UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

LARISSA OLIVEIRA GUIMARÃES

**Caracterização de subpopulações de Leucemia Mielóide Aguda portadora
do rearranjo MLL quanto à resposta diferencial ao tratamento em longo
prazo com Citarabina**

Ribeirão Preto

2015

LARISSA OLIVEIRA GUIMARÃES

**Caracterização de subpopulações de Leucemia Mielóide Aguda portadora
do rearranjo MLL quanto à resposta diferencial ao tratamento em longo
prazo com Citarabina**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aparecida Maria Fontes

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR
QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E
PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Guimarães, Larissa Oliveira.

Caracterização de subpopulações de Leucemia Mielóide Aguda portadora do rearranjo MLL quanto à resposta diferencial ao tratamento em longo prazo com Citarabina/ Larissa Oliveira Guimarães; orientadora Aparecida Maria Fontes - Ribeirão Preto, 2015

171f. il. 30cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1) Leucemia Mielóide Aguda; 2) proteína MLL; Ara-C; 3) genes *HOX*; 4) Reparo de DNA

Nome: Larissa Oliveira Guimarães

Título: Caracterização de subpopulações de Leucemia Mielóide Aguda portadora do rearranjo MLL quanto à resposta diferencial ao tratamento em longo prazo com Citarabina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Área de Concentração: Genética

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos amores da
minha vida: Meu pai Napoleão,
minha mãe Luciene, minha irmã
Graziella e minha avó Maria José
(Mariita). Vocês são minha
inspiração!*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes por ter dado a mim oportunidade de trabalhar com cultura celular e biologia molecular, e por me incentivar a fazer o estágio no exterior, que foi crucial para a realização do meu projeto de pesquisa durante o doutorado;

Ao meu mentor Dr. Stanton L. Gerson, por suas “sacadas” rápidas quando meus resultados não eram exatamente os esperados, por sugerir caminhos diferentes pra eu mesma escolher por onde caminhar, por disponibilizar as melhores condições possíveis quanto à estrutura de laboratório (instalações, acesso a equipamentos e reagentes) e pessoal qualificado para discutir tanto a parte técnica quanto o *rationale* da pesquisa, por sempre me lembrar que no doutorado é preciso aprender a contar uma história, por me perguntar “Who cares?” pra me fazer pensar sobre os meus resultados, e me fazer chegar sozinha à interpretação e ao peso que eu preciso dar a cada um deles. *Thank you so much for being my mentor*;

À Profa. Dra. Ester Silveira Ramos por ter dado a mim oportunidade de iniciar o meu doutorado em seu laboratório, e ingressar no Programa de Pós-Graduação em Genética;

Aos coordenadores e funcionários do departamento de Genética, em especial à Susie Nalon e ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares, aos quais procurei e sempre escutei uma palavra amiga acompanhada de uma possível solução para tantos problemas, além da eficiência para providenciar cada documento que eu precisei;

Aos doutores David Wald, Chengkui Qu e Douglas Graham por cederem as linhagens celulares para o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa;

Aos doutores David Wald, Thomas Laframboise, Alexander Miron e Penelope Miron (CWRU) pelos momentos de discussão de ideias, pela assistência e sugestões nas análises das células, dados do TCGA e RNA-seq, respectivamente;

À Allison Kipling e Daina Brooks pelo auxílio com as análises de citometria de fluxo;

Aos bioinformatas Prof. Dr. Joseph Abraham (Uniseb) e Dr. Pingfu Fu (CWRU) pelo auxílio com as análises, e em especial ao querido Dr. Ernest Ricky Chan (Institute of Computational Biology - CWRU), por tantas vezes ter discutido comigo os resultados, e literalmente desenhado o esquema de análise do RNA-seq em seu quadro - sempre com um sorriso no rosto e uma palavra amiga; e por ter me mostrado ferramentas para análises dos dados;

Às agências de fomento Capes e CNPq pela concessão das bolsas de doutorado no Brasil e doutorado sanduíche no exterior;

Aos colegas e amigos com os quais convivi no laboratório de Epigenética e no Bloco C. Vocês fizeram parte do momento mais “leve” do meu doutorado, mas quando os momentos mais difíceis surgiram, continuaram firme comigo;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Transferência Gênica. Obrigada por me apoiarem nos momentos em que mais pensei em desistir, e por me aceitarem no grupo mesmo quando eu não era mais “bem-vinda” nas redondezas;

Ao Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco e a equipe de seu laboratório, em especial à Dra. Andrielle de Castilho Fernandes, pela acolhida, enquanto eu não tinha uma “casa científica”;

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior e a equipe de seu laboratório, em especial a Ana Júlia Machry e Izabela Ishihara que dedicaram parte do seu tempo a me auxiliar com a cultura celular. Jamais me esquecerei do apoio que vocês me deram!

Aos queridos Márcio Penha e Júlia Veiga que conviveram comigo no bloco D, enquanto este ainda não era muito habitado;

Aos colegas do Gerson Lab: Yulan Qing, Yan Yan, Allison Condie, Hua Fung e Amar Desai, pelos direcionamentos, ideias e discussões nas reuniões do laboratório e no dia-a-dia;

Aos amigos Lucas Souza e Ricardo Bonfim por discutirem comigo os resultados, sugerirem a melhor forma de abordá-los na discussão, e me encorajarem enquanto estive desanimada. Meninos, vocês são demais, e eu tenho certeza que vocês serão excelentes orientadores! Sou muito fã de vocês, e é muito bom tê-los por perto, amigos! Ric, quero agradecer a você pelo companheirismo e apoio ao longo de todos esses anos! Obrigada por tudo!

À minha família no “Caldeirão Preto”: Thays e Diego Urenda, Tatiane Bertocin, Daniella Maranhão, Danuta Sastre, Ingrid Brilho, Débora Dacanal (Cristina), Alexandra Galvão, Mariana Pedrosa, Sarah Blima, Karina Salomão e Thaís Pimentel. Muito obrigada!

Às amigas Karla Souza e Giovana Marques, e aos sempre queridos amigos do peito da época de graduação em Jequié, que me aconselharam, animaram, consolaram, escutaram, ensinaram, papearam, divertiram, resenharam, discutiram, criticaram... mesmo distantes fisicamente, vocês deram um jeitinho de permanecerem comigo! Obrigada!

Aos amigos que fiz em Cleveland: Pamela Garcia, Renan Demori, Rafaella Nascimento, Giovana Vesentini, Bruna Zampieri, Daniella Vitorino, Felipe e Ieda Martins. O que seria de mim na terra da solidão sem a companhia de vocês, cada um em um momento, e cada um com sua particularidade... me lembrarei com carinho de todos. Gostaria de ressaltar Vanessa Nicolete (hey, soul sister), aquela que mais escutou meus resmungos nos dias difíceis, que chorou comigo quando eu chorei por problemas pessoais ou profissionais, que também sorriu com as gratas surpresas da vida! Ai, amiga, você foi um dos maiores presentes que ganhei em Cleveland! Muito, muito obrigada! Você me ensina muito!

À minha família Clevelander - Ana Maria Ramos, Ronald Blanton e Léo Blanton - que cuidou de mim e me acolheu como filha/irmã, que foi paciente para servir de plateia para o ensaio das minhas apresentações pro Gerson Lab, pelas discussões sociais e científicas, por escutar minhas lamúrias chinesas (hahaha), por me fazer sentir amada numa terra que não era a minha! Vivemos e ainda viveremos grandes histórias! Amo vocês, e muito obrigada por tudo!

Aos meus pais, Napoleão e Luciene, por me ensinarem que honestidade e respeito ao próximo se aprende com bons exemplos que vem de casa; por me incentivarem a estudar e buscar meus objetivos junto à educação formal; Mãe, obrigada pela voz mansinha quando estive nervosa, pelo sorriso quando me desesperei, por tentar minimizar cada dificuldade! Obrigada por me dizer desde pequena: “Larissa, você precisa parar de dizer que não consegue. Pode estar difícil, mas você vai conseguir”. Painho, o senhor é minha fortaleza, minha razão, minha emoção, meu amigo, meu herói! Se há em mim alguma capacidade argumentativa, devo ao senhor que me desafiou desde criança a manter minhas opiniões, mesmo não concordando muito com a maioria delas; à minha irmã, Grazy (meu Pequeno), obrigada pela cumplicidade, lealdade, por ser minha fiel escudeira que guarda segredinhos e segredões, por não me esconder informações, mesmo sabendo que eu ficaria triste ou preocupada por estar longe. Obrigada por confiar em mim; e aos meus avós, Nilo (*in memoriam*) e Mariita, que não tiveram a oportunidade de estudar, mas plantaram em minha mãe a vontade de conhecer, aprender, crescer, e ser uma mulher independente! Vovô, me lembrarei sempre com ternura do senhor! Vovó, mesmo reclamando e me perguntando “Pra que tanto estudo”, obrigada por cada lanchinho que a senhora me levava enquanto eu estava fazendo as análises da minha tese, e não tirava os olhos da tela, e por cada oração que fez por mim. O seu afeto sempre tornou tudo mais ameno! Família, obrigada por plantar em mim a sementinha da eterna busca por melhorar a mim mesma!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

Guimarães, L.O **Caracterização de subpopulações de Leucemia Mielóide Aguda portadora do rearranjo MLL quanto à resposta diferencial ao tratamento em longo prazo com Citarabina.** 2015. 171p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A natureza heterogênea da Leucemia Mielóide Aguda (LMA) tornou-se um desafio para o sucesso da quimioterapia convencional com o agente Citarabina (Ara-C), especialmente em leucemias com prognóstico desfavorável, como aquelas portadoras do rearranjo MLL. Visto que as células de LMA-MLL são consideradas sensíveis ao Ara-C quando comparadas às leucemias que não apresentam o rearranjo, mas a recaída à doença é frequente, a presente tese propôs estudar a relação entre características biológicas relacionadas às bases da resistência ao Ara-C em LMA-MLL. A abordagem proposta foi a seleção de subpopulações de linhagens celulares portadoras do rearranjo MLL submetidas ao tratamento em longo prazo com Ara-C, comparando-as com as linhagens não expostas à droga. As células foram caracterizadas quanto: 1) ao potencial proliferativo na presença ou ausência de Ara-C; 2) a distribuição das células no ciclo celular; 3) a distribuição de marcadores clássicos de superfície de células-tronco hematopoiéticas, CD34 e CD38; e 4) o perfil de expressão global dos RNAs transcritos. O tratamento em longo prazo selecionou células mais resistentes ao Ara-C que as células parentais. Além disso, quanto ao ciclo celular, as células selecionadas com Ara-C apresentaram apoptose reduzida (fase sub-G1), acúmulo na fase de síntese (fase S) e aumento da capacidade proliferativa após reexposição à droga (fase G2-M). Quanto à análise de marcadores de células-tronco hematopoiéticas, observou-se que após o tratamento em longo com Ara-C, uma das linhagens celulares apresentou distribuição bimodal do marcador CD38. Quando separadas por *sorting* em citometria de fluxo, observou-se que as subpopulações com níveis distintos de expressão de CD38, denominadas MV-4-11 CD38^{High} e MV-4-11 CD38^{Low} apresentaram resposta distinta ao tratamento com Ara-C. Quando avaliadas quanto ao perfil global de expressão gênica, constatou-se que MV-4-11 CD38^{High} eram mais semelhantes às células parentais, e que MV-4-11 CD38^{Low} formavam um grupo isolado, distinto das outras duas populações celulares. A análise de ontologia gênica (GO) evidenciou que entre as categorias mais representativas de processos biológicos estavam atividades associadas à capacidade proliferativa, ao desenvolvimento e a resposta a estímulos. As análises de agrupamentos hierárquicos mostraram que: 1) o *cluster* de genes do desenvolvimento *HOXA* estava mais expresso nas células MV-4-11 CD38^{Low} do que em MV-4-11 CD38^{High}, que

apresentaram expressão mais elevada do cluster *HOXB*; 2) o gene *HOX* mais diferencialmente expresso foi *HOXA13*, associado na literatura com prognóstico desfavorável em outros tipos de câncer; 3) dos genes associados a resposta a estímulos, o único relacionado à via de metabolização do Ara-C diferencialmente expresso entre as linhagens foi *NME1*; 4) aqueles que participam das vias de reparo de pareamento incorreto, reparo por excisão de bases e por excisão de nucleotídeos encontraram-se mais expressos nas células MV-4-11 CD38^{High} que em MV-4-11 CD38^{Low}. Além disso, diversas quinases dependentes de ciclinas (CDKs) também estiveram diferencialmente expressas entre MV-4-11 CD38^{High} e MV-4-11 CD38^{Low}. Sugere-se por fim, que o modelo *in vitro* proposto neste estudo para simular a situação de resistência ao Ara-C em subpopulações de LMA-MLL, demonstrou que os mecanismos de resposta à Citarabina nesta doença, vão além de alterações na detoxificação e metabolização da droga, e parecem mais associados a vantagens proliferativas e do desenvolvimento das células leucêmicas. Estas vias devem ser exploradas como alvos potenciais na terapia combinada ao Ara-C.

Palavras-chave: Leucemia Mielóide Aguda; proteína MLL; Ara-C; genes *HOX*; reparo de DNA

ABSTRACT

Guimarães, L.O. **Characterization of subpopulations of Acute Myeloid Leukemia harboring MLL rearrangements according to differential response to the long-term treatment with Cytarabine.** 2015. 171p. Dissertation (PhD) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

The heterogeneity of Acute Myeloid Leukemia (AML) became a challenge for the success of the conventional chemotherapy agent Cytarabine (Ara-C), especially in leukemias with poor prognosis, as those harboring MLL rearrangement. Since AML-MLL cells are considered sensitive to Ara-C when compared with leukemias that do not carry the rearrangement, but relapse is frequent, the present dissertation proposed to study the relationship between biological characteristics related to the basis of chemoresistance to Ara-C in AML-MLL. We proposed an approach based on the selection of subpopulations of cell lines bearing MLL rearrangement submitted to the long-term treatment with Ara-C, comparing them with the cell lines that were not previously exposed to the drug. The cells were characterized according to: 1) the proliferative potential in the presence and absence of Ara-C; 2) the distribution of the cells in the cell cycle; 3) distribution of hematopoietic stem cell classic surface markers, CD34 and CD38; and, 4) global expression profile of transcribed RNAs. The long-term treatment selected cells that are more resistant to Ara-C than the cells that were not previously treated (parental cells). Besides, according to cell cycle, the cells selected by Ara-C treatment present decreased apoptosis (sub-G1 phase), accumulation in the synthesis phase (S-phase) and increase in the proliferative capability after re-exposition to the drug (G2-M phase). Regarding the hematopoietic stem cell markers, we observed that after Ara-C long-term treatment, one of the cell lines exhibited a bimodal distribution of the CD38 marker. When sorted by flow cytometry, we observed that both subpopulations with distinct levels of CD38 expression, called MV-4-11 CD38^{High} and MV-4-11 CD38^{Low} also showed distinct response to Ara-C. When evaluated regarding to their global gene expression profiles, we verified that MV-4-11 CD38^{High} were more closely related to the parental cells, and MV-4-11 CD38^{Low} made up an isolated group, distinct of the other cell populations. Gene ontology (GO) analysis revealed that among the most representative categories of biological processes, activities associated with proliferative capability, development and response to stimuli were included. The hierarchical clustering analysis showed that: 1) the cluster *HOXA* of genes of development was more expressed in the MV-4-11 CD38^{Low} than in the MV-4-11 CD38^{High} cells, that presented increased expression of *HOXB* cluster; 2) the most differentially

expressed *HOX* gene was *HOXA13*, which according to the literature is associated with poor prognosis in other types of cancer; 3) among the genes associated with response to stimuli, the only one related to Ara-C-metabolizing pathway that was differentially expressed between the cell lines was *NME1*; 4) those genes that take part in the mismatch repair, base excision repair and nucleotide excision repair pathways were more expressed in the MV-4-11 CD38^{High} than in the MV-4-11 CD38^{Low} cells. Additionally, several cyclin-dependent kinases (CDKs) were also differentially expressed between MV-4-11 CD38^{High} and MV-4-11 CD38^{Low}. Finally, we suggest that the *in vitro* model proposed in this study to mimic the situation of chemoresistance to Ara-C in subpopulations of AML-MLL, showed that the mechanisms of Ara-C response in this disease, go beyond changes in drug detoxification and metabolism, and seem more associated to proliferative and development advantages of the leukemic cells. These pathways should be explored as potential targets to Ara-C combination therapies.

Keywords: Acute Myeloid Leukemia; MLL protein; Ara-C; *HOX* genes; DNA repair

Lista de abreviaturas

ACS	Sociedade Americana de Câncer, do inglês <i>American Cancer Society</i>
Ara-C	Citarabina, citosina-arabnosídeo
Ara-CMP	Arabinofuranosilcitosina monofosfato
Ara-CTP	Arabinofuranosilcitosina trifosfato
Ara-UMP	Arabinofuranosiluracila monofosfato
AML1/ETO	Fusão entre as proteínas AML1 e ETO
ATCC	American Type Culture Collection
ATRA	Ácido all-trans-retinóico
BER	Via de reparo por excisão de bases, do inglês <i>Base Excision Repair</i>
CBF/MYH11	Fusão entre as proteínas CBF e MYH11
CDA	Citidina desaminase
CDK	Quinases dependentes de ciclinas
cDNA	DNA complementar
dCK:	Desoxicitidina quinase
dCMPD	Desoxicitidilato desaminase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMT	DNA metiltransferase
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
FAB	Associação Franco-Americana-Inglesa
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
<i>FLT3-ITD</i>	Duplicação <i>in tandem</i> do gene Tirosino-quinase 3 Fms-relacionado
GDE	Gene diferencialmente expresso
GO	Análise de ontologia gênica
hENT	Transportador do Ara-C, do inglês <i>human equilibrative nucleoside transporter</i>
<i>HOX</i>	Genes <i>Homeobox</i> ou genes homeóticos de classe I
HSC	Célula-tronco hematopoiética
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMA-MLL	Leucemia Mielóide Aguda portadora do rearranjo MLL

LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LSC	Célula-tronco Leucêmica
M4	Leucemia mielomonocítica
M5	Leucemia monocítica
MDS/MPD	Doença Mielodisplásica/Mieloproliferativa
MLL	<i>Mixed Lineage Leukemia</i>
MLL–AF4	Fusão da proteína MLL com o parceiro AF4
MLL–AF6	Fusão da proteína MLL com o parceiro AF6
MLL–AF9	Fusão da proteína MLL com o parceiro AF9
MLL–AF10	Fusão da proteína MLL com o parceiro AF10
MLL–ENL	Fusão da proteína MLL com o parceiro ENL
MMR	Via de reparo de pareamento incorreto, do inglês <i>Mismatch repair</i>
NDK	Nucleosídeo difosfato quinase
NER	Via de reparo por excisão de nucleotídeo, do inglês <i>Nucleotide Excision Repair</i>
PCA	Análise de componente principal
PE	Ficoeritrina
PI	Iodeto de propídeo
PHD	Domínio PHD, do inglês <i>Plant Homeodomain</i>
PML/RARA	Fusão entre as proteínas PML e RARA
PN-I	Pirimidina nucleotidase I
RNA	Ácido desoxirribonucleico
SET	Domínio SET
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TALE	Domínio TALE, do inglês, <i>three amino acid loop extension</i>
UMP-CMPK	Desoxicitidilato quinase
WHO	Organização Mundial da Saúde

Lista de figuras

- Figura 1. Representação esquemática do sistema hematopoiético normal e em Leucemia Mielóide Aguda.25
- Figura 2. Características da proteína MLL. A) Estrutura molecular conservada da proteína MLL selvagem. A clivagem de MLL resulta nos fragmentos MLLN e MLLC. Na figura estão contidos os domínios ganchos-AT, a região de homologia com DNA metiltransferase, os domínios PHD e SET; B) Frequência dos parceiros de MLL em LMA pediátrica e em adultos; C) Funções dos parceiros de fusão de MLL descritos na literatura.....28
- Figura 3. Representações esquemáticas: A) estrutura química da Citidina, Desoxicitidina e da Citosina-arabnosídeo (Ara-C); B) Metabolismo do Ara-C; C) Mecanismo de ação do Ara-C.31
- Figura 4. Modelo da arquitetura evolutiva clonal do diagnóstico à recaída.....34
- Figura 5. Fluxo de trabalho aplicado à tecnologia de RNA-seq. Em (A), está disposto o procedimento experimental, e em (B), a descrição do processo de análise dos dados por ferramentas de bioinformática.44
- Figura 6. Curvas de crescimento das células das linhagens MV-4-11, THP-1, NOMO-1 e MOLM-14 demonstram que MV-4-11 apresenta crescimento celular mais acelerado que as demais linhagens.47
- Figura 7. Caracterização das linhagens celulares de LMA-MLL quanto a marcadores de células hematopoiéticas: marcador de linhagem mielóide - CD33 (quadro A, esquerda) e linfóide - CD19 (quadro B, direita): as linhagens apresentam o fenótipo $CD33^{+}CD19^{-}$49
- Figura 8. Caracterização das linhagens celulares de LMA-MLL quanto a marcadores de células-tronco hematopoiéticas: marcador CD34 (quadro A, esquerda) e CD38 (quadro B, direita): as linhagens apresentam o fenótipo $CD34^{-}CD38^{+}$51
- Figura 9. Curva dose X resposta para as células MV-4-11 (A), expostas às seguintes concentrações de Ara-C: 1, 10, 20, 40 e 50 μ M; THP-1 (B), NOMO-1 (C) e MOLM-14 (D), expostas a 1 μ M e 10 μ M. Em vermelho, estão destacadas as concentrações as quais as células foram mantidas durante o tratamento em longo prazo com a droga.53
- Figura 10. A linhagem celular MV-4-11 apresentou uma redução no potencial proliferativo após o tratamento em longo prazo com Ara-C maior que nas demais linhagens celulares. Na figura, estão representadas as curvas de crescimento para: A) MV-4-11 Parental e resistente ao Ara-C; B) THP-1 Parental e resistente; C) NOMO-1 Parental e resistente; e, D) MOLM-14 Parental e resistente à droga.54
- Figura 11. As linhagens celulares resistentes ao Ara-C permaneceram sensíveis à droga, mas apresentaram resposta diferente das células parentais. Nos gráficos estão mostrados: (A) A proliferação em resposta a 10 μ M de Ara-C nas células MV-4-11 parentais e resistentes; (B) A proliferação em resposta a 2 μ M de Ara-C nas células THP-1 parentais e resistentes, e (C) nas

células NOMO-1 parentais e resistentes; e, (D) A proliferação em resposta a 1µM de Ara-C nas células MOLM-14 parentais e resistentes.	55
Figura 12. Redução no conteúdo de células apoptóticas (sub-G1) e aumento de células em fase de síntese (S) na linhagem MV-4-11 resistente quando comparada à parental.	57
Figura 13. Redução no conteúdo de células apoptóticas (sub-G1) na linhagem THP-1 resistente quando comparada à parental.	59
Figura 14. Redução no conteúdo de células apoptóticas (sub-G1) na linhagem NOMO-1 resistente quando comparada à parental	60
Figura 15. As células MOLM-14 parentais não apresentaram diferenças significativas das células resistentes. A figura representa as células MOLM-14 parentais e resistentes com Ara-C	61
Figura 16. As células MV-4-11 resistentes apresentaram distribuição bimodal com relação ao marcador CD38. Os gráficos representam os dados obtidos por citometria de fluxo com marcação para os anticorpos CD34 e CD38 para as células: A) MV-4-11 parental e resistente ao Ara-C; B) THP-1 parental e resistente; C) NOMO-1 parental e resistente; e, D) MOLM-14 parental e resistente.	63
Figura 17. Definição dos intervalos para separação das subpopulações MV-4-11 CD38 ^{Low} e MV-4-11 CD38 ^{High} . Nos histogramas estão representados em (A) MV-4-11 parentais, que serviram como controle para o sorting, e em (B) as células MV-4-11 tratadas. A análise separou as subpopulações em MV-4-11 CD38 ^{Low} (P8) e MV-4-11 CD38 ^{High} (P7).	65
Figura 18. As células MV-4-11 CD38 ^{Low} são mais resistentes ao Ara-C que MV-4-11 CD38 ^{High} . (A) Curvas de crescimento das células das linhagens MV-4-11 CD38 ^{Low} e MV-4-11 CD38 ^{High} . (B) Resposta à exposição a 10µM de Ara-C para as células MV-4-11 CD38 ^{Low} e MV-4-11 CD38 ^{High}	66
Figura 19. Comportamento no ciclo celular das linhagens MV-4-11 CD38 ^{Low} e MV-4-11 CD38 ^{High} . As células MV-4-11 CD38 ^{Low} estão representadas no lado esquerdo da figura, e MV-4-11 CD38 ^{High} , do lado direito. Os seguintes tratamentos foram aplicados: 1) experimento controle; e, 2) células expostas ao Ara-C por 72 horas	68
Figura 20. Análise de componente principal (PCA) dos dados do perfil de expressão global das células MV-4-11 parentais (P), e das subpopulações MV-4-11 CD38 ^{High} (H) e MV-4-11 CD38 ^{Low} (L).	71
Figura 21. Número de genes diferencialmente expressos entre as células MV-4-11 Parental versus MV-4-11 CD38 ^{Low} , MV-4-11 Parental versus MV-4-11 CD38 ^{High} e MV-4-11 CD38 ^{Low} versus MV-4-11 CD38 ^{High}	72
Figura 22. <i>Heatmap</i> de expressão dos genes <i>HOX</i> . O cluster <i>HOXD</i> foi excluído da análise por não ser expresso em células hematopoiéticas	76

Figura 23. <i>Heatmap</i> de expressão dos genes que codificam enzimas metabolizadoras de Ara-C.	77
Figura 24. <i>Heatmap</i> de expressão dos genes da via de reparo de pareamento incorreto ou <i>Mismatch repair</i> (MMR).	78
Figura 25. <i>Heatmap</i> de expressão dos genes da via de reparo por excisão de bases ou <i>Base Excision Repair</i> (BER).	79
Figura 26. <i>Heatmap</i> de expressão dos genes das vias de reparo por excisão de nucleotídeos ou <i>Nucleotide Excision Repair</i> (NER) e reparo direto.	80

Lista de tabelas

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão do número de células MV-4-11 parentais e resistentes ao Ara-C referentes à análise de ciclo celular com coloração de Iodeto de Propídeo (PI) e citometria de fluxo.....	58
Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão do número de células MOLM-14 parentais e resistentes ao Ara-C referentes à análise de ciclo celular com coloração de Iodeto de Propídeo (PI) e citometria de fluxo.....	62
Tabela 3. Média $\pm$ desvio padrão do número de células MV-4-11 CD38 ^{Low} e MV-4-11 CD38 ^{High} referentes à análise de ciclo celular com coloração de Iodeto de Propídeo (PI) e citometria de fluxo.....	69
Tabela 4. Funções biológicas mais representativas na análise de ontologia gênica (GO) dos genes diferencialmente expressos na análise de RNA-seq entre as células MV-4-11 CD38 ^{Low} e MV-4-11 CD38 ^{High} com $\log_2(\text{fold change}) \geq 4$	74
Tabela 5. Alterações na expressão gênica entre as células MV-4-11 CD38 ^{Low} e MV-4-11 CD38 ^{High} observadas na análise de RNA-seq com $\log_2(\text{fold change}) \geq 4$	114
Tabela 6. Análise de ontologia gênica (GO) para a categoria Processo Biológico, dos genes diferencialmente expressos na análise de RNA-seq entre as células MV-4-11 CD38 ^{Low} e MV-4-11 CD38 ^{High} com $\log_2(\text{fold change}) \geq 4$	138

Sumário

INTRODUÇÃO	22
I. Introdução.....	23
1.1. Referencial teórico	23
1.1.1. O sistema hematopoiético: Hematopoiese normal x Leucemogênese	23
1.1.2. Leucemia Mielóide Aguda (LMA)	25
1.1.3. Leucemia Mielóide Aguda portadora do rearranjo MLL - 11q23	26
1.1.4. Tratamento convencional: Citarabina (Ara-C).....	30
1.1.5. Sistemas de reparo de DNA	32
1.1.6. Quimiorresistência e seleção clonal	34
OBJETIVOS	36
II. Objetivos.....	37
2.1. Objetivo geral	37
2.2. Objetivos específicos	37
MATERIAL E MÉTODOS	38
III. Material e métodos	39
3.1. Cultivo celular.....	39
3.2. Citarabina (Ara-C)	40
3.3. Estratégia de tratamento com Ara-C das linhagens celulares de LMA-MLL	40
3.4. Caracterização das células parentais (não expostas ao Ara-C) e das células tratadas em longo prazo com a droga.....	41
- Perfil imunofenotípico	41
-Curva dose x resposta e potencial proliferativo	41
- Análise de ciclo celular	42
3.5. Extração de RNA total e construção das bibliotecas de cDNA	43
3.6. Sequenciamento do transcriptoma em larga escala – RNA-seq	43
3.7. Análise dos dados de RNA-seq	44
RESULTADOS	46
IV. RESULTADOS.....	47
4.1. Caracterização das linhagens celulares MV-4-11, THP-1, NOMO-1 E MOLM-14	47
- A taxa de proliferação celular da linhagem celular MV-4-11 é mais elevada que a das demais linhagens celulares	47
- As linhagens celulares apresentam fenótipo CD33 ⁺ CD19 ⁻ CD34 ⁻ CD38 ⁺	48
- As células MV-4-11 são menos sensíveis ao Ara-C que as demais linhagens celulares	52

4.2. Caracterização das células MV-4-11, THP-1, NOMO-1 e MOLM-14 antes e após o tratamento em longo prazo com Ara-C.....	53
- Cinética de crescimento celular e tempo de duplicação	54
- Comportamento das linhagens celulares após exposição ao Ara-C por 4-5 dias	55
- Morte celular (fração sub-G1) reduzida nas células tratadas em longo versus parentais	56
- As células MV-4-11 apresentaram distribuição bimodal quanto ao marcador CD38 após o tratamento em longo prazo	63
4.3. Caracterização das subpopulações celulares MV-4-11 CD38 ^{Low} e MV-4-11 CD38 ^{High}	65
- As células MV-4-11 CD38 ^{Low} e MV-4-11 CD38 ^{High} apresentam resposta diferencial ao Ara-C	65
- Comportamento das subpopulações MV-4-11 CD38 ^{Low} e MV-4-11 CD38 ^{High} no ciclo celular	67
- Perfil de expressão global diferencial das células MV-4-11 parental, e das subpopulações MV-4-11 CD38 ^{High} e MV-4-11 CD38 ^{Low}	70
DISCUSSÃO	81
V. Discussão	82
CONCLUSÕES	94
VI. Conclusões	95
REFERÊNCIAS	97
VII. Referências.....	98
ANEXO A	107
Anexo A.....	108
ANEXO B	111
Anexo B.....	112
APÊNDICE 1	113
APÊNDICE 1	114
APÊNDICE 2	137
Apêndice 2.....	138
APÊNDICE 3: MANUSCRITO	149
Apêndice 3.....	150
Manuscrito	150

I. Introdução

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma doença clonal heterogênea resultante do bloqueio da diferenciação de células da linhagem mielóide (Frohling *et al.*, 2005). De acordo com a Associação franco-americana-inglesa (FAB, do inglês *French-American-British Association*), a LMA é classificada em dez tipos distintos, dentre estes, M4 (leucemia mielomonocítica) e M5 (leucemia monocítica), em que 6 a 8% dos casos estão associados ao rearranjo do gene *MLL* (Bennett *et al.*, 1985). O gene *MLL* codifica uma proteína encontrada em fusão com mais de 60 proteínas diferentes, e tais parceiros de fusão de *MLL* desempenham funções que vão desde a regulação da expressão gênica até organização do citoesqueleto, e participação no ciclo celular (Bernt e Armstrong, 2011).

Em LMA, a quimioterapia convencionalmente aplicada baseia-se na combinação dos agentes Citarabina (Ara-C) e uma antraciclina. Ara-C é um nucleosídeo análogo de citosina, que em sua forma ativa - Ara-CTP, é incorporado, e inibe a síntese do DNA por meio da competição com o substrato natural (desoxicitosina) (Prenkert, 2010). Apesar de responderem satisfatoriamente ao tratamento com Citarabina e serem consideradas mais sensíveis à droga que outras leucemias (Stam *et al.*, 2006), as leucemias que apresentam a fusão do gene *MLL* estão relacionadas com a alta taxa de recaída à doença de 40-60% (Balgobind *et al.*, 2009).

Visto que, aparentemente, o prognóstico desfavorável da LMA-*MLL* não é atribuído a alterações nos níveis de expressão das enzimas metabolizadoras de Ara-C (Stam *et al.*, 2006), a presente tese de Doutorado propôs estudar a relação entre características imunofenotípicas, capacidade proliferativa e expressão gênica em subpopulações de linhagens celulares portadoras do rearranjo *MLL*, submetidas ao tratamento em longo prazo com Ara-C (aproximadamente 12 semanas) com a finalidade de compreender um pouco mais sobre as bases da resistência ao Ara-C em LMA-*MLL*.

1.1. Referencial teórico

1.1.1. O sistema hematopoiético: Hematopoiese normal x Leucemogênese

O sistema hematopoiético é fundamental à manutenção da vida. O equilíbrio entre a produção e a apoptose das células do sangue e do sistema imunológico, bem como a manutenção da composição do plasma, é vital aos processos de oxigenação e nutrição dos tecidos e aos processos de defesa e homeostase do organismo. Na hematopoiese normal a

célula-tronco hematopoiética (HSC, do inglês *Hematopoietic Stem Cell*) dá origem às células precursoras multipotentes que originam os precursores linfóides e mielóides oligopotentes. O precursor linfóide é responsável pela produção e renovação dos linfócitos T, B e das células Natural Killer (Bennett *et al.* (1985). O precursor mielóide é responsável pela produção e renovação de hemácias, plaquetas, basófilos, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (Hoffbrand *et al.*, 2008). A hematopoiese pode ser comprometida pelo acúmulo sequencial de múltiplos eventos genéticos e epigenéticos que desencadeiam a desregulação da produção e função dos glóbulos brancos (Nguyen *et al.*, 2012) em um processo conhecido como leucemogênese.

A classificação geral agrupa as leucemias de acordo com a linhagem acometida e a progressão da doença em: 1) Leucemia Mielóide Aguda (LMA), 2) Leucemia Mielóide Crônica (LMC), 3) Leucemia Linfóide Aguda (LLA) e 4) Leucemia Linfóide Crônica (LLC). Conforme esta classificação, as leucemias mielóides atingem as linhagens mielóides e as linfóides, as células linfoides (WHO, *World Health Organization*). Além disso, a principal diferença entre as formas aguda e crônica é que as leucemias agudas são doenças de progressão rápida em que as células perdem a capacidade de se diferenciar, o que resulta no acúmulo de células imaturas denominadas blastos com função e proliferação celular anormais (Herrmann *et al.*, 2012), enquanto que nas leucemias crônicas há um acúmulo de células diferenciadas que conseguem realizar algumas funções no organismo. Portanto, a doença tem uma progressão mais lenta (Albitar, 2011).

Ainda sobre as leucemias agudas, sabe-se que a célula de origem pode consistir tanto na HSC como em células progenitoras que sofrem mutações e adquirem capacidade de auto-renovação (Head, 2008), conforme demonstrado na figura 1, no modelo de Leucemia Mielóide Aguda. A HSC passa então a ser chamada de célula-tronco leucêmica (LSC, do inglês *Leukemic stem cell*).

Figura 1. Representação esquemática do sistema hematopoiético normal e em Leucemia Mielóide Aguda. Retirado e modificado de Majeti Lab, Stanford, School of Medicine (2012).

1.1.2. Leucemia Mielóide Aguda (LMA)

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma doença hematológica clonal agressiva, que apresenta um bloqueio na diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas e alteração da regulação da proliferação celular. Como consequência da produção anormal de células da medula óssea ocorre insuficiência hematopoiética (granulocitopenia, trombocitopenia ou anemia), com ou sem leucocitose (Frohling *et al.*, 2005). A LMA corresponde a cerca de 25% de todas as leucemias sendo mais frequente em adultos (85%) do que em crianças (15%) (Deschler, 2008).

Devido à ampla heterogeneidade clínica e biológica das leucemias mielóides agudas, alguns critérios classificatórios são adotados pelo grupo cooperativo franco-americano-inglês (FAB, do inglês *French-American-British Association*) e pela Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*). De acordo com os critérios adotados pela FAB, a disposição celular e as características citoquímicas dos blastos (células imaturas) de portadores deste tipo de leucemia permitem sua classificação nos seguintes subtipos: (M0) leucemia indiferenciada, (M1) leucemia mielóide aguda sem diferenciação, (M2) leucemia mielóide aguda com diferenciação, (M3) leucemia promielocítica, (M4) leucemia

mielomonocítica, (M5) leucemia monocítica, (M5a) leucemia monocítica sem diferenciação, (M5b) leucemia monocítica com diferenciação, (M6) eritroleucemia e (M7) leucemia megacariocítica (Bennett *et al.*, 1985).

Na classificação adicional adotada pela WHO, os critérios de classificação baseiam-se em análise de morfologia, imunofenotipagem, citogenética e genética molecular. O limite de blastos para o diagnóstico da LMA é reduzido de 30% (Placke *et al.*, 2014) para 20% (WHO) na análise em sangue periférico ou medula óssea, e a LMA é classificada em: 1) LMA com anomalias genéticas: a) presença do rearranjo t(8;21)(q22;q22), que resulta na proteína de fusão *AML1-ETO*, b) presença de eosinófilos anormais na medula óssea e rearranjo inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22), que resulta na fusão *CBF-MYH11*, c) leucemia promielocítica aguda com o rearranjo t(15;17)(q22;q12), que resulta na fusão *PML-RARA* e variantes e, d) presença do rearranjo 11q23, que envolve o gene *MLL*); 2) LMA com displasias em múltiplas linhagens celulares: a) em decorrência de síndrome mielodisplásica (MDS) ou doença mielodisplásica/mieloproliferativa (MDS/MPD) e, b) não-decorrente de MDS ou MDS/MPD, porém, com apresentação de ao menos 50% de células displásicas em duas ou mais linhagens mielóides; 3) LMA e MDS em decorrência de terapias: a) com agentes alquilantes/radiação, e b) com inibidores de Topoisomerase II. Outras classificações são aplicadas quando nenhuma das anteriores pode ser atribuída (Vardiman *et al.*, 2002).

De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, anomalias cromossômicas facilitam a predição do prognóstico (ACS, 2014). A translocação t(8;21), em que o gene *AML1* pode encontrar-se fusionado ao gene *MTG8* (Ruddle *et al.*, 1994), presente em 5–10% dos pacientes com LMA, está associado a um prognóstico favorável, assim como a inversão/translocação no cromossomo 16, e a translocação entre os cromossomos 15 e 17. Dentre as leucemias consideradas de prognóstico desfavorável encontram-se aquelas associadas à deleção parcial dos cromossomos 5 ou 7, translocação/inversão no cromossomo 3 e ao rearranjo no gene *MLL* (região 11q23) (Zeijlemaker *et al.*, 2013).

1.1.3. Leucemia Mielóide Aguda portadora do rearranjo *MLL* - 11q23

A LMA caracterizada pela presença de translocações no gene *MLL* (do inglês, *Mixed Lineage Leukemia*), localizado na região 11q23, é encontrada em até 10% dos casos de LMA [(Huret, Dessen e Bernheim, 2000) *Apud* (Krivtsov e Armstrong, 2007)]. O gene *MLL*

codifica uma proteína remodeladora de cromatina, que pode encontrar-se rearranjada com mais de 70 proteínas de fusão diferentes, que são correlacionados ao fenótipo e prognóstico da doença (Meyer *et al.*, 2009; Bernt e Armstrong, 2011). Dentre as proteínas de fusão identificadas, cerca de trinta residem no núcleo, enquanto as outras localizam-se no citoplasma ou foram associadas à membrana celular ou mesmo possuem localização extracelular (Marschalek, 2010).

O gene *MLL* foi identificado em 1991, e quando caracterizado observou-se que ele apresenta 36 éxons. O produto de mRNA de 12kb quando traduzido gera uma proteína de 3968 aminoácidos e de massa molecular de aproximadamente 430 kD (Ilencikova e Kolenova, 2013). A estrutura molecular do gene *MLL*, bem como proteínas de fusão conhecidas estão representadas na figura 2.

A proteína codificada pelo gene *MLL* apresenta função importante na regulação da expressão gênica durante o processo inicial do desenvolvimento e na hematopoiese. Ela contém múltiplos domínios funcionais conservados, e entre os domínios com funções caracterizadas estão SET, PHD e os ganchos-AT (do inglês, *AT hooks*) (Figura 2A). Salienta-se que o domínio SET media a metilação de histonas em um resíduo específico de lisina, e os ganchos-AT apresentam uma região homóloga às DNAs metiltransferases (DNMTs) (Milne *et al.*, 2002), portanto, eles são importantes à atividade de *MLL*.

A proteína *MLL* é processada pela enzima Taspase 1 em dois fragmentos, *MLL*^N e *MLL*^C. Estes fragmentos posteriormente são reassociados para formar complexos multiprotéicos que remodelam a cromatina em regiões de genes-alvo específicos, entre eles, genes *HOX* (Marschalek, 2010).

Nas leucemias, *MLL* pode estar rearranjada com proteínas de fusão, e os parceiros mais frequentes (aproximadamente 80% dos casos) são: t(4;11)(q21;q23) ou *MLL-AF4*; t(9;11)(p22;q23) ou *MLL-AF9*; t(11;19)(q23;p13.3) ou *MLL-ENL*; t(10;11)(p12;q23) ou *MLL-AF10*; e t(6;11)(q27;q23) ou *MLL-AF6* (Krivtsov e Armstrong, 2007), como mostrado na figura 2B. Na figura 2C estão representadas algumas destas proteínas conhecidas e suas funções.

Figura 2. Características da proteína MLL. A) Estrutura molecular conservada da proteína MLL selvagem. A clivagem de MLL resulta nos fragmentos MLL^N e MLL^C. Na figura estão contidos os domínios ganchos-AT, a região de homologia com DNA metiltransferase, os domínios PHD e SET; B) Frequência dos parceiros de MLL em LMA pediátrica e em adultos; C) Funções dos parceiros de fusão de MLL descritos na literatura. Retirado de (Muntean e Hess, 2012) e (Marschalek, 2010).

A presença do rearranjo MLL nas leucemias é marcada pela desregulação de determinados genes *HOX*, fatores de transcrição da família homeodomínio que também são expressos em níveis elevados durante a auto-renovação da HSC, e inibidos durante sua diferenciação (Roboz, 2011). As proteínas de fusão MLL inibem a regulação negativa destes genes *HOX* durante a diferenciação da HSC, o que resulta no bloqueio da diferenciação hematopoiética. Além disso, neste subtipo de LMA, um aumento na expressão dos transcritos de *HOX* está associado ao prognóstico ruim (Hess, 2004; Shah e Sukumar, 2010).

Os genes *HOX* foram primeiramente descritos em *Drosophila*, e são considerados genes mestres do desenvolvimento que especificam a identidade posicional das células no embrião em desenvolvimento (Bridges e Morgan, 1923). Em mamíferos, os genes *HOX* são distribuídos em quatro clusters (*HOX A, B, C e D*), e totalizam 39 genes (Scott, 1992). Os mecanismos que dirigem sua expressão gênica são conservados há 600 milhões de anos

(Ruddle *et al.*, 1994), e estudos descreveram diversos fatores de transcrição, proteínas modificadoras de histona e da maquinaria remodeladora de cromatina, bem como, RNAs não codificadores (microRNAs e lncRNAs) que participam na regulação dos genes *HOX* (Agger, *et al.*, 2007; Beck *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2010; Kogo *et al.*, 2011).

A associação entre a desregulação dos genes *HOX* na LMA portadora do rearranjo MLL estimulou pesquisadores a realizarem triagens de compostos possivelmente associados a eventos da leucemogênese. Um exemplo promissor é a proteína DOT1L, uma histona metiltransferase envolvida na superexpressão de genes *HOXA* nas leucemias MLL. Por meio da metodologia de imunoprecipitação de cromatina, Nguyen e colaboradores (2011) verificaram que DOT1L está diretamente envolvido nesta desregulação. Os pesquisadores utilizaram células transformadas com o gene de fusão *MLL-AF9* comparadas a células progenitoras hematopoiéticas, marcadas com um anticorpo que reconhece di e trimetilação na histona H3K79 (H3K79me2/3), marca epigenética associada à ativação da expressão gênica. Foi detectado aumento de metilação preferencial em *HOXA5*, *HOXA9* e *HOXA10* - genes envolvidos na leucemogênese, além de *MEIS1*, gene homeobox que pertence a família TALE (do inglês, *three amino acid loop extension*), e é um cofator de *HOX* (Nguyen *et al.*, 2011).

Com o uso de um inibidor de DOT1L, a metilação de H3K79, assim como a proliferação dos blastos leucêmicos seriam reduzidas apenas nas células que contêm o rearranjo MLL, o que possibilitaria a especificidade deste agente terapêutico e a redução da citotoxicidade às células normais (Daigle *et al.*, 2013). De fato, estudos *in vivo* com inibidores de DOT1L demonstraram que um composto denominado EPZ-5676 apresentou regressão significativa do tamanho do tumor portador do rearranjo MLL, seja administrado por via intraperitoneal ou intravenosa. A superioridade e especificidade deste inibidor em relação a outros inibidores de DOT1L, assim como a tolerância fisiológica em animais, fizeram com que EPZ-5676 fosse selecionado para o desenvolvimento de uma droga que está atualmente na fase 1 dos ensaios clínicos (Chen e Armstrong, 2015).

Embora EPZ-5676, como agente único, tenha apresentado efeito antiproliferativo significativo em estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, a prática clínica tende a combinar agentes quimioterápicos para atingir resposta máxima nos pacientes com câncer. A combinação do agente quimioterápico convencional utilizado no tratamento de LMA, a citarabina (Ara-C), com o inibidor EPZ-5676 foi proposta por Klaus e colaboradores (2014), que demonstraram um efeito sinérgico na capacidade de reduzir a proliferação celular. A

combinação entre os agentes levou ao aumento tanto na apoptose quanto na diferenciação e no amadurecimento das células, após 10-14 dias de exposição às drogas, demonstrando sucesso na combinação de agentes tradicionais com novas drogas específicas no tratamento das leucemias (Klaus *et al.*, 2014).

1.1.4. Tratamento convencional: Citarabina (Ara-C)

A droga mais amplamente utilizada no tratamento de LMA, conhecida como citosina-arabnosídeo, citarabina ou Ara-C, foi sintetizada no final da década de 1950, e passou a ser utilizada no tratamento de leucemias mielóides agudas, leucemias linfóides agudas e linfomas não-Hodgkin por ser um análogo do nucleosídeo citosina incorporado durante a fase de síntese (S) do ciclo celular no processo de replicação do DNA, e em consequência inibe a proliferação celular (Mathews, 2012). A terapia de indução baseia-se em uma antraciclina combinada à citarabina. O regime mais comum no tratamento de adultos consiste na administração de 45–60 mg/m² de daunorubicina por três dias, e 200 mg/m² de citarabina que pode ser administrado em duas doses diárias em bolus ou infusão contínua ao longo de 12 horas por 7-10 dias. Embora a infusão contínua de citarabina ao longo de 10 dias tenha sido amplamente utilizada, não há evidência de que este regime seja superior ao de sete dias, e ele pode estar associado à maior citotoxicidade (Milligan *et al.*, 2006).

Para compreender a ação do Ara-C, é importante compreender o mecanismo de metabolização da droga, que estão descritos a seguir e esquematizados na figura 3, que também apresenta a estrutura da citarabina comparada à da citidina. Primeiramente, o Ara-C permeia a membrana celular por meio do hENT1 (do inglês, *human Equilibrative Nucleoside Transporter 1*). Após a entrada, o composto necessita ser ativado por meio de uma cascata de eventos: 1) Ara-C é fosforilado a Ara-CMP, 2) Ara-CDP, e finalmente à sua forma ativa, 3) Ara-CTP, processos catalisados respectivamente pelas enzimas dCK (do inglês, *Deoxycytidine Kinase*), UMP-CMP (*CMPK1 Cytidine Monophosphate (UMP-CMP) Kinase 1*) e NDK (*Nucleoside Diphosphate Kinase*). Duas enzimas atuam como antagônicas ao processo de ativação do Ara-C até Ara-CTP: PN-I (do inglês, *Pyrimidine Nucleotidase 1*) que inibe a fosforilação a Ara-CTP, além de, CDA (*Cytidine Deaminase*) e dCMPD (*Deoxycytidylate Deaminase*) que reduzem a oferta de Ara-C que seria fosforilado até sua forma ativa Ara-CTP, por meio da desaminação de Ara-C para Ara-U e de Ara-CMP para Ara-UMP, por CDA e dCMPD, respectivamente (Stam *et al.*, 2006).

Por ser um análogo de citosina, a forma ativa Ara-CTP funciona como um substrato para a DNA polimerase, sendo incorporado ao DNA, e inibindo a síntese de DNA nuclear por meio dos seguintes mecanismos principais: 1) incorporação ao iniciador (*primer*) da replicação; 2) retardo da elongação da fita de DNA; 3) inibição da DNA primase; e, 4) quebra da fita dupla pela DNA topoisomerase (Prenkert, 2010) Figura 3C).

Figura 3. Representações esquemáticas: A) estrutura química da Citidina, Desoxicitidina e da Citosina-arabnosídeo (Ara-C); B) Metabolismo do Ara-C; C) Mecanismo de ação do Ara-C. Retirado e modificado de (Stam *et al.*, 2006) e (Palmer, 2014).

Em B, as enzimas metabolizadoras de Ara-C. hENT: *human equilibrative nucleoside transporter*; dCK: *deoxycytidine kinase*; PN-I: *Pyrimidine Nucleotidase I*; CDA: *Cytidine deaminase*; dCMPD: *Deoxycytidylate deaminase*; UMP-CMPK: *(Deoxy)cytidilate kinase*; NDKs: *Nucleoside diphosphate kinases*.

A polimerase pode conseguir sintetizar a fita de DNA após uma molécula de Ara-C ser incorporada. Se a síntese não prosseguir, o aparato de reparo de DNA será recrutado, e a base será excisada e repostada, o que leva a um retardo na síntese de DNA. Porém, se a DNA polimerase continuar a elongação da fita de DNA mesmo após a incorporação da molécula de Ara-C, o dano ao DNA será reconhecido como uma quebra de fita dupla (*double strand break*), que constitui um sítio preferencial para a DNA topoisomerase II cortar a dupla fita de DNA. Se houver falha na religação dos fragmentos na fita danificada, quebras cromossômicas podem ocorrer. Salienta-se que ambos os mecanismos são reconhecidos como sinais pró-apoptóticos (Cline e Osheroff, 1999).

Os primeiros estudos que objetivaram relacionar a alta taxa de recaída dos pacientes com LMA-MLL à resposta diferencial ao Ara-C, verificaram que a sensibilidade a esta droga não está relacionada ao metabolismo da droga (Mata *et al.*, 2006; Stam *et al.*, 2006; Jo *et al.*, 2009): tanto a expressão quanto a atividade de suas enzimas metabolizadoras, especialmente hENT, cDK e PH-I, não foi correlacionada à taxa de recaída à LMA-MLL ou sensibilidade à droga. Como hipótese alternativa para justificar a alta taxa de recidiva e a sensibilidade diferencial às drogas, acredita-se que outros mecanismos que acelerem a proliferação celular ou mesmo dificultem a morte celular estejam desregulados (Balgobind *et al.*, 2009; Krauter *et al.*, 2009).

Como exemplos de mecanismos associados à resposta diferencial a drogas, estão os sistemas de reparo que são ativados na célula mediante uma lesão no DNA. As vias de reparo mais comuns são o reparo de pareamento incorreto, reparo por excisão de bases, e reparo por excisão de nucleotídeos. Também há a síntese translesão, o reparo por recombinação homóloga e o reparo por junção das extremidades homólogas.

1.1.5. Sistemas de reparo de DNA

Qualquer evento que introduza uma variação na estrutura em dupla hélice do DNA representa uma ameaça à constituição genética da célula. A lesão ao DNA é minimizada por sistemas que reconhecem e corrigem o dano: os sistemas de reparo. Mais de 130 genes contribuem para o reparo de DNA em eucariotos, o que demonstra a importância deste sistema (Lewin, 2009).

A via de reparo por pareamento incorreto (MMR, do inglês *mismatch repair*) mantém a integridade do genoma por meio do reparo espontâneo de danos no DNA decorrentes do processo de replicação. MSH2 e MSH6 formam o heterodímero MUTS α que inicia o reparo de pareamento incorreto. Outro heterodímero, MUTS β , formado pelas proteínas MSH2 e MSH3, media o reparo de *loops* de inserção-deleção, mas não apresenta atividade de reparo de pareamento incorreto. A seguir, o recrutamento de MUTL α (heterodímero de MLH1 e PMS2) facilita a excisão da fita, o preenchimento do espaço onde ocorreu a excisão, e finalmente o DNA é restaurado à sua estrutura original (Allan e Travis, 2005).

Outra via de reparo conhecida é a do reparo por excisão de bases. Mecanismos associados a este sistema de reparo foram primeiramente demonstrados por meio da remoção

da uracila incorporada ao DNA pela enzima Uracil-DNA-glicosilase (Gupta *et al.*, 2010), e as lesões mais comumente reconhecidas por esta via de reparo são os sítios apurínicos (ausência da purina). Embora pareça que a via BER evoluiu para proteger a célula contra efeitos endógenos de danos ao DNA, esta via é essencial à resistência a danos decorrentes da exposição a agentes exógenos, tais quais radiação ionizante e outros agentes indutores de radicais (Hatahet *et al.*, 1994; Seeberg *et al.*, 1995).

Além das glicosilases, as polimerases PARP1 e 2 desempenham papel central no reparo por excisão de bases. PARP liga-se ao DNA por meio do motivo dedo de zinco em sua extremidade N-terminal, e recruta outras enzimas essenciais ao reparo por excisão de bases. Aumento na atividade de PARP é reconhecido como um mecanismo pelo qual as células tumorais evitam apoptose causada por agentes que danificam o DNA. Portanto, PARP é considerada um alvo para a quimioterapia em câncer (Fathi *et al.*, 2010).

O sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) incorpora a excisão de bases danificadas como parte de um fragmento oligonucleotídico, ao contrário da via de reparo por excisão de bases, em que a base inapropriada ou danificada é excisada como base livre, ou da via MMR, em que a base incorretamente pareada é excisada como um único nucleotídeo. A reconstituição *in vitro* da via NER indicou que os processos de síntese e ligação do DNA reparado podem estar fisicamente ligados por meio da interação entre a DNA ligase I e a proteína PCNA (Friedberg, 2001).

Sabe-se que níveis elevados de expressão em genes de reparo permitem que células com acúmulo de danos no DNA, corrijam regiões danificadas e evitem apoptose e envelhecimento celular, aspectos importantes para os mecanismos de quimiorresistência que sugerem vias de reparo como alvos de novas terapias (Esposito e So, 2014).

Além da desregulação dos mecanismos de reparo de DNA, a quimiorresistência está associada a: 1) quiescência da LSC que protege a célula da ação de fármacos incorporados ao DNA durante a síntese (Lapidot *et al.*, 1994); 2) a interferência do microambiente tumoral por meio de mecanismos de contato direto via interações célula-célula ou célula-matriz extracelular (Nervi *et al.*, 2009), que protegem a célula leucêmica; ou ainda, 3) alterações genéticas/epigenéticas em subclones celulares leucêmicos que favorecem a manutenção/proliferação de células resistentes à droga.

1.1.6. Quimiorresistência e seleção clonal

Os avanços tecnológicos recentes possibilitam que o genoma/exoma/transcriptoma do câncer sejam completamente sequenciados, o que contribui com a pesquisa de evolução e seleção clonais em LMA. Por meio da combinação de abordagens experimentais, três modelos de evolução clonal foram propostos para explicar a recaída ao câncer: A) os clones celulares após o tratamento são idênticos à amostra no momento do diagnóstico e alterações genômicas novas não são adquiridas; B) o clone após o tratamento evolui do clone do diagnóstico com mutações lineares derivadas; ou ainda, como mais frequente; e, C) o clone após o tratamento evolui de um clone menor com mutações genômicas novas ou rearranjos estruturais adquiridos (Bachas *et al.*, 2012; Bahlis, 2012) (Figura 4).

Figura 4. Modelo da arquitetura evolutiva clonal do diagnóstico à recaída. Retirado de (Bahlis, 2012).

Embora, em geral, a quimioterapia induza morte celular, inibição da proliferação e redução da massa tumoral, muitos pacientes recaem à doença, possivelmente devido à grande heterogeneidade celular e de resposta ao tratamento ocasionada pela resistência à droga quimioterápica.

Conhecidos os mecanismos de metabolização e ação do Ara-C, a alta taxa de recaída à doença de pacientes com LMA, e a hipótese de seleção clonal associada à resistência ao Ara-C, o presente estudo objetiva avaliar as características que diferenciam subpopulações de

linhagens celulares de LMA-MLL mais resistentes ao Ara-C, selecionadas a partir de tratamento em longo prazo com a droga, das linhagens celulares não expostas à droga, tratadas aqui como linhagens parentais. As características observadas neste estudo incluem: 1) características fenotípicas relacionadas ao fenótipo da HSC; 2) resposta no ciclo celular (resposta proliferativa em presença e ausência de Ara-C; e 3) alterações em nível de transcriptoma das células após o tratamento com a droga.

II. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito biológico do agente quimioterápico Citarabina (Ara-C) em um modelo *in vitro* de seleção em longo prazo com a droga de subpopulações de linhagens celulares de Leucemia Mielóide Aguda portadoras do rearranjo MLL, com foco na resistência ao Ara-C.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Selecionar subpopulações celulares mais resistentes ao Ara-C em linhagens de Leucemia Mielóide Aguda portadoras do rearranjo MLL (MV-4-11, THP-1, NOMO-1 e MOLM-14), por meio da exposição em longo prazo à droga;
- 2) Caracterizar as células das linhagens parentais e suas derivadas resistentes quanto a: A) perfil imunofenotípico relativo aos marcadores de linhagem mielóide (CD33) e linfóide (CD19), e aos marcadores clássicos associados ao fenótipo da célula-tronco hematopoiética (CD34 e CD38); B) potencial proliferativo na ausência e presença da droga (inibição proliferativa); e, C) comportamento no ciclo celular;
- 3) Selecionar uma das linhagens parentais e a sua derivada resistente ao Ara-C, para realizar o sequenciamento completo do transcriptoma;
- 4) Enriquecer processos biológicos associados à resposta diferencial ao Ara-C;
- 5) Verificar se alterações nos perfis de expressão de vias de reparo de DNA, enzimas metabolizadoras de Ara-C e vias do desenvolvimento estão associadas a vantagens proliferativas associadas à resposta ao tratamento com Ara-C;
- 6) Evidenciar genes diferencialmente expressos e potencialmente envolvidos no processo de resposta diferencial ao Ara-C.

MATERIAL E MÉTODOS

III. Material e métodos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP) sob o CAAE nº 09150112.7.0000.5440 (Anexo A), e pelo Comitê de Revisão Institucional – IRB (Institutional Review Board) do University Hospitals Case Medical Center – Case Western Reserve University, Cleveland-OH, sob o IRB# NHR-13-99 (Anexo B).

As linhagens celulares MV-4-11 (ATCC® CRL-9591™), THP-1 (ATCC® TIB-202™), NOMO-1 (ACC-542) e MOLM-14 (ACC-777) utilizadas neste estudo foram escolhidas por apresentarem o gene *MLL* rearranjado com os parceiros de fusão AF4 (MV-4-11) ou AF9 (THP-1, NOMO-1 e MOLM-14), e foram gentilmente cedidas pelos Drs. Chengkui Qu e David Wald - Case Western Reserve University, Cleveland-OH-EUA, e pelo Dr. Douglas Graham - University of Colorado Anschutz Medical Campus, Aurora-CO-EUA.

A autenticação das linhagens humanas quanto à sua natureza foi realizada por meio de análise de citometria de fluxo para marcadores de células humanas (CD45 e CD33), e quanto à presença dos rearranjos *MLL*-AF4 e *MLL*-AF9 por PCR em tempo real.

3.1. Cultivo celular

As células MV-4-11 foram cultivadas em meio Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% Penicilina/Estreptomicina. As células THP-1, NOMO-1 e MOLM-14 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% Penicilina/Estreptomicina. Todas as células foram mantidas em estufa a 37° C e 5% de CO².

Para a estocagem, as células foram colocadas em meio de congelamento contendo soro fetal bovino e 7-10% de dimetilsulfóxido (DMSO), e congeladas em freezer -80°C.

3.2. Citarabina (Ara-C)

O agente terapêutico Citarabina ou Ara-C (Sigma-Aldrich Co.) foi reconstituído em tampão fosfato-salino (PBS), filtrado e estocado a -20°C , em uma concentração de estoque de 100mM. A droga em concentração de trabalho foi diluída em PBS no momento do uso.

3.3. Estratégia de tratamento com Ara-C das linhagens celulares de LMA-MLL

As células MV-4-11, THP-1, NOMO-1 e MOLM-14 ($2 \times 10^5/\text{mL}$) foram expostas a diferentes doses do fármaco padrão utilizado no tratamento de LMA, Ara-C, para a construção das curvas dose X resposta, que determinaram a dose inicial da droga a ser utilizada no tratamento em longo prazo, assim como análises de viabilidade e proliferação celulares em diferentes tempos de exposição. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Experimentos piloto foram realizados com as células MV-4-11. Estas células foram expostas a concentrações que variaram de 1 a $50\mu\text{M}$ ao longo de 72 horas, e a viabilidade celular foi verificada a cada 24 horas. Com os resultados observados no experimento piloto, optou-se por manter as células MV-4-11 sob as concentrações de 1 e $10\mu\text{M}$ nas primeiras seis semanas do tratamento em longo prazo. Após este período de exposição à droga, a concentração de Ara-C foi aumentada de $1\mu\text{M}$ para $10\mu\text{M}$ ou de $10\mu\text{M}$ para $20\mu\text{M}$, e mantidas por aproximadamente mais seis semanas sob estas concentrações. O meio de cultura foi substituído por meio fresco a cada 72 horas ao longo de todo o experimento.

Ainda de acordo com os resultados observados para as células MV-4-11, foram propostas duas concentrações para o tratamento das células THP-1, NOMO-1 e MOLM-14: 1 e $10\mu\text{M}$ por um período de 120 horas. Após as 72 horas iniciais do experimento, o meio de cultura era substituído por meio fresco, e às células, adicionado Ara-C nas mesmas concentrações propostas, ou não era adicionada droga no caso do experimento controle.

As células THP-1, NOMO-1 e MOLM-14 foram mantidas na dose de $1\mu\text{M}$ de Ara-C, de acordo com os resultados observados no experimento anterior, e mantidas por um período de aproximadamente seis semanas. Após este tempo, a dose de Ara-C para as células THP-1 e NOMO-1 foi aumentada de 1 para $2\mu\text{M}$, e as células foram mantidas nesta concentração da

droga por mais seis semanas. Experimentos controles com as células não expostas à droga também foram realizados.

Durante as 12 semanas do tratamento prolongado, uma densidade mínima de 2×10^5 células/mL era mantida para todas as linhagens, pois em concentração inferior a esta, as células tendem a apresentar uma taxa de proliferação reduzida, segundo os bancos de células ATCC e DSMZ. Caso as células atingissem densidade inferior a 2×10^5 células/mL, o tratamento era interrompido e retomado assim que a densidade mínima de 2×10^5 /mL fosse atingida.

Ao término do tratamento (12 semanas), as células foram: 1) estocadas em freezer - 80°C , e 2) mantidas em cultura sem adição da droga para expansão celular até a obtenção do número suficiente para os ensaios de caracterização das células.

3.4. Caracterização das células parentais e das células resistentes

- Perfil imunofenotípico

As células das linhagens celulares MV-4-11, THP-1, NOMO-1 e MOLM-14 parentais (não expostas anteriormente ao Ara-C) e as células resistentes, tratadas em longo prazo com a droga, foram caracterizadas quanto à presença de marcadores de superfície celular característicos de células hematopoiéticas de linhagem mielóide e linfóide (CD33 e CD19, respectivamente), e de marcadores clássicos de células-tronco hematopoiéticas (CD34 e CD38). A análise foi realizada por citometria de fluxo (aparelho BD™ LSR II) e os seguintes anticorpos foram utilizados: CD34 (Anti-HPCA-2)-FITC, CD38-PE, CD19-PE (BD Biosciences) e CD33-PE (BD PharMingen®).

-Curva dose x resposta e potencial proliferativo

Após o tratamento prolongado com Ara-C, a expansão das células tratadas e das células parentais, as curvas do potencial proliferativo (células não tratadas com a droga) e de sobrevivência das células (expostas a 1 ou $10\mu\text{M}$ por 96 horas) foram determinadas por meio de contagem em câmara de Neubauer e viabilidade celular após coloração com azul de Trypan).

A partir das curvas de crescimento, foi possível calcular o tempo de duplicação (*Population Doubling Time*). Os cálculos foram realizados com a aplicação das fórmulas descritas abaixo e o auxílio do programa *Doubling time* (<http://www.doubling-time.com/compute.php>). Os ensaios foram realizados em duplicata ou triplicata.

$$DP = 3,3 \times \log_{10} (N_F/N_i)$$

$$TDP = 1/DP \text{ (já que as células foram contadas diariamente).}$$

Sendo:

DP = *Duplicação da população*
população

TDP = Tempo de duplicação da

N_F = Número final de células

N_i = Número inicial de células

Os gráficos foram montados com o auxílio do software GraphPad Prism V.5.01.

- Análise de ciclo celular

O iodeto de propídeo (PI, do inglês *propidium iodide*) é um corante fluorescente que se excita com um laser de 488nm, e marca conteúdos de DNA. Desta forma, com esta coloração é possível a demonstração e observação da relação existente entre ploidia e intensidade de fluorescência na quantificação de DNA, com representação esquemática em histogramas da distribuição das células nas fases do ciclo celular (Riccardi e Nicoletti, 2006). A replicação do DNA nuclear ocorre somente na fase S (período de síntese). O intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA é chamado de fase G1, e o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose é a fase G2 (DNA replicado). DNA fragmentado (conteúdo de DNA < 2n), geralmente originado de células apoptóticas, indica a fase sub-G1. Portanto, as células em fase sub-G1, representam o número relativo de células em apoptose.

Para a realização da análise de ciclo celular, as células das linhagens MV-4-11, THP-1, NOMO-1 e MOLM-14 parentais e as células resistentes à droga foram incubadas por 24, 48, 72 e/ou 96 horas com 1 ou 10µM de Ara-C, fixadas em metanol gelado e coradas com iodeto de propídeo. A análise foi realizada em citômetro de fluxo (equipamento Epics XL-MCL™ ou BD™ LSR II), os dados foram analisados com o auxílio do software Flow Jo

V.10.0.8, e o teste t para comparação de médias foi realizado com o auxílio do software GraphPad Prism V.5.01.

Os ensaios de ciclo celular foram realizados em duplicata.

3.5. Extração de RNA total e construção das bibliotecas de cDNA

As células MV-4-11 parentais e as células resistentes foram lisadas em tampão RLT Plus, e a extração do RNA total foi realizada com o RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen) segundo instruções dos fabricantes. Para a verificação da concentração e da pureza do RNA foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific), a partir da absorbância a 260nm, e razões 280/260nm e 260/230nm, respectivamente.

Quantidade e qualidade de RNA foram também acessadas em fluorímetro Qubit® (Life Technologies) e no Bioanalyzer RNA Nano/Pico chip (Agilent Technologies) pelo Núcleo de Sequenciamento Genômico na Case Western Reserve University, Cleveland-OH-EUA.

O Núcleo de Sequenciamento Genômico foi o responsável pela produção das bibliotecas de cDNA com o uso do TruSeq® Stranded Total RNA Sample Prep Kit (Illumina), e pelo sequenciamento do RNA das amostras enviadas em triplicata.

3.6. Sequenciamento do transcriptoma em larga escala – RNA-seq

Para verificar os níveis de expressão gênica das células MV-4-11 parentais e as células resistentes à droga, foi utilizada a metodologia de sequenciamento total do transcriptoma (RNA-seq), ou sequenciamento em larga escala, no equipamento HiSeq® 2500 Sequencing System (Illumina). A análise foi realizada em triplicata com a leitura pareada das extremidades e com sequências curtas de 100pb.

Os dados gerados foram disponibilizados em formato Fastq no servidor de compartilhamento de dados do Núcleo de Sequenciamento da Case Western Reserve University. O fluxo de trabalho da tecnologia de RNA-seq está resumido na figura 5.

Figura 5. Fluxo de trabalho aplicado à tecnologia de RNA-seq. Em (A), está disposto o procedimento experimental, e em (B), a descrição do processo de análise dos dados por ferramentas de bioinformática.

3.7. Análise dos dados de RNA-seq

As sequências resultantes do sequenciamento (dados brutos) foram automaticamente salvas em arquivos com formato FASTq. A partir deste arquivo foi possível fazer o controle de qualidade e o alinhamento dos fragmentos lidos. Para testar a qualidade individual de cada base utilizou-se a ferramenta FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Depois de verificada a qualidade da leitura das sequências ao longo da sua extensão, os fragmentos foram aparados para a remoção das sequências dos adaptadores com o uso de anotação customizada e TrimGalore (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/).

As leituras que passaram no teste de qualidade foram mapeadas para o genoma de referência humano hg19/hg38 com o Tophat (Trapnell *et al.*, 2009), que implementa o algoritmo Bowtie 2 (Langmead e Salzberg, 2012) para alinhar a sequência e analisar as leituras mapeadas para identificar junções de processamento (*splice*) entre os exons. Os resultados obtidos no Tophat foram analisados no pacote de análise de RNASeq Cufflinks (Trapnell *et al.*, 2010), que reportou os valores dos fragmentos análogos por kilobase de transcritos por milhão de fragmentos mapeados (FPKM, do inglês *fragments per kilobase of exon per million fragments mapped*). Os valores de FPKM foram calculados para genes e

isoformas, e por conseguinte, os genes ou as isoformas diferencialmente expressos foram testados e comparados entre as condições, considerando-se a cobertura final dos genes e o ranking por número de vezes alterado (*fold change*), com o limiar de corte do nível de significância de $p < 0,05$. Os resultados foram resumidos no CummeRbund (<http://compbio.mit.edu/cummeRbund/>).

As análises de Ontologia Gênica foram realizadas com o auxílio dos bancos de dados The Consensus Path DB (Kamburov *et al.*, 2013) e Reactome (<http://www.reactome.org/PathwayBrowser/#DTAB=MT&TOOL=AT>) e as análises de componente principal (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) foram realizadas no programa R.

As análises de agrupamento hierárquico (*heatmap* de expressão gênica) foram realizadas com o auxílio do programa R, assim como as análises dos genes de interesse envolvidos nos processos de auto-renovação e desenvolvimento, reparo de DNA e dos genes que codificam as enzimas metabolizadoras de Ara-C.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

4.1. Caracterização das linhagens celulares MV-4-11, THP-1, NOMO-1 E MOLM-14

- A taxa de proliferação celular da linhagem celular MV-4-11 é mais elevada que a das demais linhagens celulares

Para a avaliação da cinética de crescimento e o cálculo do tempo de duplicação das células MV-4-11, THP-1, NOMO-1 E MOLM-14 foram montadas curvas de crescimento celular por meio da contagem de células viáveis a cada 24 horas (figura 6). O tempo médio em que a população de células foi duplicada (PDT, do inglês, *population doubling time*) foi calculado utilizando-se os valores do número de células no tempo 0 (2×10^5) e o número de células após 48 horas de cultivo, e está representado a seguir.

Figura 6. Curvas de crescimento das células das linhagens MV-4-11, THP-1, NOMO-1 e MOLM-14 demonstram que MV-4-11 apresenta crescimento celular mais acelerado que as demais linhagens. No eixo Y está representado o número de células, e no eixo X, o tempo em dias. Foram coletadas 2×10^5 células para o início do experimento.

Em nossas mãos, as células MV-4-11 apresentaram PDT de aproximadamente 26,5 horas, enquanto para THP-1, o tempo de duplicação foi de 30,2 horas, NOMO-1 de 41,7 horas, e MOLM-1, 40,6 horas. O cálculo do tempo de duplicação direcionou o tratamento das linhagens celulares com diferentes doses de Ara-C.

- As linhagens celulares apresentam fenótipo $CD33^+CD19^-CD34^-CD38^+$

As células das linhagens celulares MV-4-11, THP-1, NOMO-1 e MOLM-14 foram caracterizadas quanto à presença dos marcadores de superfície celular de células hematopoiéticas de linhagem mielóide, CD33, e de linhagem linfóide, CD19. Como mostrado na figura 7, as quatro linhagens celulares utilizadas neste estudo são positivas para o marcador de linhagem mielóide, CD33 (96,5% das células MV-4-11, 98,1% de THP-1 e NOMO-1 e 99,7% das células MOLM-14) (figura 7A) e negativas para o marcador de linhagem linfóide CD19 (figura 7B).

Figura 7. Caracterização das linhagens celulares de LMA-MLL quanto a marcadores de células hematopoiéticas: marcador de linhagem mielóide - CD33 (quadro A, esquerda) e linfóide - CD19 (quadro B, direita): as linhagens apresentam o fenótipo CD33+CD19-. Foram utilizados os marcadores CD33 e CD19 conjugados ao fluorocromo PE, representado no eixo X do gráfico como YG582-A.

As células foram caracterizadas quanto à presença de dois marcadores clássicos de células-tronco hematopoiéticas, CD34 e CD38. Observou-se que as quatro linhagens celulares são negativas para o marcador CD34, e positivas para o marcador CD38 - 98,7%, 100%, 98,1% e 99,3% das células MV-4-11, THP-1, NOMO-1 e MOLM-14, respectivamente (figura 8).

Estes dados sugerem que estas linhagens de LMA-MLL não compartilham as características das células-tronco hematopoiéticas, $CD34^+CD38^-$, e estão comprometidas com a diferenciação mielóide.

Figura 8. Caracterização das linhagens celulares de LMA-MLL quanto a marcadores de células-tronco hematopoiéticas: marcador CD34 (quadro A, esquerda) e CD38 (quadro B, direita); as linhagens apresentam o

fenótipo CD34-CD38+. Foram utilizados os marcadores de superfície CD34 conjugado ao fluorocromo FITC e CD38 conjugados a PE, representados no gráfico como B525-A (FITC) e YG582-A (PE).

- As células MV-4-11 são menos sensíveis ao Ara-C que as demais linhagens celulares

Para a determinação da dose de Ara-C que permite o tratamento em longo prazo, foi realizado um ensaio piloto com as células MV-4-11 durante três dias. O potencial proliferativo das células na presença de Ara-C, foi verificada a cada 24 horas por meio de contagem do número de células viáveis.

As células foram expostas às seguintes dosagens da droga: 1, 10, 20, 40 e 50 μ M (figura 9A). Como o objetivo deste experimento foi expor as células a doses do fármaco que fossem eficazes na redução da proliferação, mas que não a bloqueassem, a proliferação celular foi constantemente monitorada. As doses de 20, 40 e 50 μ M apresentaram alta toxicidade, e ocorreu a morte celular total após 5-6 dias de exposição à droga (dados não mostrados).

As células MV-4-11 foram mantidas sob 1 e 10 μ M, e depois a dose foi aumentada para 10 e 20 μ M, respectivamente. Após o tratamento em longo prazo, os ensaios para caracterização da linhagem MV-4-11 foram realizados.

Estes ensaios serviram também como base para realizar o estudo piloto com as linhagens THP-1, NOMO-1 e MOLM-14 por cinco dias, em que estas células foram expostas às concentrações de 1 e 10 μ M (Figura 9B, C e D).

Em consequência da inibição da proliferação e morte total das células THP-1, NOMO-1 e MOLM-14 sob a concentração de 10 μ M de Ara-C, as células foram mantidas sob 1 μ M da droga.

Figura 9. Curva dose X resposta para as células MV-4-11 (A), expostas às seguintes concentrações de Ara-C: 1, 10, 20, 40 e 50 μ M; THP-1 (B), NOMO-1 (C) e MOLM-14 (D), expostas a 1 μ M e 10 μ M. Em vermelho, estão destacadas as concentrações as quais as células foram mantidas durante o tratamento em longo prazo com a droga.

Os estudos piloto mostraram que as quatro linhagens celulares apresentaram resposta diferencial entre dois (MV-4-11), três ou cinco dias de exposição à droga, sendo que a linhagem MV-4-11 é mais resistente comparada às demais, e serviu de base para estabelecer a dose de início do tratamento.

4.2. Caracterização das células MV-4-11, THP-1, NOMO-1 e MOLM-14 antes e após o tratamento em longo prazo com Ara-C

Após a realização destes estudos preliminares, iniciou-se o modelo *in vitro* para a caracterização das linhagens celulares antes e após o tratamento em longo prazo com Ara-C. A dose de 10 μ M foi estabelecida para as células MV-4-11, de 2 μ M para as células THP-1 e NOMO-1, e 1 μ M para MOLM-14.

- Cinética de crescimento celular e tempo de duplicação

As células receberam o tratamento por 12 semanas e após este período foram caracterizadas quanto a cinética de crescimento, o tempo de duplicação e o ciclo celular. Como controle, foram caracterizadas as células sem tratamento, aqui denominadas parentais.

Conforme mostrado na figura 10, o efeito do tratamento em longo prazo difere entre a linhagem MV-4-11 e as demais linhagens. A linhagem celular MV-4-11 quando tratada, apresentou um crescimento de cerca de duas vezes e meia menor após 72 horas de experimento que as células parentais.

Figura 10. A linhagem celular MV-4-11 apresentou uma redução no potencial proliferativo após o tratamento em longo prazo com Ara-C maior que nas demais linhagens celulares. Na figura, estão representadas as curvas de crescimento para: A) MV-4-11 Parental e resistente ao Ara-C; B) THP-1 Parental e resistente; C) NOMO-1 Parental e resistente; e, D) MOLM-14 Parental e resistente à droga. No eixo Y está representado o número de células, e no eixo X, o tempo em dias. Foram coletadas $2-2,5 \times 10^5$ células para o início do experimento.

Quando calculado o PDT, observou-se um aumento deste nas células MV-4-11 resistentes (43,5 horas) quando comparadas às células parentais (23,6 horas). O atraso no tempo de duplicação após o tratamento, também foi observado para as células NOMO-1, com uma diferença de cerca de quatro horas (PDT das células tratadas foi de 30,11 horas *versus* 26,2 horas nas parentais; para THP-1, o efeito observado foi que as células resistentes apresentaram um PDT reduzido em cerca de cinco horas (31,5 horas) quando comparadas às

células parentais (36,6 horas). Quanto às células MOLM-14, o PDT não variou após o tratamento (22,9 e 22,8 horas antes e após o tratamento, respectivamente).

- Comportamento das linhagens celulares após reintrodução do Ara-C

As linhagens celulares parentais e resistentes ao Ara-C foram expostas ou re-expostas à dose da droga em que foram tratadas em longo prazo, e monitoradas ao longo de 4-5 dias, conforme mostrado na figura 11.

A contagem do número de células durante 4-5 dias com exposição ao Ara-C permitiu evidenciar que mesmo após o tratamento em longo prazo, as linhagens celulares permaneceram sensíveis à droga. Entretanto, ao comparar com as linhagens parentais, observou-se que em todos os casos a resistência foi aumentada após o tratamento.

Figura 11. As linhagens celulares resistentes ao Ara-C permaneceram sensíveis à droga, mas apresentaram resposta diferente das células parentais. Nos gráficos estão mostrados: (A) A proliferação em resposta a 10 μ M de Ara-C nas células MV-4-11 parentais e resistentes; (B) A proliferação em resposta a 2 μ M de Ara-C nas células THP-1 parentais e resistentes, e (C) nas células NOMO-1 parentais e resistentes; e, (D) A proliferação em resposta a 1 μ M de Ara-C nas células MOLM-14 parentais e resistentes. No eixo Y está representado o número de células, e no eixo X, o tempo em dias. Foram coletadas $2-2,5 \times 10^5$ células para o início do experimento.

Com base nos intervalos de confiança representados nos gráficos, sugere-se que, de fato, o tratamento em longo prazo comprometeu o potencial proliferativo das quatro linhagens

avaliadas, já que todas as linhagens tratadas em longo prazo foram mais resistentes à droga que as células parentais em algum momento do tratamento de 4-5 dias.

- Morte celular (fração sub-G1) reduzida nas células resistentes versus parentais

Com a finalidade de investigar a redução no potencial proliferativo e na morte celular, as células foram caracterizadas quanto às fases do ciclo celular.

Os gráficos em barra das figuras 12 (MV-4-11), 13 (THP-1), 14 (NOMO-1) e 15 (MOLM-14) representam o comportamento no ciclo celular das células parentais e suas derivadas resistentes (experimento controle), e a resposta quando expostas à droga. A análise estatística foi realizada com os resultados da duplicata (Tabela 1 - MV-4-11) (Tabela 2 - MOLM-14). Devido ao tempo, não foi possível realizar experimentos em duplicata para as linhagens celulares NOMO-1 e THP-1.

Os resultados observados na análise de ciclo celular referentes às células MV-4-11 foram: 1) o conteúdo de sub-G1 nas células resistentes estava reduzido em relação às parentais após 72 horas de tratamento; 2) a fração de células na fase S do ciclo celular estava aumentada nas células resistentes em relação às parentais; e, 3) a proliferação celular (G2-M) das células resistentes aumentou após 72 horas de tratamento quando comparada ao período de 48 horas (dado não mostrado), e foi semelhante ao número de células sob divisão no experimento controle.

Figura 12. Redução no conteúdo de células apoptóticas (sub-G1) e aumento de células em fase de síntese (S) na linhagem MV-4-11 resistente quando comparada à parental. As células parentais estão representadas no lado esquerdo da figura, e as células resistentes, do lado direito. Os seguintes tratamentos foram aplicados: 1) experimento controle; e, 2) células expostas ao Ara-C por 72 horas. A análise de citometria de fluxo foi padronizada para a contagem de 20.000 células por amostra. *A análise foi realizada em duplicata.

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão do número de células MV-4-11 parentais e resistentes ao Ara-C referentes à análise de ciclo celular com coloração de Iodeto de Propídeo (PI) e citometria de fluxo. Na tabela estão contidos os dados das seguintes comparações: 1) ausência de Ara-C - experimento controle; e, 2) células expostas ao Ara-C por 72 horas. A análise de citometria de fluxo foi padronizada para a contagem de 20.000 células por amostra, e as porcentagens observadas na análise foram convertidas em número de células. A análise foi realizada em duplicata.

ANÁLISE DE CICLO CELULAR							
MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO (NÚMERO DE CÉLULAS)							
MV-4-11 PARENTAL (CONTROLE)				MV-4-11 RESISTENTES (CONTROLE)			
Sub-G1	G1	S	G2-M	Sub-G1	G1	S	G2-M
170 $\pm$ 22,6*	13710 $\pm$ 1315,2	2410 $\pm$ 183,8	3310 $\pm$ 1117,2	181 $\pm$ 18,4*	13990 $\pm$ 834,4	2490 $\pm$ 155,6*	2980 $\pm$ 509,1
MV-4-11 PARENTAL (10 μ M - 72 HORAS)				MV-4-11 RESISTENTES (10 μ M - 72 HORAS)			
Sub-G1	G1	S	G2-M	Sub-G1	G1	S	G2-M
2001 $\pm$ 1384,5* $^{\Delta}$	14000 $\pm$ 537,4	2260 $\pm$ 282,8 $^{\Delta}$	1289 $\pm$ 971,6	646 $\pm$ 367,7* $^{\Delta}$	11580 $\pm$ 2347,6	4030 $\pm$ 1202,1* $^{\Delta}$	3111 $\pm$ 1624,9*

*Teste estatístico significativo $p < 0,05$, comparação dentro do grupo, controle *versus* tratamento

$^{\Delta}$ Teste estatístico significativo $p < 0,05$, comparação entre grupos, células parentais *versus* resistentes

Como a análise de ciclo celular de THP-1 e NOMO-1 compreendeu apenas uma replicata experimental, não foi possível realizar teste estatístico. Para ambas as linhagens, pôde-se observar um aumento no número de células na fase Sub-G1 para as células parentais quando comparadas às células resistentes, o que permite sugerir que houve seleção de subpopulações celulares com resposta diferencial ao Ara-C nestas duas linhagens celulares. Nas células THP-1, não houve alteração nas frações das demais fases do ciclo celular (figura 13). Já na linhagem NOMO-1 resistente, o número de células em divisão após 72 horas de exposição à droga é semelhante ao do experimento controle, e diferente da resposta aos 48 horas de tratamento (G2-M) (dado não mostrado), enquanto que nas células NOMO-1 parentais, há um declínio no número de células em divisão após 72 horas, quando comparados aos experimentos controle (figuras 14).

1)

2)

Figura 13. Redução no conteúdo de células apoptóticas (sub-G1) na linhagem THP-1 resistente quando comparada à parental. Na figura estão representados os experimentos nas células THP-1 parentais e resistentes. Os seguintes tratamentos foram aplicados: 1) experimento controle; e, 2) células expostas ao Ara-C por 72 horas. A análise de citometria de fluxo foi padronizada para a contagem de 20.000 células por amostra.

*A análise foi realizada com apenas uma replicata experimental.

1)

2)

Figura 14. Redução no conteúdo de células apoptóticas (sub-G1) na linhagem NOMO-1 resistente quando comparada à parental. Os seguintes tratamentos foram aplicados: 1) experimento controle; e, 2) células expostas ao Ara-C por 72 horas. A análise de citometria de fluxo foi padronizada para a contagem de 20.000 células por amostra.

*A análise foi realizada com apenas uma replicata experimental.

MOLM-14 foi a única linhagem celular tratada que não apresentou diferenças dos conteúdos celulares nas fases do ciclo celular, dados mostrados na Figura 15 e na Tabela 2.

Figura 15. As células MOLM-14 parentais não apresentaram diferenças significativas das células resistentes. A figura representa as células MOLM-14 parentais e resistentes com Ara-C. Os seguintes tratamentos foram aplicados: 1) experimento controle; e, 2) células expostas ao Ara-C por 72 horas. A análise de citometria de fluxo foi padronizada para a contagem de 20.000 células por amostra.

*A análise foi realizada em duplicata.

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão do número de células MOLM-14 parentais e resistentes referentes à análise de ciclo celular com coloração de Iodeto de Propídeo (PI) e citometria de fluxo. Na tabela estão contidos os dados das seguintes comparações: 1) ausência de Ara-C - experimento controle; e, 2) células expostas ao Ara-C por 72 horas. A análise de citometria de fluxo foi padronizada para a contagem de 20.000 células por amostra, e as porcentagens observadas na análise foram convertidas em número de células.

*A análise foi realizada em duplicata.

ANÁLISE DE CICLO CELULAR							
MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO (NÚMERO DE CÉLULAS)							
MOLM-14 PARENTAL (CONTROLE)				MOLM-14 RESISTENTES (CONTROLE)			
Sub-G1	G1	S	G2-M	Sub-G1	G1	S	G2-M
375 $\pm$ 75	13970 $\pm$ 297	3210 $\pm$ 212,1	2220 $\pm$ 84,9	468 $\pm$ 305,5	13920 $\pm$ 311,1	2930 $\pm$ 155,6	2330 $\pm$ 127,3
MOLM-14 PARENTAL (1μM - 72 HORAS)				MOLM-14 RESISTENTES (1μM - 72 HORAS)			
Sub-G1	G1	S	G2-M	Sub-G1	G1	S	G2-M
10350 $\pm$ 127,3	7690 $\pm$ 325,3	1552 $\pm$ 591,1	45 $\pm$ 24	10580 $\pm$ 452,5	6890 $\pm$ 127,3	2036 $\pm$ 967,3	139 $\pm$ 35,4

- As células MV-4-11 apresentaram distribuição bimodal quanto ao marcador CD38 após o tratamento em longo prazo

Após o tratamento em longo prazo, a expressão dos marcadores de superfície de células-tronco hematopoiéticas, CD34 e CD38, foi investigada por citometria de fluxo, e os histogramas com as representações esquemáticas estão contidos na figura 16.

Quanto ao marcador CD34, observou-se que as populações celulares mantiveram-se negativas nas quatro linhagens leucêmicas. O mesmo não foi observado para o marcador CD38, já que as células MV-4-11 apresentaram distribuição bimodal. Nas demais linhagens celulares, diferenças na expressão deste marcador não foram observadas.

Figura 16. As células MV-4-11 resistentes apresentaram distribuição bimodal com relação ao marcador CD38. Os gráficos representam os dados obtidos por citometria de fluxo com marcação para os anticorpos CD34 e CD38 para as células: A) MV-4-11 parental e resistente ao Ara-C; B) THP-1 parental e resistente; C) NOMO-1

parental e resistente; e, D) MOLM-14 parental e resistente. Foram utilizados os marcadores de superfície CD34 conjugado ao fluorocromo FITC e CD38 conjugado a PE, representados no gráfico como B525-A (FITC) e YG582-A (PE).

Mediante as diferenças na proliferação e resposta à exposição ao Ara-C entre as células MV-4-11 parentais e resistentes, assim como a expressão diferencial do marcador CD38 e o tempo em que o trabalho fora desenvolvido, optou-se por caracterizar as duas subpopulações que emergiram após o tratamento, que foram denominadas MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High}.

Para tanto, foi realizado *sorting* em citometria de fluxo das subpopulações MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High}, que a seguir foram caracterizadas quanto a: 1) potencial proliferativo em resposta ao Ara-C; 2) ciclo celular, e 3) manutenção das subpopulações com expressão diferencial do marcador CD38 nas células resistentes. As subpopulações resistentes ao Ara-C e separadas por citometria de fluxo foram denominadas MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High}.

A figura 17 é uma representação dos intervalos estabelecidos por citometria de fluxo para a separação das subpopulações celulares quanto à diferença de expressão do marcador CD38. Desta maneira, a subpopulação disposta no quadrante P8, com menor nível de expressão de CD38, corresponde a MV-4-11 CD38^{Low}, e no quadrante P7 estão as células MV-4-11 CD38^{High}.

Figura 17. Definição dos intervalos para separação das subpopulações MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High}. Nos histogramas estão representados em (A) MV-4-11 parentais, que serviram como controle para o sorting, e em (B) as células MV-4-11 tratadas. A análise separou as subpopulações em MV-4-11 CD38^{Low} (P8) e MV-4-11 CD38^{High} (P7). Foram utilizados os marcadores CD34 e CD38 conjugados aos fluorocromos FITC e PE, representados no eixo X do gráfico como B530-A e B576-A respectivamente.

4.3. Caracterização das subpopulações celulares MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High}

- As células MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High} apresentam resposta diferencial ao Ara-C

Para verificar se as subpopulações de MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High} apresentavam diferenças na cinética de crescimento celular e no tempo de duplicação, o crescimento celular foi acompanhado durante cinco dias, bem como, a resposta à exposição a 10 μ M de Ara-C (Figura 18).

Figura 18. As células MV-4-11 CD38^{Low} são mais resistentes ao Ara-C que MV-4-11 CD38^{High}. (A) Curvas de crescimento das células das linhagens MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High}. (B) Resposta à exposição a 10µM de Ara-C para as células MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High}. No eixo Y está representado o número de células, e no eixo X, o tempo em dias. Foram coletadas 5×10^5 células para o início do experimento.

Após 72 horas, observou-se uma redução no crescimento celular. Acredita-se que a reduzida proliferação deveu-se a questões metodológicas, já que a densidade celular neste experimento foi iniciada em 5×10^5 células/mL, ao invés de 2×10^5 células/mL como nos experimentos anteriores. Após 72 horas, o meio foi substituído por meio fresco, e as células retomaram o crescimento.

Quanto à resposta das duas subpopulações ao Ara-C, observou-se que as células MV-4-11 CD38^{Low} foram menos sensíveis à droga do que as células MV-4-11 CD38^{High}, visto que após cinco dias de exposição à droga, as células MV-4-11 CD38^{Low} persistiram ($1,7 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^4$), enquanto que para as células MV-4-11 CD38^{High}, observou-se morte total.

Para análises complementares sobre a proliferação e a resposta ao Ara-C, optou-se por caracterizar as duas subpopulações quanto ao ciclo celular.

- Comportamento das subpopulações MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High} no ciclo celular

Os gráficos em barra da figura 19 representam o comportamento no ciclo celular das subpopulações MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High} na ausência de Ara-C (experimento controle), e a resposta quando expostas à droga por 72 horas. A análise estatística foi realizada com os resultados da duplicata experimental.

Com relação à proliferação celular verificada após 72 horas no experimento controle, as células MV-4-11 CD38^{High} apresentaram maior potencial proliferativo que MV-4-11 CD38^{Low} (fase G2-M, $p<0,05$), mas também, uma maior morte celular (sub-G1, $p<0,05$). No que diz respeito à resposta à droga, foi observado que a subpopulação MV-4-11 CD38^{Low} foi mais resistente que MV-4-11 CD38^{High} (sub-G1, $p<0,05$) (Tabela 3).

Com relação à síntese de DNA, as células MV-4-11 CD38^{Low} encontraram-se aprisionadas na fase S. Além disso, nas células MV-4-11 CD38^{High}, o conteúdo de G1 encontrou-se enriquecido.

1)

2)

Figura 19. Comportamento no ciclo celular das linhagens MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High}. As células MV-4-11 CD38^{Low} estão representadas no lado esquerdo da figura, e MV-4-11 CD38^{High}, do lado direito. Os seguintes tratamentos foram aplicados: 1) experimento controle; e, 2) células expostas ao Ara-C por 72 horas. A análise de citometria de fluxo foi padronizada para a contagem de 20.000 células por amostra. *A análise foi realizada em duplicata.

Tabela 3. Média $\pm$ desvio padrão do número de células MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High} referentes à análise de ciclo celular com coloração de Iodeto de Propídeo (PI) e citometria de fluxo. Na tabela estão contidos os dados das seguintes comparações: 1) ausência de Ara-C - experimento controle; e, 2) células expostas ao Ara-C por 72 horas. A análise de citometria de fluxo foi padronizada para a contagem de 20.000 células por amostra, e as porcentagens observadas na análise foram convertidas em número de células.

*A análise foi realizada em duplicata.

ANÁLISE DE CICLO CELULAR							
MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO (NÚMERO DE CÉLULAS)							
MV-4-11 CD38 ^{Low} (CONTROLE)				MV-4-11 CD38 ^{High} (CONTROLE)			
Sub-G1	G1	S	G2-M	Sub-G1	G1	S	G2-M
579 $\pm$ 58 ^{*Δ}	15000 $\pm$ 367,7	2032 $\pm$ 124,5 [*]	2077 $\pm$ 287,1	1422 $\pm$ 17 ^{*Δ}	11760 $\pm$ 537,4 ^{*Δ}	2550 $\pm$ 693	3690 $\pm$ 862,7 ^Δ
MV-4-11 CD38 ^{Low} (10 μ M - 72 HORAS)				MV-4-11 CD38 ^{High} (10 μ M - 72 HORAS)			
Sub-G1	G1	S	G2-M	Sub-G1	G1	S	G2-M
973 $\pm$ 72,1 ^{*Δ}	13980 $\pm$ 1329,4	2710 $\pm$ 99 ^{*Δ}	1797 $\pm$ 994,2	7040 $\pm$ 4780 ^{*Δ}	4970 $\pm$ 2078,9 ^{*Δ}	1799 $\pm$ 397,4 ^Δ	5025 $\pm$ 6158,9

*Teste estatístico significativo $p < 0,05$, comparação dentro do grupo, controle *versus* tratamento

^ΔTeste estatístico significativo $p < 0,05$, comparação entre grupos, células MV-4-11 CD38^{Low} *versus* MV-4-11 CD38^{High}

Estes dados sobre a resposta diferencial ao Ara-C das duas subpopulações, conduziu-nos à investigação molecular para a compreensão de mecanismos moleculares associados à resposta diferencial à droga.

- Perfil de expressão global diferencial das células MV-4-11 parental, e das subpopulações MV-4-11 CD38^{High} e MV-4-11 CD38^{Low}

Com o objetivo de investigar as semelhanças e diferenças entre as células MV-4-11 parentais e as subpopulações MV-4-11 CD38^{High} e MV-4-11 CD38^{Low} quanto ao perfil de expressão global, foi realizada a análise de componente principal (PCA) (Figura 20).

Conforme destacado na figura 20, uma das análises de componente principal (comp2 X comp1) demonstrou que as células MV-4-11 CD38^{High} assemelham-se mais às células parentais, visto que estas duas células encontraram-se agrupadas.

Figura 20. Análise de componente principal (PCA) dos dados do perfil de expressão global das células MV-4-11 parentais (P), e das subpopulações MV-4-11 CD38^{High} (H) e MV-4-11 CD38^{Low} (L). A análise foi realizada com a finalidade de estimar as similaridades no transcriptoma das linhagens celulares.

Quando analisados apenas os genes diferencialmente expressos (GDEs), observou-se a mesma relação de semelhanças e diferenças entre as células MV-4-11 parentais, MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High}.

Conforme representado na figura 21, MV-4-11 CD38^{High} apresentaram menos genes diferencialmente expressos quando comparadas às células parentais (579 GDEs) do que com MV-4-11 CD38^{Low} (3395 GDEs). As células parentais apresentaram 1585 GDEs quando comparadas às MV-4-11 CD38^{Low}.

Figura 21. Número de genes diferencialmente expressos entre as células MV-4-11 Parental versus MV-4-11 CD38^{Low}, MV-4-11 Parental versus MV-4-11 CD38^{High} e MV-4-11 CD38^{Low} versus MV-4-11 CD38^{High}.

Devido ao fato de as maiores diferenças em nível de transcriptoma encontrarem-se entre as células MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High}, que também apresentaram respostas

diferenciais em relação ao tratamento com Ara-C, optou-se por realizar análises comparativas do perfil de expressão para estas duas subpopulações celulares.

Com a finalidade de estreitar o número de genes e as vias envolvidas, para as análises de ontologia gênica (GO) foram desconsiderados genes diferencialmente expressos com FPKM=0, e considerados apenas os valores de $\log_2(\text{fold change}) \geq 4$. Após esta seleção, 481 genes foram analisados (Apêndice 1, tabela 5) quanto à categoria de processos biológicos da análise de GO.

A análise completa está disponível no Apêndice 2 (Tabela 6); para fins de caracterização das duas subpopulações celulares quanto a processos biológicos, os termos de GO foram agrupados nas categorias dispostas na tabela 4.

Tabela 4. Funções biológicas mais representativas na análise de ontologia gênica (GO) dos genes diferencialmente expressos na análise de RNA-seq entre as células MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High} com $\log_2(\text{fold change}) \geq 4$.

Função biológica	Exemplos de categorias de GO	Exemplos de Genes
Desenvolvimento/embriogênese/ morfogênese	GO:0009888 Desenvolvimento de tecido	<i>HOXA13; IGF1; FOXL2</i>
	GO:2000026 Regulação do desenvolvimento de organismo multicelular	<i>SMAD1; MEIS1; SOX5</i>
	GO:0050793 Regulação de processo do desenvolvimento	<i>PPARG; TP53; WNT5B</i>
	GO:0007275 Desenvolvimento de organismo multicelular	<i>FOXO1; ZEB1; GPR55</i>
	GO:0048646 Formação de estrutura anatômica envolvida na morfogênese	<i>ALDH1A3; WNT10B</i>
Resposta a estímulos (compostos/hormônios/drogas)	GO:0042221 Resposta a químico	<i>ABCC6; DAPK1</i>
	GO:0006950 Resposta ao estresse	<i>CX3CR1; EXO5</i>
	GO:0042493 Resposta a drogas	<i>ABCB4; CYBB</i>
	GO:1901698 Resposta a composto nitrogenado	<i>ZEB2; RRAGB</i>
Crescimento/proliferação/morte celulares	GO:0042127 Regulação de proliferação celular	<i>WNT11; PAWR</i>
	GO:0072089 Proliferação de célula-tronco	<i>TP53; GPC3</i>
	GO:0012501 Morte celular programada	<i>HOXA13; FOXO1</i>
Resposta imune	GO:0050776 Regulação de resposta imune	<i>HLA-DPA1; HLA-DRB5</i>
	GO:0002520 Desenvolvimento do sistema imune	<i>HDAC9; IRF4</i>
Sinalização celular	GO:0023051 Regulação de sinalização	<i>RGS18; TREM2</i>
Movimentação/migração/ localização celulares	GO:0051674 Localização da célula	<i>RAB13; CCL22</i>

Mais de 55 categorias, dentre as 197 categorias representadas na análise de GO foram relacionadas a processos do desenvolvimento e morfogênese; cerca de 30 categorias foram relacionadas à resposta a estímulos, inclusive resposta a drogas, e mais de 15 categorias relacionadas a crescimento/proliferação/morte celular.

Entre os genes relacionados a processos do desenvolvimento e morfogênese e sugeridos no início deste estudo como candidatos à resposta diferencial das subpopulações celulares de LMA-MLL ao Ara-C, estão os genes *HOX*. Na categoria resposta a estímulos foram analisados genes associados ao metabolismo de Ara-C e ao de reparo de DNA.

Desta forma, as análises de agrupamento hierárquico, ou *heatmaps* de expressão gênica, que contém as comparações entre as subpopulações MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High} estão representados nas figuras a seguir: 1) Genes *HOX* (Figura 22); 2) Genes que codificam enzimas metabolizadoras de Ara-C (Figura 23); 3) Genes da via de reparo de pareamento incorreto, ou *Mismatch repair* (MMR) (Figura 24); 4) Genes da via de reparo por excisão de bases ou *Base Excision Repair* (BER) (Figura 25); e, 5) Genes das vias de reparo por excisão de nucleotídeos ou *Nucleotide Excision Repair* (NER) e reparo direto (MGMT) (Figura 26).

Com exceção de *HOXA9* e *HOXA10*, o cluster *HOXA* aparece mais expresso nas células MV-4-11 CD38^{Low} quando comparadas às células MV-4-11 CD38^{High}, cuja assinatura apresenta o cluster *HOXB* com níveis mais elevados de expressão.

HOXA13 foi o gene *HOX* mais diferencialmente expresso com $\log_2(\text{fold change}) = 5,06$ ($p < 0,001$). Além de *HOXA13*, *HOXA5* ($\log_2 - \text{fold change} = 2,52$), *HOXA11* ($\log_2 - \text{fold change} = 1,09$) e *HOXB7* ($\log_2 - \text{fold change} = 1,74$) apresentaram níveis de expressão significativamente distintos entre as duas linhagens celulares comparadas ($p < 0,001$).

Figura 22. Heatmap de expressão dos genes *HOX*. O cluster *HOXD* foi excluído da análise por não ser expresso em células hematopoiéticas. As replicatas experimentais das células MV-4-11 CD38^{High} estão representadas como High1, High2 e High3, e as replicatas experimentais das MV-4-11 CD38^{Low}, como Low1, Low2 e Low3.

Desta análise, pode-se observar que o gene *NME-1*, uma NDK cujo produto é o responsável por grande parte da atividade de nucleosídeo-difosfato-quinase em mamíferos, encontrou-se menos expresso nas células MV-4-11 CD38^{Low} quando comparadas a MV-4-11 CD38^{High} (log2 - fold change = 1,65, $p < 0,001$). A citosina desaminase (CDA), que catalisa a desaminação de citosina em uracila, encontrou-se mais expressa nas células MV-4-11 CD38^{Low} que nas células MV-4-11 CD38^{High}, entretanto, testes estatísticos não foram significativos.

Os demais genes que participam do metabolismo de Ara-C (*CMPK1*, *DCTD* e *dCK*) não mostraram diferenças significativas

Figura 23. Heatmap de expressão dos genes que codificam enzimas metabolizadoras de Ara-C. As replicatas experimentais das células MV-4-11 CD38^{High} estão representadas como High1, High2 e High3, e as replicatas experimentais das MV-4-11 CD38^{Low}, como Low1, Low2 e Low3.

O perfil transcricional dos genes da via de reparo MMR revelou que esta via encontrou-se mais expressa nas células MV-4-11 CD38^{High} quando comparadas às células MV-4-11 CD38^{Low}. Os genes *RPA-1* (log2 - fold change = 1,51), *RPA-2* (log2 - fold change = 1,5), *LIG-1* (log2 - fold change = 1,72) e *PCNA* (log2 - fold change = 2,23) apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$).

Figura 24. Heatmap de expressão dos genes da via de reparo de pareamento incorreto ou *Mismatch repair* (MMR). As replicatas experimentais das células MV-4-11 CD38^{High} estão representadas como High1, High2 e High3, e as replicatas experimentais das MV-4-11 CD38^{Low}, como Low1, Low2 e Low3.

Quanto aos genes da via de reparo BER, a maioria encontrou-se menos expressa nas células MV-4-11 CD38^{Low}, do que em MV-4-11 CD38^{High}. Dentro os genes cuja diferença na expressão foram significativas encontraram-se *LIG-1* (log2 - fold change = 1,72), *UNG* (log2 fold change =1,4), *POLD1* (log2 fold change =1,36), *NEIL2* (log2 fold change =2,07), *NEIL3* (log2 fold change =1,14) e *PCNA* (log2 - fold change =2,23, $p < 0,001$).

Figura 25. Heatmap de expressão dos genes da via de reparo por excisão de bases ou *Base Excision Repair* (BER). As replicatas experimentais das células MV-4-11 CD38^{High} estão representadas como High1, High2 e High3, e as replicatas experimentais das MV-4-11 CD38^{Low}, como Low1, Low2 e Low3.

Sobre os genes da via de reparo NER, *POLD1* ($\log_2$ fold change =1,36), *ERCC1* ($\log_2$ fold change =1,38), *PCNA* ($\log_2$ - fold change =2,23), *DDB2* ($\log_2$ - fold change =1,05) e *XPC* ($\log_2$ - fold change =1,13) encontraram-se diferencialmente expressos entre as subpopulações celulares, sendo que os genes desta via encontraram-se, em sua maioria, mais expressos nas células MV-4-11 CD38^{High} do que em MV-4-11 CD38^{Low}.

Neste heatmap foi incluído o gene *MGMT* que participa do reparo direto, e se encontrou significativamente mais expresso nas células MV-4-11 CD38^{Low} que em MV-4-11 CD38^{High} (log2 - fold change =2,23, p<0,001).

Figura 26. Heatmap de expressão dos genes das vias de reparo por excisão de nucleotídeos ou *Nucleotide Excision Repair* (NER) e reparo direto. As replicatas experimentais das células MV-4-11 CD38^{High} estão representadas como High1, High2 e High3, e as replicatas experimentais das MV-4-11 CD38^{Low}, como Low1, Low2 e Low3.

Em conjunto, a análise destes seis grupos gênicos indicou que as duas subpopulações apresentam diferenças significativas quanto ao nível de expressão dos transcritos. Estudos futuros com análises funcionais podem auxiliar a compreensão na resposta diferencial ao Ara-C nas duas subpopulações.

DISCUSSÃO

V. Discussão

Neste estudo foi realizada a caracterização do compartimento heterogêneo das células progenitoras $CD34^+CD38^-$ em LMA-MLL. Com esta caracterização, foi possível identificar neste compartimento, que a estratégia de tratamento *in vitro* utilizada selecionou subpopulações celulares mais resistentes ao Ara-C.

Primeiro, as células MV-4-11 resistentes apresentaram quatro eventos comumente associados à resposta diferencial a drogas análogas de nucleotídeos: 1) redução do potencial proliferativo, 2) redução do número de células apoptóticas (sub-G1), 3) aumento de células na fase de síntese de DNA (S), e 4) reestabelecimento do número de células em divisão (G2-M) após 72 horas de tratamento. Embora concentrações citotóxicas de Ara-C devessem eliminar seletivamente células em fase de síntese (S), se ocorre o acúmulo de células na fase S, há resistência de ao menos uma porção desta população celular ao agente que deveria ser letal (Shi *et al.*, 2001). Além disso, mecanismos genéticos e epigenéticos que favoreçam o aprisionamento em G2-M contribuem para a resistência a drogas (Banker *et al.*, 1998). Portanto, o mecanismo seria resumido da seguinte forma: na presença de Ara-C, se há aumento de células em fase S, há células resistentes, pois esta droga deveria ser incorporada nesta fase do ciclo celular, e eliminar as células leucêmicas. Após 72 horas de exposição à droga, mais células se acumulam em G2-M, retomando a divisão e restaurando a população leucêmica.

A seguir, avaliou-se a influência dos marcadores clássicos de célula-tronco (CD34 e CD38) nas células resistentes ao Ara-C.

O objetivo de avaliar estes marcadores surgiu do conhecimento de que LMA recidivante e refratária é frequentemente associada à presença de células-tronco leucêmicas que não foram erradicadas durante o regime quimioterápico intensivo (Yap *et al.*, 2015). Entre os pacientes que conseguem atingir a remissão morfológica completa após a terapia, muitos recaem à doença. Portanto, acredita-se que a compreensão das características biológicas pode auxiliar na erradicação das células leucêmicas residuais, sendo uma maneira eficaz de aumentar as taxas de sobrevivência em pacientes com LMA (Munoz *et al.*, 2003; Yap *et al.*, 2015). Embora o presente estudo não tenha contemplado experimentos *in vivo* para avaliar a capacidade de enxerto (*engraftment*) e desenvolvimento de doença semelhante à leucemia, observou-se um comprometimento da frequência e expressão do marcador CD38, que caracteriza o fenótipo clássico de célula-tronco hematopoiética ($CD34^+CD38^-$), na

linhagem celular MV-4-11 resistente ao Ara-C, e sua associação com a resistência ao Ara-C nas subpopulações MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High}.

A molécula CD38 humana é uma glicoproteína que pertence a uma família complexa de genes que codificam proteínas de superfície celular e envolvidas no catabolismo de nucleotídeos extracelulares. Em populações de linfócitos, ela apresenta habilidades na mediação da interação célula-célula, por meio da interação com CD31, que estimulam vias de sinalização intracelular que convergem na ativação das quinases ERK1/2, e induzem a ativação e proliferação celulares (Deaglio *et al.*, 2010).

Ghia e colaboradores (2003) relataram a existência de três grupos de pacientes com expressão distinta do marcador CD38 em LLC: um grupo homogêneo CD38⁻, um grupo homogêneo CD38⁺, e um terceiro grupo com perfil de expressão bimodal, com proporções variáveis de duas subpopulações distintas CD38⁺ e CD38⁻. Foram avaliadas amostras de sangue periférico e de medula óssea: de 63 amostras de sangue, 59 não apresentaram diferenças na expressão de CD38 antes e após o tratamento. Entretanto, em quatro casos de pacientes com expressão bimodal, houve alteração nas proporções de células CD38⁺ e CD38⁻ após a quimioterapia (Ghia *et al.*, 2003). Os autores não citaram o tratamento quimioterápico utilizado, mas é sabido que análogos de purinas são os fármacos mais comuns no tratamento de LLC, e algumas vezes a Citarabina também é utilizada (ACS, 2015).

Quando critérios relacionados à progressão da doença foram correlacionados à expressão de CD38, a grande maioria dos pacientes CD38⁻ apresentou uma doença estável. Em contrapartida, em muitos pacientes CD38⁺ ou do grupo com expressão bimodal houve progressão da doença, independente da porcentagem de células CD38⁺ (Ghia *et al.*, 2003).

As curvas de sobrevivência mostradas no estudo de Ghia indicaram que a sobrevivência média para o grupo bimodal, independente da proporção de células CD38⁺, é menor que a sobrevivência nos grupos homogêneos CD38⁺ e CD38⁻ (Ghia *et al.*, 2003). Este trabalho demonstrou que a proporção de células com expressão do marcador CD38 não é um fator clínico essencial ao diagnóstico em LLC, mas que o padrão de expressão deste marcador permite prever o risco de progressão à doença.

Assim como no trabalho de Ghia e colaboradores, nosso estudo com a linhagem celular MV-4-11 apresentou resultados de expressão bimodal de CD38 após o tratamento quimioterápico. Entretanto, o modelo de Ghia *et al.* (2003) foi desenvolvido em leucemia

linfocítica, enquanto que a linhagem utilizada em nosso estudo apresenta-se indiferenciada em relação à linhagem monocítica, indicando o comprometimento mielóide. Não foram encontrados na literatura, estudos que reportem a associação do fenótipo bimodal de CD38 em LMA, mas em LLC este fenótipo está associado à progressão da doença (Boonstra *et al.*, 2004; Vaisitti *et al.*, 2010).

Com relação à resposta ao Ara-C das células MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High}, observou-se que elas responderam de maneira distinta à droga: MV-4-11 CD38^{Low}, mais resistentes, foram aprisionadas na fase S do ciclo celular, um mecanismo associado à resistência ao Ara-C descrito por Shi e colaboradores (Shi *et al.*, 2001). Já nas células MV-4-11 CD38^{High}, foi observado o aumento no número de células apoptóticas, mas também o aumento da proliferação (G2-M).

Uma implicação relevante da expressão do marcador CD38 ao escopo deste estudo é sua associação com a proliferação celular. Em LLC, Vaisitti e colaboradores sugeriram que CD38 atua como um facilitador no processo de migração celular, guiando as células a nichos favoráveis à proliferação, o que sugere sua participação indireta na proliferação celular. Este processo seria mediado pela expressão de *CXCR4*, e o provável trajeto da interação das vias seria por meio de ERK1/2. ERK1 ou MAPK3 e ERK2 ou MAPK1 atuam na cascata de sinalização de *CXCR4*, e são alvos compartilhados com CD38 (Vaisitti *et al.*, 2010; Vaisitti *et al.*, 2013). Nosso estudo não abordou avaliação de nicho hematopoiético que pudesse identificar interações entre células, e também não evidenciou níveis de expressão diferencialmente significativos para *CXCR4* e *MAPK1*. Porém, como *MAPK3* encontrou-se diferencialmente expresso entre as células MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High} (log2 fold change =1,17, $p<0,005$), acredita-se que a relação direta da expressão de MAPK3 e CD38 favoreça a proliferação das células MV-4-11 CD38^{High} em presença de Ara-C.

O aumento na capacidade proliferativa de subpopulações CD38⁺ em relação a CD38⁻, provenientes de pacientes com fenótipo bimodal do marcador foi evidenciado por Lin e colaboradores em subpopulações de LLC provenientes de um paciente. Estes pesquisadores hipotetizaram que o aumento da capacidade proliferativa das células CD38⁺, devia-se ao aumento no número de divisões celulares, e consequente aumento no risco de lesões citogenéticas. Contudo, quando o tamanho do telômero foi analisado, os cientistas evidenciaram que como as duas subpopulações celulares (CD38⁺ e CD38⁻) apresentaram comprimento semelhante, ambas passaram por aproximadamente o mesmo número de

divisões, indicando que os dados sobre aumento na capacidade proliferativa de células CD38⁺ são controversos e necessitam de mais estudos (Lin *et al.*, 2008).

Lin e colaboradores também abordaram estudos de evolução clonal. Por meio de análise de FISH das subpopulações CD38⁺ e CD38⁻, os pesquisadores evidenciaram que as duas subpopulações celulares adquiriram alterações citogenéticas com a mesma frequência quando acompanhadas por mais de seis meses do estudo. Este resultado sugere que não há evolução clonal preferencial das subpopulações CD38⁺ por meio de aquisição de alterações moleculares que pudessem justificá-la (Lin *et al.*, 2008). Embora o presente estudo não aborde análises de origem clonal, ele concorda com a proposta da origem clonal única das subpopulações. Após o *sorting* por citometria de fluxo das subpopulações MV-4-11 CD38^{High} e MV-4-11 CD38^{Low}, as células foram mantidas em cultura e submetidas a nova análise por citometria de fluxo com marcação para CD38. Observou-se que as células MV-4-11 CD38^{Low} apresentam uma célula progenitora comum em relação a MV-4-11 CD38^{High}, pois após a separação de MV-4-11 CD38^{Low}, surgiram populações heterogêneas CD38^{Low}CD38^{High} (dados não mostrados), resultado compatível com uma origem monoclonal das subpopulações.

O aspecto seguinte abordado neste estudo foi a expressão gênica diferencial associada à resposta a drogas e ao processo de leucemogênese. Sabe-se que os processos de embriogênese normal e tumorigênese compartilham muitas vias (Hutchin *et al.*, 2005). Desta forma, decidimos iniciar as análises de expressão gênica com genes do desenvolvimento.

Os genes *HOX* são genes mestres do desenvolvimento. Diversos genes desta classe, especialmente do cluster *HOXA*, estão superexpressos na HSC, e sua expressão é diminuída durante o comprometimento e diferenciação da linhagem hematopoética. Como MLL é uma proteína homóloga a Trithorax, que pertence ao complexo que regula a ativação transcricional de genes *HOX*, quando fusionada a proteínas parceiras, inibe a regulação negativa de genes *HOX* envolvidos na hematopoiese normal (Sauvageau *et al.*, 1995; Hess, 2004; Shah e Sukumar, 2010).

Devido a sua importância em processos vitais do desenvolvimento, o silenciamento de diversos genes *HOX*, para verificar sua influência na hematopoiese e leucemogênese, nem sempre é possível, pois está associado à letalidade embrionária precoce. Quando possível, por exemplo, sabe-se que a superexpressão de *HOXA5* na medula óssea e no cordão umbilical causa expansão de células progenitoras mielóides, e redução na formação e diferenciação de

unidades eritróides. Outros genes *HOX* desregulados nas leucemias mielóides agudas são *HOXA4*, *HOXA7* e *HOXA9* (Grier *et al.*, 2005).

É comum a desregulação de *HOXA9* estar associada a leucemias MLL⁺, e vias associadas a este gene são exploradas como potenciais alvos terapêuticos (Basavapathruni *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Daigle *et al.*, 2013).

HOXA9 está associado a vias que regulam a sobrevivência celular. Em camundongos *HoxA9*^{-/-} foi observado o aumento da apoptose em células do timo fetal. Com relação à hematopoiese, o silenciamento de *HoxA9* induziu apoptose em células leucêmicas portadoras do rearranjo MLL em camundongos, o que sugere que uma função de *HoxA9* é reprimir vias apoptóticas (Brumatti *et al.*, 2013). De fato, estes autores demonstraram que a superexpressão de *HoxA9* mantém a expressão de *Bcl-2*, uma proteína que bloqueia a apoptose. Os pesquisadores projetaram um sistema de expressão lentiviral de *Hoxa9* com um promotor indutível, em células progenitoras mielóides provenientes de fígado fetal murino, e observaram que quando silenciado, *HoxA9* leva à perda de expressão de *Bcl2* (Brumatti *et al.*, 2013).

Da mesma maneira, em duas linhagens celulares portadoras do rearranjo MLL que expressam elevados níveis de *HoxA9*, e altos níveis de *Bcl2*, o tratamento com um inibidor de *Bcl2*, induziu apoptose, o que indica que *Bcl2* é necessário à sobrevivência de células que expressam altos níveis de *HoxA9*, e sua inibição apresenta um impacto significativo na viabilidade celular (Brumatti *et al.*, 2013).

Devido à relação de *HOXA9* com vias apoptóticas, acreditava-se neste gene como um candidato à resposta diferencial ao Ara-C. Entretanto, este estudo não encontrou diferenças significativas na expressão de *HOXA9* entre as células MV-4-11 CD38^{High} e MV-4-11 CD38^{Low}. Porém, outros genes *HOX* foram encontrados diferencialmente expressos.

A assinatura transcricional das células MV-4-11 CD38^{Low} encontrou-se associada a altos níveis de expressão do cluster *HOXA*. Como mencionado, *HOXA* está associado à assinatura da HSC, células progenitoras não diferenciadas, o que sugere que as células MV-4-11 CD38^{Low} são menos comprometidas com a diferenciação que MV-4-11 CD38^{High}. Além disso, a superexpressão de *HOXA* também foi associada ao prognóstico adverso e sobrevivência reduzida em pacientes com LMA (Li *et al.*, 2012), concordando com os dados de resposta diferencial ao Ara-C apresentados neste estudo.

HOXA13 foi o gene mais diferencialmente expresso entre as células MV-4-11 CD38^{High} e MV-4-11 CD38^{Low}. Este gene codifica uma proteína envolvida na formação e desenvolvimento de membros (particularmente mãos e pés), trato urinário e sistema reprodutivo (Fromental-Ramain *et al.*, 1996). Em LMA, a translocação entre os genes *NUP98* e *HOXA13* foi associada ao prognóstico desfavorável de leucemia (Eguchi-Ishimae *et al.*, 2009; Shiba *et al.*, 2013), entretanto não foi encontrado na literatura, relato de associação desde gene em LMA-MLL.

Com relação ao prognóstico em câncer, *HOXA13* foi associado ao fenótipo altamente agressivo de câncer gástrico (GC, do inglês *gastric cancer*). Por meio da comparação de análises em larga escala de microarranjos de cDNA entre amostras de mucosa gástrica normal vs cancerosa foi demonstrado que a expressão de *HOXA13* encontra-se significativamente aumentada na mucosa GC. A análise foi complementada com imunohistoquímica do tecido canceroso, que indicou superexpressão de *HOXA13* nos tecidos GC, e alta correlação com o risco de recaída à doença especialmente em pacientes com fenótipo de GC mais agressivo, baixa sobrevivência geral e sobrevida livre de doença curta (Han *et al.*, 2013). Além das implicações em GC, a superexpressão de *HOXA13* e de um RNA longo não codificador que o regula, denominado *HOTTIP*, está associada à progressão e evolução tumorais em hepatocarcinoma (Quagliata *et al.*, 2014).

Os autores descrevem o processo de regulação de *HOXA13*: o RNA *HOTTIP* interage diretamente com a proteína *Trithorax* WDR5, o que induz alteração na configuração da cromatina que a torna mais aberta. Esta configuração facilita a formação de complexos WDR5/MLL que dirigem a trimetilação da marca epigenética ativadora transcrricional H3K4, e regula a transcrição de genes *HOXA*, inclusive de *HOXA13* (Quagliata *et al.*, 2014). Apesar de *HOTTIP* não apresentar expressão diferencial em nossa análise, acredita-se que a relação entre a desregulação de *MLL* e de *HOXA13* seja importante no escopo deste estudo.

Mesmo sem envolvimento direto na leucemogênese, *HOXA13* pode estar envolvido na resposta diferencial a drogas em LMA-MLL, visto que as células MV-4-11 CD38^{Low} apresentaram níveis elevados de expressão deste gene em relação a MV-4-11 CD38^{High}. Além de *HOXA13*, outros genes que codificam proteínas que interagem com este gene, como *MEIS1* (log2 - fold change = 8,05, p<0,001) e *SMAD1* (log2 - fold change = 6,25, p<0,001) também se encontraram diferencialmente expressos. Como em GC e hepatocarcinoma, *HOXA13* apresenta potencial como um biomarcador na identificação do prognóstico, este

estudo observou que este marcador apresentou-se associado à resposta diferencial ao Ara-C em LMA-MLL.

Além de processos associados ao desenvolvimento, a categoria resposta a estímulos destaca-se na análise de processos biológicos de GO.

Diversos estudos reforçam a ideia de que fenótipos associados à resistência apresentam desregulação da absorção ou metabolização de drogas. A superexpressão de proteínas envolvidas nestes processos como a glicoproteína P (P-gp), a proteína multidroga-resistente 1 (MRP-1), a proteína de resistência do câncer de mama (BCRP), a proteína de resistência do pulmão (LRP) e os transportadores ABC representam fatores prognósticos e marcadores de quimiorresistência em diversos tipos de câncer, inclusive em leucemias (Marzac *et al.*, 2011; Samanta *et al.*, 2013; Nasilowska-Adamska *et al.*, 2014). Como o agente quimioterápico convencional utilizado no tratamento de LMA é o Ara-C, os principais candidatos são genes que codificam enzimas metabolizadoras desta droga.

Análises do sequenciamento do transcriptoma em células leucêmicas em linhagens celulares humanas de LMA-MLL antes e após o tratamento com Ara-C não foram reportadas na literatura. Portanto, o presente estudo é pioneiro quando considerada esta abordagem.

Cai e colaboradores (2008) utilizaram uma abordagem semelhante à proposta por nosso estudo, de exposição em doses crescentes de Ara-C a linhagens celulares de LLA. Os pesquisadores geraram duas linhagens celulares resistentes, denominadas CEM/4Ara-C e CEM/20Ara-C, que foram quatro e vinte vezes mais resistentes à droga, respectivamente, que as células parentais. Foram observados dois mecanismos moleculares principais envolvidos na resistência ao Ara-C: 1) nas células CEM/4Ara-C, a resistência foi associada à perda total de função de hENT1/SLC29A1, o transportador de nucleosídeos utilizado pelo Ara-C para entrar na célula; e, 2) nas células CEM/20Ara-C, a mutações de perda de função no gene dCK, absolutamente necessário à forforilação de Ara-C até Ara-CMP (Cai *et al.*, 2008). Em LMA, uma análise comparativa de linhagens celulares murinas que se apresentaram entre 500-1000 vezes mais resistentes à droga quando comparadas às células parentais não expostas ao Ara-C também indicou *dCK* como um gene funcionalmente crítico à resposta ao Ara-C (Rathe *et al.*, 2014).

Mesmo que se encontre desregulada e associada à resposta diferencial ao Ara-C em LMA, quando há translocação no gene MLL, a desregulação de enzimas metabolizadoras da

droga não está associada à resposta diferencial ao Ara-C. Stam e colaboradores demonstraram por meio de ensaios de citotoxicidade *in vitro* com amostras de pacientes pediátricos com LMA-MLL, que esta leucemia é sensível ao Ara-C, já que doses mais baixas deste fármaco foram suficientes para induzir morte dos blastos leucêmicos. Entretanto, os genes que codificam enzimas metabolizadoras da droga, *hENT1*, *dCK*, *PN-I*, *CDA* e *dCMPD*, não apresentaram alteração significativa em níveis de expressão (Stam *et al.*, 2006).

O mesmo estudo considerou amostras de LLA pediátrica e encontrou *PN-I*, o gene que codifica a enzima que catalisa a desfosforilação de Ara-CMP de volta a Ara-C, superexpresso nas células MLL⁺. Contudo, a expressão de PN-I não afetou a sensibilidade ao Ara-C, visto que, as amostras de LLA não apresentaram diferenças na citotoxicidade *in vitro*, quando comparadas às amostras MLL⁻ (Stam *et al.*, 2006). Ainda em LLA, Mata *et al.* (2006) demonstraram a redução da expressão dos genes *dCK*, a quinase responsável por fosforilar Ara-C a Ara-CMP, e *hENT1*, o transportador de Ara-C do meio extra para o intracelular. Ambos os genes subexpressos são indícios de que a sensibilidade à droga seria atribuída à desregulação de enzimas metabolizadoras. Entretanto, os pesquisadores não realizaram ensaios de citotoxicidade *in vitro*, ou a medida do acúmulo de Ara-CTP, que evidenciariam a sensibilidade ao Ara-C (Mata *et al.*, 2006).

Visto que os dados são inconclusivos, o presente estudo avaliou a expressão dos genes do metabolismo do Ara-C, e evidenciou que o gene *NME1*, que codifica uma enzima nucleosídeo difosfato-quinase responsável pela fosforilação de Ara-CDP à forma ativa Ara-CTP, encontrou-se menos expresso nas células MV-4-11 CD38^{Low} que em MV-4-11 CD38^{High} ($p < 0,001$). A subexpressão de *NME1* poderia justificar a resposta diferencial ao Ara-C, visto que menos Ara-C em sua forma ativa leva à redução da incorporação deste análogo de citosina.

Na literatura, alterações na expressão da proteína NME1, não foram associadas ao aumento de toxicidade do Ara-C, entretanto, o aumento nos níveis desta proteína promoveu o crescimento e sobrevivência *in vitro* de células de LMA, e foram correlacionados ao prognóstico desfavorável da doença (Okabe-Kado *et al.*, 2009). Apesar de a maneira como ocorre este processo ser desconhecida, como altos níveis de *NME1* foram associados à produção de citocinas e a ativação das vias *MAPK* e *STAT*, acredita-se que haja uma associação entre estes processos que não envolvem a atividade de nucleotídeo difosfato-quinase desta molécula. A ativação das vias MAPK/STAT por fatores de crescimento

convencionais ocorre mais rapidamente do que a ativação de NME1, o que pode indicar uma ativação indireta das moléculas de NME1 no processo de crescimento celular (Okabe-Kado *et al.*, 2009).

No presente estudo três genes da via MAPK/STAT encontraram-se mais expressos nas células MV-4-11 CD38^{Low} que em MV-4-11 CD38^{High}: *MAPK13* (log2 fold change= 2,92), *MAPK3* (log2 fold change= 1,17) e *STAT3* (log2 fold change= 1,01) (p<0,001), o que fortalece a hipótese de que vias associadas à proliferação estão mais envolvidas na resposta diferencial ao Ara-C em LMA-MLL, do que a via metabolizadora da droga.

Quanto ao processo de reparo de DNA, a maioria dos genes das três vias avaliadas neste estudo, MMR, BER e NER, encontrou-se mais expresso nas células MV-4-11 CD38^{High} do que em MV-4-11 CD38^{Low}.

Na primeira das vias, MMR, ocorre o reparo espontâneo de danos no DNA (Allan e Travis, 2005). Fordham e colaboradores hipotetizaram que a incorporação de Ara-C ao DNA pode gerar uma lesão reconhecida pela maquinaria de MMR, o que faria com que o *status* de MMR influenciasse na resposta celular à toxicidade do Ara-C (Fordham *et al.*, 2011).

Constatou-se que em uma linhagem celular de LMA (HL-60), o silenciamento de MSH2 ou MSH6 tornou as células mais sensíveis aos efeitos do Ara-C quando comparadas às células controle. Em contrapartida, as células deficientes em MSH3 foram mais resistentes à citotoxicidade do Ara-C que as células controle. Por conseguinte, os dados demonstraram que o *status* de MMR afeta a resposta celular ao Ara-C em LMA, e sugeriram que o modo de interação entre o DNA, os componentes de MMR e o Ara-C é específico do gene silenciado (Fordham *et al.*, 2011). Visto que a depender do gene silenciado em MMR a resposta à droga é distinta, a diferença de expressão que caracterizou a assinatura do transcriptoma das células MV-4-11 CD38^{Low} pode ter influenciado na resposta atenuada destas células ao Ara-C, quando comparada a MV-4-11 CD38^{High}.

O tratamento com agentes inibidores de PARP, polimerases que participam do sistema de reparo por excisão de bases (BER), como agentes únicos ou associados a inibidores de DNA-metiltransferases ou histona-desacetilases foi eficaz na indução de apoptose em células provenientes de pacientes e linhagens celulares de LMA (Gaymes *et al.*, 2009). Ainda que os níveis de expressão de *PARP1* não tenham se mostrado diferencialmente expressos nas células MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High}, outros genes *PARP*, como *PARP8* (log2 fold

change= 1,21), *PARP12* (*log2 fold change*= 4,16) e *PARP14* (*log2 fold change*= 1,73), foram menos expressos nas células MV-4-11 CD38^{High} do que em MV-4-11 CD38^{Low}, e *PARP11* (*log2 fold change*= 2,14) foi menos expressa em MV-4-11 CD38^{Low}. Acredita-se que são necessários mais estudos para compreender a função destas polimerases na resistência ao Ara-C.

Um gene que participa nas três vias de reparo avaliadas neste estudo e que foi encontrado diferencialmente expresso entre as células estudadas foi *PCNA*. A proteína PCNA participa do processo de replicação do DNA por meio do processamento da fita *leading*, e quando ubiquitinada, participa da via de reparo dependente de RAD6 (Ncbia, 2015). Quando comparadas amostras de LMA ao diagnóstico com amostras de pacientes após a recaída à doença, *PCNA* não se encontrou diferencialmente expresso, entretanto, este gene encontrou-se altamente expresso nas amostras de LMA. Sugere-se que a desregulação em *PCNA* seja um processo indireto em LMA, em resposta à desregulação de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) que interagem com esta proteína (Kaaijk *et al.*, 2003). Sabe-se que *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C* regulam a entrada na fase G1 do ciclo celular, e que *CDKN1A* interage com *PCNA* (Ncbib, 2015).

As proteínas CDK não regulam apenas o ciclo celular em mamíferos, como também influenciam em outros processos celulares vitais como a auto-renovação de células-tronco, diferenciação, transcrição, regulação epigenética, apoptose e reparo de DNA (Aleem e Arceci, 2015). Uma variedade de CDKs encontrou-se diferencialmente expressa entre as células MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High} (*CDK8*, *CDK14*, *CDK18*, *CDK19*, *CDK20*, *CDKAL1*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDKN2C*, *CDKN2D*) ($p < 0,001$), e análises voltadas a estas quinases são necessárias.

Devido ao desenvolvimento de muitos agentes quimioterápicos cujo alvo são quinases (inibidores de quinase), Tibes *et al* (2012) realizaram o *screening* em larga escala por meio de RNA de interferência do “quinoma” humano (o conjunto de quinases humanas), com a finalidade de identificar alvos candidatos à intensificar a terapia de indução com Ara-C. Os pesquisadores observaram a superexpressão de quinases como WEE1, PKMYT1 e CHEK1 em leucemias mielóides quando comparadas à medula óssea de pacientes saudáveis, e validaram os resultados com o uso de um inibidor de WEE1, que sensibilizou 13 linhagens de LMA ao tratamento com Ara-C, com o aumento de duas a 25 vezes na citotoxicidade da

droga (Tibes *et al.*, 2012). Acredita-se que as quinases são alvos que combinados ao Ara-C poderiam tornar a terapia de indução mais eficiente às células residuais em LMA-MLL.

Por fim, na via de excisão por nucleotídeos (NER), variantes polimórficas no gene *ERCC2* - membro do complexo TFIIF, com função de helicase, foram correlacionadas à resposta a terapia de indução com Ara-C, toxicidade e sobrevivência em LMA *de novo* e secundária (Kuptsova-Clarkson *et al.*, 2010). Níveis de expressão dos genes *ERCC2* não foram avaliados quanto à funcionalidade da mutação na expressão gênica, quanto à influência direta na sobrevida de pacientes com LMA secundária ou se estão ligadas a variantes próximas.

Com relação à via de reparo direto, alterações na expressão de *MGMT* sugerem interferências na sensibilização de células de LMA à terapia com agentes citotóxicos como Ara-C. Quando agentes demetilantes foram combinados a outras drogas citotóxicas a expressão deste gene de reparo foi influenciada, e o uso da terapia combinada com Ara-C apresentou efeito sinérgico (Fuller *et al.*, 2015).

Por sinal, o uso de agentes demetilantes pode consistir numa terapia complementar ao tratamento com Ara-C, visto que células de LLA com o rearranjo MLL foram caracterizadas por um estado genômico geral metilado, e tanto a metilação no promotor quanto em região não-promotora respondem a agentes metilantes (Stumpel *et al.*, 2013). Acredita-se que a alteração dos perfis de metilação encontrados em LMA-MLL por meio de agentes demetilantes, possa constituir uma terapia complementar ao Ara-C.

Com o objetivo de verificar se a heterogeneidade de resposta ao Ara-C presente nas células MV-4-11, também foi apresentada por outras linhagens portadoras do rearranjo MLL, as células THP-1, NOMO-1 e MOLM-14 foram caracterizadas antes e após o tratamento, entretanto, devida à limitação no tempo para a realização desta pesquisa, não foi possível realizar o sequenciamento do RNA de todas as linhagens celulares estudadas.

Em THP-1 e NOMO-1, sabe-se que houve seleção de subpopulações com resposta diferencial ao Ara-C, pois a fração de células em sub-G1 estava aumentada nas células parentais quando comparadas às células resistentes à droga. Já MOLM-14 foi a única linhagem celular tratada que não apresentou diferença na fração de células em sub-G1 antes e após o tratamento em longo prazo, e também não houve diferenças significativas nas porções

celulares distribuídas nas demais fases do ciclo celular. Sugere-se, portanto, que nesta linhagem não houve seleção de subpopulações celulares resistentes ao Ara-C.

As células MOLM-14 mostraram-se mais sensíveis ao Ara-C que as outras linhagens estudadas, e o tratamento em longo prazo foi interrompido diversas vezes para que as células atingissem a densidade mínima adequada à proliferação. Acredita-se que este fato tenha prejudicado o processo de seleção de subpopulações mais resistentes à droga, e provavelmente a aplicação de uma dose inferior, porém, constante da droga, seria eficaz na seleção.

As quatro linhagens celulares estudadas apresentam heterogeneidade na proteína de fusão com MLL. Na linhagem MV-4-11, MLL encontra-se fusionado a AF4 [t(4;11)(q21;q23)], e nas linhagens THP-1, NOMO-1 e MOLM-14, a proteína de fusão é AF9 (ATCC e DSMZ). MLL-AF4 e MLL-AF9 são duas das proteínas de fusão mais frequentes nas leucemias portadoras do rearranjo MLL. Apesar de ambas as proteínas de fusão, AF4 e AF9, apresentarem função molecular semelhante na elongação transcricional, acredita-se que o parceiro de fusão influencie na resposta diferencial ao Ara-C, bem como, o comportamento bimodal que já havia sido observado em pacientes com LLC, e parece ser uma característica intrínseca à fusão MLL-AF4.

CONCLUSÕES

VI. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- O tratamento em longo prazo selecionou células MV-4-11 mais resistentes ao Ara-C que as células parentais;
- As células MV-4-11 resistentes ao Ara-C apresentaram distribuição bimodal do marcador CD38 (subpopulações MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High});
- As subpopulações MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High} estavam associadas à resistência ao Ara-C, sendo MV-4-11 CD38^{Low} mais resistentes à droga que MV-4-11 CD38^{High} quando comparados os números de células apoptóticas e o aprisionamento na fase S do ciclo celular, entretanto MV-4-11 CD38^{High} apresentam uma taxa proliferativa maior evidenciada pelo aumento do conteúdo celular na fase G2-M do ciclo celular. Acredita-se que o aumento na capacidade proliferativa das células MV-4-11 CD38^{High} esteja associado à relação do marcador CD38 com a molécula MAPK3 ou ERK1, conhecido por induzir ativação e proliferação celulares em leucemia linfocítica crônica;
- Quanto às análises do perfil global de expressão gênica, uma das análises de componente principal (PCA), demonstrou que a subpopulação MV-4-11 CD38^{High} é mais semelhante às células MV-4-11 parentais, mas ambas diferem da subpopulação MV-4-11 CD38^{Low}, resultado corroborado pelas análises de genes diferencialmente expressos (GDEs), que indicaram 579 GDEs entre as células MV-4-11 Parentais e a subpopulação MV-4-11 CD38^{High}, 1585 GDEs entre MV-4-11 Parental *versus* MV-4-11 CD38^{Low}, e 3395 GDEs entre MV-4-11 CD38^{High} *versus* MV-4-11 CD38^{Low};
- Após a aplicação de filtros aos genes diferencialmente expressos entre as células MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High}, 481 genes foram classificados em 197 categorias de processos biológicos de ontologia gênica (GO). Observou-se o enriquecimento de categorias associadas a processos do desenvolvimento/ embriogênese/morfogênese, e resposta a estímulos (compostos/hormônios/drogas);
- Dos genes do desenvolvimento desregulados nas leucemias portadoras do rearranjo MLL, os genes *HOX* apresentaram assinatura diferencial;
 - ✓ O cluster *HOXA* encontrou-se mais expresso nas células nas células MV-4-11 CD38^{Low}, portanto, associado à maior resistência ao Ara-C, e o cluster *HOXB*

encontrou-se mais expresso em MV-4-11 CD38^{High}, portanto associado à menor resistência à droga;

- ✓ *HOXA13* foi o gene mais diferencialmente expresso entre as células MV-4-11 CD38^{High} e MV-4-11 CD38^{Low}, e acredita-se que apesar de não ter sido relacionado anteriormente à leucemogênese em LMA-MLL, esteja envolvido na quimiorressistência ao Ara-C, uma vez que na literatura, sua superexpressão foi associada ao pior prognóstico e sobrevida livre de doença em outros cânceres;
- Dos genes relacionados à categoria resposta a estímulos, aqueles que codificam enzimas metabolizadoras de Ara-C não apresentaram um perfil diferencial de expressão entre as células MV-4-11 CD38^{High} e MV-4-11 CD38^{Low};
 - ✓ *NME1*, que codifica uma enzima nucleosídeo difosfato-quinase, apesar de se encontrar significativamente menos expresso nas células MV-4-11 CD38^{Low} que em MV-4-11 CD38^{High}, não fora associado à resistência ao Ara-C, entretanto sua relação com vias de proliferação como *MAPK/STAT*, podem relacioná-lo à resistência à droga em LMA-MLL;
- Ainda entre os genes relacionados à categoria resposta a estímulos, os envolvidos nas vias de reparo de DNA, MMR, BER e NER, apresentaram-se menos expressos nas células MV-4-11 CD38^{Low} do que em MV-4-11 CD38^{High}, enquanto que o gene *MGMT* da via de reparo direto encontrou-se mais expresso nas células MV-4-11 CD38^{Low};
- Enfim, o modelo *in vitro* proposto por este estudo para caracterizar células antes e após o tratamento em longo prazo com Ara-C, demonstrou que os mecanismos de resistência à droga em LMA-MLL vão além da detoxificação e metabolização desta, e parecem mais associados às propriedades proliferativas e ao desenvolvimento das células leucêmicas;
- As diferenças na resposta diferencial ao Ara-C e na expressão do marcador CD38 podem ser atribuídas ao parceiro de fusão MLL, que em MV-4-11 é a proteína AF4, e em THP-1, NOMO-1 e MOLM-14 é a proteína AF9, ou mesmo pela diferença no regime do tratamento em longo prazo com Ara-C.

VII. Referências

- ACS. 2014. Disponível em: < <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acutemyeloidaml/detailedguide/leukemia-acute-myeloid-myelogenous-classified>
- ACS. 2015. Disponível em: < <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-chroniclymphocyticcll/detailedguide/leukemia-chronic-lymphocytic-treating-chemotherapy>
- AGGER, K.; CLOOS, P. A.; CHRISTENSEN, J.; PASINI, D.; ROSE, S.; RAPPSILBER, J.; ISSAEVA, I.; CANAANI, E.; SALCINI, A. E.; HELIN, K. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in *HOX* gene regulation and development. *Nature*, v. 449, n. 7163, p. 731-4, Oct 11, 2007.
- ALBITAR, M. A. D., A. *Molecular Pathology of Leukemia* In: (Ed.). Management of Hematologic Malignancies, 2011. cap. 1, p.1-25.
- ALEEM, E.; ARCECI, R. J. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Front Cell Dev Biol*, v. 3, p. 16, 2015.
- ALLAN, J. M.; TRAVIS, L. B. Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, v. 5, n. 12, p. 943-55, Dec 2005.
- BACHAS, C.; SCHUURHUIS, G. J.; ASSARAF, Y. G.; KWIDAMA, Z. J.; KELDER, A.; WOUTERS, F.; SNEL, A. N.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. The role of minor subpopulations within the leukemic blast compartment of AML patients at initial diagnosis in the development of relapse. *Leukemia*, v. 26, n. 6, p. 1313-1320, 2012.
- BAHLIS, N. J. Darwinian evolution and tiding clones in multiple myeloma. *Blood*, v. 120, n. 5, p. 927-8, Aug 2, 2012.
- BALGOBIND, B. V.; RAIMONDI, S. C.; HARBOTT, J.; ZIMMERMANN, M.; ALONZO, T. A.; AUVRIGNON, A.; BEVERLOO, H. B.; CHANG, M.; CREUTZIG, U.; DWORZAK, M. N.; FORESTIER, E.; GIBSON, B.; HASLE, H.; HARRISON, C. J.; HEEREMA, N. A.; KASPERS, G. J.; LESZL, A.; LITVINKO, N.; NIGRO, L. L.; MORIMOTO, A.; PEROT, C.; PIETERS, R.; REINHARDT, D.; RUBNITZ, J. E.; SMITH, F. O.; STARY, J.; STASEVICH, I.; STREHL, S.; TAGA, T.; TOMIZAWA, D.; WEBB, D.; ZEMANOVA, Z.; ZWAAN, C. M.; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood*, v. 114, n. 12, p. 2489-96, Sep 17, 2009.
- BANKER, D. E.; GROUDINE, M.; WILLMAN, C. L.; NORWOOD, T.; APPELBAUM, F. R. Cell cycle perturbations in acute myeloid leukemia samples following in vitro exposures to therapeutic agents. *Leuk Res*, v. 22, n. 3, p. 221-39, Mar 1998.
- BASAVAPATHRUNI, A.; JIN, L.; DAIGLE, S. R.; MAJER, C. R.; THERKELSEN, C. A.; WIGLE, T. J.; KUNTZ, K. W.; CHESWORTH, R.; POLLOCK, R. M.; SCOTT, M. P.; MOYER, M. P.; RICHON, V. M.; COPELAND, R. A.; OLHAVA, E. J. Conformational adaptation drives potent, selective and durable inhibition of the human protein methyltransferase DOT1L. *Chem Biol Drug Des*, v. 80, n. 6, p. 971-80, Dec 2012.

BECK, S.; FARADJI, F.; BROCK, H.; PERONNET, F. Maintenance of *HOX* gene expression patterns. Adv Exp Med Biol, v. 689, p. 41-62, 2010.

BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med, v. 103, n. 4, p. 620-5, Oct 1985.

BERNT, K. M.; ARMSTRONG, S. A. Targeting epigenetic programs in MLL-rearranged leukemias. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, v. 2011, p. 354-60, 2011.

BOONSTRA, J. G.; VON'T VEER, M. B.; GRATAMA, J. W. The use of CD38 expression by monoclonal B lymphocytes as a prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. J Biol Reg and Homeost Agents, v. 18, n. 3-4, p. 340-346, Jul-Dec 2004.

BRIDGES, C. B.; MORGAN, T. H. The third-chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster*. Washington: Carnegie Institution of Washington, 1923. 251 p. Disponível em: < <http://catalog.hathitrust.org/Record/001639341> <http://hdl.handle.net/2027/mdp.39015021945004> >.

BRUMATTI, G.; SALMANIDIS, M.; KOK, C. H.; BILARDI, R. A.; SANDOW, J. J.; SILKE, N.; MASON, K.; VISSER, J.; JABBOUR, A. M.; GLASER, S. P.; OKAMOTO, T.; BOUILLET, P.; D'ANDREA, R. J.; EKERT, P. G. HoxA9 regulated Bcl-2 expression mediates survival of myeloid progenitors and the severity of HoxA9-dependent leukemia. Oncotarget, v. 4, n. 11, p. 1933-47, Nov 2013.

CAI, J.; DAMARAJU, V. L.; GROULX, N.; MOWLES, D.; PENG, Y.; ROBINS, M. J.; CASS, C. E.; GROS, P. Two distinct molecular mechanisms underlying cytarabine resistance in human leukemic cells. Cancer Res, v. 68, n. 7, p. 2349-57, Apr 1, 2008.

CHEN, C. W.; ARMSTRONG, S. A. Targeting DOT1L and HOX gene expression in MLL-rearranged leukemia and beyond. Exp Hematol, Jun 25, 2015.

CLINE, S. D.; OSHEROFF, N. Cytosine arabinoside lesions are position-specific topoisomerase II poisons and stimulate DNA cleavage mediated by the human type II enzymes. J Biol Chem, v. 274, n. 42, p. 29740-3, Oct 15 1999.

DAIGLE, S. R.; OLHAVA, E. J.; THERKELSEN, C. A.; BASAVAPATHRUNI, A.; JIN, L.; BORIACK-SJODIN, P. A.; ALLAIN, C. J.; KLAUS, C. R.; RAIMONDI, A.; SCOTT, M. P.; WATERS, N. J.; CHESWORTH, R.; MOYER, M. P.; COPELAND, R. A.; RICHON, V. M.; POLLOCK, R. M. Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. 2013. 1017-1025 Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/bloodjournal/122/6/1017.full.pdf>.

DEAGLIO, S.; AYDIN, S.; GRAND, M. M.; VAISITTI, T.; BERGUI, L.; D'ARENA, G.; CHIORINO, G.; MALAVASI, F. CD38/CD31 interactions activate genetic pathways leading to proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells. Mol Med, v. 16, n. 3-4, p. 87-91, Mar 2010.

DESCHLER, B. L., M. Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. In: (Ed.). Acute Leukemias, 2008. cap. 3,

EGUCHI-ISHIMAE, M.; EGUCHI, M.; OHYASHIKI, K.; YAMAGATA, T.; MITANI, K. Enhanced expression of the EVI1 gene in NUP98/HOXA-expressing leukemia cells. International Journal of Hematology, v. 89, n. 2, p. 253-256, Mar 2009.

ESPOSITO, M. T.; SO, C. W. DNA damage accumulation and repair defects in acute myeloid leukemia: implications for pathogenesis, disease progression, and chemotherapy resistance. Chromosoma, v. 123, n. 6, p. 545-61, Dec 2014.

FATHI, A. T.; GRANT, S.; KARP, J. E. Exploiting cellular pathways to develop new treatment strategies for AML. Cancer Treat Rev, v. 36, n. 2, p. 142-50, Apr 2010.

FORDHAM, S. E.; MATHESON, E. C.; SCOTT, K.; IRVING, J. A.; ALLAN, J. M. DNA mismatch repair status affects cellular response to Ara-C and other anti-leukemic nucleoside analogs. Leukemia, v. 25, n. 6, p. 1046-9, Jun 2011.

FRIEDBERG, E. C. How nucleotide excision repair protects against cancer. Nature Reviews Cancer, v. 1, n. 1, p. 22-33, Oct 2001.

FROHLING, S.; SCHOLL, C.; GILLILAND, D. G.; LEVINE, R. L. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. J Clin Oncol, v. 23, n. 26, p. 6285-95, Sep 10, 2005.

FROMENTAL-RAMAIN, C.; WAROT, X.; MESSADECQ, N.; LEMEURE, M.; DOLLE, P.; CHAMBON, P. Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. Development, v. 122, n. 10, p. 2997-3011, Oct 1996.

FULLER, M.; KLEIN, M.; SCHMIDT, E.; ROHDE, C.; GOLLNER, S.; SCHULZE, I.; QIANLI, J.; BERDEL, W. E.; EDEMIR, B.; MULLER-TIDOW, C.; TSCHANTER, P. 5-azacytidine enhances efficacy of multiple chemotherapy drugs in AML and lung cancer with modulation of CpG methylation. Int J Oncol, v. 46, n. 3, p. 1192-204, Mar 2015.

GAYMES, T. J.; SHALL, S.; MACPHERSON, L. J.; TWINE, N. A.; LEA, N. C.; FARZANEH, F.; MUFTI, G. J. Inhibitors of poly ADP-ribose polymerase (PARP) induce apoptosis of myeloid leukemic cells: potential for therapy of myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. Haematologica, v. 94, n. 5, p. 638-646, May 2009.

GHIA, P.; GUIDA, G.; STELLA, S.; GOTTARDI, D.; GEUNA, M.; STROLA, G.; SCIELZO, C.; CALIGARIS-CAPPIO, F. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. Blood, v. 101, n. 4, p. 1262-9, Feb 15, 2003.

GRIER, D. G.; THOMPSON, A.; KWASNIEWSKA, A.; MCGONIGLE, G. J.; HALLIDAY, H. L.; LAPPIN, T. R. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. Journal of Pathology, v. 205, n. 2, p. 154-171, Jan 2005.

HAN, Y.; TU, W. W.; WEN, Y. G.; LI, D. P.; QIU, G. Q.; TANG, H. M.; PENG, Z. H.; ZHOU, C. Z. Identification and validation that up-expression of HOXA13 is a novel independent prognostic marker of a worse outcome in gastric cancer based on immunohistochemistry. Medical Oncology, v. 30, n. 2, Jun 2013.

GUPTA, R. A.; SHAH, N.; WANG, K. C.; KIM, J.; HORLINGS, H. M.; WONG, D. J.; TSAI, M. C.; HUNG, T.; ARGANI, P.; RINN, J. L.; WANG, Y.; BRZOSKA, P.; KONG, B.; LI, R.; WEST, R. B.; VAN DE VIJVER, M. J.; SUKUMAR, S.; CHANG, H. Y. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. Nature, v. 464, n. 7291, p. 1071-6, Apr 15, 2010.

HATAHET, Z.; KOW, Y. W.; PURMAL, A. A.; CUNNINGHAM, R. P.; WALLACE, S. S. New substrates for old enzymes. 5-Hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for Escherichia coli endonuclease III and formamidopyrimidine DNA N-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA N-glycosylase. J Biol Chem, v. 269, n. 29, p. 18814-20, Jul 22, 1994.

HEAD, A. A. T., A. . Diagnosis and Classification of the Acute Myeloid Leukemias. In: (Ed.). Acute Leukemias, v.2, 2008. cap. 2, p.21-46.

HERRMANN, H.; BLATT, K.; SHI, J.; GLEIXNER, K. V.; CERNY-REITERER, S.; MULLAUER, L.; VAKOC, C. R.; SPERR, W. R.; HORNY, H. P.; BRADNER, J. E.; ZUBER, J.; VALENT, P. Small-molecule inhibition of BRD4 as a new potent approach to eliminate leukemic stem- and progenitor cells in acute myeloid leukemia AML. Oncotarget, v. 3, n. 12, p. 1588-99, Dec 2012.

HESS, J. L. MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. Trends Mol Med, v. 10, n. 10, p. 500-7, Oct 2004.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H.; PETTIT, J. E. Fundamentos em Hematologia. 2008.

HUTCHIN, M. E.; KARIAPPER, M. S. T.; GRACHTCHOUK, M.; WANG, A. Q.; WEI, L. B.; CUMMINGS, D.; LIU, J. H.; MICHAEL, L. E.; GLICK, A.; DLUGOSZ, A. A. Sustained Hedgehog signaling is required for basal cell carcinoma proliferation and survival: conditional skin tumorigenesis recapitulates the hair growth cycle. Genes & Development, v. 19, n. 2, p. 214-223, Jan 15, 2005.

ILENCIKOVA, D.; KOLENOVA, A. MLL Gene Alterations in Acute Myeloid Leukaemia (11q23/MLL+ AML). 2013. Disponível em: <
<http://www.intechopen.com/books/export/citation/EndNote/oncogene-and-cancer-from-bench-to-clinic/ml-l-gene-alterations-in-acute-myeloid-leukaemia-11q23-ml-l-aml->>.

JO, A.; TSUKIMOTO, I.; ISHII, E.; ASOU, N.; MITANI, S.; SHIMADA, A.; IGARASHI, T.; HAYASHI, Y.; ICHIKAWA, H. Age-associated difference in gene expression of paediatric acute myelomonocytic lineage leukaemia (FAB M4 and M5 subtypes) and its correlation with prognosis. Br J Haematol, v. 144, n. 6, p. 917-29, Mar 2009.

KAAIJK, P.; KASPERS, G. J. L.; VAN WERING, E. R.; BROEKEMA, G. J.; LOONEN, A. H.; HAHLEN, K.; SCHMIEGELOW, K.; JANKA-SCHAUB, G. E.; HENZE, G.; CREUTZIG, U.; VEERMAN, A. J. P. Cell proliferation is related to in vitro drug resistance in childhood acute leukaemia. British J Cancer, v. 88, n. 5, p. 775-781, Mar 10, 2003.

KAMBUROV, A.; STELZL, U.; LEHRACH, H.; HERWIG, R. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. Nucleic Acids Res, v. 41, n. Database issue, p. D793-800, Jan 2013.

KLAUS, C. R.; IWANOWICZ, D.; JOHNSTON, D.; CAMPBELL, C. A.; SMITH, J. J.; MOYER, M. P.; COPELAND, R. A.; OLHAVA, E. J.; SCOTT, M. P.; POLLOCK, R. M.; DAIGLE, S. R.; RAIMONDI, A. DOT1L inhibitor EPZ-5676 displays synergistic antiproliferative activity in combination with standard of care drugs and hypomethylating agents in MLL-rearranged leukemia cells. J Pharmacol Exp Ther, v. 350, n. 3, p. 646-56, Sep 2014.

KOGO, R.; SHIMAMURA, T.; MIMORI, K.; KAWAHARA, K.; IMOTO, S.; SUDO, T.; TANAKA, F.; SHIBATA, K.; SUZUKI, A.; KOMUNE, S.; MIYANO, S.; MORI, M. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. Cancer Res, v. 71, n. 20, p. 6320-6, Oct 15, 2011.

KRAUTER, J.; WAGNER, K.; SCHAFER, I.; MARSCHALEK, R.; MEYER, C.; HEIL, G.; SCHAICH, M.; EHNINGER, G.; NIEDERWIESER, D.; KRAHL, R.; BUCHNER, T.; SAUERLAND, C.; SCHLEGELBERGER, B.; DOHNER, K.; DOHNER, H.; SCHLENK, R. F.; GANSER, A. Prognostic factors in adult patients up to 60 years old with acute myeloid leukemia and translocations of chromosome band 11q23: individual patient data-based meta-analysis of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. J Clin Oncol, v. 27, n. 18, p. 3000-6, Jun 20, 2009.

KRIVTSOV, A. V.; ARMSTRONG, S. A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. Nat Rev Cancer, v. 7, n. 11, p. 823-33, Nov 2007.

KUPTSOVA-CLARKSON, N.; AMBROSONE, C. B.; WEISS, J.; BAER, M. R.; SUCHESTON, L. E.; ZIRPOLI, G.; KOPECKY, K. J.; FORD, L.; BLANCO, J.; WETZLER, M.; MOYSICH, K. B. XPD DNA nucleotide excision repair gene polymorphisms associated with DNA repair deficiency predict better treatment outcomes in secondary acute myeloid leukemia. Int J Mol Epidemiol Genet, v. 1, n. 4, p. 278-94, 2010.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods, v. 9, n. 4, p. 357-9, Apr 2012.

LAPIDOT, T.; SIRARD, C.; VORMOOR, J.; MURDOCH, B.; HOANG, T.; CACERES-CORTES, J.; MINDEN, M.; PATERSON, B.; CALIGIURI, M. A.; DICK, J. E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature, v. 367, n. 6464, p. 645-8, Feb 17, 1994.

LEWIN, B. Genes IX. 9th. Artmed, 2009.

LI, Z.; HUANG, H.; CHEN, P.; HE, M.; LI, Y.; ARNOVITZ, S.; JIANG, X.; HE, C.; HYJEK, E.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; ELKAHLOUN, A.; CAO, D.; SHEN, C.; WUNDERLICH, M.; WANG, Y.; NEILLY, M. B.; JIN, J.; WEI, M.; LU, J.; VALK, P. J.; DELWEL, R.; LOWENBERG, B.; LE BEAU, M. M.; VARDIMAN, J.; MULLOY, J. C.; ZELEZNIK-LE, N. J.; LIU, P. P.; CHEN, J. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1

oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. Nat Commun, v. 3, p. 688, 2012.

LI, Z.; HUANG, H.; LI, Y.; JIANG, X.; CHEN, P.; ARNOVITZ, S.; RADMACHER, M. D.; MAHARRY, K.; ELKAHLOUN, A.; YANG, X.; HE, C.; HE, M.; ZHANG, Z.; DOHNER, K.; NEILLY, M. B.; PRICE, C.; LUSSIER, Y. A.; ZHANG, Y.; LARSON, R. A.; LE BEAU, M. M.; CALIGIURI, M. A.; BULLINGER, L.; VALK, P. J.; DELWEL, R.; LOWENBERG, B.; LIU, P. P.; MARCUCCI, G.; BLOOMFIELD, C. D.; ROWLEY, J. D.; CHEN, J. Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox-gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients with cytogenetically abnormal AML. Blood, v. 119, n. 10, p. 2314-24, Mar 8, 2012.

LIN, T. T.; HEWAMANA, S.; WARD, R.; TAYLOR, H.; PAYNE, T.; PRATT, G.; BAIRD, D.; FEGAN, C.; PEPPER, C. Highly purified CD38 sub-populations show no evidence of preferential clonal evolution despite having increased proliferative activity when compared with CD38 sub-populations derived from the same chronic lymphocytic leukaemia patient. Br J Haematol, v. 142, n. 4, p. 595-605, Aug 2008.

MARSCHALEK, R. Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. Febs Journal, v. 277, n. 8, p. 1822-1831, Apr 2010.

MARZAC, C.; GARRIDO, E.; TANG, R. P.; FAVA, F.; HIRSCH, P.; DE BENEDICTIS, C.; CORRE, E.; LAPUSAN, S.; LALLEMAND, J. Y.; MARIE, J. P.; JACQUET, E.; LEGRAND, O. ATP Binding Cassette transporters associated with chemoresistance: transcriptional profiling in extreme cohorts and their prognostic impact in a cohort of 281 acute myeloid leukemia patients. Haematologica, v. 96, n. 9, p. 1293-1301, Sep 2011.

MATA, J. F.; SCRIDELI, C. A.; QUEIROZ, R. P.; MORI, B. O.; EMERENCIANO, M.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S.; TONE, L. G. Cytosine arabinoside-metabolizing enzyme genes are underexpressed in children with MLL gene-rearranged acute lymphoblastic leukemia. Braz J Med Biol Res, v. 39, n. 11, p. 1417-23, Nov 2006.

MATHEWS, C. K. DNA Synthesis as a Therapeutic Target: The First 65 Years. The FASEB Journal, Bethesda, MD, USA, v. 26, n. 6, p. 2231-2237, 2012.

MEYER, C; KOWARZ, E; HOFMANN, J; RENNEVILLE, A; ZUNA, J; TRKA, J; BEN ABDELALI, R; MACINTYRE, E; DE BRAEKELEER, E; DE BRAEKELEER, M; DELABESSE, E; DE OLIVEIRA, M. P; CAVE, H; CLAPPIER, E; VAN DONGEN, J. J. M; BALGOBIND, B. V; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M; BEVERLOO, H. B; PANZERGRUMAYER, R; TEIGLER-SCHLEGEL, A; HARBOTT, J; KJELDSSEN, E; SCHNITTGER, S; KOEHL, U; GRUHN, B; HEIDENREICH, O; CHAN, L. C; YIP, S. F; KRZYWINSKI, M; ECKERT, C; MORICKE, A; SCHRAPPE, M; ALONSO, C. N; SCHAFFER, B. W; KRAUTER, J; LEE, D. A; ZUR STADT, U; KRONNIE, G. T.; SUTTON, R.; IZRAELI, S; TRAKHTENBROT, L; LO NIGRO, L; TSAUR, G; FECHINA, L; SZCZEPANSKI, T; STREHL, S; ILENCIKOVA, D; MOLKENTIN, M; BURMEISTER, T; DINGERMANN, T; KLINGEBIEL, T; MARSCHALEK, R. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. Leukemia, v. 23, n. 8, p. 1490-1499, Aug 2009.

MILLIGAN, D. W.; GRIMWADE, D.; CULLIS, J. O.; BOND, L.; SWIRSKY, D.; CRADDOCK, C.; KELL, J.; HOMEWOOD, J.; CAMPBELL, K.; MCGINLEY, S.;

WHEATLEY, K.; JACKSON, G. Guidelines on the management of acute myeloid leukaemia in adults. Br J Haematol, v. 135, n. 4, p. 450-74, Nov 2006.

MILNE, T. A.; BRIGGS, S. D.; BROCK, H. W.; MARTIN, M. E.; GIBBS, D.; ALLIS, C. D.; HESS, J. L. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. Molecular Cell, v. 10, n. 5, p. 1107-1117, Nov 2002.

MUNOZ, L; NOMDEDEU, J; VILLAMOR, N; GUARDIA, R; COLOMER, D; RIBERA, J. M; TORRES, J. P; BERLANGA, J. J; FERNANDEZ, C; LLORENTE, A; DE LLANO, M. P. Q; SANCHEZ, J. M; BRUNET, S; SIERRA, J; GRP, S. C. Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. Leukemia, v.17, n.1, p. 76-82, Jan 2003.

MUNTEAN, A. G.; HESS, J. L. The Pathogenesis of Mixed-Lineage Leukemia. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, Vol 7, v. 7, p. 283-301, 2012.

NASILOWSKA-ADAMSKA, B.; SOLARSKA, I.; PALUSZEWSKA, M.; MALINOWSKA, I.; JEDRZEJCZAK, W. W.; WARZOGA, K. FLT3-ITD and MLL-PTD influence the expression of MDR-1, MRP-1, and BCRP mRNA but not LRP mRNA assessed with RQ-PCR method in adult acute myeloid leukemia. Ann Hematol, v. 93, n. 4, p. 577-93, Apr 2014.

NCBIa. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5111>. 2015.

NCBIb. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1026>. 2015.

NERVI, B.; RAMIREZ, P.; RETTIG, M. P.; UY, G. L.; HOLT, M. S.; RITCHEY, J. K.; PRIOR, J. L.; PIWNICA-WORMS, D.; BRIDGER, G.; LEY, T. J.; DIPERSIO, J. F. Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. Blood, v. 113, n. 24, p. 6206-14, Jun 11, 2009.

NGUYEN, A. T.; TARANOVA, O.; HE, J.; ZHANG, Y. DOT1L, the H3K79 methyltransferase, is required for MLL-AF9-mediated leukemogenesis. Blood, v. 117, n. 25, p. 6912-22, Jun 23, 2011.

NGUYEN, L. V.; VANNER, R.; DIRKS, P.; EAVES, C. J. Cancer stem cells: an evolving concept. Nat Rev Cancer, v. 12, n. 2, p. 133-43, Feb 2012.

OKABE-KADO, J; KASUKABE, T; HONMA, Y; KOBAYASHI, H; MASEKI, N; KANEKO, Y. Extracellular NM23 protein promotes the growth and survival of primary cultured human acute myelogenous leukemia cells. Cancer Sci, v.100, n.10, p.1885-94, Oct 2009.

PALMER, M., 2014. Disponível em: <
<http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/download/16-Nucleotides.ppt> >.

PLACKE, T.; FABER, K.; NONAMI, A.; PUTWAIN, S. L.; SALIH, H. R.; HEIDEL, F. H.; KRAMER, A.; ROOT, D. E.; BARBIE, D. A.; KRIVTSOV, A. V.; ARMSTRONG, S. A.; HAHN, W. C.; HUNTLY, B. J.; SYKES, S. M.; MILSOM, M. D.; SCHOLL, C.; FROHLING, S. Requirement for CDK6 in MLL-rearranged acute myeloid leukemia. Blood, v. 124, n. 1, p. 13-23, Jul 3, 2014.

PRENKERT, M. On mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. 2010. 88 (PhD). Clinical Research Center, Örebro University Hospital, Sweden.

QUAGLIATA, L.; MATTER, M. S.; PISCUOGLIO, S.; ARABI, L.; RUIZ, C.; PROCINO, A.; KOVAC, M.; MORETTI, F.; MAKOWSKA, Z.; BOLDANOVA, T.; ANDERSEN, J. B.; HAMMERLE, M.; TORNILLO, L.; HEIM, M. H.; DIEDERICH, S.; CILLO, C.; TERRACCIANO, L. M. Long noncoding RNA HOTTIP/HOXA13 expression is associated with disease progression and predicts outcome in hepatocellular carcinoma patients. Hepatology, v. 59, n. 3, p. 911-23, Mar 2014.

RATHE, S. K.; MORIARTY, B. S.; STOLTENBERG, C. B.; KURATA, M.; AUMANN, N. K.; RAHRMANN, E. P.; BAILEY, N. J.; MELROSE, E. G.; BECKMANN, D. A.; LISKA, C. R.; LARGAESPADA, D. A. Using RNA-seq and targeted nucleases to identify mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. Sci. Rep., v. 4, 2014.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nat Protoc, v. 1, n. 3, p. 1458-61, 2006.

ROBOZ, G. J. Novel approaches to the treatment of acute myeloid leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, v. 2011, p. 43-50, 2011.

RUDDLE, F. H.; BARTELS, J. L.; BENTLEY, K. L.; KAPPEN, C.; MURTHA, M. T.; PENDLETON, J. W. Evolution of Hox genes. Annu Rev Genet, v. 28, p. 423-42, 1994.

SAMANTA, S.; PURSELL, B.; MERCURIO, A. M. IMP3 Protein Promotes Chemoresistance in Breast Cancer Cells by Regulating Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Expression. Journal of Biological Chemistry, v. 288, n. 18, p. 12569-12573, May 3, 2013.

SAUVAGEAU, G.; THORSTEINSDOTTIR, U.; EAVES, C. J.; LAWRENCE, H. J.; LARGMAN, C.; LANSDORP, P. M.; HUMPHRIES, R. K. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. Genes Dev, v. 9, n. 14, p. 1753-65, Jul 15, 1995.

SCOTT, M. P. Vertebrate homeobox gene nomenclature. Cell, v. 71, n. 4, p. 551-553, 1992.

SEEBERG, E.; EIDE, L.; BJORAS, M. The base excision repair pathway. Trends Biochem Sci, v. 20, n. 10, p. 391-7, Oct 1995.

SHAH, N.; SUKUMAR, S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. Nat Rev Cancer, v. 10, n. 5, p. 361-371, 2010.

SHI, Z.; AZUMA, A.; SAMPATH, D.; LI, Y. X.; HUANG, P.; PLUNKETT, W. S-Phase arrest by nucleoside analogues and abrogation of survival without cell cycle progression by 7-hydroxystaurosporine. Cancer Res, v. 61, n. 3, p. 1065-72, Feb 1, 2001.

SHIBA, N.; ICHIKAWA, H.; TAKI, T.; PARK, M. J.; JO, A.; MITANI, S.; KOBAYASHI, T.; SHIMADA, A.; SOTOMATSU, M.; ARAKAWA, H.; ADACHI, S.; TAWA, A.; HORIBE, K.; TSUCHIDA, M.; HANADA, R.; TSUKIMOTO, I.; HAYASHI, Y. NUP98-NSD1 gene fusion and its related gene expression signature are strongly associated with a

poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. Genes Chromosomes & Cancer, v. 52, n. 7, p. 683-693, Jul 2013.

STAM, R. W.; HUBEEK, I.; DEN BOER, M. L.; BUIJS-GLADDINES, J. G.; CREUTZIG, U.; KASPERS, G. J.; PIETERS, R. MLL gene rearrangements have no direct impact on Ara-C sensitivity in infant acute lymphoblastic leukemia and childhood M4/M5 acute myeloid leukemia. Leukemia, v. 20, n. 1, p. 179-82, Jan 2006.

STUMPEL, D. J.; SCHNEIDER, P.; VAN ROON, E. H.; PIETERS, R.; STAM, R. W. Absence of global hypomethylation in promoter hypermethylated Mixed Lineage Leukaemia-rearranged infant acute lymphoblastic leukaemia. Eur J Cancer, v. 49, n. 1, p. 175-84, Jan 2013.

TIBES, R.; BOGENBERGER, J. M.; CHAUDHURI, L.; HAGELSTROM, R. T.; CHOW, D.; BUECHEL, M. E.; GONZALES, I. M.; DEMUTH, T.; SLACK, J.; MESA, R. A.; BRAGGIO, E.; YIN, H. H.; ARORA, S.; AZORSA, D. O. RNAi screening of the kinome with cytarabine in leukemias. Blood, v. 119, n. 12, p. 2863-72, Mar 22, 2012.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics, v. 25, n. 9, p. 1105-11, May 1, 2009.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B. A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; VAN BAREN, M. J.; SALZBERG, S. L.; WOLD, B. J.; PACHTER, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. Nat Biotechnol, v. 28, n. 5, p. 511-5, May 2010.

VAISITTI, T.; AYDIN, S.; ROSSI, D.; COTTINO, F.; BERGUI, L.; D'ARENA, G.; BONELLO, L.; HORENSTEIN, A. L.; BRENNAN, P.; PEPPER, C.; GAIDANO, G.; MALAVASI, F.; DEAGLIO, S. CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. Leukemia, v. 24, n. 5, p. 958-69, May 2010.

VAISITTI, T.; SERRA, S.; PEPPER, C.; ROSSI, D.; LAURENTI, L.; GAIDANO, G.; MALAVASI, F.; DEAGLIO, S. CD38 signals upregulate expression and functions of matrix metalloproteinase-9 in chronic lymphocytic leukemia cells. Leukemia, v. 27, n. 5, p. 1177-81, Apr 2013.

VARDIMAN, J. W.; HARRIS, N. L.; BRUNNING, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood, v. 100, n. 7, p. 2292-302, Oct 1, 2002.

YAP, K. C.; HO, L. P.; YIT, P. S.; GOH, Y. T. In Vitro Generation of Cytotoxic CD4 Lymphocyte Response against Autologous Acute Myeloid Leukemia. The Open Access Journal of Science and Technology - AgiAl, v. 3, p. 1-9, 2015.

ZEIJLEMAKER, W.; GRATAMA, J. W.; SCHUURHUIS, G. J. Tumor heterogeneity makes AML a "moving target" for detection of residual disease. Cytometry B Clin Cytom, Oct 5, 2013.

Anexo A. Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Papel da célula-tronco mesenquimal na modulação das propriedades biológicas da célula-tronco leucêmica em Leucemia Mielóide Aguda

Pesquisador: Larissa Oliveira Guimarães

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 09150112.7.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 176.703

Data da Relatoria: 07/01/2013

Apresentação do Projeto:

Na medula óssea, a célula-tronco hematopoética (HSC) reside em dois nichos distintos: o osteoblástico e o vascular. A princípio, evidências apontavam o nicho osteoblástico como responsável pela quiescência e auto-renovação das HSCs e o nicho vascular por mantê-las ativas. Recentemente, esse conceito modificou, sugerindo um papel do nicho vascular na ativação e quiescência das HSCs. Dentre as células do nicho vascular, as células-tronco mesenquimais (MSCs) secretam citocinas angiogênicas, imunomoduladoras, anti-apoptóticas, interleucinas, outros fatores tróficos e microRNAs, que podem interferir nas propriedades das HSCs. Essas informações conduziram-nos à hipótese de que o secretoma das MSCs da medula óssea (BM-MSCs) de pacientes portadores de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) atua no comportamento das célulastronco leucêmicas (LSCs) resultando em mudança de fenótipo e potencial leucemogênico. Para testar essa hipótese, populações de LSCs purificadas (CD34+CD38-) de duas linhagens de LMA - MV-4; 11 e MOL-M13 - serão cultivadas na presença ou ausência do meio condicionado BM-MSCs, para responder questões sobre alterações no perfil fenotípico, na capacidade de quimiorresistência ao tratamento com Ara-C, e na modulação diferencial do compartimento de LSC. Desta forma, serão realizados testes para avaliar o papel das MSCs no perfil fenotípico e potencial leucemogênico das LSCs e será investigado se moléculas secretadas pelas MSCs aumentam a resistência das LSCs a tratamentos quimioterápicos. Em uma segunda fase, as mesmas propriedades biológicas serão avaliadas em presença de secretoma da mesenquimal de indivíduo saudável. Assim, a caracterização do papel do secretoma das MSCs na modulação das LSCs permitirá identificar

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

moléculas secretadas pelas MSCs que atuam no processo de leucemogênese e influenciam no processo de quimioresistência.

Objetivo da Pesquisa:

Elucidar o papel das células-tronco mesenquimais do nicho estromal nas propriedades biológicas da célula-tronco leucêmica em linhagens celulares de Leucemia Mielóide Aguda.

Objetivos Secundários:

1) Isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais da medula óssea de indivíduos normais e indivíduos portadores de LMA; 2) Preparar o secretoma produzido pelas células-tronco mesenquimais da medula óssea de indivíduos normais e indivíduos portadores de LMA; 3) Investigar o papel do secretoma das células-tronco mesenquimais de indivíduos portadores de LMA na modulação do perfil fenotípico das células-tronco leucêmicas CD34+CD38- das linhagens celulares MV-4; 11 e MOL-M13; 4) Comparar o potencial clonogênico e avaliar a morfologia da população leucêmica antes e após o tratamento com o secretoma de BM-MSCL leucêmica; 5) Investigar o papel do secretoma das células-tronco mesenquimais de LMA na quimiorresistência das células-tronco leucêmicas CD34+CD38- das linhagens celulares MV-4; 11 e MOL-M13; 6) Avaliar as mesmas propriedades biológicas da célula-tronco leucêmica, após o tratamento com o secretoma da célula mesenquimal normal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos para os pacientes com leucemia mielóide aguda são praticamente inexistentes durante a realização da punção. Devido ao procedimento, é comum haver queixa de dor discreta no local da punção. No caso desta pesquisa, será apenas aproveitado uma pequena parte do material coletado para o diagnóstico, sem a necessidade de coletas adicionais.

Benefícios:

As pessoas que aceitarem participar da pesquisa não serão beneficiadas diretamente pelos nossos estudos, mas poderão contribuir para a melhor compreensão da patogênese da Leucemia Mielóide Aguda, objetivada pelo projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e os procedimentos não afetarão diretamente os pacientes porque será apenas aproveitado material de biópsia coletada para o diagnóstico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram incluídos um TCLE e um orçamento detalhado.

Recomendações:

Sem novas recomendações.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e a luz da Resolução CNS 196/96 e suas complementares, o meu parecer é que o projeto de pesquisa deve ser enquadrado na categoria "APROVADO"; bem como o TCLE, versão 2 datado de 07 de dezembro de 2012.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRAO PRETO, 18 de Dezembro de 2012

Assinador por:

Ricardo de Carvalho Cavalli
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Anexo B. Comitê de Revisão Institucional – IRB (Institutional Review Board) do University Hospitals Case Medical Center – Case Western Reserve University

CENTER FOR CLINICAL RESEARCH
AND TECHNOLOGY
11100 Euclid Avenue, Lakeside 1400
Cleveland, Ohio 44106

Non Human Subject Research Determination Request

Stanton L Gerson MD,

The Center for Clinical Research and Technology has reviewed the Activity Determination Form (DET) for the project entitled "Acute Myeloid Leukemia and leukemic stem cells" (IRB# NHR-13-99) and has determined that this project does not qualify as "human subject research" according to Federal regulations. According to the review, the current project does not involve "Human Subjects" under 45 CFR46 or 21 CFR 56.

This activity is also considered HIPAA Exempt

If the scope of the project changes or once you have a plan to engage in "human subject research", please be sure to contact the Center for Clinical Research and Technology for a new determination.

Thank you for your submission. Please retain this as proof of review.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Bailey H. July'.

UHCMC IRB Chairperson
(Signature was applied by the IRB Administration Office)

*The UHCMC IRB operates under the HHS Federal Wide Assurance of Compliance number 00003937 and
IRB registration numbers 00000684 and 00001691*

p. 1 of 1 for Stanton L Gerson MD iRIS Reference # 029086

APÊNDICE 1

Tabela 5. Alterações na expressão gênica entre as células MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High} observadas na análise de RNA-seq com $\log_2(\text{fold change}) \geq 4$. Os genes que apresentaram FPKM nulo (FPKM=0) foram excluídos da análise.

ID do gene	Nome do gene	FPKMs MV-4-11 CD38 ^{High}	FPKMs MV-4- 11 CD38 ^{Low}	Valor de <i>p</i>	Valor de <i>q</i>	$\log_2(\text{fold_chang}$ <i>e</i>) Absoluto
ENSG00000111058	ACSS3	0,00505209	4,92631	0,0001	0,00161488	9,92941
ENSG00000265185	SNORD3B-1	1420,71	1,64739	5,00E-05	0,000870115	9,75221
ENSG00000104267	CA2	1,34568	949,392	5,00E-05	0,000870115	9,46252
ENSG00000153904	DDAH1	0,00514241	2,27603	5,00E-05	0,000870115	8,78986
ENSG00000111331	OAS3	0,0206573	7,11436	0,0002	0,00293138	8,42794
ENSG00000166825	ANPEP	0,226888	68,8825	5,00E-05	0,000870115	8,24601
ENSG00000183900	AC099522.1	0,161731	47,4728	0,00065	0,00789539	8,19736
ENSG00000205176	REXO1L1P	0,0241303	6,97311	0,0001	0,00161488	8,17481
ENSG00000143776	CDC42BPA	0,024858	7,03244	5,00E-05	0,000870115	8,14417
ENSG00000177425	PAWR	0,00610032	1,6755	0,0002	0,00293138	8,10149
ENSG00000143995	MEIS1	45,2388	0,170134	5,00E-05	0,000870115	8,05474
ENSG00000136732	GYPC	0,259594	68,6253	5,00E-05	0,000870115	8,04634
ENSG00000112837	TBX18	0,171973	44,4347	5,00E-05	0,000870115	8,01336
ENSG00000180543	TSPYL5	0,0530688	13,643	5,00E-05	0,000870115	8,00608
ENSG00000146242	TPBG	0,0390743	9,94763	0,00055	0,00689596	7,99199
ENSG00000083857	FAT1	0,131174	32,0426	5,00E-05	0,000870115	7,93236

ENSG00000148516	ZEB1	0,0434363	10,5997	5,00E-05	0,000870115	7,9309
ENSG00000142700	DMRTA2	0,249197	60,3431	5,00E-05	0,000870115	7,91976
ENSG00000197702	PARVA	0,0273608	6,44301	5,00E-05	0,000870115	7,87948
ENSG00000116962	NID1	0,165277	38,7863	5,00E-05	0,000870115	7,87452
ENSG00000182983	ZNF662	0,00617255	1,4241	0,00065	0,00789539	7,84997
ENSG00000125810	CD93	0,226207	51,3429	5,00E-05	0,000870115	7,82638
ENSG00000099399	MAGEB2	0,0889796	19,8878	0,0001	0,00161488	7,80419
ENSG00000137265	IRF4	25,9357	0,120329	5,00E-05	0,000870115	7,75181
ENSG00000188153	COL4A5	0,0121168	2,60447	5,00E-05	0,000870115	7,74784
ENSG00000100336	APOL4	8,56788	0,040856	5,00E-05	0,000870115	7,71225
ENSG00000102595	UGGT2	0,0271482	5,55026	5,00E-05	0,000870115	7,67556
ENSG00000017427	IGF1	4,44319	0,0218843	5,00E-05	0,000870115	7,66555
ENSG00000198795	ZNF521	0,196737	39,9382	5,00E-05	0,000870115	7,66536
ENSG00000111052	LIN7A	0,212221	42,4704	5,00E-05	0,000870115	7,64475
ENSG00000121005	CRISPLD1	0,0756623	14,6479	5,00E-05	0,000870115	7,5969
ENSG00000165659	DACH1	0,0342336	6,62694	5,00E-05	0,000870115	7,59679
ENSG00000081189	MEF2C	0,271979	50,0743	5,00E-05	0,000870115	7,52443
ENSG00000131668	BARX1	0,51428	94,4981	5,00E-05	0,000870115	7,52159
ENSG00000134184	GSTM1	0,0824821	14,9782	5,00E-05	0,000870115	7,50457
ENSG00000109452	INPP4B	0,0878201	15,9472	5,00E-05	0,000870115	7,50453
ENSG00000181195	PENK	0,140518	25,3041	5,00E-05	0,000870115	7,49247

ENSG00000129946	SHC2	0,0409393	7,32584	5,00E-05	0,000870115	7,48336
ENSG00000180592	SKIDA1	0,0900852	16,1011	5,00E-05	0,000870115	7,48165
ENSG00000165731	RET	0,534738	95,4334	5,00E-05	0,000870115	7,47952
ENSG00000120784	ZFP30	0,0153804	2,74484	5,00E-05	0,000870115	7,47949
ENSG00000225210	AL589743.1	0,0212108	3,74657	5,00E-05	0,000870115	7,46463
ENSG00000105613	MAST1	0,00282904	0,497328	0,0064	0,0496918	7,45774
ENSG00000145248	SLC10A4	0,117959	20,5875	0,00035	0,00471325	7,44734
ENSG00000164749	HNF4G	0,0671708	11,6813	5,00E-05	0,000870115	7,44215
ENSG00000118473	SGIP1	0,0121984	2,02969	5,00E-05	0,000870115	7,37842
ENSG00000131435	PDLIM4	0,0408165	6,73898	0,0003	0,0041311	7,36723
ENSG00000176046	NUPR1	0,174975	28,8291	5,00E-05	0,000870115	7,36423
ENSG00000133142	TCEAL4	0,070744	11,6407	5,00E-05	0,000870115	7,36236
ENSG00000065833	ME1	0,0762471	12,4799	5,00E-05	0,000870115	7,35471
ENSG00000182263	FIGN	0,0444792	7,17992	0,0001	0,00161488	7,33469
ENSG00000169255	B3GALNT1	0,0310018	4,94829	5,00E-05	0,000870115	7,31843
ENSG00000181577	C6orf223	0,0756822	11,7076	0,0012	0,0130484	7,27328
ENSG00000196586	MYO6	0,0376504	5,80586	5,00E-05	0,000870115	7,2687
ENSG00000008394	MGST1	0,418709	64,1447	5,00E-05	0,000870115	7,25924
ENSG00000166426	CRABP1	0,173305	25,9458	0,00155	0,0160278	7,22604
ENSG00000072657	TRHDE	0,104612	15,6303	5,00E-05	0,000870115	7,22316
ENSG00000100433	KCNK10	17,2806	0,116027	5,00E-05	0,000870115	7,21855

ENSG00000122863	CHST3	0,0189108	2,75658	0,00105	0,0117011	7,18753
ENSG00000253821	RP11-246K15.1	0,229846	33,4537	0,0002	0,00293138	7,18535
ENSG00000158258	CLSTN2	0,0873426	12,6022	5,00E-05	0,000870115	7,17277
ENSG00000147394	ZNF185	22,9966	0,161031	5,00E-05	0,000870115	7,15794
ENSG00000136193	SCRN1	0,0363327	4,96304	5,00E-05	0,000870115	7,09381
ENSG00000118596	SLC16A7	0,0527181	7,03507	5,00E-05	0,000870115	7,06012
ENSG00000131711	MAP1B	0,0483683	6,43493	5,00E-05	0,000870115	7,05572
ENSG00000081803	CADPS2	0,0185701	2,45835	0,0002	0,00293138	7,04856
ENSG00000233452	STXBP5-AS1	0,0139807	1,82429	5,00E-05	0,000870115	7,02775
ENSG00000163993	S100P	0,288202	37,3595	0,00075	0,00887691	7,01825
ENSG00000197124	ZNF682	0,0257884	3,34175	5,00E-05	0,000870115	7,01774
ENSG00000158104	HPD	28,9289	0,223613	5,00E-05	0,000870115	7,01536
ENSG00000156535	CD109	0,0621741	7,76226	5,00E-05	0,000870115	6,96402
ENSG00000236333	TRHDE-AS1	0,0279889	3,40911	0,00175	0,0177088	6,9284
ENSG00000100234	TIMP3	0,39038	47,4543	5,00E-05	0,000870115	6,92551
ENSG00000069011	PITX1	241,288	1,98782	5,00E-05	0,000870115	6,92342
ENSG00000247498	RP11-392P7.6	2,09724	0,017769	5,00E-05	0,000870115	6,88298
ENSG00000107736	CDH23	0,0607499	7,1444	5,00E-05	0,000870115	6,87779
ENSG00000103381	CPPED1	0,103229	11,9089	5,00E-05	0,000870115	6,85006
ENSG00000168329	CX3CR1	0,146126	16,7213	5,00E-05	0,000870115	6,83833
ENSG00000254319	RP11-134O21.1	0,0243915	2,78541	0,0055	0,0441395	6,83537

ENSG00000105708	ZNF14	0,0397382	4,49586	5,00E-05	0,000870115	6,82193
ENSG00000227502	RP1-249H1.4	0,0287574	3,24937	0,00145	0,0151779	6,82008
ENSG00000204287	HLA-DRA	99,2418	0,879951	5,00E-05	0,000870115	6,81738
ENSG00000104332	SFRP1	0,0333189	3,7544	0,0001	0,00161488	6,8161
ENSG00000122378	FAM213A	0,148337	16,4127	5,00E-05	0,000870115	6,78978
ENSG00000105357	MYH14	0,0262127	2,89217	5,00E-05	0,000870115	6,78574
ENSG00000102445	KIAA0226L	0,361221	39,5961	5,00E-05	0,000870115	6,77633
ENSG00000162722	TRIM58	0,0374572	4,10273	0,0024	0,0227505	6,7752
ENSG00000143545	RAB13	0,116596	12,6649	5,00E-05	0,000870115	6,76317
ENSG00000214338	SOGA3	0,00713811	0,77481	0,00085	0,00984358	6,76216
ENSG00000242550	SERPINB10	0,0768114	8,31762	0,0007	0,00838618	6,75871
ENSG00000144649	FAM198A	0,00678611	0,725371	0,00475	0,0393832	6,73999
ENSG00000187791	FAM205CP	0,0406816	4,33134	0,00185	0,0185047	6,73429
ENSG00000143369	ECM1	0,239446	25,1948	5,00E-05	0,000870115	6,71728
ENSG00000147570	DNAJC5B	0,452679	47,3199	5,00E-05	0,000870115	6,70781
ENSG00000177337	DLGAP1-AS1	0,00690254	0,713671	0,0005	0,00635952	6,69199
ENSG00000168938	PPIC	0,530198	52,6401	0,00455	0,0380462	6,63349
ENSG00000165168	CYBB	0,148736	14,5804	0,00085	0,00984358	6,61514
ENSG00000149294	NCAM1	0,552586	53,8985	5,00E-05	0,000870115	6,6079
ENSG00000046604	DSG2	0,0258033	2,51525	0,00075	0,00887691	6,60701
ENSG00000134202	GSTM3	0,115584	11,261	5,00E-05	0,000870115	6,60625

ENSG00000075618	FSCN1	0,455271	44,1901	5,00E-05	0,000870115	6,60086
ENSG00000221988	PPT2,PPT2-EGFL8	1,86696	0,0192382	5,00E-05	0,000870115	6,60057
ENSG00000170558	CDH2	0,0343354	3,3312	0,0001	0,00161488	6,6002
ENSG00000179222	MAGED1	0,0638619	6,18298	5,00E-05	0,000870115	6,5972
ENSG00000054793	ATP9A	0,0197836	1,87522	0,0001	0,00161488	6,56662
ENSG00000111186	WNT5B	0,00639444	0,603235	5,00E-05	0,000870115	6,55976
ENSG00000171714	ANO5	0,01147	1,08078	0,0019	0,0189259	6,55807
ENSG00000118971	CCND2	18,2095	0,195405	5,00E-05	0,000870115	6,54209
ENSG00000076716	GPC4	0,0445755	4,14936	5,00E-05	0,000870115	6,5405
ENSG00000132010	ZNF20	0,0395848	3,67964	5,00E-05	0,000870115	6,53847
ENSG00000198722	UNC13B	0,0418044	3,88528	5,00E-05	0,000870115	6,53822
ENSG00000142949	PTPRF	0,409243	37,8307	5,00E-05	0,000870115	6,53046
ENSG00000105426	PTPRS	0,0512034	4,68916	5,00E-05	0,000870115	6,51695
ENSG00000177932	ZNF354C	0,0353314	3,19951	5,00E-05	0,000870115	6,50076
ENSG00000253230	LINC00599	24,64	0,273986	5,00E-05	0,000870115	6,49075
ENSG00000197859	ADAMTSL2	2,68614	0,0300263	0,00055	0,00689596	6,48316
ENSG00000073737	DHRS9	0,539943	47,8965	5,00E-05	0,000870115	6,47097
ENSG00000087116	ADAMTS2	0,33736	29,897	5,00E-05	0,000870115	6,46957
ENSG00000169083	AR	0,109472	9,53209	5,00E-05	0,000870115	6,44415
ENSG00000165757	KIAA1462	0,0439098	3,70891	5,00E-05	0,000870115	6,40031
ENSG00000120332	TNN	0,0230727	1,93005	0,0002	0,00293138	6,38631

ENSG00000004799	PDK4	0,0220523	1,83402	0,00045	0,0058256	6,37794
ENSG00000106066	CPVL	0,216424	17,9645	5,00E-05	0,000870115	6,37515
ENSG00000197561	ELANE	10,3815	850,949	5,00E-05	0,000870115	6,35698
ENSG00000156011	PSD3	0,0561095	4,53527	5,00E-05	0,000870115	6,3368
ENSG00000125841	NRSN2	0,0401182	3,22965	5,00E-05	0,000870115	6,33098
ENSG00000163624	CDS1	0,0324917	2,59157	0,0003	0,0041311	6,31761
ENSG00000178919	FOXE1	0,0597417	4,74035	0,0002	0,00293138	6,31011
ENSG00000197632	SERPINB2	0,11412	9,02497	0,00025	0,00354336	6,3053
ENSG00000171509	RXFP1	0,270047	21,2422	5,00E-05	0,000870115	6,29758
ENSG00000010810	FYN	0,434118	33,9948	5,00E-05	0,000870115	6,29108
ENSG00000137941	TTLL7	0,0106714	0,831595	5,00E-05	0,000870115	6,28406
ENSG00000183508	FAM46C	2,55048	0,0330887	5,00E-05	0,000870115	6,26829
ENSG00000215146	RP11-313J2.1	0,0541953	4,16649	0,00015	0,00229713	6,26452
ENSG00000170365	SMAD1	0,05725	4,37222	5,00E-05	0,000870115	6,25495
ENSG00000082397	EPB41L3	54,9826	0,729508	5,00E-05	0,000870115	6,23591
ENSG00000182253	SYNM	0,0366587	2,72585	5,00E-05	0,000870115	6,21641
ENSG00000146373	RNF217	0,0644884	4,77361	5,00E-05	0,000870115	6,2099
ENSG00000233098	RP11-344E13.3	0,554817	40,9764	5,00E-05	0,000870115	6,20664
ENSG00000214189	ZNF788	0,0840915	6,20901	0,0003	0,0041311	6,20626
ENSG00000184313	MROH7	0,0283895	2,06827	5,00E-05	0,000870115	6,18692
ENSG00000178163	ZNF518B	0,130618	9,43953	5,00E-05	0,000870115	6,17529

ENSG00000091262	ABCC6	0,0676808	4,86657	5,00E-05	0,000870115	6,16802
ENSG00000229676	ZNF492	0,0244292	1,74782	0,00035	0,00471325	6,16081
ENSG00000237036	ZEB1-AS1	0,0658364	4,67919	5,00E-05	0,000870115	6,15123
ENSG00000125384	PTGER2	4,39033	0,0623647	0,0001	0,00161488	6,13746
ENSG00000011201	KAL1	0,0708175	4,96871	5,00E-05	0,000870115	6,13262
ENSG00000106689	LHX2	0,0744352	5,21595	0,0002	0,00293138	6,1308
ENSG00000177374	HIC1	17,4998	0,25013	5,00E-05	0,000870115	6,12852
ENSG00000247774	PCED1B-AS1	0,21255	14,8163	5,00E-05	0,000870115	6,12324
ENSG00000237506	RPSAP15	13,8108	0,198165	5,00E-05	0,000870115	6,12295
ENSG00000116157	GPX7	0,15277	10,5021	5,00E-05	0,000870115	6,10318
ENSG00000142303	ADAMTS10	12,1273	0,177637	5,00E-05	0,000870115	6,09319
ENSG00000223865	HLA-DPB1	4,612	0,0682715	5,00E-05	0,000870115	6,07796
ENSG00000165626	BEND7	0,0237678	1,6053	5,00E-05	0,000870115	6,07769
ENSG00000150471	LPHN3	0,52056	34,9093	5,00E-05	0,000870115	6,0674
ENSG00000113494	PRLR	0,0285007	1,89467	5,00E-05	0,000870115	6,0548
ENSG00000225278	RP11-782C8.5	0,0126673	0,838395	0,00015	0,00229713	6,04844
ENSG00000242574	HLA-DMB	1,64356	0,0249456	0,00445	0,0373554	6,04189
ENSG00000133687	TMTC1	0,129533	8,45946	5,00E-05	0,000870115	6,02917
ENSG00000048052	HDAC9	0,812966	53,0807	5,00E-05	0,000870115	6,02885
ENSG00000231808	RP11-143M1.4	1,08633	70,6818	5,00E-05	0,000870115	6,0238
ENSG00000071242	RPS6KA2	0,298359	19,1781	5,00E-05	0,000870115	6,00627

ENSG00000171408	PDE7B	0,0692061	4,38262	5,00E-05	0,000870115	5,98475
ENSG00000007350	TKTL1	1,4911	92,6234	5,00E-05	0,000870115	5,95692
ENSG00000163564	PYHIN1	0,0362062	2,24619	5,00E-05	0,000870115	5,9551
ENSG00000115507	OTX1	0,37102	22,9499	5,00E-05	0,000870115	5,95085
ENSG00000149289	ZC3H12C	0,0510915	3,14682	5,00E-05	0,000870115	5,94467
ENSG00000005108	THSD7A	0,351515	21,5853	5,00E-05	0,000870115	5,94032
ENSG00000164742	ADCY1	0,114047	6,94884	5,00E-05	0,000870115	5,92907
ENSG00000182048	TRPC2	0,108603	6,54984	5,00E-05	0,000870115	5,91432
ENSG00000088256	GNA11	0,0555003	3,34364	5,00E-05	0,000870115	5,91278
ENSG00000154654	NCAM2	0,537927	32,3007	5,00E-05	0,000870115	5,90801
ENSG00000107954	NEURL1	0,0926492	5,52774	0,00155	0,0160278	5,89877
ENSG00000143452	HORMAD1	34,463	0,583221	5,00E-05	0,000870115	5,88486
ENSG00000095970	TREM2	0,580711	33,1975	5,00E-05	0,000870115	5,83711
ENSG00000169855	ROBO1	0,1643	9,33963	5,00E-05	0,000870115	5,82896
ENSG00000125845	BMP2	0,02661	1,5078	0,0036	0,0315156	5,82433
ENSG00000188042	ARL4C	19,0425	0,337272	5,00E-05	0,000870115	5,81917
ENSG00000130513	GDF15	0,326453	18,4161	5,00E-05	0,000870115	5,81795
ENSG00000197506	SLC28A3	0,585803	0,010408	0,0016	0,0164607	5,81465
ENSG00000101460	MAP1LC3A	0,231075	12,8672	5,00E-05	0,000870115	5,79919
ENSG00000106992	AK1	0,198229	11,0363	0,00045	0,0058256	5,79894
ENSG00000231389	HLA-DPA1	17,1319	0,314012	5,00E-05	0,000870115	5,76972

ENSG00000165300	SLITRK5	0,0410783	2,23981	5,00E-05	0,000870115	5,76886
ENSG00000112218	GPR63	0,043613	2,36829	0,0002	0,00293138	5,76294
ENSG00000185686	PRAME	0,34827	18,879	5,00E-05	0,000870115	5,76043
ENSG00000172403	SYNPO2	0,085799	4,63188	5,00E-05	0,000870115	5,7545
ENSG00000055732	MCOLN3	0,0619168	3,34227	0,0001	0,00161488	5,75435
ENSG00000188848	BEND4	0,0100533	0,539531	0,0034	0,0301253	5,74596
ENSG00000239636	RP4-728D4.2	0,215108	11,4475	0,00355	0,0311917	5,73383
ENSG00000117114	LPHN2	0,63806	33,9285	5,00E-05	0,000870115	5,73266
ENSG00000188822	CNR2	0,949695	0,0179213	0,0005	0,00635952	5,72772
ENSG00000136235	GPNMB	0,230144	12,096	5,00E-05	0,000870115	5,71585
ENSG00000197653	DNAH10	0,0206976	1,08532	5,00E-05	0,000870115	5,71251
ENSG00000164099	PRSS12	0,559617	29,247	5,00E-05	0,000870115	5,70771
ENSG00000117519	CNN3	0,0764329	3,97468	5,00E-05	0,000870115	5,7005
ENSG00000185842	DNAH14	0,222121	11,4687	5,00E-05	0,000870115	5,69022
ENSG00000155016	CYP2U1	0,0376493	1,91443	0,0036	0,0315156	5,66815
ENSG00000136943	CTSV	0,0787277	3,99278	0,0001	0,00161488	5,66438
ENSG00000153071	DAB2	0,122024	6,15225	5,00E-05	0,000870115	5,65588
ENSG00000155974	GRIP1	94,5702	1,90563	5,00E-05	0,000870115	5,63304
ENSG00000205364	MT1M	13,9389	0,281815	0,00015	0,00229713	5,62822
ENSG00000169884	WNT10B	6,79304	0,138017	5,00E-05	0,000870115	5,62114
ENSG00000231453	AC018470.4	0,157935	7,55238	5,00E-05	0,000870115	5,57953

ENSG00000216775	RP1-152L7.5	0,0451823	2,14369	5,00E-05	0,000870115	5,56819
ENSG00000024422	EHD2	0,036985	1,72609	0,00265	0,0246602	5,54442
ENSG00000018280	SLC11A1	0,158439	7,39349	5,00E-05	0,000870115	5,54425
ENSG00000159450	TCHH	0,0266789	1,24382	5,00E-05	0,000870115	5,54293
ENSG00000171291	ZNF439	0,291101	13,5199	5,00E-05	0,000870115	5,53742
ENSG00000174370	C11orf45	0,156433	7,1343	5,00E-05	0,000870115	5,51115
ENSG00000198853	RUSC2	0,0857091	3,85385	5,00E-05	0,000870115	5,49071
ENSG00000008311	AASS	0,0664503	2,97509	5,00E-05	0,000870115	5,48452
ENSG00000235601	RP11-231K24.2	0,135455	6,05424	0,00315	0,0283387	5,48206
ENSG00000198829	SUCNR1	0,0349882	1,55055	0,0004	0,00528039	5,46976
ENSG00000007264	MATK	48,6115	1,11284	5,00E-05	0,000870115	5,44898
ENSG00000137942	FBNP1L	0,0365744	1,59761	5,00E-05	0,000870115	5,44893
ENSG00000214357	NEURL1B	0,0960955	4,16917	5,00E-05	0,000870115	5,43915
ENSG00000103528	SYT17	0,0332388	1,39089	0,0001	0,00161488	5,38699
ENSG00000089091	DZANK1	0,709138	29,6699	5,00E-05	0,000870115	5,38679
ENSG00000164294	GPX8	0,0584303	2,43547	5,00E-05	0,000870115	5,38134
ENSG00000130592	LSP1	55,8834	1,34214	5,00E-05	0,000870115	5,37981
ENSG00000165338	HECTD2	0,0335528	1,3938	5,00E-05	0,000870115	5,37644
ENSG00000181856	SLC2A4	0,490023	0,0119144	0,00455	0,0380462	5,36208
ENSG00000124107	SLPI	1,25141	51,4383	5,00E-05	0,000870115	5,36122
ENSG00000127951	FGL2	82,8468	2,0416	5,00E-05	0,000870115	5,34267

ENSG00000235750	KIAA0040	0,0698104	2,82614	5,00E-05	0,000870115	5,33925
ENSG00000234465	PINLYP	0,195313	7,87216	0,00455	0,0380462	5,3329
ENSG00000170962	PDGFD	0,0703048	2,83017	0,0001	0,00161488	5,33112
ENSG00000139211	AMIGO2	0,0159819	0,639962	0,00625	0,0487806	5,32348
ENSG00000159208	C1orf51	0,0383539	1,52849	5,00E-05	0,000870115	5,31659
ENSG00000160593	AMICA1	5,90477	0,149502	5,00E-05	0,000870115	5,30364
ENSG00000142173	COL6A2	0,201306	7,76458	5,00E-05	0,000870115	5,26945
ENSG00000163563	MNDA	1,13575	42,8689	5,00E-05	0,000870115	5,23821
ENSG00000206262	C3orf72	0,032541	1,22347	0,0004	0,00528039	5,23258
ENSG00000177839	PCDHB9	0,0386455	1,4461	0,0006	0,00740759	5,22572
ENSG00000270107	CTD-2306M10.1	7,43515	0,198853	5,00E-05	0,000870115	5,22459
ENSG00000104447	TRPS1	0,359765	13,3501	5,00E-05	0,000870115	5,21365
ENSG00000164023	SGMS2	0,0651011	2,40394	5,00E-05	0,000870115	5,20657
ENSG00000130822	PNCK	0,0525664	1,9381	5,00E-05	0,000870115	5,20436
ENSG00000242516	LINC00960	0,177736	6,54667	5,00E-05	0,000870115	5,20295
ENSG00000249395	CASC9	0,0944886	3,4677	0,00035	0,00471325	5,1977
ENSG00000170801	HTRA3	6,4179	0,175018	5,00E-05	0,000870115	5,19653
ENSG00000187116	LILRA5	1,9134	0,0522637	0,0023	0,0220191	5,19419
ENSG00000154734	ADAMTS1	0,0471676	1,72308	5,00E-05	0,000870115	5,19105
ENSG00000227372	TP73-AS1	0,0945188	3,43634	0,0001	0,00161488	5,18413
ENSG00000174099	MSRB3	0,109164	3,92317	5,00E-05	0,000870115	5,16746

ENSG00000075275	CELSR1	0,116054	4,13552	5,00E-05	0,000870115	5,1552
ENSG00000146555	SDK1	0,191517	6,80481	5,00E-05	0,000870115	5,15101
ENSG00000105371	ICAM4	11,5898	0,327403	0,00545	0,043844	5,14564
ENSG00000163430	FSTL1	0,148199	5,20006	5,00E-05	0,000870115	5,13292
ENSG00000187037	GPR141	0,0399855	1,40091	0,0037	0,032178	5,13074
ENSG00000245164	LINC00861	1,19592	0,0342111	0,00295	0,0269175	5,12751
ENSG00000129596	CDO1	0,0799989	2,77805	0,00035	0,00471325	5,11795
ENSG00000158234	FAIM	0,113419	3,89238	5,00E-05	0,000870115	5,10092
ENSG00000141198	TOM1L1	0,0634246	2,17548	5,00E-05	0,000870115	5,10015
ENSG00000148154	UGCG	299,507	8,7504	5,00E-05	0,000870115	5,0971
ENSG00000206195	AP000525.9	0,061773	2,10689	5,00E-05	0,000870115	5,09199
ENSG00000074219	TEAD2	0,0170771	0,577546	0,0001	0,00161488	5,0798
ENSG00000181523	SGSH	4,72557	0,141197	5,00E-05	0,000870115	5,06471
ENSG00000255026	RP11-326C3.2	6,11513	0,182932	0,0002	0,00293138	5,06301
ENSG00000106031	HOXA13	0,547901	18,2938	5,00E-05	0,000870115	5,0613
ENSG00000112290	WASF1	0,197561	6,45044	5,00E-05	0,000870115	5,02903
ENSG00000133818	RRAS2	0,221752	7,17331	5,00E-05	0,000870115	5,01562
ENSG00000117016	RIMS3	1,60847	51,9657	5,00E-05	0,000870115	5,0138
ENSG00000184060	ADAP2	0,0723572	2,32951	5,00E-05	0,000870115	5,00874
ENSG00000140859	KIFC3	0,473903	15,2192	5,00E-05	0,000870115	5,00515
ENSG00000257093	KIAA1147	12,1758	0,380148	5,00E-05	0,000870115	5,00131

ENSG00000171992	SYNPO	0,0294915	0,943173	5,00E-05	0,000870115	4,99915
ENSG00000197965	MPZL1	28,257	0,888878	5,00E-05	0,000870115	4,99048
ENSG00000126467	TSKS	2,9961	0,094271	5,00E-05	0,000870115	4,99013
ENSG00000137628	DDX60	0,232429	7,37841	5,00E-05	0,000870115	4,98845
ENSG00000185198	PRSS57	99,221	3,14358	5,00E-05	0,000870115	4,98016
ENSG00000135047	CTSL	0,555617	17,5151	5,00E-05	0,000870115	4,97836
ENSG00000027075	PRKCH	0,199097	6,26591	5,00E-05	0,000870115	4,97598
ENSG00000167600	CYP2S1	0,174176	5,46471	5,00E-05	0,000870115	4,97153
ENSG00000100373	UPK3A	6,45803	0,205999	0,0003	0,0041311	4,97038
ENSG00000100979	PLTP	0,553711	17,3359	0,0014	0,0147775	4,96848
ENSG00000204682	CASC10	0,408099	12,7716	5,00E-05	0,000870115	4,96788
ENSG00000070915	SLC12A3	2,30481	0,0744373	5,00E-05	0,000870115	4,95247
ENSG00000067177	PHKA1	0,0215407	0,665388	5,00E-05	0,000870115	4,94906
ENSG00000238186	RP11-656D10.6	1,78866	55,1946	0,0001	0,00161488	4,94758
ENSG00000198502	HLA-DRB5	0,0999219	3,08213	0,00095	0,0107861	4,94698
ENSG00000053747	LAMA3	0,0670367	2,04789	5,00E-05	0,000870115	4,93305
ENSG00000169122	FAM110B	0,0457212	1,39584	0,0001	0,00161488	4,93213
ENSG00000168672	FAM84B	0,495639	15,0525	5,00E-05	0,000870115	4,92457
ENSG00000170421	KRT8	12,3567	0,408908	5,00E-05	0,000870115	4,91738
ENSG00000186205	MARC1	0,209713	6,30525	5,00E-05	0,000870115	4,91006
ENSG00000132170	PPARG	0,0904088	2,71771	5,00E-05	0,000870115	4,90979

ENSG00000189057	FAM111B	0,0335842	1,00671	5,00E-05	0,000870115	4,90572
ENSG00000224259	LINC01133	0,113877	3,39781	0,00025	0,00354336	4,89905
ENSG00000010818	HIVEP2	0,0233324	0,695529	0,00075	0,00887691	4,8977
ENSG00000205221	VIT	0,311943	9,28799	5,00E-05	0,000870115	4,89601
ENSG00000174233	ADCY6	0,129008	3,83146	5,00E-05	0,000870115	4,89236
ENSG00000135631	RAB11FIP5	0,359996	10,6676	0,0003	0,0041311	4,88912
ENSG00000130598	TNNI2	10,1959	0,344601	5,00E-05	0,000870115	4,88692
ENSG00000121310	ECHDC2	1,21933	36,0734	5,00E-05	0,000870115	4,88678
ENSG00000139132	FGD4	0,0772523	2,27654	5,00E-05	0,000870115	4,88112
ENSG00000052850	ALX4	0,124835	3,67824	5,00E-05	0,000870115	4,88092
ENSG00000230333	AC004538.3	0,145693	4,28686	0,00085	0,00984358	4,87892
ENSG00000164002	EXO5	3,80573	111,841	5,00E-05	0,000870115	4,87714
ENSG00000227278	RP11-656D10.5	2,5114	73,5755	0,00015	0,00229713	4,87266
ENSG00000136379	ABHD17C	0,622557	18,1607	5,00E-05	0,000870115	4,86647
ENSG00000135406	PRPH	0,0312383	0,909688	0,0006	0,00740759	4,86398
ENSG00000143797	MBOAT2	0,224041	6,48891	5,00E-05	0,000870115	4,85614
ENSG00000121316	PLBD1	0,0322223	0,932457	0,0025	0,0235233	4,85491
ENSG00000150907	FOXO1	0,0733389	2,11823	5,00E-05	0,000870115	4,85213
ENSG00000173376	NDNF	2,72698	0,0947737	5,00E-05	0,000870115	4,84667
ENSG00000162512	SDC3	0,317615	9,08915	5,00E-05	0,000870115	4,83879
ENSG00000153132	CLGN	0,290752	8,24737	5,00E-05	0,000870115	4,82607

ENSG00000123901	GPR83	0,655051	0,023136	0,0004	0,00528039	4,8234
ENSG00000168995	SIGLEC7	0,86073	0,0304374	0,00205	0,0201054	4,82165
ENSG00000152760	TCTEX1D1	1,56859	44,2817	5,00E-05	0,000870115	4,81917
ENSG00000166743	ACSM1	1,45618	0,0516282	0,00255	0,0238956	4,81789
ENSG00000179241	LDLRAD3	5,33331	0,18989	5,00E-05	0,000870115	4,81179
ENSG00000134827	TCN1	0,133953	3,75537	0,00025	0,00354336	4,80916
ENSG00000114757	PEX5L	0,117927	3,29748	5,00E-05	0,000870115	4,8054
ENSG00000083750	RRAGB	0,150771	4,20243	0,0006	0,00740759	4,80079
ENSG00000182890	GLUD2	0,0901895	2,50454	5,00E-05	0,000870115	4,79544
ENSG00000134954	ETS1	0,486836	13,3991	5,00E-05	0,000870115	4,78256
ENSG00000169413	RNASE6	38,9015	1,41424	5,00E-05	0,000870115	4,78173
ENSG00000104870	FCGRT	5,38214	147,582	5,00E-05	0,000870115	4,77719
ENSG00000147257	GPC3	0,220809	6,04095	0,0044	0,037017	4,77391
ENSG00000072818	ACAP1	19,8515	0,72622	5,00E-05	0,000870115	4,7727
ENSG00000183770	FOXL2	0,126331	3,44233	5,00E-05	0,000870115	4,7681
ENSG00000005187	ACSM3	15,4476	0,570931	5,00E-05	0,000870115	4,75792
ENSG00000099864	PALM	0,187636	5,06873	5,00E-05	0,000870115	4,75561
ENSG000000211695	TRGV9	3,60839	0,133729	5,00E-05	0,000870115	4,75397
ENSG00000227508	RP5-894D12.3	0,0717641	1,92332	5,00E-05	0,000870115	4,74419
ENSG00000255864	RP11-444D3.1	0,590809	15,8283	0,0015	0,0156031	4,74367
ENSG00000069812	HES2	0,514338	0,0193126	0,00095	0,0107861	4,7351

ENSG00000165152	TMEM246	0,204336	5,42446	5,00E-05	0,000870115	4,73046
ENSG00000262202	SNORD3D	24,9094	0,939144	5,00E-05	0,000870115	4,7292
ENSG00000108679	LGALS3BP	0,168553	4,43387	5,00E-05	0,000870115	4,71729
ENSG00000141510	TP53	56,757	2,16597	5,00E-05	0,000870115	4,71171
ENSG00000104219	ZDHHC2	0,622075	16,3002	5,00E-05	0,000870115	4,71166
ENSG00000012779	ALOX5	0,146319	3,83043	0,0007	0,00838618	4,71032
ENSG00000143850	PLEKHA6	0,0268252	0,696057	0,0017	0,0173116	4,69754
ENSG00000126767	ELK1	21,3888	0,826218	5,00E-05	0,000870115	4,69419
ENSG000000002746	HECW1	0,0752702	1,93946	5,00E-05	0,000870115	4,68743
ENSG00000162643	WDR63	0,0475828	1,21474	0,0001	0,00161488	4,67407
ENSG000000079156	OSBPL6	0,032037	0,813974	5,00E-05	0,000870115	4,66717
ENSG00000129910	CDH15	1,45186	0,0571444	5,00E-05	0,000870115	4,66715
ENSG00000267280	RP11-332H18.4	0,0580596	1,4718	0,0019	0,0189259	4,66391
ENSG00000103811	CTSH	2,31215	58,2944	5,00E-05	0,000870115	4,65605
ENSG00000131238	PPT1	59,7568	1504,28	5,00E-05	0,000870115	4,65383
ENSG00000172159	FRMD3	0,156246	3,93189	5,00E-05	0,000870115	4,65334
ENSG00000164309	CMYA5	0,0516956	1,29123	5,00E-05	0,000870115	4,64256
ENSG00000166341	DCHS1	0,0328291	0,816436	5,00E-05	0,000870115	4,63629
ENSG00000169902	TPST1	0,0581676	1,44287	0,0033	0,0294264	4,63259
ENSG00000272983	RP11-508N22.12	0,0496622	1,2296	5,00E-05	0,000870115	4,62989
ENSG00000139737	SLAIN1	0,392631	9,69455	5,00E-05	0,000870115	4,62593
ENSG00000166394	CYB5R2	0,142551	3,51535	5,00E-05	0,000870115	4,62412

ENSG00000170122	FOXD4	0,534826	13,1594	5,00E-05	0,000870115	4,62088
ENSG00000133055	MYBPH	143,964	5,86837	5,00E-05	0,000870115	4,61661
ENSG00000196345	ZKSCAN7	0,0420427	1,02475	0,00025	0,00354336	4,60728
ENSG00000189367	KIAA0408	0,0375634	0,913694	0,00055	0,00689596	4,60431
ENSG00000064300	NGFR	7,63821	0,316175	5,00E-05	0,000870115	4,59444
ENSG00000105639	JAK3	2,33768	0,0968802	5,00E-05	0,000870115	4,59273
ENSG00000261097	LINC00563	0,0758802	1,82744	0,0035	0,0308497	4,58996
ENSG00000005471	ABCB4	0,115753	2,78043	5,00E-05	0,000870115	4,58619
ENSG00000179104	TMTC2	0,0672848	1,61097	5,00E-05	0,000870115	4,58151
ENSG00000163220	S100A9	2,03608	48,5866	5,00E-05	0,000870115	4,57669
ENSG00000166816	LDHD	0,249895	5,89545	5,00E-05	0,000870115	4,5602
ENSG00000154358	OBSCN	0,103269	2,43347	5,00E-05	0,000870115	4,55853
ENSG00000260188	CTA-331P3.1	0,374086	8,80709	5,00E-05	0,000870115	4,55722
ENSG00000155307	SAMSN1	0,0431069	1,00883	0,00085	0,00984358	4,54862
ENSG00000185332	TMEM105	0,590558	13,8166	5,00E-05	0,000870115	4,54818
ENSG00000152763	WDR78	0,194791	4,5148	5,00E-05	0,000870115	4,53467
ENSG00000116774	OLFML3	0,202126	4,68187	5,00E-05	0,000870115	4,53376
ENSG00000004848	ARX	0,0966749	2,23297	0,00045	0,0058256	4,52968
ENSG00000121410	A1BG	0,556527	12,8016	0,00255	0,0238956	4,52373
ENSG00000179862	CITED4	34,82	799,858	5,00E-05	0,000870115	4,52176
ENSG00000103485	QPRT	2,45737	56,3941	5,00E-05	0,000870115	4,52036
ENSG00000029534	ANK1	0,066094	1,51238	5,00E-05	0,000870115	4,51616

ENSG00000134061	CD180	42,7979	1,88385	5,00E-05	0,000870115	4,50578
ENSG00000123119	NECAB1	0,0275677	0,62319	0,001	0,0112522	4,49862
ENSG00000101017	CD40	0,145235	3,27618	5,00E-05	0,000870115	4,49556
ENSG00000128849	CGNL1	0,0232773	0,522199	0,0002	0,00293138	4,4876
ENSG00000136026	CKAP4	0,448988	10,0575	5,00E-05	0,000870115	4,48545
ENSG00000072682	P4HA2	0,19326	4,32265	5,00E-05	0,000870115	4,4833
ENSG00000006740	ARHGAP44	7,98054	0,359439	5,00E-05	0,000870115	4,47267
ENSG00000230628	RP4-781K5.6	1,16472	0,0524902	5,00E-05	0,000870115	4,47179
ENSG00000142192	APP	4,99701	110,867	5,00E-05	0,000870115	4,47162
ENSG00000116191	RALGPS2	0,123095	2,71525	5,00E-05	0,000870115	4,46324
ENSG00000168389	MFSD2A	7,04326	155,346	5,00E-05	0,000870115	4,4631
ENSG00000158163	DZIP1L	0,311721	6,84298	5,00E-05	0,000870115	4,4563
ENSG00000054277	OPN3	115,608	5,26639	5,00E-05	0,000870115	4,45628
ENSG00000131236	CAP1	145,198	3186,75	5,00E-05	0,000870115	4,45599
ENSG00000168785	TSPAN5	0,157107	3,42637	5,00E-05	0,000870115	4,44686
ENSG00000118292	C1orf54	3,44952	75,1407	0,0017	0,0173116	4,44513
ENSG00000081377	CDC14B	0,210179	4,54325	5,00E-05	0,000870115	4,43403
ENSG00000149557	FEZ1	0,082908	1,78883	5,00E-05	0,000870115	4,43136
ENSG00000182326	C1S	0,124959	2,69043	0,0004	0,00528039	4,42832
ENSG00000148143	ZNF462	0,0410899	0,881158	5,00E-05	0,000870115	4,42255
ENSG00000141837	CACNA1A	0,025597	0,546521	5,00E-05	0,000870115	4,41623
ENSG00000128917	DLL4	0,0311027	0,662335	0,00175	0,0177088	4,41245

ENSG00000110811	LEPREL2	0,0372794	0,784333	5,00E-05	0,000870115	4,39502
ENSG00000069482	GAL	25,3363	1,21	5,00E-05	0,000870115	4,38813
ENSG00000074590	NUAK1	1,56658	0,0763795	5,00E-05	0,000870115	4,35829
ENSG00000179277	MEIS3P1	0,173353	3,5487	0,00015	0,00229713	4,3555
ENSG00000198346	ZNF813	0,0968754	1,97887	0,00075	0,00887691	4,3524
ENSG00000119411	BSPRY	0,350107	7,13236	5,00E-05	0,000870115	4,34851
ENSG00000184254	ALDH1A3	5,66922	0,278509	0,00025	0,00354336	4,34735
ENSG00000179855	GIPC3	0,234625	4,74258	5,00E-05	0,000870115	4,33724
ENSG00000267060	PTGES3L	0,70844	14,2648	5,00E-05	0,000870115	4,33167
ENSG00000171843	MLLT3	0,220895	4,41114	5,00E-05	0,000870115	4,31972
ENSG00000144619	CNTN4	1,6046	31,8117	5,00E-05	0,000870115	4,30927
ENSG00000181381	DDX60L	1,16097	22,8307	5,00E-05	0,000870115	4,29758
ENSG00000143515	ATP8B2	0,824789	16,073	5,00E-05	0,000870115	4,28447
ENSG00000188013	MEIS3P2	0,115419	2,2482	5,00E-05	0,000870115	4,28383
ENSG00000181982	CCDC149	0,195112	3,78621	5,00E-05	0,000870115	4,27838
ENSG00000213956	RP11-269M20.1	7,81116	0,404164	0,00015	0,00229713	4,27252
ENSG00000173641	HSPB7	0,20492	3,95879	5,00E-05	0,000870115	4,27193
ENSG00000157601	MX1	0,590418	11,3648	5,00E-05	0,000870115	4,26669
ENSG00000162739	SLAMF6	0,0937318	1,79407	0,0001	0,00161488	4,25855
ENSG00000237438	CECR7	0,166635	3,1691	5,00E-05	0,000870115	4,24931
ENSG00000186469	GNG2	2,10704	0,111373	5,00E-05	0,000870115	4,24175

ENSG00000151490	PTPRO	0,249461	4,71943	5,00E-05	0,000870115	4,24173
ENSG00000115165	CYTIP	13,225	0,69909	5,00E-05	0,000870115	4,24165
ENSG00000121236	TRIM6	0,458785	0,0243651	0,0001	0,00161488	4,23493
ENSG00000116985	BMP8B	2,28255	42,7164	5,00E-05	0,000870115	4,22607
ENSG00000116701	NCF2	0,84823	15,862	0,001	0,0112522	4,22498
ENSG00000041353	RAB27B	0,833252	0,0447134	5,00E-05	0,000870115	4,21997
ENSG00000049089	COL9A2	14,8031	275,66	5,00E-05	0,000870115	4,21891
ENSG00000150681	RGS18	0,760912	14,1008	5,00E-05	0,000870115	4,2119
ENSG00000101004	NINL	0,171164	3,16476	5,00E-05	0,000870115	4,20864
ENSG00000205517	RGL3	2,84127	0,153929	5,00E-05	0,000870115	4,2062
ENSG00000183621	ZNF438	1,44107	26,4905	5,00E-05	0,000870115	4,20026
ENSG00000134532	SOX5	0,317511	5,83266	5,00E-05	0,000870115	4,19927
ENSG00000185950	IRS2	1,35354	24,8347	5,00E-05	0,000870115	4,19755
ENSG00000009950	MLXIPL	0,170885	3,1274	5,00E-05	0,000870115	4,19387
ENSG00000185168	LINC00482	0,167699	3,03513	5,00E-05	0,000870115	4,17781
ENSG00000104341	LAPTM4B	2,23007	40,3612	5,00E-05	0,000870115	4,1778
ENSG00000126016	AMOT	0,0345604	0,623563	5,00E-05	0,000870115	4,17334
ENSG00000196730	DAPK1	0,519213	9,34626	5,00E-05	0,000870115	4,16999
ENSG00000182459	TEX19	4,89416	0,272212	5,00E-05	0,000870115	4,16826
ENSG00000156587	UBE2L6	1,26938	22,8133	5,00E-05	0,000870115	4,16768
ENSG00000167261	DPEP2	4,55619	0,254036	0,0007	0,00838618	4,16473

ENSG00000135898	GPR55	0,0397577	0,711438	5,00E-05	0,000870115	4,16143
ENSG00000181045	SLC26A11	0,920265	0,051491	5,00E-05	0,000870115	4,15966
ENSG00000059378	PARP12	0,520131	9,27853	5,00E-05	0,000870115	4,15695
ENSG00000234311	RP11-432J24.3	0,733306	12,9581	5,00E-05	0,000870115	4,14329
ENSG00000148488	ST8SIA6	3,21749	0,182155	5,00E-05	0,000870115	4,14269
ENSG00000133121	STARD13	0,216118	3,8151	5,00E-05	0,000870115	4,14183
ENSG00000164674	SYTL3	0,0837495	1,47218	5,00E-05	0,000870115	4,13573
ENSG00000140368	PSTPIP1	0,99665	17,5029	5,00E-05	0,000870115	4,13437
ENSG00000169026	MFSD7	0,177955	3,09854	0,0001	0,00161488	4,122
ENSG00000089876	DHX32	14,6887	0,845043	5,00E-05	0,000870115	4,11954
ENSG00000066136	NFYC	23,4401	406,399	5,00E-05	0,000870115	4,11585
ENSG00000137193	PIM1	80,4593	4,64365	5,00E-05	0,000870115	4,11493
ENSG00000180530	NRIP1	173,658	10,0278	5,00E-05	0,000870115	4,11417
ENSG00000106605	BLVRA	0,660383	11,4342	5,00E-05	0,000870115	4,11391
ENSG00000171617	ENC1	0,274423	4,73984	0,0049	0,0403802	4,11036
ENSG00000114541	FRMD4B	0,410476	7,08667	5,00E-05	0,000870115	4,10974
ENSG00000197608	ZNF841	0,478183	8,25273	5,00E-05	0,000870115	4,10924
ENSG00000171729	TMEM51	0,29335	5,03395	5,00E-05	0,000870115	4,101
ENSG00000229047	AF127577.10	157,641	9,20899	0,00065	0,00789539	4,09745
ENSG00000186862	PDZD7	1,13378	19,3092	5,00E-05	0,000870115	4,09007
ENSG00000235092	AC011747.7	0,0298109	0,507581	0,0013	0,0139316	4,08973

ENSG00000168243	GNG4	0,158264	2,6932	5,00E-05	0,000870115	4,08892
ENSG00000103056	SMPD3	11,8909	0,69878	5,00E-05	0,000870115	4,08888
ENSG00000105204	DYRK1B	5,77188	0,33932	5,00E-05	0,000870115	4,08832
ENSG00000135919	SERPINE2	0,230209	3,90589	5,00E-05	0,000870115	4,08463
ENSG00000085741	WNT11	0,107642	1,82324	0,00415	0,0353346	4,08219
ENSG00000137869	CYP19A1	0,0407819	0,690339	5,00E-05	0,000870115	4,08131
ENSG00000104974	LILRA1	10,8641	0,64504	0,0014	0,0147775	4,07403
ENSG00000125144	MT1G	263,012	15,6346	5,00E-05	0,000870115	4,07231
ENSG00000117010	ZNF684	2,77017	46,5779	5,00E-05	0,000870115	4,0716
ENSG00000102962	CCL22	0,131664	2,21323	5,00E-05	0,000870115	4,07121
ENSG00000162836	ACP6	0,226285	3,7597	5,00E-05	0,000870115	4,0544
ENSG00000088827	SIGLEC1	0,188638	3,12302	5,00E-05	0,000870115	4,04925
ENSG00000188282	RUFY4	0,227035	3,75502	0,0001	0,00161488	4,04784
ENSG00000072422	RHOBTB1	0,157012	2,59252	5,00E-05	0,000870115	4,04541
ENSG00000117226	GBP3	0,199584	3,28717	5,00E-05	0,000870115	4,04178
ENSG00000138316	ADAMTS14	0,610699	0,0371692	0,0004	0,00528039	4,03828
ENSG00000133958	UNC79	0,0320844	0,526275	5,00E-05	0,000870115	4,03587
ENSG00000154451	GBP5	0,060836	0,990774	0,0001	0,00161488	4,02556
ENSG00000105048	TNNT1	3,68098	59,9022	5,00E-05	0,000870115	4,02445
ENSG00000100292	HMOX1	0,427682	6,88461	5,00E-05	0,000870115	4,00876
ENSG00000182168	UNC5C	30,5492	1,89863	5,00E-05	0,000870115	4,00811
ENSG00000185666	SYN3	0,0379877	0,609294	5,00E-05	0,000870115	4,00353

Apêndice 2

Tabela 6. Análise de ontologia gênica (GO) para a categoria Processo Biológico, dos genes diferencialmente expressos na análise de RNA-seq entre as células MV-4-11 CD38^{Low} e MV-4-11 CD38^{High} com $\log_2(\text{fold change}) \geq 4$.

Termo de ontologia gênica	Categoria, nível	Total de genes do conjunto	Candidatos contidos (% de candidatos no conjunto total)	Valor de <i>p</i>	Valor de <i>q</i>
GO:0007155 Adesão celular	BP 2	1375	63 (4,7%)	2,45e-08	2,18e-06
GO:0006928 Movimento de componente celular	BP 3	1696	71 (4,3%)	1,07e-07	4,27e-05
GO:0060429 Desenvolvimento do epitélio	BP 4	1066	51 (4,9%)	1,85e-07	0,000112
GO:0010033 Resposta a substância orgânica	BP 3	2490	90 (3,8%)	6,32e-07	0,000127
GO:0030154 Diferenciação celular	BP 4	3504	116 (3,4%)	1,9e-06	0,000351
GO:2000026 Regulação do desenvolvimento de organismo multicelular	BP 4	1421	59 (4,2%)	1,98e-06	0,000351
GO:0010941 Regulação da morte celular	BP 4	1432	59 (4,2%)	2,32e-06	0,000351
GO:1901700 Resposta a compostos que contém oxigênio	BP 3	1309	54 (4,3%)	4,01e-06	0,000425
GO:0009653 Morfogênese da estrutura anatômica	BP 2	2484	88 (3,6%)	4,21e-06	0,000187
GO:0070887 Resposta celular a estímulo químico	BP 3	2376	84 (3,7%)	4,24e-06	0,000425
GO:0071229 Resposta celular a químico ácido	BP 4	151	14 (9,5%)	6,36e-06	0,000771
GO:0048513 Desenvolvimento de órgãos	BP 3	2958	99 (3,4%)	7,3e-06	0,000585
GO:0033993 Resposta a lipídios	BP 4	723	35 (5,0%)	8,58e-06	0,000867
GO:0009719 Resposta a estímulo endógeno	BP 2	1409	56 (4,1%)	9,18e-06	0,000269
GO:0071310 Resposta celular a substância orgânica	BP 4	1916	70 (3,8%)	1,01e-05	0,000872

GO:0048869 Processo do desenvolvimento celular	BP 3	3751	119 (3,2%)	1,16e-05	0,000714
GO:0042221 Resposta a químico	BP 2	3872	121 (3,2%)	1,21e-05	0,000269
GO:0048731 Desenvolvimento de sistema	BP 3	4093	127 (3,2%)	1,25e-05	0,000714
GO:0051094 Regulação positiva de processo do desenvolvimento	BP 4	997	43 (4,4%)	2,01e-05	0,00152
GO:0050793 Regulação de processo do desenvolvimento	BP 3	2011	72 (3,7%)	2,43e-05	0,0012
GO:0009725 Resposta a hormônio	BP 3	859	38 (4,6%)	2,69e-05	0,0012
GO:0007399 Desenvolvimento do sistema nervoso	BP 4	2053	73 (3,6%)	2,74e-05	0,00169
GO:0001655 Desenvolvimento do sistema urogenital	BP 4	316	20 (6,5%)	2,81e-05	0,00169
GO:1901701 Resposta celular a composto que contém oxigênio	BP 4	828	37 (4,6%)	3,08e-05	0,00169
GO:0008219 Morte celular	BP 3	1895	68 (3,7%)	3,56e-05	0,00143
GO:0048856 Desenvolvimento de estrutura anatômica	BP 2	4828	143 (3,0%)	3,68e-05	0,000491
GO:0016265 Morte	BP 2	1899	68 (3,7%)	3,81e-05	0,000491
GO:0044700 Sinalização de organismo simples	BP 2	5897	167 (2,9%)	3,86e-05	0,000491
GO:0016477 Migração celular	BP 3	1092	45 (4,2%)	4,11e-05	0,00143
GO:0007165 Transdução de sinal	BP 4	5400	155 (3,0%)	4,12e-05	0,00208
GO:0007154 Comunicação celular	BP 3	5995	169 (2,9%)	4,45e-05	0,00143
GO:0071695 Amadurecimento de estrutura anatômica	BP 4	45	7 (16,3%)	4,58e-05	0,00214
GO:0012501 Morte celular programada	BP 4	1808	65 (3,7%)	4,95e-05	0,00214
GO:0007275 Desenvolvimento de organismo multicelular	BP 3	4621	137 (3,0%)	5,31e-05	0,00143

GO:0051239 Regulação de processo de organismo multicelular	BP 3	2246	77 (3,5%)	5,35e-05	0,00143
GO:0009888 Desenvolvimento de tecido	BP 3	1727	63 (3,7%)	5,36e-05	0,00143
GO:0048870 Motilidade celular	BP 2	1175	47 (4,1%)	5,81e-05	0,000575
GO:0051674 Localização da célula	BP 2	1175	47 (4,1%)	5,81e-05	0,000575
GO:0031175 Desenvolvimento de projeção do neurônio	BP 4	850	37 (4,4%)	7,17e-05	0,0029
GO:0006952 Resposta de defesa	BP 3	1553	57 (3,8%)	7,53e-05	0,00189
GO:0044767 Processo de desenvolvimento de organismo simples	BP 2	5402	155 (2,9%)	7,57e-05	0,00067
GO:0044763 Processo celular de organismo simples	BP 2	11949	300 (2,6%)	8,28e-05	0,00067
GO:0071495 Resposta celular a estímulo endógeno	BP 3	1039	42 (4,2%)	8,99e-05	0,0021
GO:0051716 Resposta celular a estímulo	BP 2	6497	179 (2,8%)	9,18e-05	0,000681
GO:0001101 Resposta a químico ácido	BP 3	266	17 (6,5%)	9,43e-05	0,0021
GO:0048522 Regulação positiva de processo celular	BP 4	4421	131 (3,0%)	9,43e-05	0,00357
GO:0051410 Detoxificação de composto nitrogenado	BP 3	5	3 (60,0%)	0,000111	0,00234
GO:0071417 Resposta celular a composto organo-nitrogenado	BP 4	482	24 (5,2%)	0,000151	0,00521
GO:0051130 Regulação positiva de organização de componente celular	BP 4	789	34 (4,4%)	0,000166	0,00521
GO:0034694 Resposta a prostaglandina	BP 4	24	5 (20,8%)	0,000172	0,00521
GO:0098742 Adesão célula-célula via moléculas de adesão	BP 4	200	14 (7,1%)	0,000172	0,00521

à membrana plasmática					
GO:0098609 Adesão célula-célula	BP 3	201	14 (7,0%)	0,000181	0,00364
GO:0045165 Comprometimento do destino celular	BP 4	253	16 (6,4%)	0,000192	0,00553
GO:0032870 Resposta celular a estímulo hormonal	BP 4	558	26 (4,9%)	0,000201	0,00553
GO:1901699 Resposta celular a composto nitrogenado	BP 4	523	25 (5,0%)	0,000212	0,00558
GO:0030029 Processo baseado em filamento de actina	BP 3	576	27 (4,8%)	0,000231	0,00441
GO:0042127 Regulação de proliferação celular	BP 4	1428	52 (3,7%)	0,000236	0,00595
GO:0002009 Morfogênese de um epitélio	BP 4	464	23 (5,1%)	0,000279	0,00676
GO:0009605 Resposta a estímulo externo	BP 2	2113	70 (3,4%)	0,00029	0,00199
GO:0046651 Proliferação de linfócito	BP 4	244	15 (6,4%)	0,000298	0,00694
GO:0045595 Regulação de diferenciação celular	BP 4	1407	51 (3,7%)	0,000321	0,00705
GO:0048468 Desenvolvimento celular	BP 3	1950	66 (3,4%)	0,000322	0,00587
GO:0032943 Proliferação de célula mononuclear	BP 4	246	15 (6,4%)	0,000326	0,00705
GO:0006955 Resposta imune	BP 2	1457	52 (3,7%)	0,000337	0,00214
GO:0022603 Regulação de morfogênese de estrutura anatômica	BP 4	819	34 (4,2%)	0,000375	0,00783
GO:0045321 Ativação de leucócito	BP 2	673	29 (4,4%)	0,000436	0,00259
GO:0072001 Desenvolvimento do sistema renal	BP 4	276	16 (5,9%)	0,000492	0,00947
GO:0070661 Proliferação de leucócito	BP 3	257	15 (6,1%)	0,000505	0,00847
GO:0022601 Fase do ciclo menstrual	BP 2	2	2 (100,0%)	0,00051	0,00284
GO:0002694 Regulação de ativação de leucócito	BP 4	401	20 (5,2%)	0,000516	0,00947

GO:0001942 Desenvolvimento do folículo capilar	BP 3	83	8 (9,8%)	0,000528	0,00847
GO:0022404 Processo de ciclo de muda	BP 3	83	8 (9,8%)	0,000528	0,00847
GO:0022405 Processo de ciclo capilar	BP 4	83	8 (9,8%)	0,000528	0,00947
GO:0016337 Adesão célula-célula de organismo simples	BP 4	679	29 (4,4%)	0,00053	0,00947
GO:0050865 Regulação da ativação celular	BP 4	432	21 (5,1%)	0,000531	0,00947
GO:0048666 Desenvolvimento de neurônios	BP 4	978	38 (4,0%)	0,000574	0,00994
GO:1901698 Resposta a composto nitrogenado	BP 3	831	33 (4,1%)	0,00063	0,00965
GO:0048839 Desenvolvimento do ouvido interno	BP 3	180	12 (6,9%)	0,00065	0,00965
GO:0098602 Adesão celular de organismo simples	BP 2	721	30 (4,3%)	0,00067	0,00351
GO:0061448 Desenvolvimento de tecido conectivo	BP 4	229	14 (6,2%)	0,000688	0,0116
GO:0030198 Organização de matriz extracelular	BP 4	376	19 (5,1%)	0,000786	0,0129
GO:0001822 Desenvolvimento do rim	BP 3	260	15 (5,8%)	0,000793	0,0112
GO:0043062 Organização de estrutura extracelular	BP 3	377	19 (5,1%)	0,000812	0,0112
GO:0001775 Ativação celular	BP 3	903	35 (4,0%)	0,000835	0,0112
GO:0030155 Regulação de adesão celular	BP 4	570	25 (4,5%)	0,000873	0,0137
GO:0010463 Proliferação de célula mesenquimal	BP 4	51	6 (12,0%)	0,000883	0,0137
GO:0016358 Desenvolvimento de dendrito	BP 3	160	11 (7,0%)	0,000905	0,0117
GO:0048518 Regulação positiva de processo biológico	BP 3	4927	137 (2,8%)	0,00105	0,0132
GO:0010243 Resposta a composto organo-nitrogenado	BP 3	761	30 (4,1%)	0,00119	0,0145
GO:0048583 Regulação de resposta a estímulo	BP 3	3338	98 (3,0%)	0,0013	0,0149
GO:0023051 Regulação de sinalização	BP 3	2860	86 (3,1%)	0,0013	0,0149

GO:0044707 Processo de organismo simples/multicelular	BP 2	6462	172 (2,7%)	0,00134	0,00661
GO:0051240 Regulação positiva de processo de organismo multicelular	BP 4	1245	44 (3,6%)	0,00138	0,0209
GO:0042330 Táxis	BP 2	692	28 (4,2%)	0,00143	0,00671
GO:0006935 Quimiotáxis	BP 3	692	28 (4,2%)	0,00143	0,0159
GO:0002682 Regulação de processo do sistema imune	BP 3	1226	43 (3,6%)	0,0015	0,0159
GO:0070458 Detoxificação celular de composto nitrogenado	BP 3	3	2 (66,7%)	0,00151	0,0159
GO:0010646 Regulação de comunicação celular	BP 4	2875	86 (3,1%)	0,00153	0,0225
GO:0030036 Organização de citoesqueleto de actina	BP 4	525	23 (4,5%)	0,00159	0,0225
GO:0002495 Processamento de antígeno e apresentação de antígeno peptídico via MHC de classe II	BP 4	98	8 (8,2%)	0,0016	0,0225
GO:2000505 Regulação da homeostase energética	BP 4	11	3 (27,3%)	0,00165	0,0228
GO:0002504 Processamento de antígeno e apresentação de peptídeo ou antígeno polissacarídico via MHC de classe II	BP 3	99	8 (8,2%)	0,00171	0,0175
GO:0001657 Desenvolvimento do broto ureteral	BP 4	100	8 (8,1%)	0,00182	0,0239
GO:0070848 Resposta a fator de crescimento	BP 4	695	28 (4,1%)	0,00186	0,0239
GO:0046649 Ativação de linfócito	BP 3	572	24 (4,3%)	0,0019	0,019
GO:0051336 Regulação de atividade de hidrolase	BP 4	1226	43 (3,6%)	0,00191	0,0239
GO:0072164 Desenvolvimento de túbulo mesonéfrico	BP 4	101	8 (8,0%)	0,00194	0,0239
GO:0050776 Regulação de resposta imune	BP 4	814	31 (3,9%)	0,00197	0,0239

GO:0072358 Desenvolvimento do sistema cardiovascular	BP 4	876	33 (3,9%)	0,00201	0,0239
GO:0072359 Desenvolvimento do sistema circulatório	BP 4	876	33 (3,9%)	0,00201	0,0239
GO:0043583 Desenvolvimento do ouvido	BP 4	205	12 (6,0%)	0,00205	0,0239
GO:0070542 Resposta a ácido graxo	BP 4	59	6 (10,2%)	0,00211	0,0241
GO:0042303 Ciclo de muda	BP 3	104	8 (7,8%)	0,0022	0,0207
GO:0042633 Ciclo capilar	BP 4	104	8 (7,8%)	0,0022	0,0246
GO:0048144 Proliferação de fibroblasto	BP 3	81	7 (8,8%)	0,00221	0,0207
GO:0007009 Organização da membrana plasmática	BP 3	232	13 (5,7%)	0,00222	0,0207
GO:0097485 Orientação da projeção do neurônio	BP 4	413	19 (4,7%)	0,00224	0,0246
GO:0048646 Formação de estrutura anatômica envolvida na morfogênese	BP 2	1061	38 (3,7%)	0,00247	0,0105
GO:0019882 Processamento e apresentação de antígeno	BP 2	233	13 (5,6%)	0,00248	0,0105
GO:0001823 Desenvolvimento do mesonefro	BP 4	105	8 (7,7%)	0,00249	0,0266
GO:0050654 Processo metabólico do proteoglicano do sulfato de condroitina	BP 4	61	6 (9,8%)	0,00251	0,0266
GO:0051216 Desenvolvimento da cartilagem	BP 4	180	11 (6,1%)	0,00269	0,0282
GO:0008283 Proliferação celular	BP 2	1861	59 (3,3%)	0,0027	0,0107
GO:0098754 Detoxificação	BP 2	13	3 (23,1%)	0,00277	0,0107
GO:0045087 Resposta imune inata	BP 3	933	34 (3,7%)	0,00291	0,0265
GO:0018916 Processo metabólico nitrobenzênico	BP 3	4	2 (50,0%)	0,00297	0,0265
GO:0045113 Regulação do processo biossintético de	BP 4	4	2 (50,0%)	0,00297	0,03

integrina								
GO:0061209 Proliferação celular envolvida no desenvolvimento do mesonefro	BP 4	4	2 (50,0%)	0,00297	0,03			
GO:0072006 Desenvolvimento do néfron	BP 3	134	9 (6,8%)	0,00328	0,0286			
GO:0043931 Ossificação envolvida no amadurecimento ósseo	BP 4	15	3 (21,4%)	0,00347	0,0345			
GO:0048729 Morfogênese do tecido	BP 3	594	24 (4,1%)	0,00356	0,0304			
GO:0021700 Amadurecimento durante o desenvolvimento	BP 3	221	12 (5,6%)	0,0037	0,0309			
GO:0043588 Desenvolvimento da pele	BP 4	339	16 (4,8%)	0,00372	0,0363			
GO:0006887 Exocitose	BP 4	371	17 (4,7%)	0,004	0,0385			
GO:0048771 Remodelagem de tecido	BP 3	140	9 (6,5%)	0,00418	0,0337			
GO:0007420 Desenvolvimento cerebral	BP 3	641	25 (4,0%)	0,0042	0,0337			
GO:0060442 Ramificação envolvida na morfogênese da próstata	BP 4	15	3 (20,0%)	0,00427	0,0396			
GO:0007158 Adesão célula-célula do neurônio	BP 4	15	3 (20,0%)	0,00427	0,0396			
GO:0060322 Desenvolvimento da cabeça	BP 3	678	26 (4,0%)	0,00433	0,0341			
GO:0009966 Regulação da transdução de sinais	BP 4	2573	76 (3,0%)	0,00439	0,0396			
GO:0001944 Desenvolvimento da vasculatura	BP 4	573	23 (4,1%)	0,0044	0,0396			
GO:0045926 Regulação negativa do crescimento	BP 4	223	12 (5,5%)	0,00445	0,0396			
GO:0050789 Regulação de processo biológico	BP 2	10286	253 (2,5%)	0,00468	0,0174			
GO:0072089 Proliferação de célula-tronco	BP 3	142	9 (6,4%)	0,00482	0,0371			

GO:0030850 Desenvolvimento da glândula prostática	BP 4	51	5 (10,2%)	0,00486	0,0422
GO:0038171 Via de sinalização de canabinoide	BP 4	6	2 (40,0%)	0,00488	0,0422
GO:0034405 Resposta a estresse de corte de fluidos	BP 3	31	4 (12,9%)	0,005	0,0378
GO:1901654 Resposta a cetona	BP 4	119	8 (6,8%)	0,00511	0,0437
GO:0071559 Resposta a fator de crescimento beta transformador	BP 3	228	12 (5,3%)	0,00531	0,0386
GO:0071560 Resposta celular ao estímulo do fator de crescimento beta transformador	BP 4	228	12 (5,3%)	0,00531	0,0447
GO:0048002 Processamento de antígeno e apresentação de antígeno peptídico	BP 3	198	11 (5,6%)	0,00533	0,0386
GO:0030030 Organização de projeção celular	BP 3	1224	41 (3,4%)	0,00539	0,0386
GO:0050673 Proliferação celular epitelial	BP 3	323	15 (4,7%)	0,00576	0,0405
GO:0072659 Localização protéica para membrana plasmática	BP 4	174	10 (5,8%)	0,00586	0,0486
GO:0001568 Desenvolvimento de vaso sanguíneo	BP 3	553	22 (4,1%)	0,00592	0,0409
GO:0048858 Morfogênese de projeção celular	BP 4	865	31 (3,7%)	0,006	0,0491
GO:0007163 Estabelecimento ou manutenção da polaridade da célula	BP 3	149	9 (6,2%)	0,00603	0,041
GO:0048585 Regulação negativa a resposta a estímulo	BP 4	1238	41 (3,4%)	0,00619	0,0491
GO:0060562 Morfogênese de tubo epitelial	BP 4	326	15 (4,7%)	0,00626	0,0491
GO:0008038 Reconhecimento neuronal	BP 4	34	4 (12,1%)	0,00628	0,0491

GO:0043434 Resposta a hormônio peptídico	BP 4	431	18 (4,4%)	0,00632	0,0491
GO:0050794 Regulação de processo celular	BP 3	9880	243 (2,5%)	0,0064	0,0428
GO:0008544 Desenvolvimento da epiderme	BP 4	297	14 (4,8%)	0,0065	0,0499
GO:0035239 Morfogênese de tubo	BP 3	488	20 (4,2%)	0,00655	0,043
GO:0016049 Crescimento celular	BP 2	421	18 (4,3%)	0,00663	0,0236
GO:0030574 Processo catabólico de colágeno	BP 4	77	6 (8,0%)	0,00699	0,0517
GO:0030048 Movimento baseado em filamento de actina	BP 4	75	6 (8,0%)	0,00699	0,0517
GO:0048545 Resposta a hormônio esteroide	BP 4	371	16 (4,5%)	0,007	0,0517
GO:0034330 Organização de junção celular	BP 3	238	12 (5,1%)	0,00719	0,0465
GO:0044851 Fase do ciclo capilar	BP 2	6	2 (33,3%)	0,0072	0,0247
GO:0022617 Desmontagem de matriz extracelular	BP 4	127	8 (6,5%)	0,00721	0,0527
GO:1901565 Processo catabólico de composto organonitrogenado	BP 4	1091	37 (3,4%)	0,0074	0,0534
GO:0034329 Montagem de junção celular	BP 4	211	11 (5,3%)	0,00764	0,0545
GO:0023057 Regulação negativa da sinalização	BP 4	1106	37 (3,4%)	0,00783	0,0551
GO:0031214 Desenvolvimento de órgão biomineral	BP 4	128	8 (6,3%)	0,00792	0,0551
GO:0048534 Desenvolvimento de órgão hematopoiético ou linfoide	BP 3	746	27 (3,7%)	0,00808	0,0514
GO:0032990 Morfogênese da parte celular	BP 4	884	31 (3,6%)	0,00814	0,0561
GO:0007417 Desenvolvimento do sistema nervoso central	BP 4	854	30 (3,6%)	0,00833	0,0564
GO:0097009 Homeostase de energia	BP 4	19	3 (15,8%)	0,0085	0,0564

GO:0042634 Regulação do ciclo capilar	BP 4	19	3 (15,8%)	0,0085	0,0564
GO:0034103 Regulação da remodelagem de tecidos	BP 4	58	5 (8,9%)	0,00856	0,0564
GO:0002520 Desenvolvimento do sistema imune	BP 2	786	28 (3,7%)	0,00866	0,0275
GO:0006950 Resposta ao estresse	BP 2	3557	98 (2,8%)	0,00867	0,0275
GO:0007269 Secreção de neurotransmissores	BP 4	130	8 (6,2%)	0,00867	0,0565
GO:0042493 Resposta a drogas	BP 3	402	17 (4,3%)	0,00882	0,0548
GO:0030900 Desenvolvimento do prosencéfalo	BP 3	342	15 (4,5%)	0,00889	0,0548
GO:0042113 Ativação de células B	BP 4	215	11 (5,2%)	0,00906	0,0584
GO:0040012 Regulação da locomoção	BP 3	641	24 (3,8%)	0,00906	0,0551
GO:0051604 Maturação protéica	BP 4	575	22 (3,9%)	0,00979	0,0596
GO:0055093 Resposta à hiperóxia	BP 3	20	3 (15,0%)	0,00983	0,0569
GO:0036296 Resposta a níveis aumentados de oxigênio	BP 4	20	3 (15,0%)	0,00983	0,0596
GO:0030204 Processo metabólico do sulfato de condroitina	BP 4	58	5 (8,6%)	0,0099	0,0596
GO:0051599 Resposta à pressão hidrostática	BP 3	7	2 (28,6%)	0,00994	0,0569
GO:0042167 Processo catabólico do grupo heme	BP 4	7	2 (28,6%)	0,00994	0,0596
GO:0046149 Processo catabólico do pigmento	BP 4	7	2 (28,6%)	0,00994	0,0596
GO:0071455 Resposta celular à hiperóxia	BP 4	7	2 (28,6%)	0,00994	0,0596
GO:0060526 Morfogênese do ácino glandular da próstata	BP 4	7	2 (28,6%)	0,00994	0,0596

Apêndice 3

Manuscrito

HOX signature associated with CD38 marker and differential response to Cytarabine in Acute Myeloid Leukemia cell line carrying MLL-AF4 fusion

Larissa O. Guimarães¹; Yulan Qing²; Stanton L. Gerson² and Aparecida M. Fontes¹

¹Departament of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil;

²Case Comprehensive Cancer Center, National Center for Regenerative Medicine, Seidman Cancer Center, University Hospitals Case Medical Center and Case Western Reserve University, Cleveland, USA.

Keywords: AML, nucleoside analogue, Ara-C, drug response, MLL, *HOX* genes

***Corresponding Author:** Aparecida Maria Fontes, Departament of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, 14090-190, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Tel: +55 16 3315-3080/ **Email address:** aparecidamfontes@usp.br

Financial support: *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Brazil; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Brazil*

Abstract

The heterogeneity of Acute Myeloid Leukemia (AML) became a challenge for the success of the conventional chemotherapy agent Cytarabine (Ara-C), especially in leukemias with poor prognosis, as those harboring MLL rearrangement. Since AML-MLL cells are considered sensitive to Ara-C when compared with leukemias that do not carry the rearrangement, but relapse is frequent, the present study investigated whether a *HOX* gene signature is related to resistance to Ara-C in AML-MLL. The approach consisted in selecting Ara-C subpopulations through long-term exposure to the drug of a MLL⁺ human cell line. The long-term treated cells presented characteristics associated with resistance to Ara-C such as decreased number of apoptotic cells and increased content of cells in the synthesis phase. Also, the cells exhibited a bimodal distribution of the CD38 marker associated with differential response to Ara-C. The cells generated through long-term exposure, called MV-4-11 CD38^{High} and MV-4-11 CD38^{Low}, presented 3395 differentially expressed genes through RNA sequencing analysis, and developmental functions were enriched in Gene Ontology analysis. Since *HOX* are the main genes involved in developmental processes, we performed a hierarchical clustering analysis that showed: 1) *HOXA* cluster more expressed in MV-4-11 CD38^{Low} than in MV-4-11 CD38^{High} cells; 2) *HOXB* cluster more expressed in MV-4-11 CD38^{High} than in MV-4-11 CD38^{Low}, and 3) among *HOX* genes, *HOXA13* was the most differentially expressed one. Finally, we suggest that the *in vitro* model proposed in this study to mimic the situation of resistance to Ara-C in subpopulations of AML-MLL, showed that the mechanisms of resistance to Ara-C in this disease, go beyond changes in drug detoxification and metabolism, and seem more associated with proliferative and development advantages of the leukemic cells. These pathways should be explored as potential targets to Ara-C combination therapies.

Introduction

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a heterogeneous clonal disease that results from the blockade of differentiation and abnormal cell proliferation in the myeloid lineage (Frohling *et al.*, 2005). The AML harboring *MLL* translocations (Mixed Lineage Leukemia, 11q23) are characterized by poor prognosis (Zeijlemaker *et al.*, 2013), clinical and biological parameters associated with early minimum residual disease (Wang *et al.*, 2015) and deregulation of *HOX* genes (Roboz, 2011).

MLL is a member of the evolutionarily-conserved trithorax group (trxG) family of proteins that is associated with activation of gene transcription and act antagonistically to the Polycomb repressor group (PcG) of proteins. When it is rearranged with one of its several different fusion partners (Bernt e Armstrong, 2011), such as t(4;11)(q21;q23) or *MLL-AF4* and t(9;11)(p22;q23) or *MLL-AF9*, (Krivtsov e Armstrong, 2007), the negative regulation of *HOX* genes is impaired, especially in *HOXA* cluster, which is directly involved in the differentiation of hematopoietic cells (Kawagoe *et al.*, 1999).

HOX genes are master genes of development, play a crucial role in positional identity (Lewis, 1978), and their deregulation is associated with several diseases, including cancer (Lewis, 1978; Grier *et al.*, 2005). Furthermore, silencing this pathway to study its implications on cancer is not always possible, due to the early embryonic lethality associated with *HOX* impairments.

In hematopoiesis, the overexpression of *HOXA5* in the bone marrow and umbilical cord causes expansion of myeloid progenitor cells, and decreases in the emergence and differentiation of erythroid units (Grier *et al.*, 2005). Besides *HOXA5*, *HOXA9* deregulation is highly associated with *MLL*⁺ leukemias, and pathways related to this gene are being explored as potential therapeutic targets (Basavapathruni *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Daigle *et al.*, 2013).

The conventional induction therapy for AML harboring *MLL* translocations is based on Cytarabine (Ara-C) combined with an anthracycline. Although *MLL* leukemias are highly sensitive to Ara-C, there is no evidence that *MLL* cells are deficient for Ara-C metabolizing enzymes. AML harboring *MLL* rearrangements, however, show a high rate of relapse (Mata *et al.*, 2006; Stam *et al.*, 2006; Jo *et al.*, 2009). As alternative hypothesis to study the resistance to Ara-C, we hypothesized that mechanisms associated with proliferation and

developmental capabilities are involved in the resistance to Ara-C in AML-MLL leukemias (Balgobind *et al.*, 2009; Krauter *et al.*, 2009).

Since *HOX* genes deregulation is associated with leukemogenesis and poor prognosis in leukemia, we hypothesized that in AML harboring MLL translocations, a *HOX* signature is associated with resistance to the nucleoside analogue, Ara-C, and *HOX* are potential markers for biological parameters associated with differential response to this drug, such as advantageous proliferation when exposed to it. To test our hypothesis, we got a MLL⁺ human cell line, and selected two different cell subpopulations based on CD38 expression, through long-term exposure to Ara-C that presented differences in the response to the drug, performed gene expression analysis through RNA-sequencing and focused in the expression of *HOX* genes.

Material and Methods

Cell line, culture and chemotherapy agent

MV-4-11 cell line (ATCC® CRL-9591™) was kindly provided by Dr. Chengkui Qu - Case Western Reserve University, Cleveland-OH. After thawing, the cell line was cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) supplemented with 10% FBS and 1% Penicillin/Streptomycin at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

The chemotherapy agent Cytarabine or Ara-C (Sigma-Aldrich Co.) was reconstituted in PBS, filtered and stored under -20°C.

Flow cytometry analysis

The cells were stained with propidium iodide (PI) for cell cycle analysis and flow cytometry was performed in an Epics XL-MCL™ cytometer. For the detection of leukemic stem cell classic markers the cells were stained with CD34 (Anti-HPCA-2)-FITC and CD38-PE (BD Biosciences) and the fluorescent signal detected by a BD™ LSR II cytometer.

RNA isolation, cDNA libraries construction and RNA sequencing

RNA was isolated with the RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen), quality and quantity were assessed with Qubit® Fluorometer (Life Technologies) and Bioanalyzer RNA Nano/Pico chip (Agilent Technologies), and cDNA libraries were synthesized with the

TruSeq® Stranded Total RNA Sample Prep Kit (Illumina). The sequencing was performed by the Genomics Sequencing Core at Case Western Reserve University, in a HiSeq® 2500 Sequencing System (Illumina), and the results were delivered in Fastq file format. It is important to mention that the analysis was performed in triplicates.

Data processing

Flow cytometry data were analyzed in the software Flow Jo V.10.0.8, and *t*-tests were performed in GraphPad Prism V.5.01. The quality of the Illumina sequencing reads were assessed using FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Reads were trimmed for quality and the adapter sequences removed using custom in-house scripts and TrimGalore (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/). Reads that passed the quality filtering were mapped to the hg19 human reference genome using Tophat (Trapnell *et al.*, 2009), which implements the Bowtie 2 (Langmead e Salzberg, 2012) algorithm for sequence alignment and analyzes the mapped reads to identify splice junctions between exons. The Tophat results were analyzed using Cufflinks RNASeq analysis package (Trapnell *et al.*, 2010), reporting the fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM) values. The FPKM values were calculated on a gene and isoform level and differentially expressed genes or isoforms were tested for significance between conditions taking into consideration final coverage of the genes, ranked fold change, and using an adjusted significance cutoff of $p < 0.05$. The results were summarized using CummeRbund (<http://compbio.mit.edu/cummeRbund/>). For Gene Ontology analysis, we used the data bank The Consensus Path DB (Kamburov *et al.*, 2013).

Results

CD38 in MLL-AF4 rearranged cells is a marker for differential response to Ara-C

After exposing MV-4-11 cells to a long-term treatment with Ara-C (12 weeks), we performed flow cytometry analysis for two different markers associated with the leukemic stem cell phenotype: CD34 and CD38. We observed that CD34 did not show differences in expression when compared to parental cells without previous treatment and the long-term treated cells. However, CD38 presented a bimodal distribution that did not show up in the non-treated cells (Figure 1). So, those cells were sorted out based on the expression of CD38, and the subpopulations were called MV-4-11 CD38^{High} and MV-4-11 CD38^{Low}.

We performed cell cycle analysis and proliferation curves in the presence and absence of Ara-C in order to address if the cells responded differentially to Ara-C. MV-4-11 CD38^{Low} subpopulation was more resistant to Ara-C than MV-4-11 CD38^{High} cells (Figure 2), and the differences in sensitivity to the drug can also be seen by the cell cycle analysis (Figure 3): MV-4-11 CD38^{High} cells accumulate in Sub-G1 portion, which represents apoptotic cells, and also shows an increase in proliferation (G2-M phase) in the presence of Ara-C. Nonetheless, MV-4-11 CD38^{Low} presented an increase in S-phase content, which means more cells performing DNA synthesis, and decreased G1 content (Gap-1 phase) (Table 1).

As differences in cell cycle and proliferation were seen between MV-4-11 CD38^{High} and MV-4-11 CD38^{Low} cells, we performed RNA sequencing analysis on both subpopulations.

Table 1. Average $\pm$ standard deviation of MV-4-11 CD38^{Low} and MV-4-11 CD38^{High} cell counts related to cell cycle analysis with PI staining (PI) and flow cytometry. In the table, the data displayed are the following comparisons: 1) absence of Ara-C - control experiment; and, 2) cells exposed to Ara-C for 72 hours. Flow cytometry analysis was optimized to count 20,000 cells per sample, and the percentages counted were converted into number of cells.

*The analysis was performed in triplicate.

CELL CYCLE ANALYSIS							
AVERAGE $\pm$ STANDARD DEVIATION (CELL COUNTS)							
MV-4-11 CD38 ^{Low} (CONTROL)				MV-4-11 CD38 ^{High} (CONTROL)			
Sub-G1	G1	S	G2-M	Sub-G1	G1	S	G2-M
579 $\pm$ 58 ^{*Δ}	15000 $\pm$ 367,7	2032 $\pm$ 124,5 [*]	2077 $\pm$ 287,1	1422 $\pm$ 17 ^{*Δ}	11760 $\pm$ 537,4 ^{*Δ}	2550 $\pm$ 693	3690 $\pm$ 862,7 ^Δ
MV-4-11 CD38 ^{Low} (10μM - 72 HORAS)				MV-4-11 CD38 ^{High} (10μM - 72 HORAS)			
Sub-G1	G1	S	G2-M	Sub-G1	G1	S	G2-M
973 $\pm$ 72,1 ^{*Δ}	13980 $\pm$ 1329,4	2710 $\pm$ 99 ^{*Δ}	1797 $\pm$ 994,2	7040 $\pm$ 4780 ^{*Δ}	4970 $\pm$ 2078,9 ^{*Δ}	1799 $\pm$ 397,4 ^Δ	5025 $\pm$ 6158,9

*Significantly different $p < 0,05$, when comparing control experiments *versus* treated cells

^Δ Significantly different $p < 0,05$, when comparing MV-4-11 CD38^{Low} *versus* MV-4-11 CD38^{High}

RNA sequencing data reveals differences between MV-4-11 CD38^{High} and MV-4-11 CD38^{Low} subpopulations

The global analysis of expression profiles was performed through Principal Component analysis (PCA) in which one of the comparisons (component2 X component1) showed more similarities between MV-4-11 parental cells and MV-4-11 CD38^{High} subpopulation than with the MV-4-11 CD38^{Low} subpopulations. The number of differentially expressed genes (DEG) also revealed the distance between and MV-4-11 CD38^{Low} and MV-4-11 CD38^{High} that showed 3,395 DEGs (Figure 4).

Developmental processes are highly differentially expressed between MV-4-11 CD38^{High} and MV-4-11 CD38^{Low} subpopulations

The genes included in the Gene Ontology Analysis (GO) should had been under two conditions: 1) DEGs that presented FPKM=0 were excluded of the analysis and 2) only genes with $\log_2(\text{fold change}) \geq 4$ were included. We only considered categories of biological processes.

From 3,395 genes, GO analysis was performed for the 481 most differentially expressed genes, which revealed enrichment of 197 biological processes, grouped according to the categories displayed on Table 2.

More than 55 categories were related to developmental processes and morphogenesis, while the second most representative category (response to stimuli) only represented 30 categories.

Since developmental processes and morphogenesis were the most enriched categories, we decided to evaluate how *HOX* genes behaved on both subpopulations.

Table 2. The most representative biological functions in Gene Ontology analysis (GO) of DEGs with $\log_2(\text{fold change}) \geq 4$ from RNA-seq analysis comparing MV-4-11 CD38^{Low} and MV-4-11 CD38^{High} subpopulations.

Biological function	Examples of GO categories	Examples of Genes
Developmental processes/embryogenesis/ Morphogenesis	GO:0009888 Tissue development	<i>FOXL2; HOXA13; IGF1</i>
	GO:2000026 Regulation of multicellular organismal development	<i>SMAD1; MEIS1; SOX5</i>
	GO:0050793 Regulation of developmental process	<i>PPARG; TP53; WNT5B</i>
	GO:0007275 Multicellular organismal development	<i>FOXO1; ZEB1; GPR55</i>
	GO:0048646 Anatomical structure formation involved in morphogenesis	<i>ALDH1A3; WNT10B</i>
	GO:0021700 Developmental maturation	<i>PPARG; BMP2; RET</i>
	GO:0048534 Hematopoietic or lymphoid organ development	<i>JAK3; BARX1; MEIS1</i>
	GO:0002520 Immune system development	<i>HDAC9; SFRP1; GPC3</i>
	GO:0048869 Cellular developmental process	<i>MATK; HOXA13; JAK3</i>
	GO:0042221 Response to chemical	<i>ABCC6; DAPK1; PDK4</i>
Response to stimuli (compounds/hormones/drugs)	GO:0006950 Response to stress	<i>CX3CR1; EXO5</i>
	GO:0042493 Response to drug	<i>ABCB4; CYBB</i>
	GO:1901698 Response to nitrogen compound	<i>ZEB2; RRAGB</i>
	GO:0048583 Regulation of response to stimulus	<i>HOXA13; HLA-DMB</i>
	GO:0070848 Response to growth factor	<i>FOX1; DAB2; SMAD1</i>
	GO:1901654 Response to ketone	<i>GNG2; ELK1; NCF2</i>

HOX genes expression signature in MV-4-11 CD38^{High} and MV-4-11 CD38^{Low} cell subpopulations

Excepting *HOXA9* and *HOXA10*, *HOXA* cluster was more expressed by MV-4-11 CD38^{Low} cells when compared with MV-4-11 CD38^{High}, in which signature was associated with *HOXB* higher levels (Figure 5).

HOXA13 was the most differentially expressed gene with a log2 fold change = 5,06 ($p < 0,001$). Besides *HOXA13*, *HOXA5* (log2 fold change = 2,52), *HOXA11* (log2 fold change = 1,09) and *HOXB7* (log2 fold change = 1,74) presented significantly distinct expression levels when comparing both cell lines ($p < 0,001$).

Discussion

In this study, we characterized the heterogeneous compartment of progenitor cells in AML harboring MLL rearrangement. With this characterization, we were able to identify in this compartment that the long-term treatment *in vitro* selected cell subpopulations more resistant to Ara-C.

First, MV-4-11 resistant cells presented four events commonly related to differential response to nucleoside analogue drugs: 1) decreased proliferation; 2) decrease in apoptotic cells (sub-G1 phase), 3) increase in synthesis (S-phase cells), and 4) increase in division after 72 hours of treatment (G2-M) (data not shown). Although cytotoxic concentrations of Ara-C might be able to selectively eliminate S-phase cells, when cells in synthesis get arrested, at least a portion of them presents resistance to the drug that should be lethal (Shi *et al.*, 2001). Additionally, genetics and epigenetics mechanisms that favor G2-M arrest, contribute to drug resistance (Banker *et al.*, 1998). Therefore, the mechanism would be summarized as follows: when exposed to Ara-C, if S-phase cells are increased, resistant cells are enriched, since this drug should had been incorporated and must had eliminated leukemic cells. After 72 hours of exposure, cells get accumulated in G2-M phase, resuming division and restoring the leukemic population.

Subsequently, we evaluated the influence of two classic stem cell markers (CD34 and CD38) in the long-term treated cells and observed that the cells showed a bimodal distribution

of the CD38 marker. The cells called MV-4-11 CD38^{Low} and MV-4-11 CD38^{High} also showed differential response to Ara-C.

Human CD38 is a glycoprotein that belongs to a complex family of genes that encodes proteins of cell surface and involved in extracellular nucleotide catabolism (Deaglio *et al.*, 2010). The bimodal expression of this marker was correlated with leukemia progression in Chronic Lymphoblastic Leukemia (CLL); Ghia and colleagues had shown that the overall survival of patients with CD38 bimodal expression was shorter than in patients with homogeneous CD38⁺ or CD38⁻ subpopulations. Although this study did not demonstrate that the proportion of cells expressing CD38 marker is essential for clinical diagnosis, the pattern of CD38 expression seems to be a good marker for risk in disease's progression (Ghia *et al.*, 2003). Several studies showed the bimodal distribution according to CD38 expression in CLL (Boonstra *et al.*, 2004; Vaisitti *et al.*, 2010), however in AML, we did not find this distribution reported in the literature.

After cell analysis, we performed the RNA sequencing on both subpopulations, MV-4-11 CD38^{Low} and MV-4-11 CD38^{High}. Since normal embryogenesis and tumorigenesis share several pathways (Hutchin *et al.*, 2005), we decided to analyze gene expression levels of genes of development, such as *HOX*.

HOX genes are master genes of development, and their deregulation is markedly seen on MLL-rearranged leukemias. *HOXA* cluster is abundantly expressed in hematopoietic stem cells (HSC), and as those cells become committed with cell differentiation of myeloid lineage, *HOXA* expression decreases. Since MLL is a homologous protein of Trithorax, that belongs to a complex that positively regulates *HOX* expression, when fused with one of its several possible partners, it inhibits the negative regulation required for maturation and normal hematopoiesis (Sauvageau *et al.*, 1995; Hess, 2004; Shah and Sukumar, 2010).

Among *Hox*, *Hoxa9* seems to regulate pathways that control cell survival: when silenced, *HoxA9* induces apoptosis in AML cells that harbor MLL rearrangement, which suggest that *Hoxa9* might be involved in the repression of apoptotic pathways (Brumatti *et al.*, 2013). In fact, these authors had shown that the upregulation of *Hoxa9*, keeps *Bcl2* highly expressed: *Bcl2* blocks apoptosis (Brumatti *et al.*, 2013). Likewise, two cell lines carrying MLL fusions, and expressing high levels of *Hoxa9* and *Bcl2*, when treated with *Bcl2* inhibitor, went into apoptosis induction, which indicates that *Bcl2* is required to survival in cells expressing high levels of *Hoxa9* (Brumatti *et al.*, 2013). Because of all these

implications, we thought *HOXA9* would be a strong candidate for differential response to drugs. However, we did not find significant differences in *HOXA9* expression between MV-4-11 CD38^{High} and MV-4-11 CD38^{Low} subpopulations.

Despite *HOXA9*, the transcriptional signature of MV-4-11 CD38^{Low} was strongly associated with high expression levels of *HOXA* cluster genes. As mentioned, *HOXA* is associated with the HSC signature, suggesting that MV-4-11 CD38^{Low} cells are less committed with differentiation than MV-4-11 CD38^{High} cells. Besides, the upregulation of *HOXA* was associated with an adverse outcome and decreased overall survival in AML (Li *et al.*, 2012), which corroborates with the resistance to Ara-C presented in this study.

Additionally, *HOXA13* was the most differentially expressed gene between MV-4-11 CD38^{High} e MV-4-11 CD38^{Low}. This gene encodes a protein required for limbs formation and development (particularly hands and feet), urinary tract and reproductive system (Fromental-Ramain *et al.*, 1996). In AML, a rare translocation between *NUP98* and *HOXA13* genes was associated with a poor prognosis in leukemia (Eguchi-Ishimae *et al.*, 2009; Shiba *et al.*, 2013), though, we did not find in the literature, reports associating *HOXA13* and AML-MLL.

Although it was not involved in the pathogenesis of MLL-leukemias, *HOXA13* expression was associated with a highly aggressive phenotype of gastric cancer (GC). Comparing highthroughput cDNA microarray analysis between normal gastric mucosa *versus* GC mucosa, Han and colleagues had shown that *HOXA13* expression is significantly increased in the GC tissue. They added to their approach, immunohistochemistry analysis, and showed that *HOXA13* is upregulated in GC tissues, and the overexpression is also associated with a high risk of relapse, especially in patients with the most aggressive phenotype, poor overall survival and short disease-free survival (Han *et al.*, 2013). Besides GC, *HOXA13* upregulation was also associated with tumor progression and evolution in hepatocellular carcinoma (Quagliata *et al.*, 2014), which made us propose that *HOXA13* could also be involved in AML carrying MLL rearrangements.

Quagliata and colleagues describe the process of regulation of *HOXA13* as follows: the lncRNA *HOTTIP* directly interacts with the Trithorax protein WDR5, that induces a more opened chromatin structure; this configuration makes easier the formation of WDR5/MLL complexes that drive the trimethylation of the transcriptional activator epigenetics mark H3K4, and regulates *HOXA* transcription, including *HOXA13* (Quagliata *et al.*, 2014). Even

if *HOTTIP* did not present differences of expression in our analysis, we believe that the deregulation of *MLL* and *HOXA13* is important to the scope of this study.

We conclude that a *HOX* signature is associated with differential response to Ara-C in a human cell line that harbors MLL-AF4 fusion. High expression of *HOXA* cluster was associated with the most resistant subpopulation, MV-4-11 CD38^{Low}, while the most sensitive subpopulation MV-4-11 CD38^{High} was associated with high expression levels of *HOXB* cluster. Further analysis are required, but we also believe that even without a report in the literature of its direct involvement in leukemogenesis, the deregulation of *HOXA13* is associated with resistance to Ara-C, and in the future could be a marker of prognosis in MLL leukemias after the induction therapy with Ara-C. Since other genes that encode proteins which interact with *HOXA13*, such as *MEIS1* (log2 fold change = 8,05, $p < 0,001$) and *SMAD1* (log2 fold change = 6,25, $p < 0,001$) were also significantly different between the subpopulations, we propose that functional assays should be performed to demonstrate the importance of *HOXA13* and/or related genes in AML-MLL cell proliferation and growth advantage after Ara-C treatment.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Dr. Chengkui Qu for providing MV-4-11 cell line, and Dr. Ernest R. Chan and Dr. Kuruvilla J. Abraham for helping with the bioinformatics analysis. The first author of the publication would also like to acknowledge *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes* and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq* for providing her a scholarship to perform the research.

The authors disclose no conflicts of interest.

REFERENCES

- BALGOBIND, B. V. et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. **Blood**, v. 114, n. 12, p. 2489-96, Sep 17, 2009.
- BANKER, D. E. et al. Cell cycle perturbations in acute myeloid leukemia samples following in vitro exposures to therapeutic agents. **Leuk Res**, v. 22, n. 3, p. 221-39, Mar 1998.
- BASAVAPATHRUNI, A. et al. Conformational adaptation drives potent, selective and durable inhibition of the human protein methyltransferase DOT1L. **Chem Biol Drug Des**, v. 80, n. 6, p. 971-80, Dec 2012.

BERNT, K. M.; ARMSTRONG, S. A. Targeting epigenetic programs in MLL-rearranged leukemias. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2011, p. 354-60, 2011.

BRUMATTI, G. et al. HoxA9 regulated Bcl-2 expression mediates survival of myeloid progenitors and the severity of HoxA9-dependent leukemia. **Oncotarget**, v. 4, n. 11, p. 1933-47, Nov 2013.

DAIGLE, S. R. et al. **Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia.** 2013. 1017-1025

DEAGLIO, S. et al. CD38/CD31 interactions activate genetic pathways leading to proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells. **Mol Med**, v. 16, n. 3-4, p. 87-91, Mar 2010.

EGUCHI-ISHIMAE, M. et al. Enhanced expression of the EVI1 gene in NUP98/HOXA-expressing leukemia cells. **International Journal of Hematology**, v. 89, n. 2, p. 253-256, Mar 2009.

FROHLING, S. et al. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 26, p. 6285-95, Sep 10, 2005.

FROMENTAL-RAMAIN, C. et al. Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. **Development**, v. 122, n. 10, p. 2997-3011, Oct 1996.

GHIA, P. et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. **Blood**, v. 101, n. 4, p. 1262-9, Feb 15, 2003.

GRIER, D. G. et al. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. **Journal of Pathology**, v. 205, n. 2, p. 154-171, Jan 2005.

HAN, Y. et al. Identification and validation that up-expression of HOXA13 is a novel independent prognostic marker of a worse outcome in gastric cancer based on immunohistochemistry. **Medical Oncology**, v. 30, n. 2, Jun 2013.

HESS, J. L. MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. **Trends Mol Med**, v. 10, n. 10, p. 500-7, Oct 2004.

HUTCHIN, M. E. et al. Sustained Hedgehog signaling is required for basal cell carcinoma proliferation and survival: conditional skin tumorigenesis recapitulates the hair growth cycle. **Genes & Development**, v. 19, n. 2, p. 214-223, Jan 15, 2005.

JO, A. et al. Age-associated difference in gene expression of paediatric acute myelomonocytic lineage leukaemia (FAB M4 and M5 subtypes) and its correlation with prognosis. **Br J Haematol**, v. 144, n. 6, p. 917-29, Mar 2009.

KAMBUROV, A. et al. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. Database issue, p. D793-800, Jan 2013.

KAWAGOE, H. et al. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. **Leukemia**, v. 13, n. 5, p. 687-98, May 1999.

KRAUTER, J. et al. Prognostic factors in adult patients up to 60 years old with acute myeloid leukemia and translocations of chromosome band 11q23: individual patient data-based meta-analysis of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 18, p. 3000-6, Jun 20, 2009.

KRIVTSOV, A. V.; ARMSTRONG, S. A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 11, p. 823-33, Nov 2007.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nat Methods**, v. 9, n. 4, p. 357-9, Apr 2012.

LEWIS, E. B. A gene complex controlling segmentation in Drosophila. **Nature**, v. 276, n. 5688, p. 565-70, Dec 7, 1978.

LI, Z. et al. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. **Nat Commun**, v. 3, p. 688, 2012.

LI, Z. et al. Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox-gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients with cytogenetically abnormal AML. **Blood**, v. 119, n. 10, p. 2314-24, Mar 8, 2012.

MATA, J. F. et al. Cytosine arabinoside-metabolizing enzyme genes are underexpressed in children with MLL gene-rearranged acute lymphoblastic leukemia. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 11, p. 1417-23, Nov 2006.

MUNOZ, L. et al. Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. **Leukemia**, v.17, n.1, p.76-82, Jan 2003.

QUAGLIATA, L. et al. Long noncoding RNA HOTTIP/HOXA13 expression is associated with disease progression and predicts outcome in hepatocellular carcinoma patients. **Hepatology**, v. 59, n. 3, p. 911-23, Mar 2014.

ROBOZ, G. J. Novel approaches to the treatment of acute myeloid leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2011, p. 43-50, 2011.

SAUVAGEAU, G. et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. **Genes Dev**, v. 9, n. 14, p. 1753-65, Jul 15, 1995.

SHAH, N.; SUKUMAR, S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 5, p. 361-371, 2010.

SHI, Z. et al. S-Phase arrest by nucleoside analogues and abrogation of survival without cell cycle progression by 7-hydroxystaurosporine. **Cancer Res**, v. 61, n. 3, p. 1065-72, Feb 1, 2001.

SHIBA, N. et al. NUP98-NSD1 gene fusion and its related gene expression signature are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. **Genes Chromosomes & Cancer**, v. 52, n. 7, p. 683-693, Jul 2013.

STAM, R. W. et al. MLL gene rearrangements have no direct impact on Ara-C sensitivity in infant acute lymphoblastic leukemia and childhood M4/M5 acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 20, n. 1, p. 179-82, Jan 2006.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105-11, May 1, 2009.

TRAPNELL, C. et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 5, p. 511-5, May 2010.

WANG, J. et al. A six gene expression signature defines aggressive subtypes and predicts outcome in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget**, v. 6, n. 18, p. 16527-42, Jun 30, 2015.

YAP, K. C. et al. In Vitro Generation of Cytotoxic CD4 Lymphocyte Response against Autologous Acute Myeloid Leukemia. **The Open Access Journal of Science and Technology - AgiAl**, v. 3, p. 1-9, 2015.

ZEIJLEMAKER, W.; GRATAMA, J. W.; SCHUURHUIS, G. J. Tumor heterogeneity makes AML a "moving target" for detection of residual disease. **Cytometry B Clin Cytom**, Oct 5, 2013.

Figure legends

Figure 1. Histograms of cell sorting analysis by flow cytometry comparing the parental and long-term treated MV-4-11 cells. The sorted subpopulations were called MV-4-11 CD38^{Low} (P8) e MV-4-11 CD38^{High} (P7). CD34 and CD38 markers were conjugated to FITC and PE fluorochromes, represented in the X axis as B530-A and B576-A, respectively.

Figure 2. (A) Growth curve in the absence of Ara-C and (B) inhibition of proliferation with Ara-C of MV-4-11 CD38^{Low} and MV-4-11 CD38^{High} subpopulations. Y axis represents the counts of cells, and X axis, the time in days. The experiments were started with 5×10^5 cells plated.

Figure 3. Graphs of cell cycle analysis with Propidium Iodide (PI) staining and flow cytometry of MV-4-11 CD38^{Low} and MV-4-11 CD38^{High} subpopulations. From the left to the right, the graphs represented are: 1) absence of Ara-C (control experiment); and, 2) cells exposed to Ara-C for 72 hours. Flow cytometry analysis was optimized for counting 20,000 cells per sample.

Figure 4. Principal Component Analysis (PCA) with RNA-seq data of the long-term treated cells: MV-4-11 CD38^{High} (H) and MV-4-11 CD38^{Low} (L). The analysis was performed to estimate the similarities in the transcriptome among both cell subpopulations.

Figure 5. Hierarchical clustering analysis of expression levels of *HOX* genes. *HOXD* cluster was excluded of this analysis, since it is not expressed by hematopoietic cells. Experimental replicates of MV-4-11 CD38^{High} cells are represented as High1, High2 and High3, and of MV-4-11 CD38^{Low} cells, as Low1, Low2 and Low3.

Figure 1.

A) MV-4-11 Parental

B) MV-4-11 long-term treated

Figure 2.

Figure 3.

1)

2)

Figure 4.

Figure 5.