲ HNRPL ▼ ROD1
		Regulação do metabolismo dos ácidos nucléicos			▲ NME1 ▲ NME2 ▲ IMPDH2 ▼ CTNNB1 ▼ Q5QPQ9_Human	▼ NFKB1	▲ TALDO1
		Transcrição			▼ CTNNB1 ▼ MID1 ▼ MTPN ▲ NME2 ▼ Q5QPQ9_Human ▲ Q96PY5_Human ▲ TAF9L ▼ SAT	▼ CTNNB1 ▼ NFKB1 ▲ POLR2A ▼ Q66K49_Human ▲ SS18L1 ▼ PFN1	▲ CTNNB1 ▼ GATA3 ▲ NSEP1 ▲ Q66K49 ▼ SMARCB1 ▲ TRAF7 ▲ PFN1

<i>FUNÇÃO MOLECULAR</i>			
Atividade relacionada à transdução de sinal via receptor de membrana	▲ CDC42 ▼ CTNNB1 ▼ THBS1 ▼ COG2 ▼ ERBB4 ▼ FCER1 ▼ LBR ▼ B2M ▲ ABCC9 ▼ MUC4 ▼ PSDCBP ▼ BID ▼ CDKN1B ▼ HLA_DQB1	▲ CDC42 ▼ CTNNB1 ▲ PLCG2 ▼ FCER1G ▼ MUC4 ▼ PSDCBP ▼ CDKN1B	▲ CTNNB1 ▲ ARHGAP1 ▼ TRB2 ▲ HLA-A ▲ NPC2 ▲ S100A11 ▲ COPA
Atividade relacionada à regulação da transcrição	▼ SAT ▼ CTNNB1 ▼ MTPN ▲ NME2 ▲ Q96PY5_Human ▲ RGL2	▼ CTNNB1 ▼ NFKB1 ▲ SS18L1	▲ CTNNB1 ▼ GATA3 ▲ NSEP1
Atividade relacionada à tradução	▲ Q96PY5_Human	▼ EIF3S6IP	▼ EIF5 ▲ EIF3S61P
Atividade relacionada ao transporte de membrana	▲ ABCC9 ▼ UQCRB ▼ MID1 ▼ COG2 ▲ IPO9	▼ COX15 ▼ NDUFS2 ▼ NINM_Human ▲ SSH1	▲ KCNE3 ▲ NDUFS2 ▲ PDIA3 ▲ PRDX5 ▲ HSD17B4 ▲ COPA

Na comparação entre as LMA e os controles, observou-se a expressão diferencial de um grande número de genes envolvidos com o processo de adesão celular (CTNNB1, SSX2IP, THBS1, MUC4 e PSCDBP), regulação do metabolismo de nucleotídeos (SAT, CIZ1, Q5QPQ9, NME1, NME2, IMPDH2, CTNNB1, MID1, MTPN, Q96PY5, TAF9L e SAT) e atividade relacionada à transdução de sinal via receptor de membrana (CDC42, CTNNB1, THBS1, COG2, ERBB4, FCER1, LBR, B2M, ABCC9, MUC4, PSDCBP, BID, CDKN1B e HLA_DQB1). Particularmente interessante foi o achado de que na comparação entre LLA e controles, um considerável número de genes funcionalmente relacionados à morte celular foi diferencialmente expresso entre as leucemias (PFN1, BIRC6, NFKB1, NFKBIA, PSEN1, SH3GLB1 e LARP). A relação detalhada dos genes diferencialmente expressos em cada grupo de comparação está relacionada na **tabela 7**. Deve-se notar que para este tipo de análise a seleção das categorias funcionais foi realizada ativa e arbitrariamente de acordo com sua presumível importância biológica. E ainda, cada gene pode ser enquadrado em mais de uma categoria funcional, o que explica a repetição, na tabela, de alguns genes enumerados em diferentes processos celulares.

A visualização da clusterização hierárquica inicial dos casos e a verificação de que as amostras referentes às LMA-M3 foram agrupadas conjuntamente sugeriu que este subtipo específico de LA pudesse apresentar um padrão característico de expressão gênica. Assim, uma nova análise estatística aplicando-se o teste de Wilcoxon foi realizada, excluindo-se os casos-controle, as LLA e o único caso de LMA-M5b, com um objetivo de uniformizar a população de estudo e distinguir exclusivamente os casos de LMA-M3 dos demais LMA. Os genes foram novamente agrupados segundo os valores p de significância, sendo que 82 genes com menor p-valor ($p < 0,05$) foram selecionados e, destes, alguns reseqüenciados e submetidos à clusterização hierárquica. A **figura 7** mostra a clusterização hierárquica das LMA-M3 e LMA-não M3, e os genes que foram diferencialmente expressos. Apesar do reduzido número de amostras utilizados na comparação entre os casos LMA-M3 e os casos LMA-não M3, pôde-se verificar que a seleção de genes foi eficiente na distinção dos casos de LMA-M3 dos demais casos de LMA. A análise funcional dos genes com menores valores de p não foi informativa e não permitiu a identificação de vias

metabólicas que pudessem estar particularmente envolvidas no processo leucemogênico das LMA-M3.

A análise estatística fatorial, utilizando a metodologia de análise dos componentes principais, foi aplicada para a totalidade das amostras hibridizadas. Esta metodologia procura selecionar um conjunto de fatores (combinações lineares das medidas iniciais) que melhor defina e represente o conjunto das variáveis iniciais. Esta abordagem pode ser utilizada para a identificação de um conjunto de genes que melhor caracteriza os grupos estudados. Tomando-se os genes que apresentaram *factor loading* > 0,70 dois conjuntos de genes foram selecionados (componentes principais), compostos como mostram as **tabelas 8 e 9**. Em razão provavelmente do baixo número de amostras não foi possível obterem-se resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos.

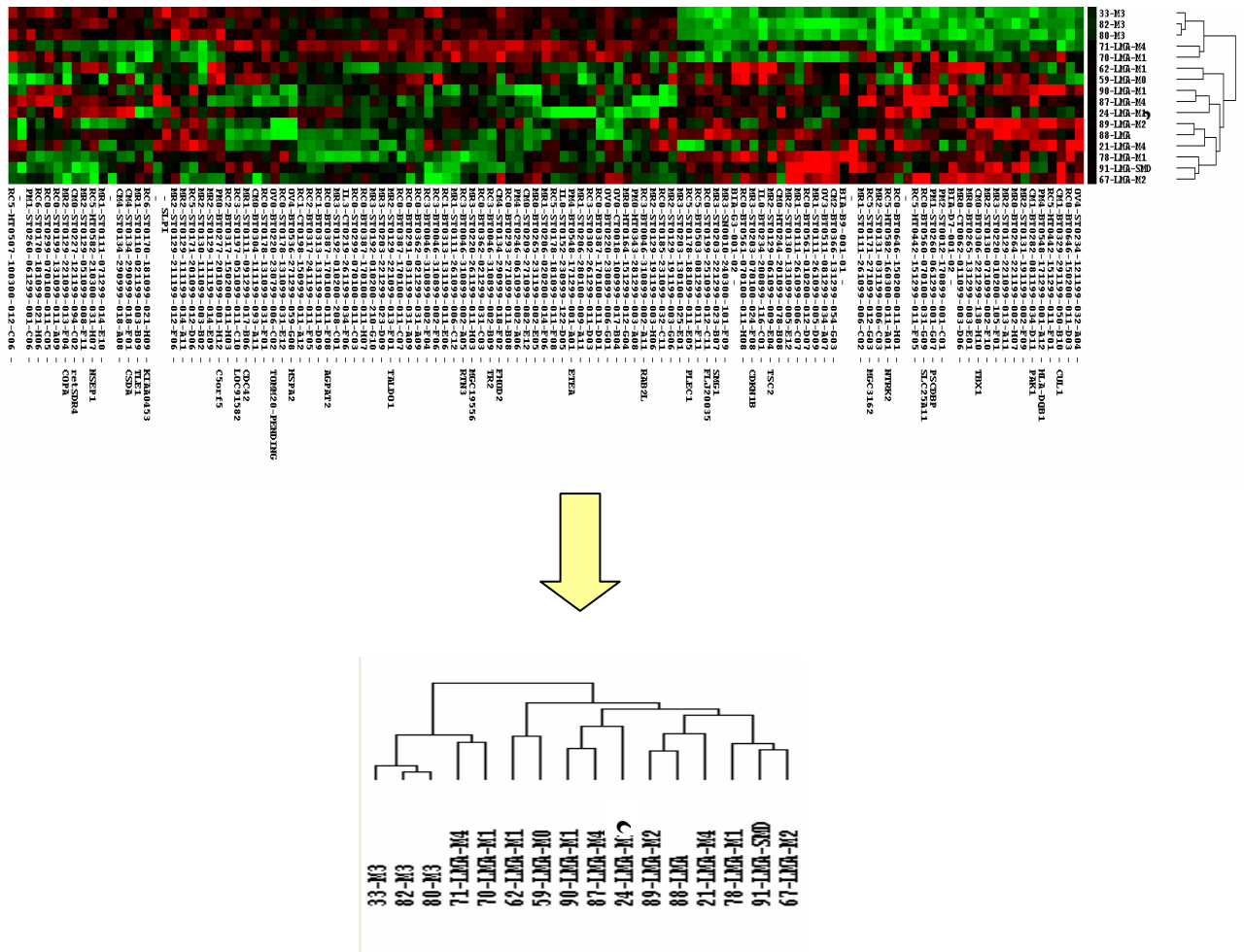


Figura 7- Dendrograma ampliado do resultado da clusterização hierárquica de 129 genes selecionados pelo teste de Wilcoxon com menor valor de p de significância, na comparação LMA-não-M3 vs LMA-M3. A análise permitiu a classificação dos casos de LMA-M3 como um perfil específico.

Dado que os componentes principais em seu conjunto não permitiu a identificação das LA em relação ao controle, procedeu-se o teste de Mann-Whitney para cada gene individualmente, porém também nenhum deles mostrou significância estatística ($p < 0,05$). Entretanto, a análise dos gráficos *scatterplot* de alguns genes (do componente 1: MAL2, FKBP5 e ROBO2; HYAL12, GLB1 e FKBP5; componente 2: HERC4, DDX46 e SEP/PLXNB1), separados de acordo com o grupo a que pertencem, evidencia que houve uma tendência de separação entre os casos de LA e os controles (**figura 8**). O fato de que não foi possível atingir valores de p estatisticamente significativos para esta seleção de componentes pode ser explicada pelo conjunto de clones que especificamente constituíram esta membrana e pela pequena amostragem de alguns grupos (LLA e controle), porém pelos padrões de dispersão do *scatterplot* pode-se especular que talvez outros conjuntos de genes possam separar os casos-controle das LA aplicando-se a mesma metodologia.

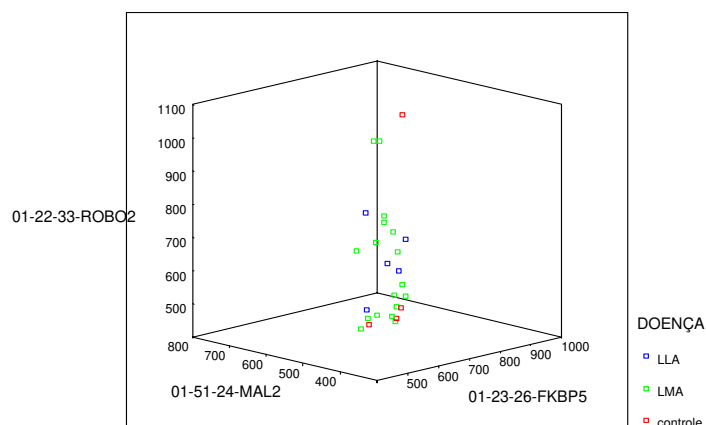
Para a confirmação dos resultados obtidos no microarranjo a expressão gênica foi validada em 5 genes (PRX5, CTSB, CTNNB1, EIF5 e SERINC3) através da análise quantitativa por PCR em tempo real. Para verificar se os dados iniciais poderiam ser extrapolados para uma população maior de casos, os genes selecionados foram testados nas amostras iniciais que participaram do microarranjo, adicionando-se outras amostras de controle, LLA e LMA. No total, os experimentos com PCR em tempo real incluíram 7 amostras de controle de células progenitoras de sangue periférico, 11 amostras de LLA e 28 amostras de LMA (**gráficos**).

Tabelas 8 e 9- Descrição e resultado do re-seqüenciamento dos genes que compuseram o primeiro e segundo componentes, respectivamente, da Análise Fatorial (Análise dos Componentes Principais).

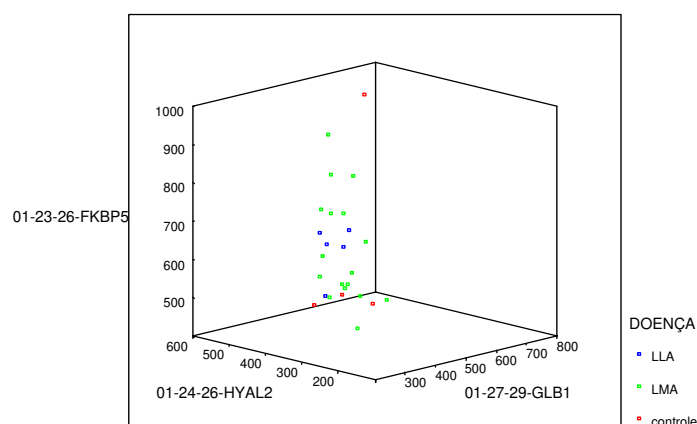
Localização	Clones	acesso_gene_bank	gene descrição	score	e-value
4K7-01-29-24	CM1-BT0596-110100-089-G08	BC007196	USP22 - ubiquitin specific peptidase 22	295	4 e-77
4K7-01-51-24	QV3-BT0511-081299-035-E01	NM_052886	MAL2 - T-cell differentiation protein 2	765	0.0
4K7-01-23-26	RC0-BT0293-271099-011-A03	AL590400	FKBP5 - contains the 5' end of a variant of the FKBP5 gene for FK506 binding protein 5 (FKBP51)	442	1 e-120
4K7-01-24-26	RC0-ST0199-131099-011-A05	BC000692	HYAL2 - Homo sapiens hyaluronoglucosaminidase 2, transcript variant 2	668	0.0
4K7-01-32-28	CM3-ST0208-191199-038-B11	NM_014829	DDX46 - Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46	218	2 e-53
4K7-01-33-22	MR3-SN0010-240300-101-D03	NM_001017972	HERC4 - hect domain and RLD 4 (HERC4), transcript variant 3	872	0.0
4K7-01-26-36	MR3-SN0010-030700-105-H12	NM_002673	SEP/PLXNB1 - semaphorin receptor (plexin-B1/SEP gene)	799	0.0
4K7-01-40-31	MR3-ST0191-110100-025-F08	NM_006640	SEPT9 - septin 9	1233	0.0
4K7-01-27-29	RC0-ST0199-251099-012-C05	NM_000404	GLB1 - galactosidase, beta 1	842	0.0
4K7-01-34-28	BIA	AC019171	SOS1 - son of sevenless homolog 1	375	8 e-101
4K7-01-22-26	CM4-BT0366-061299-054-A03	AL359878	Human DNA sequence from clone RP11-363N22 on chromosome 10 Contains the 5' end of gene KIAA0217, a novel gene, the 5' end of the gene for G protein-binding protein CRFG	313	4 e-82
4K7-01-29-39	CM2-BT0543-231299-060-H05	AK128853	Homo sapiens cDNA FLJ46639 fis - Homo sapiens glutathione S-transferase A3 (GSTA3)	561	1 e-156

Localização	Amostras	acesso_gene_bank	gene	score	e-value
4K7-01-01-44	CM0-BT0615-140200-175-F11	BC080578	TXLNA - taxilin alpha	373	3 e-100
4K7-01-01-59	CM1-BT0592-110100-090-E02	AL139286	EIF2C3 - EIF2C1 gene for eukaryotic translation initiation factor 2C	626	3 e-176
4K7-01-02-60	QV3-BT0537-060100-057-D10	NM_033198	PIGS - phosphatidylinositol glycan, class S	236	9 e-59
4K7-01-09-82	RC0-BT0291-011199-011-F05	BC100023	QSCN6 - quiescin Q6, transcript variant 1	285	3 e-74
4K7-01-04-67	RC0-ST0185-151099-031-B01	AL158824	ROD1 - regulator of differentiation 1 (ROD1)	1162	0.0
4K7-01-04-10	RC5-ST0178-081099-011-A08	AL139814	CACNB2 - DNA sequence from clone RP11-211E5 on chromosome 10p12.1-12.33 Contains part of the CACNB2 gene for calcium channel voltage-dependent beta 2 subunit	163	6 e-37
4K7-01-05-49	MR3-ST0203-201199-013-A03	AL032821	Contains a pseudogene similar to part of hepatic leukemia factor (HLF), the VNN1 gene for vanin 1, a cyclin G (CCNG1) pseudogene, the VVN3 gene for vanin 3, the VNN2 gene for vanin 2, a novel gene, and the 3' end of the gene for a novel protein	408	5 e-111
4K7-01-05-63	MR3-ST0203-201199-013-A08	BC023548	ACTG1 - actin, gamma 1, mRNA	605	8 e-170

A)



B)



C)

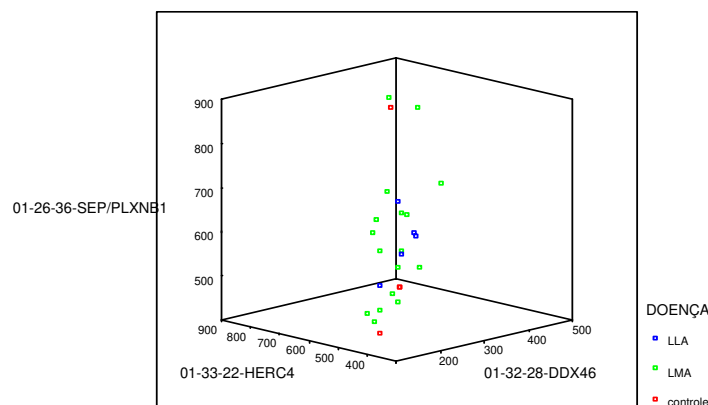
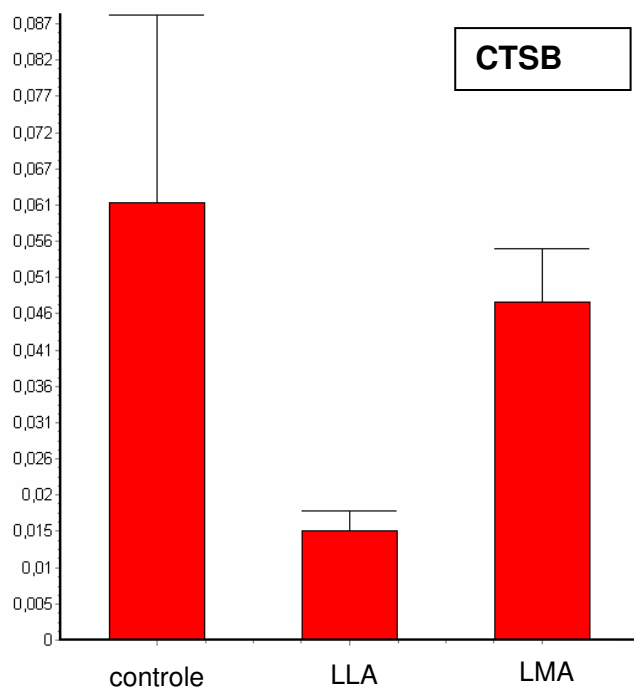
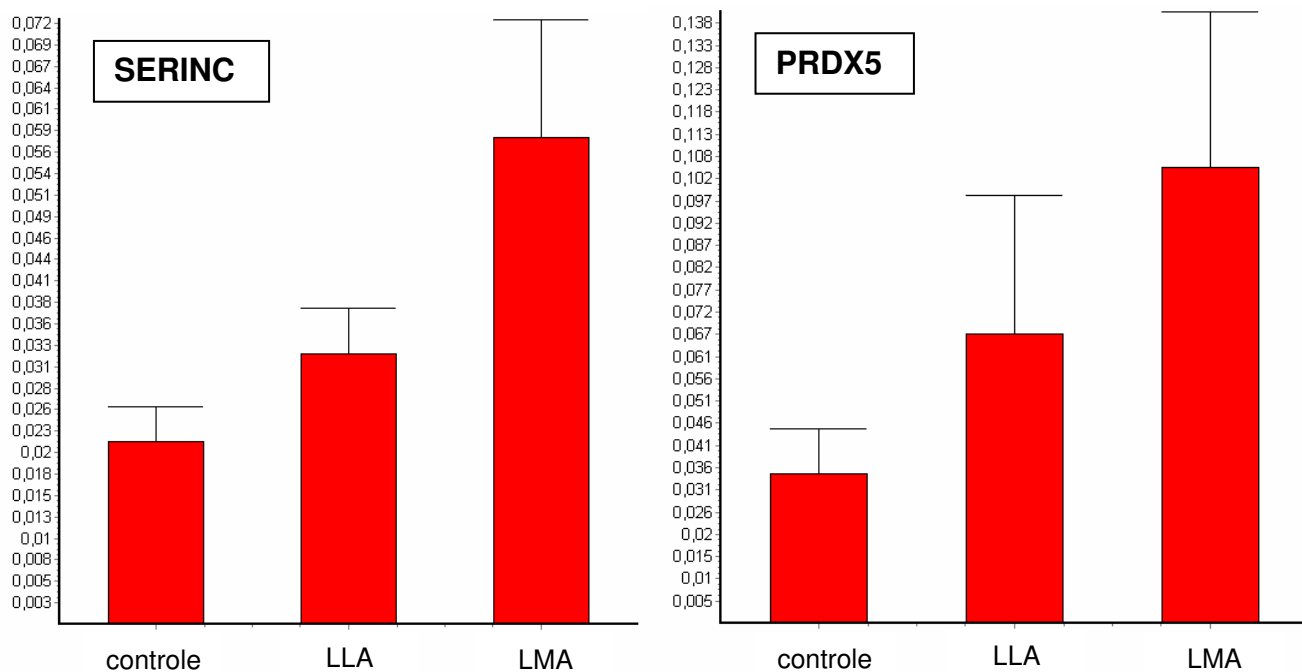


Figura 8- Curva de dispersão de alguns genes que compuseram os componentes principais, distribuídos de acordo com o diagnóstico. Em (A) a curva foi constituída pelos valores de expressão normalizados dos genes ROBO2, MAL2 e FKBP5 e em (B) FKBP5, HYAL2 e GLB1, todos participando do primeiro componente. Em (C) foram utilizados os valores de expressão de genes do segundo componente, o DDX46, HERC4 e SEP/PLXNB1.



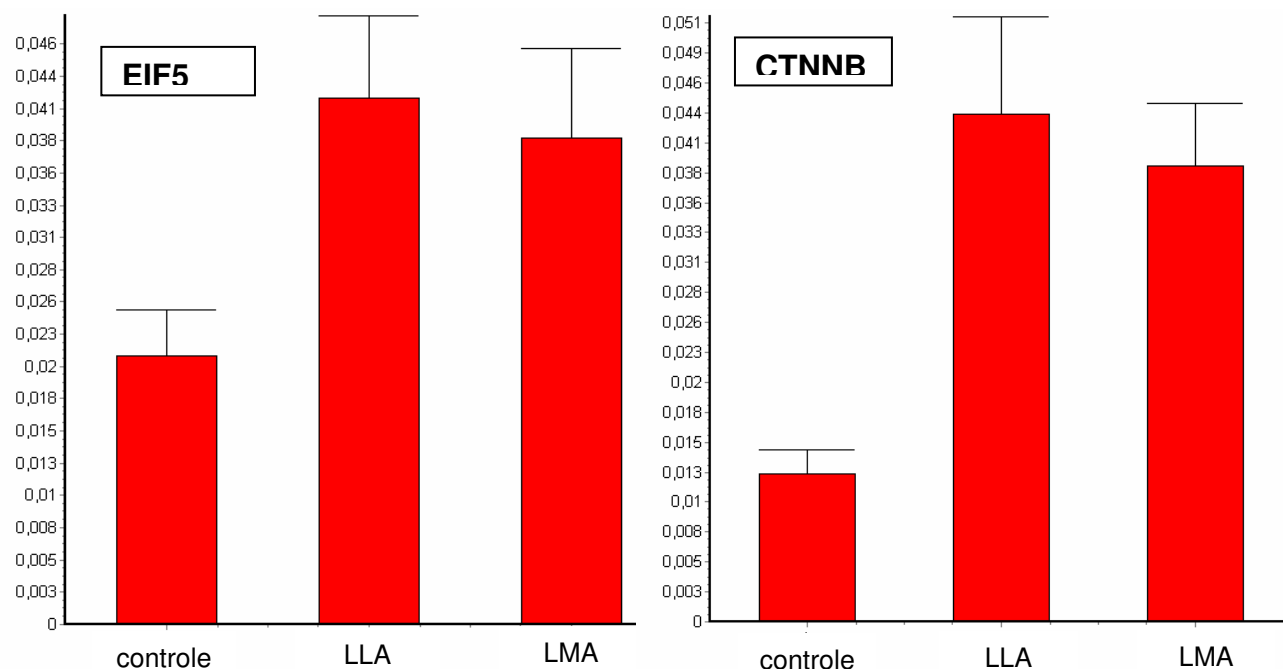


Figura 9- Validação dos resultados obtidos nos microarranjos com membranas 4.7K Instituto Ludwig/FAPESP, pela análise da expressão gênica por PCR em tempo real dos genes SERINC3, CTSB, PRDX5, EIF5 e CTNNB1. As amostras tiveram expressão normalizada tendo como referência a média geométrica entre dois genes constitutivos (β -actina e GAPDH).

Os resultados do PCR em tempo real confirmaram o padrão verificado nas membranas de microarranjo, à exceção da β -catenina (CTNNB1). Tomados os p-valores que foram obtidos pelo teste de Wilcoxon de todos os genes, conforme descrito anteriormente, pode-se verificar a hiperexpressão de CTSB e PRDX5 nas LMA em relação às LLA. Quando os “valores relativos” do PCR em tempo real foram submetidos a análise estatística não paramétrica para amostras não pareadas pelo teste de Kruskal-Wallis (**tabela 10**), não houve diferença significativa nos níveis de expressão do gene PRDX5, embora verifique-se elevação de sua expressão nos casos de LMA. No caso do gene CTSB, entretanto, houve hiperexpressão nas LMA em relação às LLA com diferença muito significativa ($p < 0,01$). Do mesmo modo, as membranas de microarranjo demonstraram hiperexpressão do gene SERINC3 nos casos de LMA em relação aos controles, e hiperexpressão de EIF5 entre as LLA em relação às LMA. Estes resultados se mantiveram na análise do PCR quantitativo em tempo real, porém não foram considerados estatisticamente significativos.

No caso da β -catenina o PCR quantitativo obteve resultados divergentes em relação ao demonstrado nas membranas. Nestas, a β -catenina foi hipoeexpressa nas LLA e LMA em relação ao controle, porém a validação mostrou que entre amostras leucêmicas a β -catenina foi hiperexpressa, inclusive com valores estatisticamente muito significativos ($p < 0,01$) nos dois tipos de LA em relação ao controle.

Dessa forma, o PCR em tempo real não foi discrepante dos dados de quantificação obtidos das membranas 4,7K Instituto Ludwig/FAPESP, à exceção do gene da β -catenina, e mostrou-se fundamental na validação estatística dos resultados iniciais.

Tabela 10- Resultados obtidos nos microarranjos com membranas 4.7K Instituto Ludwig/FAPESP, pela análise da expressão gênica por PCR em tempo real dos genes SERINC3, CTSB, PRDX5, EIF5 e CTNNB1. As amostras tiveram expressão normalizada tendo como referência a média geométrica entre dois genes constitutivos (β -actina e GAPDH).

	Controles n=7 Média (\pmDP)	LLA n=11 Média (\pmDP)	LMA n=28 Média (\pmDP)
SERINC3	0,021 (\pm 0,010)	0,032 (\pm 0,018)	0,058 (\pm 0,074)
PRDX5	0,034 (\pm 0,027)	0,066 (\pm 0,010)	0,105 (\pm 0,189)
EIF5	0,021 (\pm 0,009)	0,041 (\pm 0,021)	0,038 (\pm 0,037)
CTSB	0,061 (\pm 0,070)	0,015 (\pm 0,009)	0,047 (\pm 0,039)
CTNNB1	0,12 (\pm 0,005)	0,043 (\pm 0,027)	0,039 (\pm 0,028)

5- DISCUSSÃO

Caracterização das subclasses de Leucemias Agudas

As LA constituem um grupo heterogêneo de doenças considerando-se tanto aspectos biológicos como clínicos. Novos métodos de caracterização molecular como o SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), as bibliotecas subtrativas e o perfil de expressão gênica por microarranjo podem oferecer uma visão global dos diferentes genes envolvidos no desenvolvimento de padrões de função celular anormal nas neoplasias, permitindo um conceito mais apurado de classificação de doenças e o conhecimento de processos celulares específicos que possam ser utilizados como futuros alvos de terapêutica. Embora a tecnologia de microarranjos já tenha sido previamente utilizada por outros grupos na caracterização de LA (VIRTANEVA et al., 2001; ARMSTRONG et al., 2002; FERRANDO et al., 2002; SCHUCH et al., 2002; YEOH et al., 2002; FERRANDO et al., 2003; CHIARETTI et al., 2004; LINDVALL et al., 2004; CHIARETTI et al., 2005), a membrana e o conjunto de genes deste trabalho constituem um importante acréscimo de informações à literatura uma vez que representa um conjunto bastante particular de genes derivados do Projeto Genoma do Câncer Instituto Ludwig/FAPESP. Neste projeto, as bibliotecas de EST foram geradas através da metodologia ORESTES, pela qual é possível obter seqüências mais representativas de toda a extensão do transcriptoma fornecendo um elevado número de EST referentes às porções mediais dos genes, em contraposição à produção preferencial de segmentos representativos das adjacências da extremidade 3' do cDNA encontrada em outras tecnologias de geração de bibliotecas cDNA (DIAS NETO et al., 2000). Além disso, pode-se sugerir que, sendo esta membrana construída com seqüências derivadas de tecidos neoplásicos (cérebro, mama, cólon, cabeça e pescoço, rim, pulmão, ovário, próstata e útero, entre outros), ela poderia melhor representar os processos envolvidos na tumorigênese (DIAS NETO et al., 2000; BRENTANI et al., 2003).

Tomando-se o método de clusterização hierárquica supervisionada, ou seja, pressupondo critérios prévios de análise crítica e controlada dos dados, pudemos observar que o microarranjo permitiu identificar subgrupos de leucemias e as diferenças em relação ao controle. O critério para a seleção dos genes, no caso, foi a análise estatística pelo teste de Wilcoxon, selecionando os genes que obtiveram os menores valores p de significância.

A visualização do dendograma formado por este procedimento traz informações interessantes como a possibilidade de identificar os casos de LLA e LMA-M3 pela análise da expressão de um determinado grupo de genes. Internamente ao conjunto de LLA, o programa não foi eficiente para a separação das LA de linhagens B e T, porém o pequeno número de casos restringiu a imposição de critérios específicos e mais seletivos.

Outro dado obtido desta análise é a verificação de que os casos de LMA não se distribuíram em um agrupamento único. Embora o agrupamento encontrado nos casos de LMA não seja altamente sensível e específico, a revisão da literatura nos mostra que outros autores também observaram anteriormente discrepâncias na clusterização (VIRTANEVA et al., 2001; LINDVALL et al., 2004).

Este fenômeno talvez se relacione à sobreposição da expressão de marcadores anormais e a diferenças ou similaridades de fatores de transcrição ativados ou reprimidos nos variados subtipos de LA. Armstrong et cols. (2002) estudou 57 casos de leucemias distribuídos em LLA-B, LLA-B com translocações envolvendo o gene MLL(11q23) e LMA, verificando que os casos envolvendo o rearranjos do MLL (LLA-B-MLL+) mantêm um padrão de expressão intermediário e distinto das LLA-B e LMA, com hiperexpressão de genes relacionados à célula progenitora como PROM1, FLT3 e LMO2 e de genes específicos da linhagem mielóide como CCNA1, SERPINB1, CAPG e RNASE3 (ARMSTRONG et al., 2002). Estes dados sugerem que as células neoplásicas das LLA-B-MLL+ apresentem como correspondente normal progenitores hematopoéticos mais precoces, ainda não comprometidos com a diferenciação, e com capacidade de expressão de marcadores de múltiplas linhagens (HU et al., 1997; ARMSTRONG et al., 2002). Outra possibilidade é de que a expressão de marcadores mielóides nos casos de LLA-B-MLL+ seja um evento leucemogênico secundário, associado à transformação do progenitor B pelo rearranjo do gene MLL e ativação anormal de processos transcricionais e de vias de sinalização. A presença de elevados níveis de expressão do gene FLT3 (cuja ativação é capaz de induzir a diferenciação mielóide em células precursoras T) nas amostras LLA-B-MLL+ é sugerida como um exemplo deste fenômeno (BERTHO et al., 2000; FERRANDO et al., 2003).

Assim, a observação de que os casos referentes às LMA apresentaram uma distribuição não homogênea pelos métodos de clusterização hierárquica pode não representar a variabilidade intrínseca da técnica de microarranjo, ou uma inadequação da membrana para o tipo de tumor estudado, mas sim a interferência de processos biológicos superponíveis nas células leucêmicas com conseqüente expressão de marcadores anormais de diferenciação.

As amostras de LMA-M3, que caracteristicamente apresentam a t(15;17) (PML-RAR α), foram clusterizadas conjuntamente, sugerindo que seu perfil de expressão gênica seja específico para sua subclassificação. Dentre os genes que foram diferencialmente expressos nas LMA-M3 em relação ao conjunto de LMA-não-M3 (TLE1 (*transducin-like enhancer of split 1*), PSCDBP (*pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein*), SMG1 (*PI-3-kinase-related kinase SMG-1*), TALDO1 (*transaldolase 1*), CUL1 (*cullin 1*), TBX1 (*T-box 1*) e UBXD8 (*UBX domain containing 8*)) alguns parecem ser particularmente interessantes. O gene CUL1, por exemplo, foi previamente relacionado ao câncer de mama, sendo hipoexpresso neste tecido (FAY et al., 2003). De fato, estudos sugerem que a CUL1, hipoexpressa entre a LMA-M3, pertence a uma nova família de proteínas (culinas) necessária para a regulação negativa do ciclo celular e morte celular programada. Apesar de não mostrar participação nos eventos de comprometimento e diferenciação celular, células mutantes deficientes de culina não conseguem sair do ciclo mitótico, apresentam elevada capacidade proliferativa e diminuição da entrada no ciclo de apoptose (KIPREOS et al., 1996; FAY et al., 2003). O reconhecimento de uma via apoptótica aparentemente específica das LMA-M3 pode ser importante no desenvolvimento de tratamentos direcionados a este tipo leucêmico em particular. Outro gene, hiperexpresso nas LMA-M3 foi o TEL1, um dos componentes do complexo Groucho/TLE, funcionando como repressor da atividade transcricional induzida pela via Wnt. Dados da literatura sugerem que a β -catenina provoca a ruptura do complexo repressor formado pelas proteínas Groucho/TLE e TCF/LEF e ativa, então, as vias nucleares de transcrição (DANIELS e WEIS, 2005). Esta pode ser uma informação importante sobre a participação da via Wnt nas LA, quando associamos o achado de que, na validação dos resultados, a β -catenina foi hiperexpressa quando comparadas as LMA e LLA em relação ao controle.

Alterações citogenéticas específicas parecem influenciar sobremaneira o perfil de expressão gênica em tecidos tumorais. Vitarneva mostrou que a análise de LMA com citogenética normal e LMA com trissomia do cromossomo 8 (LMA+8) como alteração citogenética isolada em um conjunto de 20 pacientes (n=10 para cada grupo) não foi capaz de encontrar diferenças que permitissem a seleção de um conjunto confiável de genes para a classificação dos LMA+8 distintamente do conjunto de LMA (VIRTANEVA et al., 2001). Porém, baseando-se em evidências clínicas de que alterações cariotípicas específicas associam-se a melhores taxas de cura, trabalhos subsequentes correlacionaram grupos citogenéticos como a t(15;17)(q22;q11-12), t(8;21)(q22;q22) e a inv16(p13;q22) com padrões próprios de expressão gênica. Schoch et cols. (2002) utilizando a análise de componentes principais e a metodologia de predição de classes desenvolvida por Golub et cols. (1999) em trabalho anterior conseguiu classificar separadamente cada grupo de alteração citogenética e prever com acerto de 94% o subtipo leucêmico através da seleção de genes que melhor representassem as diferenças de expressão (GOLUB et al., 1999; SCHOCH et al., 2002). As evidências de que os perfis de expressão gênica por microarranjo são altamente influenciados pela alteração citogenética culminaram com um estudo de Lindvall et cols. (2004) comparando casos de LMA com cariótipo normal e cariótipo complexo (LMA-CC) (LINDVALL et al., 2004). Apesar de também aqui a clusterização hierárquica não permitir uma completa separação por similaridade entre os casos de LMA e LMA-CC, pôde-se atingir uma seleção de 169 genes diferencialmente expressos com nível de significância $p < 0,05$ e, ainda, mostrou que os padrões de expressão seguiram proporções consistentemente correlacionadas com as perdas ou ganhos cromossômicos (LINDVALL et al., 2004). Assim, resultados obtidos nas membranas de microarranjo 4.7K Instituto Ludwig/Fapesp são coerentes com a literatura de modo geral quanto à capacidade do perfil de expressão gênica de poder discriminar subgrupos com alterações citogenéticas específicas, como também traz informações sobre genes que antes não haviam sido especificamente relacionados ao subtipo LMA-M3.

Análise Funcional dos genes diferencialmente expressos

A observação dos genes diferencialmente expressos entre as comparações realizadas, após sua análise funcional pela classificação no *Gene Ontology*, permitiu a identificação de grupos funcionais interessantes para a compreensão dos processos celulares relacionados à leucemogênese. Quando comparadas as LMA em relação ao controle dois processos biologicamente correlacionados foram destacados: a expressão de genes envolvidos com adesão celular e vias de transdução de sinal por receptor de membrana. Um dos genes hiperexpressos nas LMA em relação ao controle foi o SSX2IP (*synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein*), correspondente a uma proteína que interage no núcleo celular com o SSX2, é um dos cinco membros da família SSX e tem sido relatada como supressora da atividade transcricional. A hiperexpressão do SSX2IP já foi demonstrada em LMA, porém os mecanismos específicos pelos quais promove supressão da transcrição quando em associação com o SSX2 ainda não são conhecidos (DE BRUIJN et al., 2002; GUINN et al., 2005).

Os experimentos verificaram, ainda, que outros genes envolvidos com a adesão celular foram hipoexpressos nas LMA quando comparados ao controle não neoplásico, como o MUC4 (*mucin 4*), THBS1 (*thrombospondin*), PSCDBP (*pleckstrin homology binding protein*), FCER1G (*receptor for Fc fragment of IgE*) e RGL2 (*ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 2*). Virtaneva et cols. (2001) sugeriram a expressão inapropriada de alguns genes funcionalmente relacionados à adesão celular, como por exemplo a hiperexpressão do RAC2 que está associado à sinalização da célula progenitora mediada por integrinas e com a inibição da morte celular, ou o próprio aumento da expressão de integrinas (ITGB7, ITGB2 ou CD18) e membros da superfamília de imunoglobulinas (ICAM2 e ICAM3) (VIRTANEVA et al., 2001).

Genes funcionalmente correlacionados à transdução de sinal via receptor de membrana apresentaram sua expressão alterada tanto nas leucemias mielóides como linfóides agudas quando comparados ao controle, tais como os membros que participam da sinalização através de receptores de adesão denominados integrinas. Muitas das integrinas são predominante ou exclusivamente receptores para componentes da matriz extracelular como as fibronectinas, lamininas e colágenos, porém algumas poucas têm importante papel

na adesão celular heterotípica como a relacionada aos leucócitos, quando se ligam a um contra-receptor da super-família das imunoglobulinas (ICAM, VCAM-1, MAdCAM-1) ou uma caderina (caderina E) (LE et al., 1999). Observou-se que um grupo de genes diferencialmente expressos nas LMA pertence às vias de transdução de sinal que especificamente afetam a progressão do ciclo celular da fase G1 para S e a regulação da atividade de transcrição, ambos mediados por uma família de proteínas conhecidas como *Small GTPases*.

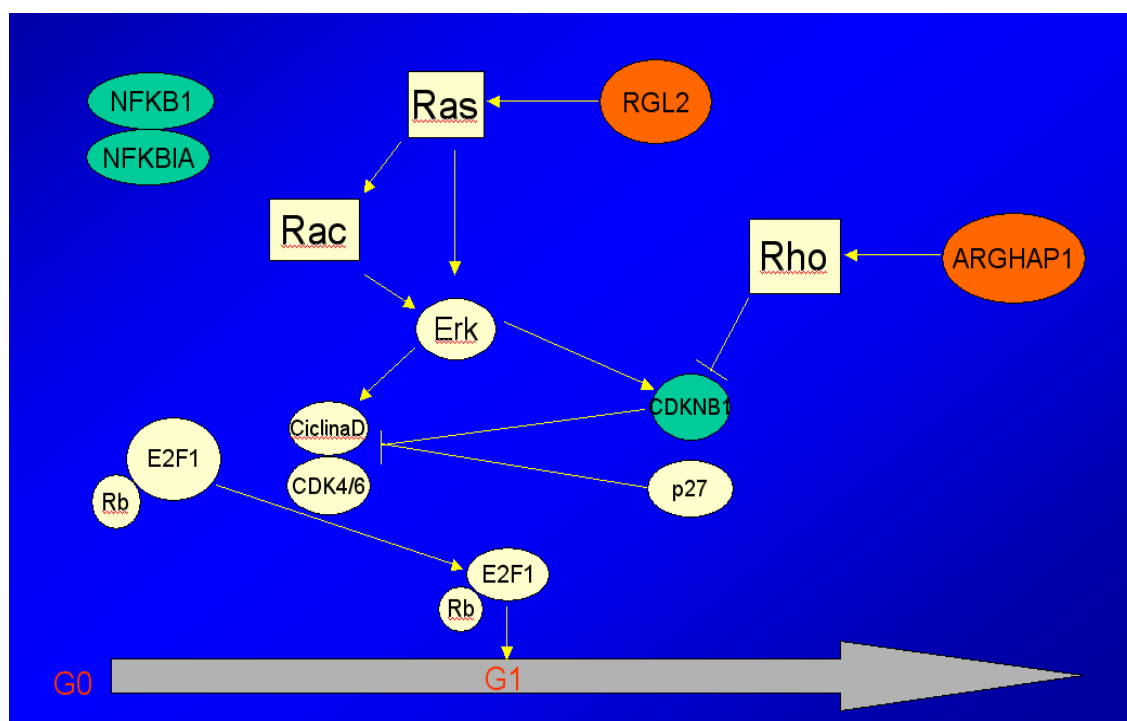


Figura 10- Vias Ras e Rho das *small GTPases*, que diretamente afetam a progressão para o ciclo celular da fase G1 para S nas leucemias agudas. Dentro da via os genes hiperexpressos nas membranas 4,7Kb Instituto Ludwig/FAPESP foram ressaltados em vermelho, e os hipoexpressos em verde.

Assim, houve hiperexpressão nas LMA de CDC42 (*cell division cycle 42*), ARHGAP1 (*Rho GTPase activating protein 1*) e RGL2 (*ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 2*) enquanto que os genes CDKN1B (cyclin-dependent kinase

inibitor 1B), PSDCBP (*pleckstrin homology*), RAB27A (*Ras-related protein Rab-27A*), DBNL (*drebrin-like*), NFKBIA (*nuclear factor kappa-B inhibitor alpha*) e NFKB1 (*nuclear factor kappa-B, subunit 1*) foram hipoexpressos.

A proteína RGL2 é um dos conhecidos efetores (ou facilitadores) da mudança conformacional da proteína Ras de sua forma inativa (ligada ao GDP) para sua forma ativa (ligada ao GTP) (PRUITT e DER, 2001). A Ras localiza-se na face interna da membrana intracelular e é reponsável pela transmissão do estímulo extracelular para as cascatas de sinalização citoplasmáticas. A hiperexpressão de RGL2 pode sugerir que a via de proliferação celular mediada pela proteína Ras esteja hiperativa. De fato, estudos mostraram que a inibição da via por anticorpos anti-Ras foi capaz de bloquear a passagem no ciclo celular da fase G1 para S (MULCAHY et al., 1985). Fisiologicamente, a via de sinalização mediada por Ras envolve as ciclinas e proteínas-quinases dependentes de ciclina (CDK): as ciclinas D1, D2 e D3 formam complexos com CDK4 e CDK6 que após passagem do citoplasma para o núcleo, promovem a fosforilação e inativação da proteína supressora tumoral Rb (*retinoblastoma tumoral repressor*). Uma vez inativado, o supressor tumoral Rb libera o fator de transcrição E2F e este evento permite o recrutamento dos genes necessários para a entrada na fase S (BAR-SAGI e HALL, 2000; SCHEELE et al., 2000; PRUITT e DER, 2001). A via de sinalização Ras é ainda regulada pela proteína Rho, que possui efeito estimulador sobre a atividade mitogênica mediada pelo Ras através da supressão do CDKN1B. Estes dados são coerentes com os achados do perfil de expressão gênica obtidos das membranas 4.7K Instituto Ludwig/FAPESP, nos quais observou-se hiperexpressão da Rho GTPase ARGHAP1 e diminuição dos níveis de CDKN1B (**figuras 10 e 11**).

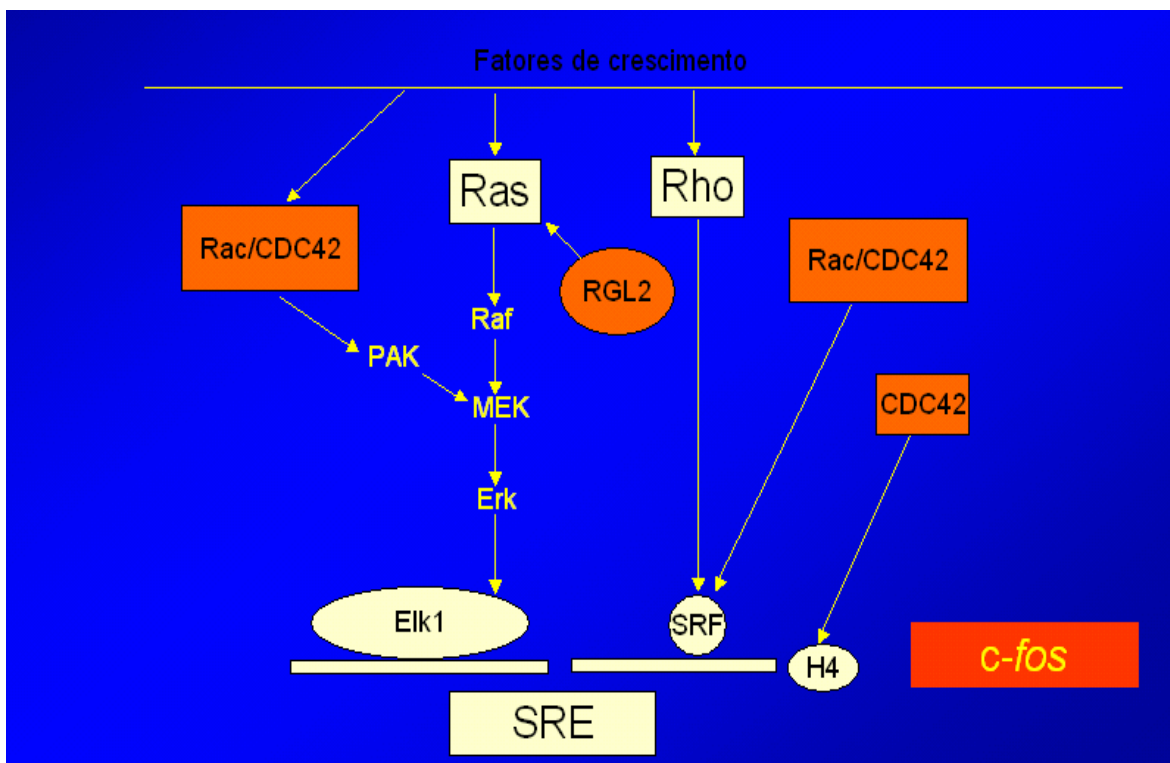


Figura 11- Provável influência das vias Ras e Rho das *small GTPases* na ativação transcricional nas leucemias agudas. A via Ras/Raf/ERK provoca a fosforilação do Elk1, induzindo assim o início da transcrição. Esta via transcricional é conhecida como SER (*serum element response*). Dentro da via os genes hiperexpressos nas membranas 4,7Kb Instituto Ludwig/FAPESP foram ressaltados em vermelho.

Além do aumento da capacidade mitogênica induzida pela via de transdução de sinal Ras, um outro passo aparentemente relevante para a leucemogênese envolve a expressão do NFkB1 que, conjuntamente com o NFkBIA, seu inibidor, foram hipoexpressos nas LMA. A ativação da via Ras promove a regulação positiva da transcrição NFkB1-dependente e isto se relaciona com uma resposta adaptativa anti-apoptótica (MAYO et al., 1997).

A via de transdução de sinal Wnt, mediada pelo receptor FZD (*Frizzled*), também pareceu estar alterada no ensaio de microarranjo. O perfil de expressão nas membranas 4.7K Instituto Ludwig/FAPESP demonstrou reduzidos níveis de expressão de β -catenina tanto nas LLA como LMA e, ainda, queda da expressão da PS1 exclusivamente nas LLA em relação ao controle. A análise quantitativa da expressão por PCR em tempo real (*Real Time PCR*) não confirmou os dados do microarranjo: notou-se a hiperexpressão da β -catenina nas LA quando comparadas ao controle, com níveis mais elevados de expressão entre as LLA. Serinsöz et cols. (2004) analisou a expressão de β -catenina em neoplasias hematológicas como as síndromes mieloproliferativas, além das LLA e LMA, observando níveis aumentados de expressão de β -catenina entre as LMA. Ainda, não pôde verificar diferença de expressão entre todas as outras doenças estudadas, e observou ligeiro decréscimo da expressão de β -catenina na população de LLA em relação ao controle (SERINSOZ et al., 2004).

No caso específico da célula progenitora hematopoética, a via Wnt e a regulação nuclear promovida pela β -catenina são necessárias para o controle da proliferação e do potencial de diferenciação. A sobrevivência da célula progenitora na medula óssea parece ser dependente de sua interação com os osteoblastos através da adesão célula-célula mediada pelas caderinas. Alterações na morte, diferenciação, adesão e migração celulares, que são marcadores das características neoplásicas de uma célula, associam-se a perda do controle da regulação dos níveis citoplasmáticos de β -catenina, como já demonstrado no câncer colo-retal e correlacionado com o aumento da expressão de ciclina D1 no câncer de mama (POLAKIS, 2000; REYA et al., 2003).

O principal elemento regulador da via Wnt parece ser a β -catenina, que atua como cofator transcricional do TCF/LEF (*T cell factor/lymphoid enhancer factor*) e como proteína adaptadora estrutural ligando as caderinas à actina do citoesqueleto no mecanismo de adesão célula-célula (CADIGAN e NUSSE, 1997; JAMORA e FUCHS, 2002). A sinalização inicia-se pela ação de um ligante Wnt em duas moléculas receptoras de superfície, as proteínas *Frizzled* e LRP-5/6 (*lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6*). Esta ativação causa o acúmulo de β -catenina, que então forma um complexo com o fator TCF/LEF e regula a expressão gênica de via específicas. Normalmente, na ausência da

ativação da via Wnt, os níveis de β -catenina são mantidos baixos através da degradação citoplasmática pelas caderinas de membrana (caderinas E e N, por exemplo). A degradação proteolítica também ocorre por ubiquitinação por um complexo formado pelas enzimas CKI (*serine/threonine kinases casein kinase I*) e GSK-3 β (*Glycogen synthase-3 β*) juntamente com a axina e a proteína APC (*adenomatous polyposis coli protein*). Quando ativada, a via Wnt provoca a inibição da atividade da GSK-3 β com conseqüente acúmulo citoplasmático de β -catenina, o que permite sua ligação com fatores de transcrição da família TCF/LEF e regula a expressão gênica (CADIGAN e NUSSE, 1997).

De modo geral, a concentração de beta-catenina é regulada por ativação de proteínas com atividade tirosina quinase, o que provoca o seu acúmulo tanto pela liberação direta no citoplasma após desestabilização do complexo caderina- β -catenina, como pela indução de endocitose das caderinas (LE et al., 1999). Outro importante fator regulador da β -catenina parece ser atuação da preselina (PS1) que, como o complexo APC/axina, facilita a fosforilação pela CKI e GSK-3 β e sua posterior degradação. Além disso, a PS1 promove a clivagem proteolítica do domínio citoplasmático das caderinas, fazendo com que estes fragmentos se liguem às proteínas do CBP (*core binding proteins*) e provoquem a supressão da transcrição CBP-mediada (SORIANO et al., 2001; XIA et al., 2001; MARAMBAUD et al., 2003). O achado de redução da expressão de PS1 nas amostras de LLA em associação com a hiperexpressão de β -catenina verificado pelo PCR em tempo real sugerem que talvez o aumento pronunciado da β -catenina nas LLA esteja relacionado à regulação mediada pela preselina.

A regulação inadequada da apoptose pode romper o equilíbrio entre os processos de proliferação e morte celular, induzindo finalmente a transformação neoplásica. Em muitos cânceres é possível observar mutações com capacidade de inativação de proteínas pró-apoptóticas, ou então a regulação positiva de outras proteínas anti-apoptóticas, o que provoca a perda do controle sobre o crescimento tumoral e a incapacidade da resposta fisiológica ao estresse celular e à lesão do DNA (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000). O fenômeno de apoptose pareceu ter significado particularmente importante entre os casos de LLA. Vários genes envolvidos com o processo de apoptose foram diferencialmente expressos neste grupo, tanto positiva em

relação aos casos-controle como BIRC6 (*baculoviral IAP repeat-containing6*) e SH3GLB1 (*SH3-domain GRB2-like endophilin B1*), quanto negativamente no caso do NFKB1, NFKBIA, PSEN1 e LARP (*septin 1*). De fato, outros trabalhos já haviam mostrado a metodologia de microarranjo também eficiente na discriminação dos processos apoptóticos em LA. Virtaneva et cols. (2001) mencionou a hipoeexpressão nos casos de LMA com trissomia do cromossomo 8 a hipoeexpressão do indutor de apoptose CRADD e do antagonista BAD do BCL2, em contraposição ao aumento dos níveis do gene supressor tumoral e indutor de apoptose TP53. E ainda, Ferrando (2002) verificou em casos de LLA-T com aumento da atividade do fator de transcrição LYL1 ou TAL1 houve hiperexpressão de BCL2 e BCL2A1, sugerindo que este evento possa relacionar-se com diminuição da metabolização de drogas citotóxicas através da via intrínseca (mitocondrial) e ser um dos mecanismos de resistência à ação quimioterápica (VIRTANEVA et al., 2001; FERRANDO et al., 2002).

Fisiologicamente, as vias de sinalização da apoptose podem ser dividida em dois principais componentes: a via mitocondrial ou intrínseca e a via de receptores de morte celular ou via extrínseca. Na via extrínseca, ligantes como o fator de necrose tumoral (TNF), o FAS-ligante e o TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) interagem com receptores específicos como DR4 e DR5 e há o conseqüente recrutamento do FADD (*FAS-associated death domain*) e ativação da caspase 8. A caspase 8 então realiza a ativação por clivagem da caspase 3, e este evento leva ao início da ativação de várias outras caspases, resultando em uma cascata proteolítica que induz a morte celular caracterizada por fragmentação do DNA e desestabilização da membrana. Já a via intrínseca envolve a liberação do citocromo *c* do espaço intermembrana da mitocôndria, que interage com a APAF1 (*apoptotic protease-activating factor1*) e dATP formando um complexo multimérico que recruta e ativa a caspase 8 e, assim, o restante da via das caspases (FESIK, 2005; VERMEULEN et al., 2005). Figura

Especificamente nas LLA, verificou-se hipoeexpressão da presenilina. Esta proteína (PS1), embora envolvida com a via de sinalização Wnt na regulação da β -catenina, também exerce um efetivo papel anti-apoptótico capaz de inibir a morte celular induzida pela via de transdução P53. De fato, a regulação negativa experimental da

presenilina através de cDNA *antisense* induziu a apoptose tanto em células hematopoéticas como neuronais, sugerindo que esta função se conserva em diferentes tipos celulares (ROPERCH et al., 1998; AMSON et al., 2000). Outro gene diferencialmente expresso é um membro da família das endofilinas B, o SH3GLB1, que parece regular a via intrínseca pela ativação das proteínas Bax e Bak. Takahashi et cols. (2005) mostrou que a inibição de sua expressão através de RNA de interferência em células HeLa aboliu a ativação do Bax e Bak e, conseqüentemente, a liberação de citocromo *c* e ativação da caspase 3. Estes dados reforçam a idéia do SH3GLB1 como um importante componente da via mitocondrial de apoptose, ativador Bax/Bak, e de sua contribuição na tumorigênese (TAKAHASHI et al., 2005).

Entre as LMA pôde-se observar redução dos níveis de expressão do NFKB1, NFKBIA e BID. O BID (*BH3 interacting domain death agonist*) é um membro da família BCL2 de reguladores da morte celular que sofre clivagem proteolítica pela caspase 8. Após clivagem, a porção COOH-amino-terminal do BID interage com a membrana mitocondrial induzindo a liberação de citocromo *c*, o que culmina com a indução da morte celular (ZINKEL et al., 2003; ZINKEL et al., 2005).

O NFKB é um fator de transcrição que participa de inúmeros processos celulares como a expressão de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão e proteínas de fase aguda. Parece ser ativado por um amplo espectro de agentes indutores, como irradiação e antígenos virais e bacterianos, em resposta favorável à sobrevivência celular quando da exposição de fatores de estresse do microambiente. Normalmente, encontra-se em sua forma inativa no citoplasma, ligado à proteína inibitória NFKBIA que, após estímulos extracelulares, pode ser fosforilado e degradado, permitindo a translocação para o núcleo (CHEN et al., 1999). Embora estudos demonstrem o efeito anti-apoptótico do NFKB (MAYO et al., 1997), observou-se concomitantemente que em certos tipos celulares e em condições diversas do microambiente o mesmo gene pode ter efeito indutor da apoptose, como verificado em blastos de leucemia promielocítica expostos ao etoposide, ou em situações de estresse oxidativo (BESSHO et al., 1994; KITAJIMA et al., 1996). Na literatura encontram-se relatos do aumento da expressão do NFKB em blastos leucêmicos de LMA, bem como aumento da atividade da

I κ B quinase (enzima que promove a fosforilação e degradação do inibidor NF κ BIA) (BAUMGARTNER et al., 2002; BUESO-RAMOS et al., 2004). Guzman et cols. (2002), em um elegante ensaio, demonstrou que culturas de células derivadas de amostras de LMA, quando tratadas com idarrubicina e o inibidor de proteossomo MG-132 (que bloqueia a degradação do NF κ BIA), apresentaram intensa atividade apoptótica e que este efeito associou-se com a inibição do NF κ B (GUZMAN et al., 2002). Assim, embora o achado de que o NF κ B foi hipoexpresso entre as LMA nas membranas 4.7K Instituto Ludwig/FAPESP seja antagônico a algumas referências da literatura, o conjunto de evidências levantadas em associação com a hipoexpressão do inibidor NF κ B (NF κ BIA) sugerem que a regulação deste fator de transcrição possa conter outras variáveis que ainda necessitam ser melhor analisadas

O conjunto dos dados relacionados aos genes envolvidos no processo celular apoptose demonstram que nas células leucêmicas existem simultaneamente expressão diferencial tanto de genes pro-apoptóticos como anti-apoptóticos. Experimentos pormenorizados incluindo este conjunto de genes serão necessários para o esclarecimento de seu papel no desenvolvimento e progressão da neoplasia.

Análise Fatorial e Validação dos Resultados

Outro procedimento estatístico aplicado aos dados obtidos pelos microarranjos foi a Análise dos Componentes Principais. Através desta metodologia procedimentos específicos e ferramentas estatísticas são utilizadas para a discriminação de conjuntos de genes que respondam pela maior parte da variabilidade de expressão gênica encontrada, ou seja, representem mais significativamente as informações de variação de expressão de toda a membrana. A Análise dos Componentes Principais tem encontrado sua maior aplicação em estudos de expressão gênica na determinação de subclasses de doenças. Em estudos de microarranjo permitiu a distinção entre casos de LLA-T, LLA-B com a translocação BCR-ABL e LLA-B com a translocação envolvendo o gene MLL e, em casos de LMA, a subclassificação de acordo com rearranjos específicos como a inv16, a t(8;21) e a t(15;17).

Em relação à plataforma de microarranjo estudada neste trabalho (membrana de 4.7K Instituto Ludwig/FAPESP) a tecnologia foi eficientemente aplicada para análise dos dados obtidos nas pesquisas de alterações evolutivas da tumorigênese do câncer gástrico e câncer de esôfago. Assim, foi possível discriminação de um conjunto de genes que corretamente classificou amostras de tecido normal, metaplasia gástrica, gastrite e adenocarcinoma gástrico, bem como em outro estudo as amostras de esofagite, esôfago de Barret e adenocarcinoma de esôfago.(MEIRELES et al., 2004; GOMES et al., 2005) A Análise de Componentes Principais quando aplicado ao perfil de expressão das LA permitiu a separação de dois componentes que responderam por 38,00% e 27,87% da variabilidade das amostras, respectivamente. Apesar da distribuição dos casos pelo *scatterplot* mostrar uma tendência de separação das LA dos controles, os dois componentes estudados não atingiram significância estatística ($p < 0,05$). Isto sugere que o conjunto de genes representados nesta plataforma não foi suficientemente discriminativo. Uma especulação a ser feita é a de que o número inicial de amostras foi reduzido e que, talvez, ampliando o número de casos houvesse uma melhor definição dos tipos de LA com significância estatística.

A validação dos resultados de experimentos de microarranjo é controversa. Embora alguns autores indiquem ser indispensável a confirmação dos resultados por outras metodologias de análise de expressão gênica, outros autores afirmam que a análise dos dados dos *arrays* são por si suficientes. Em nosso estudo realizamos a validação do microarranjo utilizando 5 genes arbitrariamente escolhidos entre os genes diferencialmente expressos, estendendo-se a análise a outros casos de LA e controles para estabelecer se as observações iniciais obtidas dos microarranjos poderiam ser extrapoladas para uma população ainda maior. Todos os resultados foram coerentes com as observações da membrana, à exceção da β -catenina. A análise estatística revelou que houve hiperexpressão da CTSB nas LMA em relação às LLA, e hiperexpressão da β -catenina nas LA em relação ao controle, com $p < 0,01$.

6- CONCLUSÕES

- 1) Quanto à sua aplicabilidade no reconhecimento dos subtipos leucêmicos, utilizando-se informações geradas da expressão gênica global, a metodologia de microarranjo estabeleceu um conjunto de genes que possivelmente permitam a identificação dos casos de LLA, LMA-M3 e os casos-controles de CPSP. Não houve uma adequada separação dos casos de LMA-não-M3, o que pode ser atribuído não a uma falha do método, mas sim à real diversidade que compõe este tipo leucêmico;
- 2) Dentre os genes que foram diferencialmente expressos, sob o aspecto funcional foi possível observar genes relacionados a processos celulares particularmente afetados, como vias de regulação do metabolismo de nucleotídeos, adesão e sinalização celulares e transdução de sinal entre as LMA (especialmente a via Wnt e via Rãs e Rho das “*small GTPases*”) e um conjunto de reguladores apoptóticos como os genes BIRC6, SH3GLB1, PSEN1 e NFKB1 entre as LLA;
- 3) A metodologia serviu para o reconhecimento de vias metabólicas que podem correlacionar-se com o processo de leucemogênese, mostrando envolvimento de alguns genes que deverão ser submetidos a análises posteriores para avaliação de sua utilidade como prováveis marcadores celulares de doença e terapia;
- 4) A metodologia de microarranjo permitiu a identificação de um conjunto de genes ainda não descritos, relacionados ao fenótipo de LMA-M3.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIZADEH, A.A.;EISEN, M.B.;DAVIS, R.E.;MA, C.;LOSSOS, I.S.;ROSENWALD, A.;BOLDRICK, J.C.;SABET, H.;TRAN, T.;YU, X.;POWELL, J.I.;YANG, L.;MARTI, G.E.;MOORE, T.;HUDSON, J., JR.;LU, L.;LEWIS, D.B.;TIBSHIRANI, R.;SHERLOCK, G.;CHAN, W.C.;GREINER, T.C.;WEISENBURGER, D.D.;ARMITAGE, J.O.;WARNKE, R.;LEVY, R.;WILSON, W.;GREVER, M.R.;BYRD, J.C.;BOTSTEIN, D.;BROWN, P.O.;STAUDT, L.M. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403: 503-11, 2000.

AMSON, R.;LASSALLE, J.M.;HALLEY, H.;PRIEUR, S.;LETHROSNE, F.;ROPERCH, J.P.;ISRAELI, D.;GENDRON, M.C.;DUYCKAERTS, C.;CHECLER, F.;DAUSSET, J.;COHEN, D.;OREN, M.;TELERMAN, A. Behavioral alterations associated with apoptosis and down-regulation of presenilin 1 in the brains of p53-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 5346-50, 2000.

ARMSTRONG, S.A.;STAUNTON, J.E.;SILVERMAN, L.B.;PIETERS, R.;DEN BOER, M.L.;MINDEN, M.D.;SALLAN, S.E.;LANDER, E.S.;GOLUB, T.R.;KORSMEYER, S.J. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet*, 30: 41-7, 2002.

BALLERINI, P.;BLAISE, A.;BUSSON-LE CONIAT, M.;SU, X.Y.;ZUCMAN-ROSSI, J.;ADAM, M.;VAN DEN AKKER, J.;PEROT, C.;PELLEGRINO, B.;LANDMAN-PARKER, J.;DOUAY, L.;BERGER, R.;BERNARD, O.A. HOX11L2 expression defines a clinical subtype of pediatric T-ALL associated with poor prognosis. *Blood*, 100: 991-7, 2002.

BAR-SAGI, D.;HALL, A. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell*, 103: 227-38, 2000.

BASH, R.O.;HALL, S.;TIMMONS, C.F.;CRIST, W.M.;AMYLON, M.;SMITH, R.G.;BAER, R. Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study. *Blood*, 86: 666-76, 1995.

BASSO, G.;BULDINI, B.;DE ZEN, L.;ORFAO, A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica*, 86: 675-92, 2001.

BAUMGARTNER, B.;WEBER, M.;QUIRLING, M.;FISCHER, C.;PAGE, S.;ADAM, M.;VON SCHILLING, C.;WATERHOUSE, C.;SCHMID, C.;NEUMEIER, D.;BRAND, K. Increased IkappaB kinase activity is associated with activated NF-kappaB in acute myeloid blasts. *Leukemia*, 16: 2062-71, 2002.

BENNETT, J.M.;CATOVSKY, D.;DANIEL, M.T.;FLANDRIN, G.;GALTON, D.A.;GRALNICK, H.R.;SULTAN, C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, 33: 451-8, 1976.

BERTHO, J.M.;CHAPEL, A.;LOILLEUX, S.;FRICK, J.;AIGUEPERSE, J.;GORIN, N.C.;GOURMELON, P. CD135 (Flk2/Flt3) expression by human thymocytes delineates a possible role of FLT3-ligand in T-cell precursor proliferation and differentiation. *Scand J Immunol*, 52: 53-61, 2000.

BESSHO, R.;MATSUBARA, K.;KUBOTA, M.;KUWAKADO, K.;HIROTA, H.;WAKAZONO, Y.;LIN, Y.W.;OKUDA, A.;KAWAI, M.;NISHIKOMORI, R.;ET AL. Pyrrolidine dithiocarbamate, a potent inhibitor of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) activation, prevents apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and thymocytes. *Biochem Pharmacol*, 48: 1883-9, 1994.

BRENTANI, H.;CABALLERO, O.L.;CAMARGO, A.A.;DA SILVA, A.M.;DA SILVA, W.A., JR.;DIAS NETO, E.;GRIVET, M.;GRUBER, A.;GUIMARAES, P.E.;HIDE, W.;ISELI, C.;JONGENEEL, C.V.;KELSO, J.;NAGAI, M.A.;OJOPI, E.P.;OSORIO, E.C.;REIS, E.M.;RIGGINS, G.J.;SIMPSON, A.J.;DE SOUZA, S.;STEVENSON, B.J.;STRAUSBERG, R.L.;TAJARA, E.H.;VERJOVSKI-ALMEIDA, S.;ACENCIO, M.L.;BENGTON, M.H.;BETTONI, F.;BODMER, W.F.;BRIONES, M.R.;CAMARGO, L.P.;CAVENEY, W.;CERUTTI, J.M.;COELHO ANDRADE, L.E.;COSTA DOS SANTOS, P.C.;RAMOS COSTA, M.C.;DA SILVA, I.T.;ESTECIO, M.R.;SA FERREIRA, K.;FURNARI, F.B.;FARIA, M., JR.;GALANTE, P.A.;GUIMARAES, G.S.;HOLANDA, A.J.;KIMURA, E.T.;LEERKES, M.R.;LU, X.;MACIEL, R.M.;MARTINS, E.A.;MASSIRER, K.B.;MELO, A.S.;MESTRINER, C.A.;MIRACCA, E.C.;MIRANDA, L.L.;NOBREGA, F.G.;OLIVEIRA, P.S.;PAQUOLA, A.C.;PANDOLFI, J.R.;CAMPOS PARDINI, M.I.;PASSETTI, F.;QUACKENBUSH, J.;SCHNABEL, B.;SOGAYAR, M.C.;SOUZA, J.E.;VALENTINI, S.R.;ZAIATS, A.C.;AMARAL, E.J.;ARNALDI, L.A.;DE ARAUJO, A.G.;DE BESSA, S.A.;BICKNELL, D.C.;RIBEIRO DE CAMARO, M.E.;CARRARO, D.M.;CARRER, H.;CARVALHO, A.F.;COLIN, C.;COSTA, F.;CURCIO, C.;GUERREIRO DA SILVA, I.D.;PEREIRA DA SILVA, N.;DELLAMANO, M.;EL-DORRY, H.;ESPRAFICO, E.M.;SCATTONE FERREIRA, A.J.;AYRES FERREIRA, C.;FORTES, M.A.;GAMA, A.H.;GIANNELLA-NETO, D.;GIANNELLA, M.L.;GIORGI, R.R.;GOLDMAN, G.H.;GOLDMAN, M.H.;HACKEL, C.;HO, P.L.;KIMURA, E.M.;KOWALSKI, L.P.;KRIEGER, J.E.;LEITE, L.C.;LOPES, A.;LUNA, A.M.;MACKAY, A.;MARI, S.K.;MARQUES, A.A.;MARTINS, W.K.;MONTAGNINI, A.;MOURAO NETO, M.;NASCIMENTO, A.L.;NEVILLE, A.M.;NOBREGA, M.P.;O'HARE, M.J.;OTSUKA, A.Y.;RUAS DE MELO, A.I.;PACO-LARSON, M.L.;GUIMARAES PEREIRA, G.;PESQUERO, J.B.;PESSOA, J.G.;RAHAL, P.;RAINHO, C.A.;RODRIGUES, V.;ROGATTO, S.R.;ROMANO, C.M.;ROMEIRO, J.G.;ROSSI, B.M.;RUSTICCI, M.;GUERRA DE SA, R.;SANT' ANNA, S.C.;SARMAZO, M.L.;SILVA, T.C.;SOARES, F.A.;SONATI MDE, F.;DE FREITAS SOUSA, J.;QUEIROZ, D.;VALENTE, V.;VETTORE, A.L.;VILLANOVA, F.E.;ZAGO, M.A.;ZALCBURG, H. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 13418-23, 2003.

BRENTANI, R.R.;CARRARO, D.M.;VERJOVSKI-ALMEIDA, S.;REIS, E.M.;NEVES, E.J.;DE SOUZA, S.J.;CARVALHO, A.F.;BRENTANI, H.;REIS, L.F. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. *Crit Rev Oncol Hematol*, 54: 95-105, 2005.

BUESO-RAMOS, C.E.;ROCHA, F.C.;SHISHODIA, S.;MEDEIROS, L.J.;KANTARJIAN, H.M.;VADHAN-RAJ, S.;ESTROV, Z.;SMITH, T.L.;NGUYEN, M.H.;AGGARWAL, B.B. Expression of constitutively active nuclear-kappa B RelA transcription factor in blasts of acute myeloid leukemia. *Hum Pathol*, 35: 246-53, 2004.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25: 169-93, 2000.

BYRD, J.C.;MROZEK, K.;DODGE, R.K.;CARROLL, A.J.;EDWARDS, C.G.;ARTHUR, D.C.;PETTENATI, M.J.;PATIL, S.R.;RAO, K.W.;WATSON, M.S.;KODURU, P.R.;MOORE, J.O.;STONE, R.M.;MAYER, R.J.;FELDMAN, E.J.;DAVEY, F.R.;SCHIFFER, C.A.;LARSON, R.A.;BLOOMFIELD, C.D. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*, 100: 4325-36, 2002.

CADIGAN, K.M.;NUSSE, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, 11: 3286-305, 1997.

CHEN, F.;CASTRANOVA, V.;SHI, X.;DEMERS, L.M. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem*, 45: 7-17, 1999.

CHESON, B.D.;BENNETT, J.M.;KOPECKY, K.J.;BUCHNER, T.;WILLMAN, C.L.;ESTEY, E.H.;SCHIFFER, C.A.;DOEHNER, H.;TALLMAN, M.S.;LISTER, T.A.;LO-COCO, F.;WILLEMZE, R.;BIONDI, A.;HIDDEMANN, W.;LARSON, R.A.;LOWENBERG, B.;SANZ, M.A.;HEAD, D.R.;OHNO, R.;BLOOMFIELD, C.D. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*, 21: 4642-9, 2003.

CHIARETTI, S.;LI, X.;GENTLEMAN, R.;VITALE, A.;VIGNETTI, M.;MANDELLI, F.;RITZ, J.;FOA, R. Gene expression profile of adult T-cell acute lymphocytic leukemia identifies distinct subsets of patients with different response to therapy and survival. *Blood*, 103: 2771-8, 2004.

CHIARETTI, S.;LI, X.;GENTLEMAN, R.;VITALE, A.;WANG, K.S.;MANDELLI, F.;FOA, R.;RITZ, J. Gene expression profiles of B-lineage adult acute lymphocytic leukemia reveal genetic patterns that identify lineage derivation and distinct mechanisms of transformation. *Clin Cancer Res*, 11: 7209-19, 2005.

CHOMCZYNSKI, P.;SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162: 156-9, 1987.

CRIST, W.M.;CARROLL, A.J.;SHUSTER, J.J.;BEHM, F.G.;WHITEHEAD, M.;VIETTI, T.J.;LOOK, A.T.;MAHONEY, D.;RAGAB, A.;PULLEN, D.J.;ET AL. Poor prognosis of children with pre-B acute lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19)(q23;p13): a Pediatric Oncology Group study. *Blood*, 76: 117-22, 1990.

DANIELS, D.L.;WEIS, W.I. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol*, 12: 364-71, 2005.

DAOUST, K.B.M.P.R. Clinical manifestations of acute myeloid leukemia. In: *Hematology, Basic Principles and Practice*. (fourth edition ed.), edited by MacGlave HBSFCS: Elsevier Churchill Livingstone, 2005, p. 1071-98.

DASH, A.;GILLILAND, D.G. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14: 49-64, 2001.

DE BRUIJN, D.R.;DOS SANTOS, N.R.;KATER-BAATS, E.;THIJSEN, J.;VAN DEN BERK, L.;STAP, J.;BALEMANS, M.;SCHEPENS, M.;MERKX, G.;VAN KESSEL, A.G. The cancer-related protein SSX2 interacts with the human homologue of a Ras-like GTPase interactor, RAB3IP, and a novel nuclear protein, SSX2IP. *Genes Chromosomes Cancer*, 34: 285-98, 2002.

DERISI, J.;PENLAND, L.;BROWN, P.O.;BITTNER, M.L.;MELTZER, P.S.;RAY, M.;CHEN, Y.;SU, Y.A.;TRENT, J.M. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet*, 14: 457-60, 1996.

DIAS NETO, E.;CORREA, R.G.;VERJOVSKI-ALMEIDA, S.;BRIONES, M.R.;NAGAI, M.A.;DA SILVA, W., JR.;ZAGO, M.A.;BORDIN, S.;COSTA, F.F.;GOLDMAN, G.H.;CARVALHO, A.F.;MATSUKUMA, A.;BAIA, G.S.;SIMPSON, D.H.;BRUNSTEIN, A.;DE OLIVEIRA, P.S.;BUCHER, P.;JONGENEEL, C.V.;O'HARE, M.J.;SOARES, F.;BRENTANI, R.R.;REIS, L.F.;DE SOUZA, S.J.;SIMPSON, A.J. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 3491-6, 2000.

EISEN, M.B.;SPELLMAN, P.T.;BROWN, P.O.;BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 14863-8, 1998.

FAY, M.J.;LONGO, K.A.;KARATHANASIS, G.A.;SHOPE, D.M.;MANDERNACH, C.J.;LEONG, J.R.;HICKS, A.;PHERSON, K.;HUSAIN, A. Analysis of CUL-5 expression in breast epithelial cells, breast cancer cell lines, normal tissues and tumor tissues. *Mol Cancer*, 2: 40, 2003.

FERRANDO, A.A.;ARMSTRONG, S.A.;NEUBERG, D.S.;SALLAN, S.E.;SILVERMAN, L.B.;KORSMEYER, S.J.;LOOK, A.T. Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood*, 102: 262-8, 2003.

FERRANDO, A.A.;LOOK, A.T. Clinical implications of recurring chromosomal and associated molecular abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*, 37: 381-95, 2000.

FERRANDO, A.A.;NEUBERG, D.S.;STAUNTON, J.;LOH, M.L.;HUARD, C.;RAIMONDI, S.C.;BEHM, F.G.;PUI, C.H.;DOWNING, J.R.;GILLILAND, D.G.;LANDER, E.S.;GOLUB, T.R.;LOOK, A.T. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*, 1: 75-87, 2002.

FESIK, S.W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer*, 5: 876-85, 2005.

FLETCHER, J.A.;LYNCH, E.A.;KIMBALL, V.M.;DONNELLY, M.;TANTRAVAH, R.;SALLAN, S.E. Translocation (9;22) is associated with extremely poor prognosis in intensively treated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 77: 435-9, 1991.

FOA, R.;VITALE, A.;CHIARETTI, S.;GUARINI, A. A broad and integrated diagnostic work-up for a modern management of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Hematology*, 10 Suppl 1: 55-62, 2005.

FROHLING, S.;SCHLENK, R.F.;BREITRUCK, J.;BENNER, A.;KREITMEIER, S.;TOBIS, K.;DOHNER, H.;DOHNER, K. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*, 100: 4372-80, 2002.

FROHLING, S.;SCHOLL, C.;GILLILAND, D.G.;LEVINE, R.L. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol*, 23: 6285-95, 2005.

GILLILAND, D.G.;JORDAN, C.T.;FELIX, C.A. The molecular basis of leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*: 80-97, 2004.

GILLILAND, D.G.;TALLMAN, M.S. Focus on acute leukemias. *Cancer Cell*, 1: 417-20, 2002.

GOLUB, T.R.;SLONIM, D.K.;TAMAYO, P.;HUARD, C.;GAASENBEEK, M.;MESIROV, J.P.;COLLER, H.;LOH, M.L.;DOWNING, J.R.;CALIGIURI, M.A.;BLOOMFIELD, C.D.;LANDER, E.S. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286: 531-7, 1999.

GOMES, L.I.;ESTEVEZ, G.H.;CARVALHO, A.F.;CRISTO, E.B.;HIRATA, R., JR.;MARTINS, W.K.;MARQUES, S.M.;CAMARGO, L.P.;BRENTANI, H.;PELOSO, A.;ZITRON, C.;SALLUM, R.A.;MONTAGNINI, A.;SOARES, F.A.;NEVES, E.J.;REIS, L.F. Expression profile of malignant and nonmalignant lesions of esophagus and stomach: differential activity of functional modules related to inflammation and lipid metabolism. *Cancer Res*, 65: 7127-36, 2005.

GUINN, B.A.;BLAND, E.A.;LODI, U.;LIGGINS, A.P.;TOBAL, K.;PETTERS, S.;WELLS, J.W.;BANHAM, A.H.;MUFTI, G.J. Humoral detection of leukaemia-associated antigens in presentation acute myeloid leukaemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 335: 1293-304, 2005.

GUZMAN, M.L.;SWIDERSKI, C.F.;HOWARD, D.S.;GRIMES, B.A.;ROSSI, R.M.;SZILVASSY, S.J.;JORDAN, C.T. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 16220-5, 2002.

HANAHAHAN, D.;WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70, 2000.

HARRIS, N.L.;JAFFE, E.S.;DIEBOLD, J.;FLANDRIN, G.;MULLER-HERMELINK, H.K.;VARDIMAN, J.;LISTER, T.A.;BLOOMFIELD, C.D. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*, 17: 3835-49, 1999.

HIGUCHI, R.;FOCKLER, C.;DOLLINGER, G.;WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11: 1026-30, 1993.

HU, M.;KRAUSE, D.;GREAVES, M.;SHARKIS, S.;DEXTER, M.;HEYWORTH, C.;ENVER, T. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev*, 11: 774-85, 1997.

HUANG, J.Z.;SANGER, W.G.;GREINER, T.C.;STAUDT, L.M.;WEISENBURGER, D.D.;PICKERING, D.L.;LYNCH, J.C.;ARMITAGE, J.O.;WARNKE, R.A.;ALIZADEH, A.A.;LOSSOS, I.S.;LEVY, R.;CHAN, W.C. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood*, 99: 2285-90, 2002.

JAMORA, C.;FUCHS, E. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol*, 4: E101-8, 2002.

KIPREOS, E.T.;LANDER, L.E.;WING, J.P.;HE, W.W.;HEDGECOCK, E.M. *cul-1* is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family. *Cell*, 85: 829-39, 1996.

KITAJIMA, I.;NAKAJIMA, T.;IMAMURA, T.;TAKASAKI, I.;KAWAHARA, K.;OKANO, T.;TOKIOKA, T.;SOEJIMA, Y.;ABEYAMA, K.;MARUYAMA, I. Induction of apoptosis in murine clonal osteoblasts expressed by human T-cell leukemia virus type I tax by NF-kappa B and TNF-alpha. J Bone Miner Res, 11: 200-10, 1996.

LACOMBE, F.;DURRIEU, F.;BRIAIS, A.;DUMAIN, P.;BELLOC, F.;BASCANS, E.;REIFFERS, J.;BOISSEAU, M.R.;BERNARD, P. Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. Leukemia, 11: 1878-86, 1997.

LE, T.L.;YAP, A.S.;STOW, J.L. Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. J Cell Biol, 146: 219-32, 1999.

LINDVALL, C.;FURGE, K.;BJORKHOLM, M.;GUO, X.;HAAB, B.;BLENNOW, E.;NORDENSKJOLD, M.;TEH, B.T. Combined genetic and transcriptional profiling of acute myeloid leukemia with normal and complex karyotypes. Haematologica, 89: 1072-81, 2004.

LOOK, A.T. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. Science, 278: 1059-64, 1997.

MAHADEVAN, D.;LIST, A.F. Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies. Blood, 104: 1940-51, 2004.

MARAMBAUD, P.;WEN, P.H.;DUTT, A.;SHIOI, J.;TAKASHIMA, A.;SIMAN, R.;ROBAKIS, N.K. A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. Cell, 114: 635-45, 2003.

MAYO, M.W.;WANG, C.Y.;COGSWELL, P.C.;ROGERS-GRAHAM, K.S.;LOWE, S.W.;DER, C.J.;BALDWIN, A.S., JR. Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. Science, 278: 1812-5, 1997.

MEIRELES, S.I.;CRISTO, E.B.;CARVALHO, A.F.;HIRATA, R., JR.;PELOSOF, A.;GOMES, L.I.;MARTINS, W.K.;BEGNAMI, M.D.;ZITRON, C.;MONTAGNINI, A.L.;SOARES, F.A.;NEVES, E.J.;REIS, L.F. Molecular classifiers for gastric cancer and nonmalignant diseases of the gastric mucosa. Cancer Res, 64: 1255-65, 2004.

MULCAHY, L.S.;SMITH, M.R.;STACEY, D.W. Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature*, 313: 241-3, 1985.

PEREIRA, J. Análise de dados qualitativos: estratégias metodológicas para as ciências da saúde, humanas e sociais. In: *Princípios gerais da análise multivariada.*, edited by Paulo EdUdS. São Paulo, 2001, p. 101-51.

POLAKIS, P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 14: 1837-51, 2000.

PRUITT, K.;DER, C.J. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett*, 171: 1-10, 2001.

PUI, C.H.;EVANS, W.E. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 339: 605-15, 1998.

QUACKENBUSH, J. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet*, 32 Suppl: 496-501, 2002.

RAIMONDI, S.C.;ROBERSON, P.K.;PUI, C.H.;BEHM, F.G.;RIVERA, G.K. Hyperdiploid (47-50) acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood*, 79: 3245-52, 1992.

REYA, T.;DUNCAN, A.W.;AILLES, L.;DOMEN, J.;SCHERER, D.C.;WILLERT, K.;HINTZ, L.;NUSSE, R.;WEISSMAN, I.L. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423: 409-14, 2003.

ROPERCH, J.P.;ALVARO, V.;PRIEUR, S.;TUYNDER, M.;NEMANI, M.;LETHROSNE, F.;PIOUFFRE, L.;GENDRON, M.C.;ISRAELI, D.;DAUSSET, J.;OREN, M.;AMSON, R.;TELERMAN, A. Inhibition of presenilin 1 expression is promoted by p53 and p21WAF-1 and results in apoptosis and tumor suppression. *Nat Med*, 4: 835-8, 1998.

SCHEELE, J.S.;RIPPLE, D.;LUBBERT, M. The role of ras and other low molecular weight guanine nucleotide (GTP)-binding proteins during hematopoietic cell differentiation. *Cell Mol Life Sci*, 57: 1950-63, 2000.

SCHOCH, C.;KOHLMANN, A.;SCHNITTGER, S.;BRORS, B.;DUGAS, M.;MERGENTHALER, S.;KERN, W.;HIDDEMANN, W.;EILS, R.;HAFERLACH, T. Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 10008-13, 2002.

SCHUCHHARDT, J.;BEULE, D.;MALIK, A.;WOLSKI, E.;EICKHOFF, H.;LEHRACH, H.;HERZEL, H. Normalization strategies for cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res*, 28: E47, 2000.

SERINSOZ, E.;NEUSCH, M.;BUSCHE, G.;WASIELEWSKI, R.;KREIPE, H.;BOCK, O. Aberrant expression of beta-catenin discriminates acute myeloid leukaemia from acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 126: 313-9, 2004.

SHIPP, M.A.;ROSS, K.N.;TAMAYO, P.;WENG, A.P.;KUTOK, J.L.;AGUIAR, R.C.;GAASENBEEK, M.;ANGELO, M.;REICH, M.;PINKUS, G.S.;RAY, T.S.;KOVAL, M.A.;LAST, K.W.;NORTON, A.;LISTER, T.A.;MESIROV, J.;NEUBERG, D.S.;LANDER, E.S.;ASTER, J.C.;GOLUB, T.R. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med*, 8: 68-74, 2002.

SONG, W.J.;SULLIVAN, M.G.;LEGARE, R.D.;HUTCHINGS, S.;TAN, X.;KUFRIN, D.;RATAJCZAK, J.;RESENDE, I.C.;HAWORTH, C.;HOCK, R.;LOH, M.;FELIX, C.;ROY, D.C.;BUSQUE, L.;KURNIT, D.;WILLMAN, C.;GEWIRTZ, A.M.;SPECK, N.A.;BUSHWELLER, J.H.;LI, F.P.;GARDINER, K.;PONCZ, M.;MARIS, J.M.;GILLILAND, D.G. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet*, 23: 166-75, 1999.

SORIANO, S.;KANG, D.E.;FU, M.;PESTELL, R.;CHEVALLIER, N.;ZHENG, H.;KOO, E.H. Presenilin 1 negatively regulates beta-catenin/T cell factor/lymphoid enhancer factor-1 signaling independently of beta-amyloid precursor protein and notch processing. *J Cell Biol*, 152: 785-94, 2001.

STILLMAN, B.A.;TONKINSON, J.L. Expression microarray hybridization kinetics depend on length of the immobilized DNA but are independent of immobilization substrate. *Anal Biochem*, 295: 149-57, 2001.

STIREWALT, D.L.;RADICH, J.P. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer*, 3: 650-65, 2003.

TAKAHASHI, Y.;KARBOWSKI, M.;YAMAGUCHI, H.;KAZI, A.;WU, J.;SEBTI, S.M.;YOULE, R.J.;WANG, H.G. Loss of Bif-1 suppresses Bax/Bak conformational change and mitochondrial apoptosis. *Mol Cell Biol*, 25: 9369-82, 2005.

VANDESOMPELE, J.;DE PRETER, K.;PATTYN, F.;POPPE, B.;VAN ROY, N.;DE PAEPE, A.;SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3: RESEARCH0034, 2002.

VERMEULEN, K.;VAN BOCKSTAELE, D.R.;BERNEMAN, Z.N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol*, 84: 627-39, 2005.

VIRTANEVA, K.;WRIGHT, F.A.;TANNER, S.M.;YUAN, B.;LEMON, W.J.;CALIGIURI, M.A.;BLOOMFIELD, C.D.;DE LA CHAPELLE, A.;KRAHE, R. Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 1124-9, 2001.

WHITMAN, S.P.;ARCHER, K.J.;FENG, L.;BALDUS, C.;BECKNELL, B.;CARLSON, B.D.;CARROLL, A.J.;MROZEK, K.;VARDIMAN, J.W.;GEORGE, S.L.;KOLITZ, J.E.;LARSON, R.A.;BLOOMFIELD, C.D.;CALIGIURI, M.A. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res*, 61: 7233-9, 2001.

XIA, X.;QIAN, S.;SORIANO, S.;WU, Y.;FLETCHER, A.M.;WANG, X.J.;KOO, E.H.;WU, X.;ZHENG, H. Loss of presenilin 1 is associated with enhanced beta-catenin signaling and skin tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 10863-8, 2001.

YEOH, E.J.;ROSS, M.E.;SHURTLEFF, S.A.;WILLIAMS, W.K.;PATEL, D.;MAHFOUZ, R.;BEHM, F.G.;RAIMONDI, S.C.;RELLING, M.V.;PATEL, A.;CHENG, C.;CAMPANA, D.;WILKINS, D.;ZHOU, X.;LI, J.;LIU, H.;PUI, C.H.;EVANS, W.E.;NAEVE, C.;WONG, L.;DOWNING, J.R. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*, 1: 133-43, 2002.

ZHANG, L.;ZHOU, W.;VELCULESCU, V.E.;KERN, S.E.;HRUBAN, R.H.;HAMILTON, S.R.;VOGELSTEIN, B.;KINZLER, K.W. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science*, 276: 1268-72, 1997.

ZINKEL, S.S.;HUROV, K.E.;ONG, C.;ABTAHI, F.M.;GROSS, A.;KORSMEYER, S.J. A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. *Cell*, 122: 579-91, 2005.

ZINKEL, S.S.;ONG, C.C.;FERGUSON, D.O.;IWASAKI, H.;AKASHI, K.;BRONSON, R.T.;KUTOK, J.L.;ALT, F.W.;KORSMEYER, S.J. Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *Genes Dev*, 17: 229-39, 2003.

8- APÊNDICES

AMOSTRA	IDADE	SEXO	%BLASTOS	LEUCOMETRIA	DIAGNÓSTICO	CITOGENÉTICA
21	49	M	34,0	18,33	LMA-M4	S/METÁFASE
24	DI	DI	73,0	DI	LMA-M1	S/EXAME
29	61	M	87,0	212,28	LMA-M5B	S/METÁFASE
33	40	F	41,0	12,40	LMA-M3	NÃO REALIZADO
57	20	M	94,5	78,63	LLA-T	S/METÁFASE
58	45	F	92,0	39,88	LLA ₂ ^P	46,XX
59	92	F	74,5	DI	LMA-M0	46,XX
60	19	M	89,5	DI	LLA-T	46,XY
62	39	M	98,0	80,92	LMA-M1	46,XX
66	40	M	96,0	127,00	LLA-T	46,XY
67	21	M	52,0	52,70	LMA-M2	46,XY
70	DI	M	DI	DI	LMA-M1	46,XY
71	52	M	71,0	26,76	LMA-M4	46,XY
78	18	F	90,0	37,37	LMA-M1	46,XX
80	18	M	86,0	46,62	LMA-M3	S/METÁFASE
82	45	F	88,0	25,30	LMA-M3	47,XX, t(15;17),+8
87	72	F	81,5	121,90	LMA-M4	46,XX
88	81	F	68,0	49,23	LMA	NÃO REALIZADO
89	42	M	46,5	3,88	LMA-M2	46,XY
90	32	M	94,0	DI	LMA-M1	S/METÁFASE
91	79	F	88,5	127,40	SMProliferativa+LMA	47,XX,+21
99	20	M	96,5	38,70	LLA-B	46,XY

DI: dado indisponível. As amostras realçadas em vermelho são de sangue periférico.

PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DE 17/24 CASOS INCLUÍDOS NO ESTUDO

	21	57	58*	59	60	62*	66*	67	70	71	80	82	88	89*	90	91	99*
HLA-DR	77,6	82,0	91,1	97,7	77,7	97,7	-	95,0	+	81,8	-	-	86,1	76,8	90,8	96,2	95,7
CD34	83,6	-	84,9	98	-	93,0	-	90,0	78,0	-	-	14,0	82,7	74,0	n	7,0	n
CD10	-	43,7	50,0	-	-	-	28,0	-	-	-	-	-	-	n	n	n	91,4
CD19	-	-	90,5	-	-	14,5	-	-	-	14,7	-	-	-	-	n	-	91,5
CD20	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	-
CD23	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Ig (cit)	n	n	n	n	-	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Ig (sup)	n	n	n	n	-	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
CD3	-	41,1	-	-	77,7	-	86,0	-	-	-	-	-	-	-	n	-	-
CD4	n	n	n	n	n	n	86,0	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
CD8	n	n	n	n	n	n	86,0	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
CD5	n	n	n	n	n	n	86,0	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
CD7	-	98,6	99,3	3,7	94,0	90,0	86,0	-	-	-	-	-	-	5,9	n	-	-
CD38	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
MPO	7,8	-	-	-	-	55,5	-	94,4	+	92,5	98,7	95,0	62,6	85,3	23,4	52,8	n
CD13	92,7	-	-	18,8	-	-	-	89,0	+	32,1	87,4	90,0	62,4	76,8	n	96,2	-
CD33	27,5	-	-	13,1	-	90,0	-	-	+	97,6	79,8	97,0	29,5	60,0	15,4	95,3	75,9
CD14	-	-	-	-	-	-	-	-	+	46,4	-	-	-	-	-	-	n
CD56	n	n	n	n	n	n	n	n	-	n	n	n	n	-	n	-	n
CD2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	-	n	-	n
Diagnóstico Fenotípico	LMA-M4	LLA-T	LLA-B	LMA-M0	LLA-T	LMA-M1	LLA-T	LMA-M2	LMA-M1	LMA-M4	LMA-M3	LMA-M3	LMA	LMA-M2	LMA-M1	LMA/SMD	LLA-B

n: marcador não analisado para a respectiva amostra.

*58: população CD19+ com co-expressão de CD10.

*60: população HLA-DR com co-expressão de CD3.

*62: população CD33+ com co-expressão de CD7; expressão anômala de CD19.

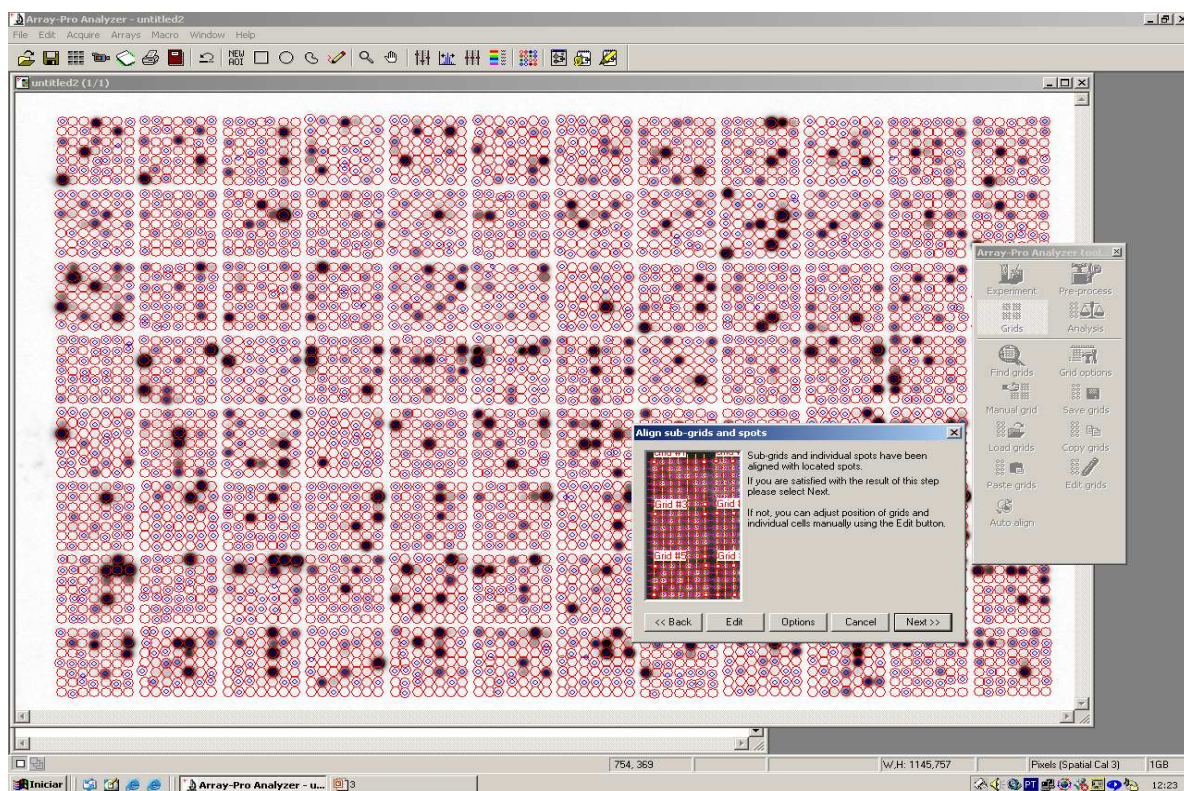
*66: expressão de CD10.

*89: população CD33+ com co-expressão de CD7; população HLA-DR com co-expressão de CD13.

*91: população HLA-DR com co-expressão de CD13.

*99: expressão anômala de CD33

**Imagem demonstrativa do processamento de imagem na membranas 4.7K Instituto
Ludwig/FAPESP através do programa ArrayPro® (Media Cybernetics)**



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

(0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

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

cep@fcm.unicamp.br

CEP, 23/08/05.

(Grupo I)

PARECER PROJETO: N° 347/2005

CAAE: 0147.0.146.000-05

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE LEUCEMIAS AGUDAS POR TÉCNICA DE MICROARRANJO (MICROARRAY)”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: André Fattori

INSTITUIÇÃO: HC/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 07/07/2005

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 23/02/06 e 23/08/06

II - OBJETIVOS

Distingui grupos específicos de leucemias linfóides ou mielóides de acordo com o perfil de expressão gênica; estabelecer correlação entre os perfis de expressão gênica e dados da caracterização citogenética convencional; identificar possíveis genes relacionados à leucemogênese, tanto pela caracterização dos processos biológicos como pelo reconhecimento de EST's de identidade ainda não estabelecida, pela comparação das amostras de LA com o padrão da célula progenitora normal.

III - SUMÁRIO

Serão colhidas amostras na punção diagnóstica. Serão selecionados para o estudo pacientes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda e Leucemia Mielóide Aguda e amostras de células progenitoras hematopoiéticas de sangue de doadores de transplante de medula óssea. Será correlacionado o perfil de expressão gênica com diferentes tipos de leucemia e do perfil de expressão gênica com possíveis mecanismos biológicos envolvidos no desenvolvimento e manutenção do processo tumoral.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto bem estruturado, com Termo de Consentimento adequado. Relação risco/benefício favorável.

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 VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de agosto de 2005.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP