Rosimeire Aparecida Roela

**Caracterização molecular do estroma
conjuntivo de medula óssea de pacientes
com síndrome mielodisplásica na
infância**

Tese apresentada ao Departamento de
Radiologia da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Oncologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani
Co-orientador: Dr. Luiz Fernando Lopes

São Paulo

2004

Este trabalho é dedicado

- *Ao meu esposo Carlos, meus pais Vicente e Therezinha e ao meu irmão Roberto que sempre estiveram ao meu lado me apoiando com amor, respeito e carinho.*
- *À todos aqueles (e foram muitos) que interferiram de forma objetiva no percurso da minha vida.*
- *Às crianças e seus pais que me ensinaram a cada dia a importância maior da esperança com um simples sorriso e a beleza do amanhã em cada coração.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani pelo seu exemplo, pela sua dedicação não apenas durante a orientação desta tese, mas ao longo destes 15 anos de convívio e por ser uma das pessoas que interferiram de forma objetiva e positiva tanto na minha vida profissional como em meu aprimoramento como ser humano.

Aos Prof. Dra. Maria Mitzi Brentani e Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani por viabilizarem a execução deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Fernando Lopes pela sua co-orientação, dedicação, amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. Radovan Borojevic e seu grupo que contribuíram nos momentos iniciais da geração do projeto que deu origem a esta tese.

Ao Dr. Luiz Fernando Lima Reis e seu grupo principalmente Dr. Alex Fiorino e Dra. Sibele Meirelles do Instituto Ludwig de São Paulo pela confecção das membranas de *cDNA array* e lamínas de *cDNA microarray* e pela colaboração na realização dos ensaios de *cDNA array* e *PCR semi-quantitativo*.

À Dra. Dirce Maria Carraro, Srta. Jane Haruko Lima Kaiano e Srta. Elen Pereira Bastos do Laboratório de expressão gênica do Instituto Ludwig de São Paulo pela amizade e a colaboração na realização dos ensaios de *cDNA microarray*.

À Dra. Helena Brentani e seu grupo principalmente o Sr. Luiz Paulo Camargo do Laboratório de bioinformática do Instituto Ludwig de São Paulo pela realização das análises estatísticas dos dados de *cDNA microarray*.

À Dra. Maria Lucia Hirata Katayama pela sua amizade e por sua colaboração no ensaio de RPA para a determinação de expressão de citocinas e fatores de crescimento.

À Sra Fátima Solange Pasini pela realização dos ensaios de *differential display* em células estromais de medula óssea que resultou na geração de seqüências adicionadas a membrana de *cDNA array* utilizadas na primeira parte desta tese.

À Sra. Patrícia Bortman Rozenchan pela sua amizade e colaboração na cultura das células estromais de medula óssea.

Aos membros do grupo cooperativo brasileiro em SMD pediátrico (BCG-PED-MDS) em especial aos comitês de Patologia e Genética.

À Sra. Maria José Gonçalves Benevides, pela amizade e cooperação em nossa rotina de trabalho no Laboratório de Oncologia.

Aos amigos do Laboratório de Oncologia pelo companheirismo e apoio ao longo do nosso convívio.

À FAPESP processo 99/12641-1, pelo patrocínio deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	12
CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	14
1. Casuística.....	14
2. Cultura primária de células estromais.....	14
3. Extração de RNA total.....	15
4. <i>cDNA array</i>	16
4.1. Precipitação de RNA total.....	16
4.2. Preparação da sonda de cDNA.....	16
4.3. Seleção das ESTs a serem incluídas no <i>cDNA array</i>	17
4.4. Hibridização.....	18
4.5. Análise de resultados de <i>cDNA array</i>	19
4.6. PCR.....	21
5. <i>cDNA microarray</i>	22
5.1. Amplificação.....	23
5.2. Hibridização.....	26
5.3. Análise matemática dos dados.....	29
6. Ensaio de Proteção da Ribonuclease (RPA).....	31
RESULTADOS.....	34
1. <i>cDNA array</i>	34
2. <i>cDNA microarray</i>	39
2.1. <i>cDNA microarray</i>	40

2.2. Genes diferencialmente expressos.....	40
3. Ensaio de Proteção da Ribonuclease (RPA).....	61
DISCUSSÃO.....	64
CONCLUSÃO.....	83
ANEXOS.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
Apêndice	

RESUMO

Existem evidências da participação das células estromais da medula óssea (MO) no desenvolvimento de doenças malignas hematopoéticas, tais com a Síndrome mielodisplásica na infância (SMD). Nosso objetivo foi determinar a expressão diferencial de genes por *cDNA microarray* em células estromais da MO ao longo da transformação e evolução. Culturas primárias de células estromais da MO foram obtidas de crianças saudáveis (CT), pacientes com SMD com anemia refratária com excesso de blastos (AREB), e leucemia mieloide aguda associada à SMD (SMD/LMA). Após a comparação do perfil gênico entre CT vs. MDS, CT vs. MDS/AML e MDS vs. MDS/AML foram identificados grupos de genes com padrões de expressão específicos durante a transformação (CT→MDS→MDS/AML) ou evolução (MDS→MDS/AML) da SMD. A análise destes genes que codificam GTPases (ARHE e PPP1R12B), proteínas associadas a formação e direcionamento de microtúbulos (MAP1B e MAPRE2) indicou um padrão de expressão variado. Outros genes envolvidos com tráfico de membrana (GJA1 e KCNJ15) e ponto de checagem mitótico (TPX2 e TOP2A) apresentaram expressão aumentada, em contraste à diminuição de expressão de genes associados com a via do fas (BID e IL1 β). Todos estes genes foram associados com processos celulares, tais como apoptose, proliferação e ação de fatores transcricionais. Em adição, a reduzida expressão de genes associados com processamento de colágeno (P4HB e LOXL2), outras moléculas da matriz extracelular (THBS1) e proteases (PLAT e PLAU), envolvidos em megacariopoese foram observados somente em SMD/LMA. A variação do perfil destes genes pode contribuir para a transformação/evolução da SMD.

SUMMARY

There are evidences of bone marrow (BM) stromal cell participation in the development of hematopoietic malignancies, such as childhood Myelodysplastic Syndromes (MDS). Our aim was to determine differential gene expression in BM stromal cells along MDS transformation and evolution by cDNA microarray analysis. BM stromal cell primary cultures were obtained from healthy children (CT), MDS patients with refractory anemia with excess of blasts (RAEB) and MDS-associated acute myeloid leukemia (MDS/AML). After comparison of their gene expression profile between CT vs. MDS, CT vs.MDS/AML or MDS vs.MDS/AML gene sets were identified with stage-specific manner of expression during transformation (CT→ MDS→MDS/AML) or evolution (MDS→MDS/AML) of MDS. Analysis of these genes showed an expression variation of genes associated with GTPases (ARHE and PPP1R12B), microtubule formation and orientation (MAP1B and MAPRE2). Simultaneously increased levels of genes involved with membrane trafficking (GJA1 and KCNJ15) and mitotic checkpoints (TPX2 and TOP2A) were observed, in contrast with the reduced expression of genes associated with the Fas pathway (BID and IL1 β). All these genes were associated with cellular processes, such as apoptosis, proliferation and transcription factors action. In addition, the decreased expression of genes associated with processing of Collagens (P4HB and LOXL2), others extracellular matrix molecules (THBS1) and proteases (PLAT and PLAU), involved in megakaryocytic differentiation was observed only during the evolution to MDS/AML. These gene level expression profiles might contribute to transformation/evolution of MDS.

INTRODUÇÃO

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são caracterizadas por diferenciação e maturação anormais do clone hematopoético, pancitopenia e invariavelmente alta celularidade medular. A alteração na hematopoese observada em SMD pode ser acompanhada ou não de instabilidade genética que predispõe à evolução para Leucemia Mielóide Aguda associada à SMD (SMD/LMA), a qual apresenta como principal característica o aumento do número de blastos na medula óssea (Sperr et al., 2001, Oshima et al., 2003). Em alguns raros casos ocorre a transformação de SMD para Leucemia Linfóide Aguda (SMD/LLA) (Kouides et al., 1995; San Miguel et al., 1992; Lopes et al., 1999).

As SMD ocorrem geralmente em pacientes adultos e raramente em crianças. A frequência neste grupo jovem pode ser subestimada devido à dificuldade de diagnóstico e controvérsias quanto à classificação da doença (Hasle et al., 1995; Gardner et al., 1992). Lopes et al., 1999 estimaram que no Hospital do Câncer A. C. Camargo (São Paulo), em um período de 12 anos, a frequência de SMD em relação à leucemia aguda foi de 3,3%, o que considerou similar para outras populações pediátricas. Um destes estudos é de um grupo da Dinamarca que sugere a incidência de SMD como sendo 4/milhão de habitante (Hasle et al., 1995).

Existem vários estudos tentando classificar esta patologia de características tão heterogêneas (revisado no livro *Myelodysplastic and Myeloproliferative Disorders in Childhood*, 2003). A classificação FAB (French-American-British) foi a primeira a ser proposta (Bennet et al., 1982) para SMD em adultos, sendo amplamente utilizada em vários países também para crianças. A classificação FAB sofreu revisão em 2000 pelo mesmo grupo que a sugeriu (Bennett et al., 2000) e estabelece os seguintes subtipos

de SMD: AR (Anemia Refratária), ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel), AREB (Anemia Refratária com Excesso de Blastos) tipo I e II e LMMoC (Leucemia Mielomonocítica Crônica). Estes subtipos são determinados segundo a presença de blastos e o fenótipo da população hematopoética presente na medula óssea conforme resumido na tabela 1.

Tabela 1 – Características da medula óssea segundo a classificação FAB

Tipo	Medula óssea
AR Anemia Refratária	Usualmente hiperplasia eritróide com diseritropoiese, < 5% blastos
ARSA Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel	Igual AR, porém sideroblasto tipo III > ou = 15% precursor eritróide.
AREB I Anemia Refratária com Excesso de Blastos I	<10% blastos, 2 ou 3 linhagens mostrando dismorfismo
AREB II Anemia Refratária com Excesso de Blastos II	>10% blastos
LMMoC Leucemia Mielomonocítica Crônica	1% - 20% blastos. Monocitose

Em indivíduos adultos a taxa de evolução para SMD/LMA está associada com o subtipo FAB, sendo maior para AREB, LMMoC e o que se considerava pela velha classificação como AREB –(transformação)t (Sperr et al., 2001). Em crianças esta taxa de transformação parece ser independente do subtipo e é extremamente alta (Lopes et al., 1999). Interessantemente, SMD na infância está freqüentemente associada com outras condições não específicas da doença, tais como a síndrome de Down (Chessels et al., 1998).

Na medula óssea as alterações cromossomais em SMD são principalmente determinadas no clone hematopoético.

Além de anomalias genéticas constitutivas descritas em crianças com SMD podemos destacar outras alterações cromossomais sendo a monossomia 7q e a perda do cromossomo 5q mais freqüentes em crianças

e adultos, respectivamente (Chessels et al., 1998). Interessantemente, ambos cromossomos 5 e 7 apresentam genes com papel em hematopoese e na supressão de tumor o que sugere que a perda de genes localizados nestes cromossomos pode contribuir para desenvolvimento de leucemias (Luna-Fineman et al., 1995).

A literatura sobre SMD em adultos envolve muitos trabalhos sobre mutação em vários proto-oncogenes, incluindo mutações de p53 associadas com perda do braço curto do cromossomo 17 (Pedersen-Bjergaard et al., 1995) em associação com perda da região 5q33 e mutações nos genes da família do *ras*. Em crianças com SMD a mutação de *ras* parece estar associada com monossomia do cromossomo 7 (Neubauer et al., 1991). Durante o desenvolvimento da doença é mais provável que as mudanças genéticas observadas em SMD participem da parte final do processo e não dos eventos iniciais (Paquette et al., 1993).

As células estromais da medula óssea, tais como células mesênquimais ou fibroblastos, células endoteliais, adipócitos e macrófagos, as quais correspondem de 0,01% até 0,001% do total de células presentes na medula óssea (Pittenger et al., 1999) compõem o microambiente medular o qual colabora para o controle da hematopoese. Estas células produzem componentes da matriz extracelular, citocinas e fatores de crescimento necessários a regulação, crescimento e sobrevivência das células hematopoiéticas (tabela 2) (Verfaillie, 1998).

Em medula óssea de indivíduos saudáveis as células estromais organizam-se em nichos de diferenciação favorecendo a interação direta de células primordiais e progenitoras hematopoéticas com proteoglicanas, componentes da matriz extracelular, fatores de crescimento e citocinas agrupadas como

sugerido na figura 1 (Gupta et al., 1998). Variações regionais deste compartimento do microambiente hematopoético podem criar nichos específicos para um dado estágio de diferenciação (Deryugina et al., 1993; Hangoc et al., 1993).

Vários estudos indicaram a afinidade das glicosaminoglicanas (GAG) das proteoglicanas a muitos dos componentes da matriz extracelular, incluindo fatores de crescimento e citocinas (Gupta et al., 1998). Assim, as proteoglicanas, principalmente as heparan-sulfato, são importantes no controle da hematopoese por modularem a atividade de citocinas como o fator estimulador de crescimento de granulócitos e monócitos (GM-CSF) que controla a proliferação e diferenciação da linhagem mielóide (Borojevic et al., 2003) ou por interagirem com outros componentes da matriz, por exemplo, a trombospodina que foi descrita por inibir a megacariopoese (Yang et al., 2003).

Tabela 2 – Moléculas do microambiente hematopoético expressas por células estromais

Tipo de molécula	Descrição	Referência
Antígeno específico	SH2, SH3, SH4	Conget et al., 1999
	STRO-1	Haynesworth et al., 1992
	α - actina de musculo liso	Galmiche et al., 1993
	MAB1740	Simmons et al., 1991
Citocinas e Fatores de Crescimento	Interleucinas: 1 α , 6, 7, 8, 11, 12, 14 e 15	Majumdar et al., 1998
	LIF, SCF, Flt-3 ligante, GM-CSF, G-CSF,	Haynesworth et al., 1992
	M-CSF	Jia_bone_marrow_stroma

		LIB. 574
Receptores de citocinas e fatores de crescimento	IL1R, IL3R, IL4R, IL6R, IL7R, LIFR, SCFR, G-CSFR, IFN γ R, TNFIR, TNFIIR, TGF β IR, TGF β IIR, bFGFR, PDGFR, EGFR	Conget et al., 1999 Pittenger et al., 1999 Satomura et al., 1998 Jia_bone_marrow_stroma LIB. 574
Moléculas de adesão	Integrinas: $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5 Cadeia de integrinas: α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α v, β 1, β 3, β 4 ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA3, L-selectina, endogлина, CD44	Conget et al., 1999 Pittenger et al., 1999 Bruder et al., 1998
Matriz extracelular	Colágenos tipo I, III, IV, V e VI Fibronectina, laminina, hialurona, proteoglicanas, hemonectina, transgelina, trombospondina 1, fator de crescimento de osteoblasto-1, osteonectina, metaloproteases-2 e -9	Conget et al., 1999 Prockop et al., 1997 Chichester et al., 1993 Jia_bone_marrow_stroma LIB. 574

Figura 1: O controle da hematopoese é orquestrado pela interação com o microambiente medular, onde células estromais e progenitoras hematopoéticas interagem pela ação de componentes da matriz extracelular (MEC), principalmente as GAG das proteoglicanas que recrutam citocinas (CK) e fatores de crescimento.

Várias evidências tem sugerido que anormalidades no microambiente da medula óssea estão implicadas em neoplasias hematopoiéticas. Podemos citar as anomalias na composição e função de células estromais provenientes da medula óssea de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Leucemia Mielóide Crônica (LMC), Leucemia Linfóide Aguda (LLA),

Leucemia Linfóide Crônica (LLC) e SMD. O papel das células estromais no estabelecimento ou evolução de neoplasias hematopoéticas acima referidas foram avaliados por Dührsen & Hossfeld (1996) os quais sugeriram 3 hipóteses: i) O estroma pode ser modificado pela presença de células malignas que induzem uma produção alterada de citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão e de componentes da matriz extracelular; ii) O estroma pode ser modificado permanentemente pela presença de células derivadas dos clones hematopoéticos transformados, tais como macrófagos e megacariócitos; iii) O estroma intrinsecamente modificado pode gerar condições favoráveis ao desenvolvimento da neoplasia hematopoética.

Das patologias acima descritas (LMA, LMC, LLA e LLC) atribui-se aos macrófagos originários do clone hematopoético transformado a participação do microambiente nos mecanismos que promovem o distúrbio na hematopoese. A participação do clone não-hematopoético presente na medula óssea é pouco entendida principalmente em pacientes adultos e pediátricos com SMD. As células estromais provenientes de medula óssea de pacientes adultos com mielodisplasia são capazes de suportar a diferenciação e proliferação de células progenitoras hematopoéticas (Coutinho et al., 1990; Alvi et al., 2001). No entanto, trabalhos recentes sugerem que o estroma das SMD não se constitui em suporte adequado a hematopoese induzindo (Aizawa et al., 2000) e sofrendo (Raza et al., 1995^a e 1995^b) apoptose. Em adição, em adultos com SMD foram descritos inúmeros trabalhos sobre a apoptose observada no clone hematopoético (Raza et al., 1995^a; Tsoplou et al., 1999; Westwood et al., 2003) provavelmente via Fas

considerando a alta expressão de TNF- α , Fas (CD95) e ligante de Fas (CD95L) afetando negativamente a hematopoese (Deeg et al., 2000).

Em adição, alteração de elementos estromais (Bernard et al., 1981) em associação com o acúmulo de fator de crescimento de fibroblasto depositado na matriz extracelular, ambos sintetizados pelas células estromais estão associados a mielofibrose, comum em SMD ou a várias doenças mieloproliferativas (Yoon et al., 2001).

Em adultos com SMD não foram observadas alterações na composição celular das células estromais (Hirayama et al., 1993), entretanto Lorand-Metze (2003) observou um aumentado número de macrófagos em crianças com SMD o que pode favorecer a hiper-expressão de TGF β , prostaglandina E, ferritina, IL-6 e TNF- α (Yoon et al., 2000), sendo este último também expresso por fibroblastos (Flores-Figueroa et al., 2002). Apenas um trabalho descreve hiper-expressão de TNF- α em uma criança com SMD, cujos autores não observaram variação de expressão para GM-CSF e G-CSF entre outras citocinas avaliadas (Winter et al., 1997). Em estudo recente (Narendran et al., 2004) foi verificado em uma criança com trissomia 8 e SMD a mesma alteração cromossomal em 50% das células estromais.

Das células que compõem o estroma a maior fração é composta de fibroblastos (60%) e macrófagos (10%). Culturas homogêneas de fibroblastos podem ser obtidas e contribuem no entendimento da importância na hematopoese de componentes moleculares produzidos por células de origem não-hematopoética (Verfaillie et al., 1992 e Koller et al., 1992).

O nosso objetivo envolve a terceira hipótese sugerida por Dührsen & Houssfeld, uma vez que observamos em trabalho anterior (Borojevic et al., 2004) que culturas primárias de miofibroblastos, isentas de qualquer

elemento proveniente do clone hematopoético após longos períodos (4-5 meses) apresentaram a capacidade de afetar a hematopoese normal de células progenitoras CD34+, após várias passagens. Estes resultados sugeriram que este estroma sofreu modificações permanentes permissíveis ao desenvolvimento da SMD.

Portanto, nosso presente objetivo foi comparar o perfil genético de células estromais de medula óssea de origem não-hematopoética de crianças saudáveis, com SMD ou SMD/LMA e determinar possíveis alterações moleculares que poderiam contribuir para o desenvolvimento de microambientes favoráveis para a transformação e evolução da SMD.

A tecnologia de *cDNA microarray* tem a vantagem de analisar um grande número de genes, caracterizando diferentes subtipos de uma doença. Esta técnica tem importantes implicações quanto ao esclarecimento de complicadas alterações genéticas envolvidas na tumorigênese, no desenvolvimento de outras doenças e para a geração de informações prognósticas e otimização de tratamentos (Maughan et al., 2001). Tecidos normais e tumorais são compostos de muitos tipos de células e para um melhor aproveitamento do potencial da técnica de *cDNA microarray* torna-se interessante o isolamento da porção celular que se deseja estudar (Miyazato et al., 2001), geralmente obtido por microdissecção ou utilizando outros sistemas de separação tais como anticorpos conjugados com partículas magnéticas.

O primeiro estudo endereçado a avaliar o perfil genético de indivíduos com SMD foi conduzido por Miyazato et al., 2001 que utilizando *DNA microarray*, com 2.304 genes, determinaram a expressão diferencial de genes em células progenitoras hematopoiéticas AC133+ (CD34^{alto}, CD38^{baixo}

e Kit+) de pacientes adultos com SMD em relação as AC133+ de indivíduos normais. O gene que codifica a proteína Delta-like (Dlk), relacionada com a família Delta-Notch, foi o que apresentou maior expressão diferencial, sugerindo que Dlk tenha uma expressão característica na doença e seja importante durante o desenvolvimento da SMD. Em adição, Lee et al., 2001, considerando a diferenciação eritróide anormal como uma manifestação comum em SMD, desenvolveram um *array* com genes conhecidos ligados à diferenciação e proliferação eritrócitos. A expressão de genes associados à proliferação (por ex: c-myb, p23, Ad14g01) e diferenciação (por ex: α -globina, β -globina e δ -globina) foi respectivamente, aumentada ou reduzida quando comparada ao controle normal. No entanto, estudos da expressão gênica em medula óssea tanto em células estromais como em células hematopoéticas de SMD pediátrica, os quais contribuiriam para a compreensão de detalhes fisiopatológicos da SMD na infância não foram realizados.

O desenvolvimento de um tratamento efetivo para SMD requer a caracterização de mecanismos moleculares de sinalização e de genes associados a evolução progressiva para SMD/LMA. Em nossa presente hipótese, genes diferencialmente expressos em células estromais poderiam ser sugeridos como o ponto de partida para o estudo do envolvimento do microambiente hematopoético na SMD de crianças e futuramente constituírem-se em novos alvos terapêuticos.

OBJETIVOS

- Determinar genes diferencialmente expressos em células estromais de medula óssea de crianças com SMD e indivíduos normais adultos em comparação a uma criança normal.*

- Determinar genes diferencialmente expressos em células estromais de medula óssea entre 3 grupos de crianças:
 - Grupo1-** Crianças Normais
 - Grupo2-** Crianças com SMD – AREB
 - Grupo3-** Crianças com LMA associada a SMD (SMD/LMA)

- Identificar dentre os genes diferencialmente expressos, aqueles que apresentam padrões bem definidos de expressão ao longo do processo de evolução para SMD/LMA

CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

1. Casuística

As medulas ósseas, provenientes do Departamento de Pediatria do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo (São Paulo) foram obtidas da crista ílica durante procedimento para monitoração ou diagnóstico de pacientes com idades entre 0 e 12 anos. Para análise dos dados foram considerados 13 amostras de medula ósseas sendo amostras obtidas de dois indivíduos adultos (NA1 e NA2) e de duas crianças (CT1 e CT2) considerados saudáveis. Estas medulas ósseas de indivíduos saudáveis foram provenientes de doadores para transplantes do Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os pacientes com suspeita de SMD foram classificados segundo a classificação FAB (*French-American-British*) pelo Grupo Cooperativo Brasileiro em SMD pediátrico (BCG-PED-MDS).

As 7 culturas primárias de células estromais com SMD e duas com SMD/LMA estão divididas segundo sua classificação na tabela 3:

Tabela 3 - Características das crianças com SMD e SMD/LMA

Paciente	Idade	Classificação	Cariótipo
SMD1	2 anos	AREBI	47,XX,+21c[20]
SMD2	1 ano	AREBII	XY *
SMD3	2 anos	AREBI	46,XY [20]
SMD4	12 anos	AREBII	46,XY [20]
SMD5	2 anos	AREBII	47,XY+21c[20]
SMD6	12 anos	AREBI	46,XY[20]
SMD7	2 anos	AREBII	XX *
SMD/LMA1	1 ano		53,XXY,+5,+13,+17,+19,+21+21c[20]
SMD/LMA2	2 anos		47,XX,+21c[20]

* O cariótipo não foi realizado.

2. Cultura primária de células estromais

Brevemente, a medula óssea foi suavemente adicionada ao meio de cultura Iscove's (Invitrogen, EUA) suplementado com 20% de soro fetal

bovino (FCS) e acrescido de anti-coagulante (Liquemine ,20U/ml) e antibióticos (estreptomicina, 100U/ml e Penicilina 100U/ml). O material foi processado com Hespan (DuPont, Reino Unido) e a suspensão celular obtida foi mantida em meio Iscove's (20% FCS) a 37° C e atmosfera de CO₂ (5,0%). Semanalmente metade do meio foi retirado e repostado com meio Iscove' s suplementado com FCS. Ao final de aproximadamente 30 dias uma população de células aderentes foi obtida e caracterizada como células estromais.

3. Extração de RNA total

Os RNAs totais de células provenientes das culturas primárias foram extraídos na 5^o ou 6^o passagem de cultura, utilizando-se o reagente TRIZOL (Invitrogen) que é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, sendo esta uma otimização do método de extração de RNA desenvolvido por Chomczynski and Sacchi em 1987.

Resumidamente, após a adição de TRIZOL as amostras foram homogeneizadas e mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado a este homogeneizado clorofórmio na proporção de 1:5 do volume de TRIZOL e após agitação vigorosa, as amostras foram centrifugadas a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, e adicionado álcool isopropílico por 10 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugar por 10 minutos à 12.000xg , 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com etanol 75% e seco por alguns minutos a temperatura ambiente. Ao RNA total foi adicionado H₂O livre de Rnase (H₂O DEPC, Merck, Alemanha). A concentração de RNA total foi determinada por espectrometria e a pureza e integridade da amostra

avaliada pela relação da D.O. 260/280 e em gel analítico de agarose 1%, respectivamente.

4. *cDNA array*

4.1. Precipitação de RNA total

A 30 µg de RNA total acrescentou-se 2µl de RNA controle e acetato de sódio e etanol absoluto. A precipitação transcorreu por 2 horas no mínimo, então após o RNA precipitado ser centrifugado a 14000 xg por 30 minutos e o precipitado lavado 2 vezes com etanol 75% e seco a temperatura ambiente por alguns minutos, o RNA foi ressuspendido em 15µl de H₂O DEPC.

4.2. Preparação da sonda de cDNA

O RNA total das amostras obtido na ultima precipitação foi utilizado como molde para gerar a sonda de cDNA marcada com ³³P usando a reação de transcriptase reversa. Ao RNA total obtido acrescentou-se 2µg de oligo dT (Life technologies) e o volume completado para 15,5 µl com H₂O DEPC, incubado durante 10 minutos a 70°C e imediatamente resfriado em banho de gelo por 2 minutos. A seguir adicionou-se a cada amostra 19,5 µl de uma solução com 8,0 µl de 5X tampão de primeira fita (250mM Tris-HCl, pH 8,3; 375mM KCl; 15mM MgCl₂), 4µl de DTT 0,1 M, 2,5 µl de Transcriptase reversa (Life technologies), 1,0 µl de dNTP (dATP, dGTP e dTTP a 10mM, Amershan-Pharmacia) e 3,0 µl de dCTP 16 µM e Rnasin 40u/µl. Por fim, para este 35 µl serão acrescentados 5µl de ³³P dCTP (Amershan) e a reação incubada à 37°C por 90 minutos.

A purificação da sonda foi feita por hidrólise: Adicionando a reação: 1,0 µl de SDS 1%, 3,0 µl de NaOH 3M e 1,0 µl de EDTA 0,5M. Após a incubação

por 20 minutos à 70°C foi realizada a neutralização adicionando à reação 10µl de Tris 1M (pH 8,0); 4,8µl de HCl 2N em seguida as amostras foram passadas em colunas de *Sephadex* G25, afim de remover os nucleotídeos radioativos livres. Das amostras retirou-se uma alíquota para verificar a eficiência da marcação, por contagem em contador β (Beckman).

4.3. Seleção das ESTs a serem incluídas no *cDNA array*

As membranas por nós utilizadas, as quais identificaremos por 4.7K001 foram definidas como se segue: As seqüências incluídas na membrana foram o resultado de uma triagem feita entre *ESTs* derivadas de tumores humanos (tumores de mama, estomago e cabeça e pescoço) geradas pelo Projeto Genoma Humano de Câncer (Ludwig/FAPESP) através da metodologia do *ORESTES* (Camargo et al., 2001). Dentre os genes de expressão constitutiva utilizados no estudo encontra-se o cDNA codificador da *acid ribosomal phosphoprotein* (ARP), *gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), *retinoic acid receptor* (RAR), actina e α -Tubulina. As seqüências de plantas utilizadas como controles negativos foram o cDNA codificador da ribulose 1,5-bifosfato carboxilase, enzima envolvida no processo de fotossíntese, e o cDNA codificador da Th1, envolvida na síntese de tiamina em plantas.

As *ESTs* selecionadas representam preferencialmente a porção 3' dos mensageiros e possuem um tamanho médio de 350 pares de bases. Foram eliminadas as redundâncias (duas seqüências provenientes do mesmo mensageiro) e as seqüências foram homogenizadas com relação ao seu tamanho (número de bases) e conteúdo de guanina/citosina, como uma forma de se obter uma maior uniformidade nas condições das hibridizações.

Estas *ESTs* são amplificados por PCR, utilizando iniciadores que hibridizam em regiões adjacentes ao sítio de clonagem do plasmídeo usando como vetor. Os produtos da PCR purificados são então fixados em membranas utilizando o robot Flexys (Genomic Solutions, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados também controles positivos e negativos, de forma a monitorar a qualidade das reações de transcrição reversa.

4.4. Hibridização

As membranas em triplicata foram colocadas em cilindros de hibridização de modo que à parte onde estão as seqüências *ESTs* fixadas estarão voltadas para o interior do cilindro. A hibridização foi realizada segundo o procedimento descrito por Church & Gilbert, 1984. Resumidamente, as membranas foram colocadas para pré-hibridizar em forno de hibridização por no mínimo 2 horas á 65°C em solução com 50% (v/v) de solução estoque de fosfato de sódio; 7% de SDS; 1% BSA e 1mM EDTA. A sonda marcada com ³³PdCTP foi desnaturada por 5 minutos á 95°C e adicionadas á membrana e hibridizadas por 18 horas a 65°C. A seguir, as membranas foram lavadas por 2 vezes á 65°C durante 20 minutos com a solução I (50% (v/v) de solução estoque de fosfato de sódio; 1% de SDS e 1mM EDTA).

Após o final das lavagens, o excesso de solução de lavagem foi levemente removido e as membranas ainda úmidas envolvidas em filme plástico e os sinais gerados capturados em *photoimager Storm 840*

(Molecular Dynamics) com 100 μm de resolução e os dados obtidos em diferentes tempos de exposição foram avaliados.

4.5. Análise de resultados de *cDNA array*

A imagem capturada dos sinais gerados foi analisada pelo programa *Array Vision*TM (Imaging Research Inc., EUA). Este programa é capaz de localizar os sinais gerados pela hibridização e quantificar a intensidade deste sinal baseando-se na média da distribuição dos *pixels*. Para cada elemento, o valor fornecido pelo software é chamado de volume e é utilizado para análises subseqüentes. O volume correspondente ao valor da média de todos os *pixels* contido no *spot* é multiplicado área do *spot* para se obter o volume total de cada *spot*. Em seguida, os valores de volume foram analisados em nosso laboratório em 3 etapas, enumeradas a seguir:

- 1) Cálculo da energia total de cada membrana e normalização da energia total das membranas que foram hibridizadas com a mesma sonda: O valor da energia total de cada membrana foi calculado somando-se os valores de volume de todos os elementos presentes no *array*. O maior valor obtido foi usado para corrigir a energia total das outras réplicas que foram hibridizadas com a mesma sonda.
- 2) Correção do valor de sinal obtido: O valor do *background* das membranas foi determinado a partir das regiões das membranas que não possuem seqüências fixadas. Este valor foi subtraído do valor de intensidade de expressão obtido para cada elemento.
- 3) Cálculo da expressão diferencial: Após todas as etapas de normalização o valor da intensidade de cada elemento foi comparado

entre membranas hibridizadas com cDNA obtido a partir das culturas primárias de células estromais estudadas (SMD x CT1 e NA x CT1). Esta comparação foi feita através do cálculo da razão entre os valores de sinal para cada elemento nas comparações executadas. A determinação dos genes (*ORESTES*) mais ou menos expressos nas comparações estudadas foi feita pelo programa *GeneSpring* (Silicon Genetics, USA). Consideramos genes diferencialmente expresso quando a razão entre os valores de expressão nas comparações descritas foi maior que dois.

Os genes diferencialmente expressos foram submetidos à busca por homologia ao nível de nucleotídeos utilizando o algoritmo BLAST N disponível no site do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para considerarmos um cDNA identificado devido a sua alta homologia com alguma sequência já depositada em banco de dados este deveria apresentar um valor de p menor que 10^{-5} .

4.6. PCR

Brevemente, após tratamento com DNaseI, a 4 µg do RNA total de células estromais em 20 µl de H₂ODEPC foram desnaturados a 70°C por 5 minutos e o anelamento do oligo dT (1 µg) ocorreu enquanto a reação atingia a temperatura ambiente. A reação de transcrição reversa (RT) para obtenção da primeira fita de cDNA foi realizada pela adição de 8 µl de tampão de primeira fita 5X, 2 µl DTT 0,1 M, 2 µl dNTP 200µM, 2 µl de inibidor

de Rnase (RNasin) (Promega, EUA) e 2 µl da enzima SuperScript (Life Technologies, EUA), após uma hora a 42°C a polimerase foi inativada por 15 minutos a 70°C. Duzentos nanogramas deste cDNA foram então amplificados por PCR usando 1,0U da enzima da Taq DNA-polimerase e uma mistura contendo, nas concentrações finais, 2µM dNTPs (2µM dATP, 2µM dCTP, 2µM dGTP, 2µM dTTP), 1,5mM MgCl₂ e 0,2 µM para cada fita (sense e antisense) da seqüência iniciadora escolhida, em solução tampão-PCR 10X (Tris-HCl 100mM pH 8,3, KCl 500mM), volume final de 20µl. A reação foi submetida a 95°C/5 min com variado número de ciclos (14, 21, 28 e 35 ciclos) de 95°C/1 min., 62°C/1 min, 72°C/1 min. e uma extensão final a 72°C/10 min. Todo o produto da PCR foi submetido a uma corrida eletroforética em gel 1,5% de agarose juntamente com tampão de amostra 1X (Tampão 6X: xilenocianol 0,25% e glicerol 30%) em tampão de corrida TBE 1x (Tris-borato 0,09M e EDTA 2mM). O brometo de etídio adicionado a amostra permitiu que após exposição à luz UV seja captada a imagem bem como a quantificação utilizando o equipamento ImageMaster (Amersham pharmacia). Os valores densitométricos (D.^o) de cada banda foram então normalizados em função da expressão do GAPDH respectivo.

Os *primers* (Borojevic et al., 2004) utilizados no ensaio de PCR semi-quantitativo foram desenhadas utilizando o programa *Primer3 Output* que se encontra no endereço: <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>.

5. cDNA microarray

As lâminas de *cDNA microarray* 4.8K002 são constituídas de clones de ORESTES que respeitam os seguintes critérios para inclusão: i) Clone de *full length*; ii) Clone com tamanho maior que 300 pares de bases com seqüência

de alta qualidade (conteúdo de CG); iii) Clone que quando pesquisado no site: <http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast> resultou em gene com identidade > que 85% em 100 pb; e iv) Clone com seqüência mais 3'. Esta lâmina é composta por 4.608 genes conhecidos diferentes, além dos controles positivos e negativos. Dos 4.608 genes 2.159 apresentam função conhecida, sendo categorizados em 505 classes funcionais distintas.

As seqüências foram amplificadas por reação de polimerase em cadeia (PCR) onde foram usados 0,1 mM dos iniciadores universais senso e anti-senso do fago M13; 0,025 unidades de TAQ DNA-polimerase; 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP); 10 μ l de tampão de PCR 10X e 2 μ l da suspensão contendo o clone bacteriano, em um volume final de 100 μ l de reação. As reações foram incubadas no aparelho Gene Amp (Perkin Elmer, EUA) sob as seguintes condições: 1 ciclo: 95 °C por 5 min seguidos de 35 ciclos: 94 °C por 20 seg, 55 °C por 20 seg, 72 °C por 40 seg e um último ciclo de extensão a 72 °C por 5 min.

Os produtos de PCR foram fracionados em gel de agarose 1 %, o qual foi corado com brometo de etídio, a fim de verificar a presença de amplificações inespecíficas. No passo seguinte os produtos foram purificados utilizando-se o produto *QIAquick 96 PCR Purification* (Quiagen, Alemanha) e fixados a lâminas de vidro utilizando o robô Flexys (Genomic Solutions, Reino Unido). Foram dispensados 50-75 nl de suspensão contendo o inserto, correspondendo, aproximadamente a 10 pg de DNA em cada ponto. Após a deposição, a fixação do cDNA deu-se em luz ultravioleta a 90 μ J/cm² (UV cross linker, Stratagene, EUA), seguida de incubação a 80 °C durante 2 a 4 h. As lâminas foram estocadas em dissecador sob vácuo.

5.1. Amplificação

O protocolo de amplificação de RNAm baseia-se em Wang et al. (2000) e Baugh et al. (2001), os quais foram realizadas modificações visando um melhor resultado. Partiu-se de 3,0 µg de RNA total das células estromais, diluído em 6 µl de H₂O DEPC contendo 1 µl (0,5 µg/µl) do oligonucleotídeo iniciador oligo dT (15)-T7 (5' AAA CGA CGG GCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC 3'). O RNA total foi desnaturado a 70°C por 5 min e o anelamento do oligo ocorreu enquanto a reação atingia a temperatura ambiente. O promotor do fago bacteriano T7 foi incorporado na síntese da primeira fita de cDNA pela reação de transcrição reversa (RT) por adição de 4 µl de tampão de primeira fita 5X (Life Technologies), 2 µl DTT 0,1 M (Life Technologies), 2 µl dNTP 10 mM, 1 µl de inibidor de Rnase (RNasin) (Promega, EUA), 2 µl (0,5 µg/µl) oligonucleotídeo TS (*template switch*) (5' AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG 3') e 2 µl da enzima transcriptase reversa Superscript II (Life Technologies). A síntese de cDNA completou-se após 2 h a 42°C.

A segunda fita de DNA foi sintetizada por adição, na reação anterior, de 106 µl de H₂O DEPC, 15 µl tampão de *PCR Advantage* (Clontech, EUA), 3 µl dNTP 10 mM, 1 µl da enzima RNase-H (Promega) e 3 µl da enzima *cDNA polimerase Advantage* (Clontech). No termociclador os seguintes ciclos de temperatura foram utilizados: 37 °C por 5 min para digestão do mRNA, 94 °C por 2 min para desnaturação do cDNA, 65 °C por 2 min para anelamento específico do oligonucleotídeo TS e 75°C por 30 min para a extensão final. As reações foram finalizadas pela adição de 7,5 µl de NaOH 1 M com 2 mM EDTA a 65 °C por 10 min para que ocorresse a desnaturação da enzima. A segunda fita pode ser também sintetizada utilizando pela

adição de 93µl de H₂O DEPC, 30µl de tampão para segunda fita 5X (Life Technologies), 1µl de 10mM de dNTP, 1µl de E. coli DNA ligase (Life Technologies), 4µl de DNA polimerase, 1µl de E. coli Rnase H (Life Technologies), reação a qual após 2 horas a 16°C foi adicionado 2µl de T4 DNA polimerase por 5 minutos a 16°C, a reação foi finalizada pela adição de 10µl de EDTA 0,5M em banho de gelo. O cDNA dupla fita foi purificado por adição de 150 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugação a 14.000xg por 5 min. A fase aquosa foi adicionado acetato de amônio 7,5M (Merck) e etanol absoluto gelado, agitado vigorosamente e centrifugado a 14.000xg por 20 min foram realizadas 2 lavagens com etanol 70% e após secar o precipitado a temperatura ambiente, este foi ressuscitado em 20 µl de H₂O DEPC.

Para a reação de transcrição *in vitro* utilizou-se o produto *RiboMAXTM Large Scale RNA Production Systems-SP6*, T3, T7 (Promega). Adicionou-se à solução de 20 µl de cDNA dupla fita, 10 µl de tampão de reação, 15 µl de ribonucleotídeos trifosfato (rNTP) 25 mM e 5 µl da mistura da enzima de transcrição T7 RNA polimerase, a qual é específica para o promotor do fago T7. Essa reação foi incubada por 6 h a 37 °C. O RNA amplificado (RNAa) foi purificado e o cDNA dupla fita, removido pelo método de TRIZOL (Life Technologies). A concentração foi determinada por leitura da absorbância a 260 e 280 nm em espectrofotômetro (GeneQuant, França).

Para a segunda etapa de amplificação de RNAm, 7 µl de RNAa adicionou-se 1 µl (2µg/µl) de iniciadores hexâmeros randômicos (dN6; Amersham Pharmacia, Suécia), 4 µl do tampão de primeira fita 5X (Life Technologies), 2 µl DTT 0,1 M (Life Technologies), 2 µl dNTP 10 mM; 1 µl

RNasin (Promega), seguindo incubação de 65°C por 10 min. Após a adição de 2 µl da enzima transcriptase reversa Superscript II (Life Technologies) a reação foi incubada por 2 h a 42 °C. A síntese da segunda fita de cDNA utilizou 1µl do iniciador de oligo dT (15)-T7, com os reagentes descritos no protocolo de segunda fita utilizando a enzima cDNA polimerase *Advantage* (Clontech) da primeira etapa de amplificação. As etapas de purificação de cDNA dupla fita e da transcrição *in vitro* também seguiram o protocolo anterior.

5.2. Hibridização

As lâminas foram pré-hibridizadas a 42 °C durante 8 h em tubo cônico contendo 5X SSC; 0,2 % SDS; 1 % BSA; 5X solução de *Denhardt's* (filtrada em membrana de poro 0,22 ou 0,45 µm). A seguir as lâminas foram lavadas em água destilada e montadas na estação de hibridização GeneTac 2000 (Genomic Solutions).

A partir do RNA amplificado foi sintetizada a sonda de cDNA marcada com dUTP conjugado a fluorocromos, através de uma reação de transcrição reversa. 3,5 µg de RNA amplificados foram precipitados com 10% de acetato de sódio 3 M e 3 volumes de etanol a -70 °C por, no mínimo, 16 h. Em seguida, o RNA foi centrifugado e lavado com etanol 70%. O RNA foi então dissolvido em 4 µl de água tratada com DEPC e aquecido a 70°C por 10 min na presença de 2,5 µg de oligo dT (Oligo dT₁₂₋₁₈, Life Technologies, USA) sendo em seguida resfriado em gelo por 2 min. Os RNAs foram transcritos

reversamente à primeira fita de cDNA na presença de 400 U da enzima transcriptase-reversa (Superscript II), 500 µM de cada deoxirribonucleotídeo, dATP, dGTP e dCTP e 100 µM de dTTP, 1 mM DTT, 1X de tampão de transcrição reversa (Life Technologies), 40 U de RNasin, (Promega) e 3 mM de deoxirribonucleotídeos conjugados a fluorocromos, Cy-3 ou dUTP/Cy-5 dUTP (Amershan), em uma reação com volume final de 50 µl. O RNA referência utilizado que corresponde a uma mistura de RNA amplificados da amostra NA1 foi também marcado com deoxirribonucleotídeos conjugados a fluorocromos, Cy-3 ou dUTP/Cy-5 dUTP (Amershan), para correção de possíveis variações decorrentes da marcação. A reação de síntese de cDNA foi então incubada a 42 °C por 2 h sendo a hidrólise do RNA feita pela adição de 1,5 µl de EDTA 0,5M e 15 µl de NaOH 0,1 M, seguida de incubação a 70 °C durante 10 min.

Os nucleotídeos não incorporados foram removidos através de uma etapa de precipitação à temperatura ambiente durante 30 min na presença de 10 % do volume de acetato de sódio 3 M e 3 volumes de etanol. Em seguida, o cDNA foi centrifugado e lavado 4 vezes com 100 µl de etanol 70 %. A sonda de cDNA foi então dissolvida em 7,5 µl de tampão de hibridização (Genomic Solutions) e 7,5 µl de formamida deionizada (Sigma, EUA). Quantidades iguais das sondas de cDNA marcadas com deoxinucleotídeo fluorescente e correspondentes a cada uma das amostras a serem comparadas foram então misturadas e aquecidas a 95 °C por 5 min. Para a hibridização, adicionou-se todo o volume das sondas sobre a lâmina de *microarray* a ser hibridizada e cobriu-se a mesma com lamínula. A hibridização foi feita em câmara úmida (40 % de formamida e SSC 2X) a 48 °C durante, no mínimo, 16 h.

Em seguida à reação de hibridização foram feitas lavagens sucessivas da lâmina em solução de SSC 2X sob 5 min de agitação, solução de SSC 0,1 % e SDS 0,1 % sob agitação por 15 min. Por último, a lâmina foi lavada com solução de SSC 0,1 %, sob 5 min de agitação e posteriormente centrifugada por 5 min a 150xg para leitura e análise dos resultados.

Os sinais gerados pela hibridização dos cDNAs das amostras (marcados com Cy3 dUTP ou Cy5 dUTP) às seqüências fixadas nas lâminas de vidro foram capturados utilizando-se o *ScanArray Express* (Perkin Elmer Life Sciences, Inc., EUA), um scanner a laser confocal com canal duplo. O scanner localiza os pontos de hibridização e adquire os dados correspondentes aos sinais de fluorescência emitidos pelo material presente nas lâminas de hibridização, quando os fluorocromos Cy3 e Cy5 são excitados pelo laser emitido pelo sistema. O sistema permite a quantificação do sinal desde que a luz emitida pelos fluorocromos excitados é convertida em energia elétrica, produzindo um sinal mensurável, que é proporcional ao número de fótons detectados. Este sistema a laser produz dados com menor variância, considerando a resolução de 5 μ m, e o sistema de filtros permite aumento da intensidade do sinal alvo enquanto um aparato, que bloqueia a passagem de luz refletida, proporciona eliminação do ruído com maior eficiência.

Os dados foram adquiridos e quantificados utilizando-se o programa de análise *QuantArray*. Este programa permite a localização automática dos pontos de cDNA hibridizados na lâmina baseando-se em marcadores de posição e o refinamento desta localização foi realizado de forma manual. O programa realiza o cálculo da intensidade de cada ponto de hibridização para cada uma das amostras (células estromais de pacientes ou célula

referência), o qual corresponde à intensidade média e desvio padrão da fluorescência de cada sinal individual (pixel) gerado por fluorocromo verde ou vermelho, multiplicada pela área de hibridização. As imagens decompostas (fluorocromo verde ou vermelho separadamente) ou compostas (ambos os fluorocromos conjuntamente) foram gravadas como imagens 16-bit TIFF (Anexo 5).

5.3. Análise matemática dos dados

A próxima etapa do processo foi o de eliminar todos os pontos da lamina que apresentavam $[I_{\text{spot}} - (I_{\text{back}} + 2 \text{ SD})] > 0$, onde I_{spot} = intensidade do spot; I_{back} = intensidade do controle negativo e todos os pontos com intensidade $>$ que 63000 que foram considerados saturados $[65535 = 16 \text{ BIT}]$, portanto foram retirados da análise aqueles pontos com sinal próximo do controle (ruído) e aqueles que apresentaram saturação de hibridização. Neste último caso, o excesso de material hibridizado gera sinal muito intenso que, supera a capacidade do detector de medir a intensidade de fluorescência, e invalida a quantificação e comparações, devendo portanto, ser eliminado de futuras análises.

O processo de quantificação é a normalização da intensidade do sinal, conforme revisto por Quackenbush, et al., 2001 e Quackenbush, et al., 2002. A normalização permite o ajuste de possíveis diferenças em quantidades iniciais de RNA entre as duas amostras utilizadas no ensaio e permite também o ajuste de variações de marcação e de eficiência de detecção entre

os fluorocromos utilizados. Assumindo que o número de moléculas em cada amostra é igual, isto é, se a representação de uma espécie de RNA aumenta, a de outra espécie diminui, aproximadamente o mesmo número de moléculas marcadas deve hibridizar com os *arrays* e a intensidade total de todos os elementos do *array* deve ser a mesma para cada amostra. Um fator de normalização é então calculado, pela somatória das intensidades de sinal medidas em ambos os canais. Este fator ajusta a expressão de cada molécula de modo que a razão entre todos os elementos é igual a 1 e o processo é denominado normalização pela energia total. A replica técnica ou inversão de corantes para marcação da mesma amostra, foi utilizada para identificar variações que possam ocorrer durante a marcação da amostra com fluorocromo, isto é, caso determinado cDNA apresente marcação preferencial com o fluorocromo verde ou vermelho. Como estamos fazendo comparações entre amostras idênticas, espera-se que obtenhamos medidas consistentes, isto é, sem variações. Portanto, sinais de hibridização correspondendo à expressão de um mesmo gene, mas cuja energia total foi diferente entre a mesma amostra marcada com os diferentes fluorocromos, foram eliminados de futuras análises.

Para identificar os genes diferencialmente expressos calculou-se o logaritmo da razão da expressão de cada gene em células estromais de um paciente em relação a células de referência ($\log_2$ razão), assumiu-se que estes valores têm distribuição normal. Através da distribuição normal das comparações (CTXSMD, CTXSMD/LMA e SMDXSMD/LMA) determinamos os valores da média e do desvio padrão (SD) que serão considerados para a determinação dos valores das razões ($p < 0,05$) a partir das quais os genes serão considerado diferencialmente expressos. A expressão adotada para a determinação destes valores foi: $\text{media} \pm (1,96 \times \text{SD})$.

6. Ensaio de Proteção da Ribonuclease (RPA)

O Ensaio de Proteção da Ribonuclease utilizando *RiboQuantTM Multi-Probe Rnase protection Assay – hCK-4 Multi-Probe Template Set* (Pharmigen International, EUA) consiste na síntese de RNAs antisense marcados com UTP [^{32}P] (Amersham-Pharmacia, UK) que serve como sonda para detecção de RNAs específicos. Para esta reação foi adicionado na ordem: 40U/ μl de Rnasin, 1 μl de GACU (CTP, ATP, GTP (2,5M) e UTP (61 μM), 1 μl DTT 100mM, 1 μl de tampão de transcrição 5X, 1 μl de mistura de molde de RNA de interesse, 1 μl de UTP [^{32}P] e 1 μl de RNA polimerase T7 (20U/ μl). Após 1h a 37°C, seguida da adição de 1 μl de

Dnase/Rnase-free durante 30 minutos a 37°C a sonda sintetizada durante esta transcrição *in vitro* utilizou como molde fragmentos das seqüências dos RNAs de interesse, cada qual com um tamanho distinto, clonado em um plasmídeo contendo o sítio de ligação da T7 RNA polimerase o qual foi purificada adicionando EDTA 20mM, RNAt de levedura e Fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (50:1) seguido de agitação vigorosa e centrifugação 22.000xg por 5 minutos a temperatura ambiente, seguido da precipitação pela adição de acetato de amônio 4M e etanol absoluto. O conjunto de sondas foi hibridizado com 10µg de RNA total proveniente de células estromais durante 16 até 18 horas sendo esta reação seguida da ação de uma Rnase que quebrará todos os RNAs de fita simples mantendo intacto aqueles que estiverem ligados a seqüências complementares. Esses RNAs restantes, protegidos da Rnase foram purificados, aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida, o qual foi exposto a um filme de raio X e o sinal gerado foi quantificado em um densitômetro *phosphorimaging* IMAGEMASTER (Amershan). A quantificação de cada tipo de RNA foi baseado na intensidade do fragmento de sonda protegido, do tamanho apropriado expressas segundo o conteúdo de GAPDH presente na mesma amostra.

RESULTADOS

1. *cDNA array*

Em uma primeira etapa a expressão diferencial de genes em células estromais provenientes de medula óssea de crianças com SMD (n=4) e indivíduos normais adultos (NA, n=2) em comparação as mesmas células obtidas de uma criança saudável (CT) foi determinada como esquematizado no anexo 1.

Os ensaios de *cDNA array* foram realizados como descrito em casuística, material e métodos e a comparação entre os grupos SMD (SMD1-SMD4) e NA (NA1 e NA2) e a criança (CT1) foi realizada após a normalização dos dados utilizando o programa *GeneSpring*. O perfil de expressão obtido para as células estromais de uma criança normal (CT) foi considerado como sendo o padrão de expressão referência. Os genes diferencialmente expressos foram considerados aqueles cuja razão (r) entre a média de expressão para cada grupo SMD ou NA em relação aos valores de expressão para CT1 resultou em um valor superior a dois ($r > 2$) ou inferior a 0,5 ($r < 0,5$), como podemos observar nos gráficos de dispersão na figura 2.

Nesta figura podemos observar a predominância de genes hiper-expressos ($r > 2$) em NA (figura 2 A) e SMD (figura 2 B) em relação a CT1. A análise dos genes diferencialmente expressos nestes dois grupos, representados no diagrama de Venn (figura 3), indica que dos 358 genes hiper-expressos em NA, 140 são hiper-expressos também em SMD, portanto somente 13 genes foram exclusivamente hiper-expressos em SMD. Dentre estes 13 genes, *DNAJ-like1*(HSJ1) o qual codifica uma proteína de choque térmico apresentou função conhecida.

Figura 2: Gráficos de dispersão obtidos para os genes analisados em células estromais de indivíduos adultos normais (NA), uma criança normal (CT1) e crianças com SMD. As comparações realizadas foram: NA X CT1 (A) e SMD X CT1 (B).

Figura 3: No diagrama de Venn os genes hiper-expresso em células estromais de pacientes com SMD e indivíduos adultos normais foram distribuídos respeitando o grupo de pacientes ao qual este pertença. A intersecção apresenta os genes hiper-expressos nos 2 grupos simultaneamente.

Dos 358 genes diferencialmente expressos em células estromais de adultos normais (NA), 218 genes foram exclusivos de NA, e entre estes, 61 apresentaram função conhecida (anexo 2). A análise ontológica indicou que estes genes foram principalmente associados a metabolismo, processos fisiológicos celulares e comunicação celular. Os genes associados à comunicação celular (ARHGAP5, NFAT5, CTNNB1, LAMB3, PRKCM, ITGB1BP2, ADRBK2, GRP58, GAB1, APLP2, CTNND1 e COL6A2) foram também associados com morfogênese (LAMB3 e ITGB1BP2), com a

organização estrutural da matriz extracelular (COL6A2) e a regulação de processos fisiológicos celulares (NFAT5 e CTNNB1).

Dentre os 140 genes hiper-expressos simultaneamente em SMD e NA em relação a uma criança normal, 41 apresentaram função conhecida (anexo 3). Estes genes foram segundo o *Gene Ontology* principalmente relacionados ao metabolismo e entre os genes classificados em processos fisiológicos celulares observamos aqueles também associados a morte celular (LTF), homeostase (TEGF), coagulação (THBS1) e atividade reguladora enzimática (CDC37). O gene COL1A2 foi associado juntamente com PTX3 e LTF a resposta a estímulos e com outros genes tais como SPARC, THBS1 e OSF-2 a morfogênese e a matriz extracelular.

Com a finalidade de validar os resultados obtidos por *cDNA array* avaliamos por PCR semi-quantitativo a expressão dos genes SPARC, THBS1, OSF-2 e COL1A2 os quais foram diferencialmente expressos e potencialmente poderiam ser importantes na fisiopatologia da SMD.

O PCR semi-quantitativo de 7 SMD (SMD1 – SMD7) entre as quais as 4 utilizadas no ensaio de *cDNA array* demonstrou que o produto amplificado após 21 ciclos seria ideal para a determinação da expressão dos genes avaliados (figura 4).

Figura 4: Validação por PCR semi-quantitativo dos genes diferencialmente expressos na comparação entre células estromais de crianças com SMD e uma criança saudável (controle). Imagem representativa dos produtos de PCR para OSF, COL1A2 SPARC, THBS1, e GAPDH obtidos após 21, 28 e 35 ciclos.

A análise da THBS1 por PCR confirmou o resultado de *cDNA array* para todos os 7 pacientes, enquanto para COL1A2, OSF-2 e SPARC foram, respectivamente, hiper-expressos em 5, 2 e 4 de 6 SMD, conforme pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4 – Validação dos genes diferencialmente expressos por PCR semi-quantitativo

	OSF-2		SPARC		COL1A2		THBS1	
	PCR	cDNA array	PCR	cDNA array	PCR	cDNA array	PCR	cDNA array
CT 1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
SMD1	1,5	6,4	2,0	2,8	1,9	6,6	2,5	4,5
SMD2	-	2,6	-	1,9	-	2,8	-	2,7
SMD3	0,6	4,3	1,1	1,4	1,7	2,3	2,1	1,6
SMD4	1,9	2,5	1,6	2,3	0,8	7,2	2,2	11,3
SMD5	1,1	-	1,4	-	1,9	-	2,0	-
SMD6	0,7	-	1,1	-	1,9	-	2,6	-
SMD7	1,3	-	1,6	-	2,5	-	2,8	-

Os valores apresentados na tabela são relativos a análise do produto de PCR obtido após 21 ciclos, conforme descrito em casuística, material e métodos.

Parte destes resultados foi publicada no capítulo *Molecular aspects of stromal analysis of bone marrow on MDS in childhood* do livro *Myelodysplastic and Myeloproliferative disorders in children* (2003) e outra parte publicada no periódico *Leukemia Research* 28 (2004) 831 – 844. Ambos no apêndice no final do volume desta tese.

Nesta segunda etapa utilizando a técnica de *cDNA microarray* avaliamos em células estromais provenientes de medula óssea de crianças saudáveis (CT, n=2), SMD (n=4) SMD/LMA (n=2) a expressão diferencial de genes potencialmente importantes no processo de transformação das SMD. A fim de avaliar possíveis genes importantes na fisiopatologia da SMD que não estariam presentes em nossa lamina de *cDNA microarray* analisamos em ensaios de proteção de ribonuclease (RPA) a expressão de interleucinas e fatores de crescimento potencialmente importantes na hematopoese (anexo 4).

2. *cDNA microarray*

Apesar de obtermos resultados de *cDNA array* de boa qualidade quando utilizamos RNA total (30µg) e membranas de nylon com seqüências imobilizadas na primeira etapa (anexo 1, descrito em casuística material e métodos), nesta segunda etapa optamos pela amplificação do RNAm utilizando pequenas quantidades iniciais de RNA total (3µg), o qual têm sido descrita em outros modelos por resultar em dados similares aqueles que seriam obtidos em *cDNA array* com RNA total. Em adição, entre outras vantagens a lamina de vidro a qual foi confeccionada respeitando critérios descritos em casuística, material e métodos, garante maior eficiência de hibridização e permite normalizações adicionais àquelas não passíveis na membrana.

Avaliamos dois sistemas para amplificação de RNAm, basicamente eles apenas diferem no procedimento da síntese da segunda fita na primeira etapa de amplificação, ambos os sistemas foram descritos em casuística, material e métodos e serão aqui identificados como (A) que utiliza a enzima polimerase *Advantage* e (B) o que utiliza uma mistura de enzimas: *E. coli*

DNA ligase, DNA polimerase, E. coli Rnase H e T4 DNA polimerase. Em todas as amplificações a quantidade de RNA total inicial foi de 3µg e consideramos que partimos de 30ng de RNAm. Na tabela 5 apresentamos o número de vezes que o RNAm foi amplificado ao final da 2ª etapa de amplificação.

Tabela 5 – Comparação da eficiência de dois sistemas de amplificação

	Sistema A	Sistema B
Amostra		
NA1	229,0	1.365,3
CT1	88,3	162,0
CT2	124,7	443,3
SMD3	106,8	286,0
SMD5	-	530,0
SMD6	170,3	253,3
SMD7	-	205,0
SMD/LMA1	250,7	1.095,7
SMD/LMA2	218,4	2.147,0

Os valores apresentados correspondem ao número de vezes que a quantidade inicial de 30ng de RNAm foi aumentado para cada amostra ao final de 2ª etapa, considerando os sistemas acima definidos em um ensaio representativo. Nas amostras SMD5 e SMD7 foram feitas amplificações utilizando apenas o sistema B.

No sistema A as amplificações resultaram em quantidades de RNAa (amplificado) de 2,6µg até 7,5 µg, enquanto que no sistema B as quantidades obtidas de RNAa apresentaram-se no intervalo entre 4,8µg e 64,41µg. O sistema B demonstrou maior eficiência e foi utilizado para amplificar as demais amostras. Excetuando-se o RNAa de referência do qual consumimos 12 µg de RNA total somente as amostra CT1 e SMD7 necessitaram de uma nova leva de amplificações.

2.1. Genes diferencialmente expressos

A expressão diferencial de genes em células estromais de crianças saudáveis ou com SMD, ou SMD/LMA foi avaliada utilizando uma lamina de *cDNA microarray* (anexo 5). Os resultados obtidos foram avaliados, sendo submetidos inicialmente a alguns critérios de qualidade necessários para a adequada análise estatística.

O primeiro critério considera a qualidade da marcação de Cy3 e Cy5. Marcamos a amostra de interesse separadamente com cada um dos fluorocromos Cy3 ou Cy5 e procedemos da mesma maneira com o material de referência. No momento da hibridação as 2 diferentes amostras (interesse e referência) foram colocadas em 2 laminas, de modo que, quando comparadas, cada amostra apresentasse marcação invertida com os fluorocromos (padrão e *swap*). Isto foi feito com o objetivo de eliminar viés decorrente da variação de eficiência de marcação. Na figura 5 podemos observar a dispersão dos pontos, que representam a relação entre os valores de intensidade para cada gene obtido para células estromais de uma criança e a célula estromal utilizada como referência.

Figura 5 – Gráficos de dispersão representativos que apresentam a relação entre os valores de intensidade para cada gene expresso nas células estromais de cada criança (CE) e a célula estromal utilizada como referência (CR). Permite avaliar a eficiência da marcação. (CE-Cy3 X CR-Cy5) vs. (CE-Cy5 X CR-Cy3). Gráfico (A) corresponde a dispersão próxima do ideal, tendendo a uma reta e (B) não está de acordo com os padrões de qualidade esperados.

O gráfico A da figura 5 representa uma dispersão que segue o padrão de uma reta o que seria ideal para a continuidade da análise. Em contraste, o gráfico B, da mesma figura, mostra uma dispersão que não está de acordo com os padrões de qualidade esperados. Mas o critério considerado mais importante está representado na figura 6, onde os gráficos de dispersão representam o Log_2 dos valores de intensidade de fluorescência para cada fluorocromo, sendo eliminados aqueles elementos da lamina cujo valor de $[I_{\text{spot}} - (I_{\text{back}} + 2 \text{ SD})]$ fosse maior que 0, como já descrito em casuística, material e métodos. Assim, de forma representativa podemos verificar para o paciente (gráficos A e B) um pequeno número de pontos eliminado (em azul), os quais podem ser confirmados nos gráficos C e D, onde somente os pontos referentes ao controle negativo estão em destaque. Portanto, estas laminas obedecem a este critério. Em contraste, no anexo 6 apresentamos os mesmos gráficos para as laminas hibridizadas as quais seriam excluídas da análise.

Figura 6 – Representa os gráficos de dispersão (A e B) expressos como o Log_2 dos valores de intensidade de fluorescência para cada fluorocromo, sendo eliminados aqueles elementos da lamina cujo sinal foi similar ao observado nos controles negativos. Assim, de forma representativa podemos verificar em A e B, um pequeno número de pontos eliminados (cinza), o que pode ser confirmado nas figuras C e D, onde somente os pontos referentes ao controle negativo estão em destaque.

As comparações da expressão de genes em células estromais de SMD, SMD/LMA e das crianças normais levaram em consideração um $p < 0,05$ (figura 7) do $\log_2$ da razão dos valores da relação entre a média da intensidade obtida para cada gene em relação à referência, de dois grupos a serem comparados, por exemplo, SMD X SMD/LMA.

Figura 7: Representação gráfica dos genes considerando o $\log_2$ da razão entre (A) SMD vs. CT, (B) SMD vs. SMD/LMA e (C) CT vs. SMD/LMA. As retas verticais (vermelha) indicam os valores a partir dos quais os genes foram definidos como diferencialmente expressos. No eixo y apresentamos a razão entre cada grupo de pacientes e no eixo x a frequência de genes para aquele intervalo de razão.

Em cada comparação indicada na figura 7 o valor da razão para cada gene entre os grupos de indivíduos foi calculado como descrito em casuística, material e métodos. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 6.

Tabela 6 – Genes diferencialmente expressos na comparação entre CT, SMD e SMD/LMA

	SMD vs. CT	SMD vs. SMD/LMA	CT vs. SMD/LMA
CT	1,80 – 16,16 (n=189)	-	2,13 – 31,88 (n=179)
SMD	1,71 – 4,99 (n=103)	1,70 – 7,66 (n=176)	-
SMD/LMA	-	1,65 – 4,67 (n=114)	1,97 – 8,59 (n=118)

Os valores apresentados correspondem ao intervalo de razões obtidas em cada comparação, o valor apresentado entre parênteses indica o número de genes diferencialmente expressos (hiper-expressos) em cada comparação. Os genes diferencialmente expressos em cada comparação foram descritos nos anexo 7 até 12.

As comparações feitas entre células estromais de crianças com SMD e SMD/LMA e em relação as crianças normais sugerem genes diferencialmente expressos que potencialmente poderiam ser importantes durante a transformação e a evolução de SMD para SMD/LMA. Estes genes apresentam padrões de expressão, os quais podem ser determinados considerando os valores médios da razão para um dado gene em comum para 3 ou 2 grupos de comparações (SMD vs. CT; SMD vs. SMD/LMA e CT vs. SMD/LMA). A figura 8 exemplifica alguns genes com os padrões de expressão determinados que serão definidos na sequência dos resultados.

Dentre os 30 genes em comum nas três comparações observamos principalmente dois padrões de expressão de genes os quais identificaremos como A e B (figura 9).

Figura 8: Gráficos tipo *boxplot* representativos dos padrões de expressão gênica das células estromais durante a transformação e evolução da SMD. Genes que aumentam (A) ou diminuem (B) gradativamente, genes que apresentam aumento (C) ou diminuição (D) apenas em SMD/LMA e genes que aumentam (E) ou diminuem em SMD e SMD/LMA simultaneamente em relação ao controle.

Figura 9: No diagrama de Venn indicamos os genes diferencialmente expressos em comum nas três comparações: CTXSMD, SMDXSMD/LMA e CTXSMD/LMA

- A. Genes que apresentam aumento de expressão ao longo da transformação (n=14, tabela 7). Estes genes foram selecionados a partir das

três comparações: SMD vs. CT, SMD vs. SMD/LMA e SMD/LMA vs. CT, onde consideramos genes hiper-expressos em SMD em relação ao CT (SMD>CT), genes hiper-expressos em SMD/LMA em relação a SMD (SMD/LMA > SMD) e genes hiper-expressos em SMD/LMA em relação a CT (SMD/LMA > CT). Portanto, estes genes são aqueles que obedecem as relações: SMD>CT, SMD/LMA > SMD e SMD/LMA > CT. Logo: SMD/LMA>SMD>CT.

Tabela 7 - Genes que apresentam aumento de expressão ao longo da transformação que respeitam a expressão: CT<SMD<SMD/LMA, (n=14).

		SMD vs. CT	SMD vs. SMD/LMA	SMD/LMA vs. CT
		SMD	SMD/LMA	SMD/LMA
1	AZGP1 alpha-2-glycoprotein 1, zinc	2,51	1,78	4,48
2	CSE1L CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	2,41	1,72	4,15
3	EIF4EBP2 eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	1,77	2,30	4,06
4	FAM8A1 family with sequence similarity 8, member A1	2,49	1,89	4,70
5	FBLN1 fibulin 1	1,84	4,67	8,59
6	FN3K fructosamine-3-kinase	1,82	2,12	3,85
7	GATA4 GATA binding protein 4	1,71	1,81	3,10
8	IL6ST interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1,87	1,75	3,26
9	KLK2 kallikrein 2, prostatic	1,94	1,94	3,76
10	LOC90550 hypothetical protein BC010682	1,83	2,80	5,11
11	MRPL44 mitochondrial ribosomal protein L44	2,41	1,82	4,38
12	SPAG9 sperm associated antigen 9	1,80	1,78	3,19
13	TA-PP2C T-cell activation protein phosphatase 2C	2,95	1,77	5,21
14	UBXD1 1	2,09	2,15	4,50

B. Genes que apresentam redução de expressão ao longo da transformação (n=16, tabela 8). Novamente foram consideradas as três comparações. Ao contrário do padrão de expressão observado em A, os genes selecionados foram hiper-expressos em CT em relação ao SMD (CT

> SMD), genes hiper-expressos em SMD em relação a SMD/LMA (SMD > SMD/LMA) e genes hiper-expressos em CT em relação a SMD (CT > SMD/LMA). Portanto, estes genes são aqueles que seguem a relação: CT > SMD, SMD > SMD/LMA e CT > SMD/LMA. Logo: CT>SMD>SMD/LMA.

Tabela 8 - Genes que apresentam redução de expressão ao longo da transformação que respeitam a expressão: SMD/LMA<SMD<CT, (n=16).

		SMD vs. CT	SMD vs. SMD/LMA	SMD/LMA vs. CT	
		CT	SMD	CT	
1	ARHE	ras homolog gene family, member E	2,68	2,05	5,51
2	C6orf69	chromosome 6 open reading frame 69	4,16	7,66	31,88
3	CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	3,19	2,04	6,52
4	DEPP	decidual protein induced by progesterone	1,88	2,17	4,07
5	GLTSCR2	glioma tumor suppressor candidate region gene 2	2,76	4,90	4,13
6	IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4	2,59	2,88	7,44
7	ITGB1	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2)	2,37	1,94	4,60
8	KPNA3	karyopherin alpha 3 (importin alpha 4)	1,88	2,26	4,23
9	NCF2	neutrophil cytosolic factor 2 (65kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 2)	2,25	2,00	4,48
10	PHC2	polyhomeotic-like 2 (Drosophila)	2,21	1,79	3,95
11	PPP1R12A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A	2,32	1,77	4,10
12	RPS11	ribosomal protein S11	6,54	1,71	11,20
13	SERPINB2	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	2,12	3,69	7,81
14	SLC7A2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	1,89	2,38	4,49
15	TM4SF10	transmembrane 4 superfamily member 10	2,95	2,10	6,19
16	WAC	WW domain-containing adapter with a coiled-coil region	1,89	3,43	6,5

Considerados os 95 genes em comum entre as comparações SMDX SMD/LMA e CTX SMD/LMA observamos os padrões de expressão de genes C e D (figura 10).

Figura 10: No diagrama de Venn indicamos os genes em comum diferencialmente expresso nas duas comparações: SMDX SMD/LMA vs. CTX SMD/LMA

- C.** Genes que permanecem com expressão inalterada em crianças normais e com SMD, mas aumentam em SMD/LMA (n=36, tabela 9). Estes genes não apresentam expressão diferencial na comparação SMD vs. CT, mas são SMD/LMA > SMD e SMD/LMA > CT nas demais comparações.

Tabela 9 - Genes que permanecem com expressão inalterada em crianças normais e com SMD, mas aumentam em SMD/LMA (n=36)

			SMD vs. SMD/LMA	SMD/LMA vs. CT
			SMD/LMA	SM/LMA
1	B2M	beta-2-microglobulin	2,76	2,62
2	C2F	C2f protein	1,71	2,07
3	C6orf49	chromosome 6 open reading frame 49	1,77	2,57
4	COX5B	cytochrome c oxidase subunit Vb	2,01	1,97
5	CTSZ	cathepsin Z	2,30	2,08

6	DKFZp564I1922	adlcan	1,87	2,49
7	DKFZp761H0421	hypothetical protein DKFZp761H0421	1,92	2,89
8	EEG1	Likely ortholog of mouse embryonic epithelial gene 1	1,90	2,32
9	EVI2B	ecotropic viral integration site 2B	2,26	2,21
10	FLJ10700	hypothetical protein FLJ10700	1,73	2,39
11	FLJ23153	Likely ortholog of mouse tumor necrosis-alpha- induced adipose-related protein	2,14	2,07
12	FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	4,16	5,46
13	GALC	galactosylceramidase (Krabbe disease)	2,06	2,50
14	GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	1,84	2,27
15	HNRPH3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9)	2,28	3,70
16	KCNJ15	potassium inwardly- rectifying channel, subfamily J, member 15	2,48	2,75
17	LUM	lumican	2,40	3,37
18	MGC2628	hypothetical protein MGC2628	1,68	2,24
19	MRPL27	mitochondrial ribosomal protein L27	1,65	2,49
20	MTA1L1	metastasis-associated 1- like 1	1,85	2,68
21	NAB1	NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)	1,66	2,47
22	PBXIP1	pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1	2,44	2,43
23	PME-1	protein phosphatase methylesterase-1	1,87	2,74
24	PSMB9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional protease 2)	2,39	2,54
25	RAB3-GAP150	rab3 GTPase-activating protein, non-catalytic subunit (150kD)	1,80	3,06
26	RAB9P40	Rab9 effector p40	1,78	2,73
27	RGS16	regulator of G-protein signalling 16	3,44	2,63
28	RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	4,32	2,72
29	SIAT9	sialyltransferase 9 (CMP- NeuAc:lactosylceramide alpha-2,3-sialyltransferase; GM3 synthase)	2,01	2,29
30	SNAP25	synaptosomal-associated protein, 25kDa	3,37	2,11
31	SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia,	2,12	2,51

autosomal sex-reversal)			
32	T1A-2	lung type-I cell membrane-associated glycoprotein	1,96 2,11
33	TMEM9	transmembrane protein 9	2,59 2,15
34	UXT	ubiquitously-expressed transcript	2,05 2,16
35	VLDLR	very low density lipoprotein receptor	2,44 3,46
36	ZNF19	zinc finger protein 19 (KOX 12)	2,54 2,36

D. Genes que permanecem com expressão inalterada em normal e SMD, mas reduzida na evolução para SMD/LMA (n=59, tabela 10). Como nos genes citados em C, estes genes não apresentam expressão diferencial na comparação SMD vs. CT, no entanto são SMD > SMD/LMA e CT > SMD/LMA nas demais comparações.

Tabela 10 - Genes que permanecem com expressão inalterada em normal e SMD, mas reduzida na evolução para SMD/LMA (n=59).

		SMD vs. SMD/LMA	SMD/LMA vs. CT
		SMD	CT
1	ABI-2	abl-interactor 2	1,88 2,81
2	ACTN4	actinin, alpha 4	2,76 2,23
3	C13orf11	chromosome 13 open reading frame 11	1,77 2,17
4	CA14	carbonic anhydrase XIV	3,26 2,84
5	CAMTA2	calmodulin binding transcription activator 2	2,71 2,17
6	CAPZB	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	2,21 2,37
7	CDKN2D	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	2,15 2,29
8	COMT	catechol-O-methyltransferase	2,16 3,11
9	COTL1	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	1,98 2,45
10	CRK	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)	2,28 2,16
11	CTGF	connective tissue growth factor	2,09 2,89
12	CTL2	CTL2 gene	2,03 2,85
13	DDOST	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase	1,89 2,27
14	DOC1	downregulated in ovarian cancer 1	2,09 2,55
15	EIF3S4	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 4 delta, 44kDa	1,90 2,21
16	FADS1	fatty acid desaturase 1	1,96 2,31

17	FBLP-1	filamin-binding LIM protein-1	3,25	2,32
18	FLJ12666	hypothetical protein FLJ12666	2,19	2,26
19	FLJ13612	likely ortholog of neuronally expressed calcium binding protein	2,65	2,88
20	FLJ22649	hypothetical protein FLJ22649 similar to signal peptidase SPC22/23	1,88	3,24
21	FOXP1	forkhead box P1	1,89	3,00
22	GLG1	golgi apparatus protein 1	2,40	2,60
23	GNAI2	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2	3,21	4,13
24	IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30	2,09	2,77
25	KAI1	kangai 1 (suppression of tumorigenicity 6, prostate; CD82 antigen (R2 leukocyte antigen, antigen detected by monoclonal and antibody IA4))	2,00	3,02
26	KPNA6	karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)	2,12	2,69
27	LOC51759	hepatocellular carcinoma-associated antigen 59	1,77	2,56
28	LOC55971	insulin receptor tyrosine kinase substrate	1,89	2,38
29	LOC56270	hypothetical protein 628	2,61	4,52
30	LOXL2	lysyl oxidase-like 2	2,69	4,29
31	LRP10	low density lipoprotein receptor-related protein 10	2,09	3,14
32	MAP1B	microtubule-associated protein 1B	1,88	2,57
33	MARK3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	2,20	2,70
34	MVP	major vault protein	1,80	2,31
35	MYLK	myosin, light polypeptide kinase	3,54	4,39
36	NEDF	neuroendocrine differentiation factor	2,27	2,18
37	NRXN3	neurexin 3	2,55	2,59
38	OAZIN	ornithine decarboxylase antizyme inhibitor	3,51	4,56
39	P4HB	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase; thyroid hormone binding protein p55)	1,77	2,55
40	PACSL1	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3	2,03	2,96
41	PALM2	paralemmin 2	2,37	2,92
42	PLAT	plasminogen activator, tissue	3,05	3,70
43	PLD3	phospholipase D3	2,14	2,16
44	PLOD	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase, Ehlers-Danlos syndrome type VI)	2,81	2,75

45	PRG1	proteoglycan 1, secretory granule	2,15	3,74
46	RAB3B	RAB3B, member RAS oncogene family	2,47	3,99
47	SDR1	short-chain dehydrogenase/reductase 1	2,55	2,51
48	SNX19	sorting nexin 19	3,24	4,00
49	SPINT2	serine protease inhibitor, Kunitz type, 2	2,38	2,42
50	SYNPO2	synaptopodin 2	4,10	4,15
51	TADA3L	transcriptional adaptor 3 (NGG1 homolog, yeast)-like	1,78	2,73
52	TETRA	tetracycline transporter-like protein	2,36	2,48
53	THBS1	thrombospondin 1	4,92	6,73
54	TKT	transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome)	1,87	2,83
55	TM9SF1	transmembrane 9 superfamily member 1	1,99	2,29
56	TMEM8	transmembrane protein 8 (five membrane-spanning domains)	1,77	2,17
57	TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	2,77	2,82
58	TXCTP	thioredoxin interacting protein	2,73	3,60
59	XPO7	exportin 7	1,81	2,15

Dentre os 120 genes (figura 11) em comum na comparação entre SMDXCT e CTXSMD/LMA foram observados os padrões de expressão E e F.

Figura 11: No diagrama de Venn indicamos os genes em comum diferencialmente expresso nas duas comparações: SMDXCT vs. CTXSMD/LMA.

E. Genes que apresentam níveis elevados de expressão do normal para SMD, mantendo-se elevados na evolução para SMD/LMA (n=42, tabela 11). Estes genes não apresentam expressão

diferencial na comparação SMD vs. SMD/LMA, mas nas demais comparações são SMD>CT e SMD/LMA > CT.

Tabela 11 - Genes diferencialmente expressos em células estromais que apresenta níveis de expressão aumentados em SMD e em SMD/LMA (n=42).

		SMD vs. CT	SMD/LMA vs. CT
		SMD	SMD/LMA
1	ADRB1 adrenergic, beta-1-, receptor	1,72	2,50
2	AGRN agrin	2,12	2,24
3	C14orf120 chromosome 14 open reading frame 120	2,17	3,57
4	CDCA8 cell division cycle associated 8	2,19	2,06
5	CDK2AP1 CDK2-associated protein 1	3,93	2,35
6	CNNM3 cyclin M3	3,00	4,08
7	CPNE3 copine III	2,39	3,49
8	DSC3 desmocollin 3	2,74	3,49
9	FACL6 fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 6	3,00	2,84
10	FLJ10074 hypothetical protein FLJ10074	2,14	2,03
11	FLJ20618 hypothetical protein FLJ20618	2,53	2,85
12	FLJ21545 Homo sapiens cDNA: FLJ21545 fis, clone COL06195	4,25	5,22
13	FLJ39963 hypothetical protein FLJ39963	3,29	5,05
14	GIT1 G protein-coupled receptor kinase-interactor 1	1,96	3,03
15	HYPIC Huntingtin interacting protein C	2,00	2,52
16	ITPKC inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C	2,31	3,59
17	KCNK2 potassium channel, subfamily K, member 2	2,05	2,09
18	KIAA0870 KIAA0870 protein	2,21	2,95
19	KIAA1055 KIAA1055 protein	2,02	2,63
20	KIAA1416 KIAA1416 protein	1,81	2,22
21	KIAA1805 KIAA1805 protein	2,54	2,30
22	KLF5 Kruppel-like factor 5 (intestinal)	1,83	2,16
23	KMO kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)	2,17	2,43
24	LPAAT-e acid acyltransferase-epsilon	2,42	3,04
25	LSM3 LSM3 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	2,40	2,82
26	LSM4 LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	1,92	2,03
27	MAPRE2 microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	2,33	3,09
28	MCM2 MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (S. cerevisiae)	2,00	2,77
29	MRE11A MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)	2,26	2,44
30	MRPL47 mitochondrial ribosomal protein L47	3,95	5,32
31	MRPS28 mitochondrial ribosomal protein S28	2,89	2,98
32	NTN4 netrin 4	1,83	2,03
33	OSF-2 osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like)	4,99	4,43
34	OSR2 odd-skipped-related 2A protein	3,33	3,82
35	PRC1 protein regulator of cytokinesis 1	3,35	3,46
36	SCNN1A sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	2,78	2,75

37	SLPI	secretory leukocyte protease inhibitor (antileukoproteinase)	1,82	2,50
38	SOX17	SRY (sex determining region Y)-box 17	3,10	3,84
39	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	1,90	2,34
40	TPX2	TPX2, microtubule-associated protein homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	2,36	3,13
41	TTC1	tetratricopeptide repeat domain 1	1,74	2,01
42	TXNRD3	thioredoxin reductase 3	1,83	2,77

F. Genes que apresentam níveis reduzidos de expressão do normal para SMD, mantendo-se baixos em SMD/LMA (n=78, tabela 12). Como no grupo E, estes genes não apresentam expressão diferencial na comparação SMD vs. SMD/LMA, mas nas demais comparações são CT>SMD e CT > SMD/LMA.

Tabela 12 - Genes diferencialmente expressos em células estromais que apresentam níveis de expressão reduzidos em SMD e em SMD/LMA (n=78).

		SMD vs. NL	SMD/LMA vs. NL	
		NL	NL	
1	ACTR3	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	2,06	2,57
2	APMCF1	APMCF1 protein	2,76	2,56
3	BCL7B	B-cell CLL/lymphoma 7B	1,87	2,29
4	BID	BH3 interacting domain death agonist	2,11	2,19
5	BTBD6	BTB (POZ) domain containing 6	1,82	2,36
6	BZRP	benzodiazapine receptor (peripheral)	3,07	4,86
7	C20orf45	chromosome 20 open reading frame 45	4,51	2,96
8	CD207	CD207 antigen, langerin	2,86	3,16
9	CD2BP2	CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2	2,03	2,83
10	CENTG3	centaurin, gamma 3	2,78	2,43
11	CKTSF1B1	cysteine knot superfamily 1, BMP antagonist 1	16,16	12,23
12	CRYL1	crystallin, lambda 1	1,84	2,26
13	CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	2,81	4,66
14	DAP	death-associated protein	1,81	2,67
15	DEGS	degenerative spermatocyte homolog, lipid desaturase (Drosophila)	1,90	2,39
16	DES	desmin	2,40	2,13
17	DKFZP434J154	DKFZP434J154 protein	2,38	3,14
18	DNAJA2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2	2,84	2,89
19	FBXL8	F-box and leucine-rich repeat protein 8	1,88	2,69
20	FES	feline sarcoma oncogene	1,85	2,20

21	FLJ10055	hypothetical protein FLJ10055	3,62	3,61
22	FLJ10305	hypothetical protein FLJ10305	2,21	2,84
23	FLJ12953	hypothetical protein FLJ12953 similar to Mus musculus D3Mm3e	3,34	2,72
24	FRCP1	likely ortholog of mouse fibronectin type III repeat containing protein 1	2,03	3,13
25	GALNT11	UDP-N-acetyl-alpha-D- galactosamine:polypeptide N- acetylgalactosaminyltransferase 11 (GalNAc-T11)	2,01	2,32
26	GOLGA5	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 5	2,73	3,20
27	GPSN2	glycoprotein, synaptic 2	3,34	5,50
28	GSN	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	3,68	4,12
29	HBXAP	hepatitis B virus x associated protein	1,93	2,17
30	HIAT1	hippocampus abundant gene transcript 1	2,60	3,18
31	HSPC121	butyrate-induced transcript 1	2,09	2,46
32	IL1B	interleukin 1, beta	2,58	3,46
33	KIAA0247	KIAA0247 gene product	2,01	2,40
34	KIAA0625	KIAA0625 protein	2,12	2,55
35	KIAA1189	KIAA1189 protein	1,93	2,61
36	KIAA1698	KIAA1698 protein	1,92	2,96
37	LGTN	ligatin	1,98	2,28
38	LOC144455	hypothetical protein BC016658	3,25	4,79
39	LOC151534	hypothetical protein BC009264	4,16	4,21
40	MAIL	molecule possessing ankyrin repeats induced by lipopolysaccharide (MAIL), homolog of mouse	2,38	2,81
41	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	2,28	2,90
42	ME1	malic enzyme 1, NADP(+)- dependent, cytosolic	2,38	2,23
43	METTL3	methyltransferase like 3	2,82	4,13
44	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	2,84	2,47
45	NCK2	NCK adaptor protein 2	2,15	2,58
46	NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated	2,34	2,25
47	NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells inhibitor, alpha	3,43	2,55
48	NFYB	nuclear transcription factor Y, beta	2,86	3,11
49	NMES1	normal mucosa of esophagus specific 1	8,06	5,25
50	NT5E	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	3,45	3,26
51	PAWR	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	2,32	2,74
52	PGCP	plasma glutamate carboxypeptidase	4,07	3,66
53	PLAU	plasminogen activator, urokinase	2,57	2,13
54	PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5- dioxygenase (lysine hydroxylase) 2	2,00	2,35
55	PP2135	PP2135 protein	2,89	4,24
56	PPHLN1	periphrin 1	1,92	2,13
57	PRKAG2	protein kinase, AMP-activated,	2,76	3,69

	gamma 2 non-catalytic subunit			
58	PTX1	PTX1 protein	2,09	2,26
59	QKI	quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)	1,85	2,20
60	RAB4A	RAB4A, member RAS oncogene family	2,42	2,29
61	RNP24	coated vesicle membrane protein	2,73	4,45
62	RPL18	ribosomal protein L18	2,58	2,31
63	S100A6	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	2,26	2,59
64	SEMA4B	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4B	2,84	2,99
65	SLC9A7	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 7	2,18	2,69
65	SLC37A3	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3	1,99	2,14
66	SMYD3	SET and MYND domain containing 3	3,17	2,23
67	SNN	Stannin	1,98	2,22
68	SPEC1	small protein effector 1 of Cdc42	3,11	4,55
69	SRP72	signal recognition particle 72kDa	1,96	3,07
70	STARD3NL	STARD3 N-terminal like	3,09	2,60
71	TEX27	testis expressed sequence 27	1,93	2,37
72	TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	2,78	3,11
73	TGFA	transforming growth factor, alpha	2,93	2,87
74	TSSC1	tumor suppressing subtransferable candidate 1	2,01	2,88
75	UBE2B	ubiquitin-conjugating enzyme E2B (RAD6 homolog)	3,05	2,97
76	WDFY1	WD repeat and FYVE domain containing 1	2,54	2,14
77	WFS1	Wolfram syndrome 1 (wolframin)	1,87	2,44
78	ZFP36L1	zinc finger protein 36, C3H type-like 1	1,81	2,13

Portanto, por *cDNA microarray* detectamos genes com padrão de expressão em células estromais associados com a transformação (A, B, E e F) e a evolução da SMD (C e D), sendo (A) genes que apresentaram aumento ou (B) redução gradativos de expressão ao longo da evolução, (C) genes que apresentam aumento ou (D) redução apenas na SMD/LMA e (E) genes que apresentam aumento ou (F) redução em ambas SMD e SMD/LMA quando comparados aos controles normais. Em adição, os genes que apresentaram padrões de expressão reduzidos

constituem um número maior de genes (n=153) em comparação daqueles que apresentam padrão de expressão aumentado (n=92).

A classificação ontológica destes genes permitiu agrupar estes genes segundo sua participação em processos biológicos e função molecular. Dentro destas classificações, por exemplo, em processos biológicos um gene pode ser classificado como associado à morte celular e metabolismo. Com objetivo de apresentar os resultados de maneira mais clara iremos considerar a classificação ontológica que melhor define o gene a ser descrito.

A classificação ontológica para processos biológicos indicou principalmente genes associados ao metabolismo, comunicação celular, morte celular e morfogênese (Tabelas 13, 14, 15 e 16).

Tabela 13 – Genes com padrão de expressão definido ao longo da transformação e evolução da SMD associados ao metabolismo

Padrão de expressão	
A	KLK2 MRPL44 FN3K
B	KPNA3 SLC7A2 RPS11 NCF2
C	NAB1 SIAT9 PSMB9 ZNF19 COX5B UXT GALC DKFZp564I1922 FOSB HNRPH3 MRPL27 C2F CTSZ
D	PLOD EIF3S4 CA14 PLD3 MYLK FOXP1 OAZIN P4HB MARK3 TADA3L XPO7 DDOST LOXL2 FADS1 IFI30
E	MCM2 KLF5 KMO KIAA1416 KIAA1055 TOP2A TTC1 SOX17 FLJ39963 LSM3 CPNE3 CDK2AP1 FLJ10074 MRE11A LSM4 LPAAT-e TXNRD3 MRPL47 MRPS28
F	RPL18 HBXAP LGTN METTL3 NFIL3 SRP72 BZRP NT5E PRKAG2 PGCP CRYL1 UBE2B NFYB ME1 PLOD2 DEGS

Dentre os genes associados ao metabolismo observamos genes que codificam proteínas associadas ao transporte de outras proteínas e partículas, com atividade oxi-redutase e constituintes de ribossomos.

Dentre estes genes observamos aqueles que codificam proteínas envolvidas em transporte e apresentaram expressão gradativamente reduzida ao longo da transformação (KPNA3, SCL7A2 e NCF2 (item B, tabela 8)) e evolução da SMD (XPO7 (item D, tabela 10)).

Os genes cujo produto de transcrição apresentou atividade oxi-redutase foram (tabela 13): COX5B (C), PLOD (D), LOXL2 (D), P4HB (D), FADS (D), IFI30 (D), KMO (E), TXNRD3 (E), CRYL1 (F), ME1 (F), DEGS (F) e PLOD2 (F). Alguns destes genes apresentaram aumento de expressão na evolução (item C, tabela 9) e transformação (item E, Tabela 11) da SMD: COX5B, KMO e TXNRD3, mas a grande maioria dos genes relacionados a atividade oxi-redutase apresentaram redução de expressão na evolução (item D, tabela 10) e transformação (item F, Tabela 12) da SMD: PLOD, LOXL2, P4HB, FADS, IFI30, CRYL1, ME1, DEGS e PLOD2.

Os genes MRPL44 (A), RPS11 (B), MRPS28 (E), MRPSL27 (E) e RPL18 (F) codificam proteínas constituintes dos ribossomos (tabela 12).

Tabela 14 – Genes com padrão de expressão definido ao longo da transformação e evolução da SMD associados à comunicação celular

Padrão de expressão	
A	IL6ST
B	CCL20 ARHE ITGB1
C	RGS16 RGS2 GJAI
D	TMEM8 COMT CRK SNX19 RAB3B CTL2
E	MAPRE2 GIT1 ADRB1 AGRN DSC3
F	CENTG3 CD207 RAB4A SPEC1 NCK2 FES HSPC121

Dentre os genes associados à comunicação celular observamos genes que codificam proteínas que apresentam atividade reguladora de GTPases (tabela 14): RGS16 (C), RGS2 (C), GIT1 (E), SPEC1 (F) e HSPC12I (F). Outros genes associados ao transporte de moléculas como GJAI (C) e RAB4A (F) foram também observados.

Tabela 15 – Genes com padrão de expressão definido ao longo da transformação e evolução da SMD associados à morte celular

Padrão de expressão	
A	CSE1L
B	SERPINB2
C	-
D	TNFAIP3
E	-
F	NFKBIA DAP IL1B PAWR BID

Dentre os genes associados à morte celular (tabela 16) observamos principalmente aqueles que codificam proteínas ligantes a receptores, como: NFKBIA, IL1B e PAWR. Todos estes genes apresentaram expressão reduzida tanto em SMD como em SMD/LMA (item F, tabela 12).

Tabela 16 – Genes com padrão de expressão definido ao longo da transformação e evolução da SMD associados à morfogênese

Padrão de expressão	
A	GATA4

B	IGFBP4
C	VLDLR SOX9
D	NRXN3
E	OSF-2
F	S100A6 CYR61 DES WFS1

Em relação aos genes associados a morfogênese (tabela 16) foram observados principalmente aqueles que codificam proteínas ligantes de glicosaminoglicanas (OSF-2 (E) e CYR61 (F)), constituinte estrutural do citoesqueleto (DES(F)) e fator transcricional (SOX9 (C)).

Em adição, entre os genes associados a coagulação foram observados aqueles que codificam proteínas constituintes da matriz extracelular (THBS1 e TFPI2) e hidrolases (PLAT e PLAU). Estes genes apresentaram a expressão reduzida na evolução (item D: THBS1 e PLAT) bem como simultaneamente em SMD e SMD/LMA (item F: TFPI2 e PLAU).

3. Ensaio de Proteção da Ribonuclease (RPA)

Pelo ensaio de proteção da ribonuclease avaliamos um grupo de genes que consideramos importantes durante a hematopoese, mas que não constavam da lista de seqüências colocadas na nossa lamina e portanto seria impossível de serem avaliados por *cDNA microarray*. Estes genes são: Interleucina-3 (IL-3), IL-7, fator estimulador de monócitos e granulócitos (GM-CSF), G-CSF, M-CSF, IL-6, fator inibidor de leucemia (LIF), SCF, OSM e os genes constitutivos L32 e GAPDH.

Em nossos dados observamos que as células estromais de SMD apresentaram expressão em níveis variados de GM-CSF, G-CSF, LIF, IL-6 e CSF (figura 12) (tabela 17). Em todas as 3 SMD quando comparadas a CT observamos uma tendência de expressão reduzida para a IL-6, GM-CSF e G-CSF, sendo a única exceção a expressão de LIF para as células SMD3. Nas duas SMD/LMA observamos claramente alta expressão de LIF para as demais citocinas o não foi possível concluir o padrão de expressão dado a pequena casuística de SMD/LMA.

Tabela 17 - Perfil de Interleucinas e fatores de crescimento em células estromais

	Normal	SMD			SMD/LMA	
	CT1	SMD3	SMD5	SMD6	SMD/LMA1	SMD/LMA2
GM CSF	1	0,24	0,10	0,20	0,81	0,77
G CSF	1	0,76	0,15	0,36	1,00	1,49
LIF	1	5,84	0,24	2,68	2,54	11,11
IL6	1	0,93	0,09	0,21	1,03	4,84
SCF	1	0,67	0,33	0,67	1,33	4,00

Os valores obtidos correspondem a razão entre os valores de D.O. obtidos para cada transcrito avaliado corrigidos pelo respectivo valor de D.O. para GAPDH em cada amostra e os respectivos valores para a criança normal.

Figura 12: Ensaio de proteção da ribonuclease (RPA). Autorradiograma do gel de acrilamida do para avaliar a expressão dos seguintes transcritos: Interleucina-3 (IL-3), IL-7, fator estimulador de monócitos e granulócitos (GM-CSF), G-CSF, M-CSF, IL-6, fator inibidor de leucemia (LIF), SCF, OSM e os genes constitutivos L32 e GAPDH. Para (1) criança controle, (2-7) SMD (1-6) e 8/9 SMD/LMA (1 e 2).

DISCUSSÃO

A maior parte da literatura disponível sobre a fisiopatologia da SMD enfoca a doença em adultos com ênfase no clone hematopoético. Os mecanismos moleculares em SMD geralmente são associados a anomalias cromossômicas principalmente aquelas que afetam os cromossomos 5 e 7, no entanto, estas alterações são estimadas em cerca de 30 a 50% dos casos. Entre os mecanismos moleculares envolvidos podemos destacar a mutação em proto-oncogenes da família RAS (Horiike et al., 1994; Neubauer et al., 1994), perda de alelo ou mutações no gene supressor de tumor P53 (Fenaux et al. 1996) e repressão transcricional através do silenciamento de promotores para o gene supressor de tumor que codifica p15^{INK4b} (Quesnel et al., 1998). Entretanto, nenhuma destas alterações foram consideradas relevantes para a progressão da SMD. Em recente trabalho, Ueda et al., 2003 descreveram um conjunto de genes os quais poderiam ter a expressão reduzida associada a evolução da SMD. Estes genes incluem o PIASy (proteína inibidora do STAT1 ativado (transdutor de sinal e ativador da transcrição 1)), o qual apresentou-se como um forte candidato. Considerando o seu efeito supressor de tumor, PIASy foi sugerido pelos autores como um mediador para a progressão da SMD contribuindo possivelmente para o aumento do número de blastos.

A função do microambiente da medula óssea em SMD é controversa sugerindo o macrófago originado do clone hematopoético anormal como o principal responsável pela participação das células estromais na manutenção da SMD. No entanto, estudos mais recentes evidenciam o envolvimento de células de origem não-hematopoéticas na fisiopatologia da SMD (Flores-figueroa et al., 2002, Narendran et. al. 2004 e Borojevic et. al. 2004). Estes estudos caracterizam as células estromais de pacientes adultos (Flores-

figueroa) e de crianças (Narendran e Borojevic) com SMD, como sendo capazes de induzir a proliferação de células progenitoras hematopoéticas mantendo as em um fenótipo indiferenciado, sugerindo que este fenótipo seja o resultado principalmente da produção alterada de citocinas, tais como: interleucina-6 (IL-6) e fator inibidor de leucemia (LIF), de componentes de matriz extracelular em especial de proteoglicanas, colágeno e trombospondina, além de outras moléculas associadas a diferenciação de osteoblastos (osteonectina e faciclina) .

O nosso objetivo foi o de verificar o perfil molecular das células estromais de crianças com SMD e SMD/LMA relativos a crianças normais (CT) afim de sugerir possíveis genes-alvos que poderiam estar contribuindo no suporte/progressão na SMD.

Os resultados obtidos por *cDNA microarray* permitiram a elaboração de seis possíveis padrões de expressão de genes nas células estromais estudadas. Estes padrões de expressão gênica foram os seguintes: Genes que apresentaram aumento (**A**, tabela 7) ou redução (**B**, tabela 8) gradativo de expressão ao longo da evolução; Genes que apresentam aumento (**C**, tabela 9) ou redução (**D**, tabela 10) apenas na SMD/LMA; Genes que apresentam aumento (**E**, tabela 11) ou redução (**F**, tabela 12) na transformação para SMD sem diferença significativa a nível de expressão na SMD/LMA.

A maioria dos genes que apresentaram aumento de expressão gradativa (tabela 7) foram relacionados ao controle da proliferação e da apoptose, tais como os genes AZGP1, FBL1, IL6ST e CSE1L. O gene AZGP1 codifica a glicoproteína Zn α 2gp, a qual apresenta um sítio com atividade de ribonuclease, caracterizando-se por inibir a proliferação em

células epiteliais, as quais apresentam uma adesão a $\text{Zn}\alpha 2\text{gp}$ comparável à observada para fibronectina. Em nosso trabalho anterior (Borojevic et al., 2004) células estromais normais e mielodisplásicas apresentaram perfil similar dos *splicings* alternativos de fibronectina. No entanto, devido a quantidade limitada de amostras, as diferenças da expressão destes produtos não foram determinadas. Na literatura os receptores de fibronectina $\alpha 5\beta 1$ são descritos por não participar das interações entre células hematopóéticas provenientes de SMD de adultos e fibronectina (Timar et al. 1994). O produto da transcrição do gene *FBLN1*, a proteína fibulina 1 descrita em vários modelos (ex: mama) inibe a mobilidade celular pela modulação da sinalização via ERK (Twal et al., 2001) e pode contribuir para a proliferação mielóide (Weinstein et al. 1989) e de células progenitoras $\text{CD}34^+$ (Schofield et al., 1998) mediada por fibronectina. Portanto, questões endereçadas a possível relação entre o aumento de $\text{Zn}\alpha 2\text{gp}$ e fibulina-1 com alterações de proliferação, mobilidade e diferenciação de células progenitoras hematopóéticas provenientes de indivíduos com SMD e SMD/LMA precisam ser futuramente esclarecidas.

O gene *IL6ST* codifica um mediador de sinal para muitas citocinas incluindo IL-6 e LIF, ambos avaliados por nós utilizando a técnica de RPA em células estromais de uma criança normal, 3 crianças com SMD e duas com SMD/LMA. Nestes experimentos observamos níveis reduzidos de IL-6 e aumentados de LIF na maioria dos pacientes quando comparados com a criança normal. Estes resultados de expressão de citocinas estão de acordo com Narendran et al 2004 que avaliaram uma criança com SMD com mosaico para trissomia 8. Em adição, LIF foi descrito por promover proliferação ou apoptose dependendo da linhagem celular estudada e seu

estado de diferenciação (Kamohara et al., 1997; Viswanalhan et al., 2003). Esta capacidade de LIF pode ser importante na fisiopatologia da SMD, onde ambas situações são observadas nas células hematopoéticas.

O gene CSE1L (CAS) codifica uma proteína importante no transporte de importina α do núcleo para o citoplasma, relacionada ao ponto de checagem mitótico (Behrens et al., 2003). A importina α , ligada a importina β , participa da internalização nuclear de fatores de transcrição, oncogenes, genes supressores de tumor os quais controlam apoptose, proliferação e organização de microtubulos (Wellmann et al., 1997e Behrens et al., 2002). A hiper-expressão de CSE1L pode impedir o transporte para o núcleo celular de onco-proteínas, resultando em acumulação destas no citoplasma. De acordo com estes mecanismos verificamos que KPNA3 (importina $\alpha 4$) apresentou redução gradativa de expressão (tabela 8), enquanto que KPNA6 e XPO7 os quais codificam a importina $\alpha 7$ e um dos membros da super-família das importinas β respectivamente apresentaram-se reduzidos apenas em SMD/LMA (tabela 10) sugerindo uma alteração do transporte de fatores nucleares.

Os genes ITGB1 (integrina $\beta 1$), ARHE (RhoE) e PPP1R12A (MYPT1) apresentam redução gradativa de expressão ao longo da evolução da SMD para SMD/LMA (tabela 8) e estão envolvidos no mecanismo do controle de organização do citoesqueleto. A via de RhoGTPase (ex: RhoE) pode ser ativada por receptores de adesão (ex: integrinas como a $\beta 1$ (ITGB1)), sendo que em particular Rho E, abundante em fibroblastos, caracteriza-se por ser encontrada constitutivamente na forma ativa e competir com RhoA na ligação a uma das Rho quinases (ex: ROCKI). As Rho quinases são responsáveis pela inativação de miosina fosfatases (Kimura et al., 1996), tais como a

MYPT1 codificada pelo gene PPP1R12A. Esta cascata de eventos resulta no controle na organização das fibras de actina (Riento et al., 2003) e conseqüentemente do citoesqueleto. Esta possível reorganização do citoesqueleto em células estromais de crianças com SMD e SMD/LMA poderia ser acompanhada de alterações morfológicas e em funções celular tais como: exo-ou endo-citose (Allan & Schroer, 1999), adesão, migração e ciclo celular. Dentre os genes associados ao citoesqueleto verificamos que alguns se apresentaram simultaneamente com expressão reduzida em SMD e SMD/LMA (tabela 12) tais como ACTR3, DES (desmina) e GSN (gelsolina). ACTR3 e GSN codificam proteínas que se ligam aos filamentos de actina afetando o controle da morfologia e mobilidade celular. Em adição a expressão reduzida de GSN a qual apresenta função de supressor de tumor, está de acordo com a possível transformação das células estromais provenientes de crianças com SMD e SMD/LMA. A desmina por sua vez é um filamento intermediário que compõe o citoesqueleto sendo específica de músculo liso. A expressão diminuída de genes como DES (desmina) sugere possíveis alterações na potencial plasticidade das células estromais de SMD e SMD/LMA.

Outros genes associados ao citoesqueleto que apresentaram redução de expressão apenas em SMD/LMA (tabela 10) sugerem possíveis alterações na organização das fibras de actina nas células estromais destes pacientes, as quais poderiam capacitar estas células a suportar um número aumentado de blastos. Os genes que apresentaram este padrão de expressão foram: MYLK, o qual codifica uma proteína que fosforila a miosina facilitando sua interação com actina, ACTN4 (cadeia $\alpha 4$ da actina) e proteínas ligantes de actina, tais como: FBLP-1, CATSZ e COTL1

modulando várias das funções celulares mediadas pela participação do citoesqueleto.

A redução da expressão de genes associados ao citoesqueleto pode sugerir alterações funcionais como o tráfico pela membrana citoplasmática de íons e pequenas moléculas. Observamos que genes codificando proteínas relacionadas a transporte de íons de potássio (KCNK2) e sódio (SCNN1A), apresentaram aumento de expressão em células estromais de ambos grupos de pacientes SMD e SMD/LMA (tabela 11), enquanto que outros genes relacionados ao transporte de elementos de pequeno peso molecular tais como a conexina 43 (GJA1) e de íons potássio (KCNJ15) apresentaram expressão aumentada somente em SMD/LMA (tabela 9). Todos estes genes foram descritos por serem relacionados com a integridade de microtubulos (Martin et al., 2004, Gómez et al., 2004), os quais são fundamentais na geração de fusos mitóticos. Em adição, o gene KCNJ15, o qual codifica um canal de potássio, localiza-se em uma região do cromossomo 21 crítica por contribuir para as muitas características fenotípicas da trissomia do cromossomo 21 conhecida como Síndrome de Down (Gosset et al., 1997). A detecção de genes como o KCNJ15 já era esperada considerando-se que uma das quatro crianças com SMD e todas com SMD/LMA (n=2) apresentaram a trissomia 21. O gene KCNJ15 merece futuros estudos funcionais afim de definir sua participação no desenvolvimento de malignidades hematopoéticas que afetam esta população de crianças.

Entre os genes avaliados não observamos expressão diferencial de tubulina, o principal componente dos microtubulos, mas observamos genes que codificam proteínas associadas a estes, tais como: MAP1B, MAPRE2 e

TPX2. MAP1B foi descrita como importante na rápida polimerização dos filamentos de tubulina e participando da morfogênese do sistema nervoso (Noiges et al., 2002) a redução da expressão deste gene em SMD/LMA (tabela 10) permanece por ser esclarecida, bem como o aumento de expressão tanto em SMD como em SMD/LMA (tabela 11) de outros genes: MAPRE2 (EB1) e TPX2 . O gene MAPRE2 codifica um membro da família de EB1 (homologo ao APC) o qual apresenta um importante papel na dinâmica dos microtubulos direcionando-os na formação de fusos mitóticos. O produto da transcrição do gene TPX2 foi descrito como sendo importante durante a mitose na manutenção da atividade da proteína codificada pelo gene AURORA A, o qual freqüentemente é super-expresso durante a carcinogênese (Meraldi et al., 2004). Embora as quinases dependentes de ciclinas mitóticas preparem o ambiente nuclear da célula para a mitose, o controle tempo/espaço do processo parece requerer mais da atividade de proteína quinases como aquelas da família AURORA (Glover et al., 2003). Dois importantes membros desta família são: AURORA A a qual se caracteriza por participar das primeiras etapas da mitose tendo a função de organizar o microtubulo para a formação dos fusos mitóticos e AURORA B que participa da fase final da mitose regulando a condensação cromossômica e a sua polarização (Meraldi et al., 2004). Interessantemente, o gene *survivin* que ativa AURORA B de maneira similar a AURORA A ativada por TPX2 foi descrito como aumentado no clone hematopoético de pacientes adultos com SMD, tanto aqueles classificados como AR (anemia refratária) como aqueles com AREB (anemia refratária com excesso de blastos) sugerindo a *survivin* como um possível marcador (Badran et al., 2003). Outros genes que interagem ativando ou servindo como substrato

para as enzima AURORA A não foram detectadas entre os genes diferencialmente expressos observados, mas entre os vários substratos para AURORA B observamos a desmina, produto do gene DES que apresentou expressão reduzida tanto em SMD como em SMD/LMA (tabela 12). Estas alterações na expressão de TPX2 e DES em SMD e SMD/LMA podem contribuir para a desregulação do controle do ponto de checagem na mitose entre a metáfase e anáfase. Embora, a expressão diferencial de genes que codificaram ciclinas ou quinases dependentes de ciclinas (CDKs do inglês *cyclin-dependent kinases*) importantes neste ponto de checagem mitótico não fosse observada, genes associados a estas CDKs, tais como PRC1 e MCM2, foram detectados com expressão aumentada em SMD e SMD/LMA (tabela 11). O produto da transcrição do gene PRC1 tem sido descrito como substrato de CDKs participando da citocinese celular (Jiang et al., 1998) e controle da hematopoese (Galen et al., 2004), enquanto MCM2 codifica uma proteína que apresenta aumento de expressão gradativo ao longo da transição da fase S para G2/M participando do controle das CDKs. Este gene foi descrito por apresentar expressão aumentada em estágios iniciais de vários tipos de câncer (Blow et al., 2002). Variações no controle do ponto de checagem foram descritas por afetar a regulação de dois eventos chave: a proliferação e a longevidade celular (Beardmore et al., 2004).

Além dos genes relacionados à atividade da família AURORA e CDKs, observamos o aumento da expressão em SMD e SMD/LMA (tabela 11) do gene TOP2A que codifica a DNA topoisomerase II α envolvida na condensação e segregação de cromossomos, sendo um importante fator do controle do ponto de checagem mitótico (Martin-Subero et al., 2001; Meraldi et al., 2004). Na literatura existem vários trabalhos (45 artigos completos em

revistas indexadas) que enfocam a expressão aumentada de TOP2A em células progenitoras hematopoéticas provenientes de crianças (Mauritzson et al., 2002) e principalmente de adultos com SMD, todos estes trabalhos associam as alterações observadas na expressão ou atividade da DNA topoisomerase II α com anomalias cromossômicas. No ser humano o TOP2A localiza-se no 17q21-q22, a amplificação desta região resultaria no aumento da expressão deste gene mas apenas uma das crianças apresentou alterações no cromossomo 17 (53, XYY, +5, +13, +17, +19, +21 [15]), o que não permite atribuir a expressão observada neste gene a este tipo de anomalia cromossômica. Em adição, na literatura não existe nenhuma referencia associando a expressão da TOP2A com a trissomia do 21, uma vez que uma das quatro crianças com SMD e todas as duas com SMD/LMA apresentaram a trissomia 21. O aumento da expressão de TOP2 pode contribuir para a redução da suscetibilidade das células estromais de indivíduos com SMD e SMD/LMA à apoptose. A figura 13 esquematiza a interação entre alguns dos genes citados e processos celulares descritos até o momento.

Genes relacionados à apoptose emergiram em nossa análise. Observamos genes com expressão gradativamente aumentada, tais como: CSE1L e IL6ST os quais anteriormente já foram comentados (tabela 7). Outros genes relacionados a apoptose observados em nossas comparações apresentaram simultaneamente expressão reduzida em SMD e SMD/LMA (tabela 12): BID, GSN, IL1B, NFKBIA, PAWR e SRP72 ou expressão reduzida apenas em SMD/LMA: PRG1, TADA3L, THBS1, TNDAIP3. Entre estes genes podemos destacar: BID, GSN, THBS1, IL1B, NFKBIA e TNDAIP3. Os produtos da transcrição dos genes BID, GSN e THBS1 foram descritos por participarem da

via de apoptose mediada por fas (Okada et al., 2004). Em particular o gene BID na rota clássica de apoptose participa da liberação do citocromo c pela mitocôndria levando a ativação de uma série de proteases cuja ação culmina na destruição de estruturas celulares. Em adição à redução de expressão de BID, foi observada também a variação de expressão de algumas proteínas ribossômicas mitocôndriais (MRPL44 (A), MRPSL28 (E) e MRPSL27(F)). A alteração da composição destas proteínas ribossômicas pode ser importante no funcionamento deficiente das mitocôndrias já descrita em pacientes com SMD, à qual se atribui principalmente a apoptose e alterações observadas na eritropoese (Van Lowsdrecht et al., 2001) nos estágios iniciais da doença.

Figura 13: Relação entre processos celulares e padrão de expressão de genes. Genes que aumentam (A) ou diminuem (B) gradativamente de expressão, genes que são aumentados (C) ou diminuídos (D) apenas em SMD/LMA e genes que aumentam (E) ou diminuem em SMD mantendo este nível de expressão em SMD/LMA. Genes que correspondem a padrão de expressão aumentado (A,C e E) indicados em vermelho e genes que correspondam a padrão de expressão reduzido (B, D e F) indicados em verde.

Os genes IL1B, NFKBIA e TNDAIP3 relacionados a vias pelas quais Interleucina 1 (IL1) e o fator de necrose tumoral (TNF) α interagem com a via do fas afetando a atividade de proteínas chamadas caspases, embora não tivéssemos observado quaisquer variações significativas do padrão de expressão dos genes que codificam caspases durante a evolução da SMD. A literatura existente descreve que em adultos a apoptose mediada via o receptor de morte celular, fas, e seus ligantes é importante na manutenção da hematopoiese defectiva contribuindo para o mecanismo patogênico da SMD (Tehranchi et al., 2003). Raza et al 1996 e 1998 descreveram a apoptose em células provenientes de medula óssea de indivíduos adultos com SMD e observaram que células estromais não apresentavam apoptose. Embora a expressão de genes relacionados a apoptose esteja reduzida em células estromais provenientes de crianças com SMD e SMD/LMA não temos no presente momento indicações experimentais que nesta patologia ocorra apoptose em células estromais. A participação dos genes associados a apoptose está esquematizada na figura 14.

Figura 14: Relação entre apoptose e padrão de expressão de genes. Genes que aumentam (A) ou diminuem (B) gradativamente de expressão, genes que são aumentados (C) ou diminuídos (D) apenas em SMD/LMA e genes que aumentam (E) ou diminuem simultaneamente em SMD e SMD/LMA em relação ao controle.

Em nosso trabalho anterior (Borojevic et al., 2004) comparamos a taxa de proliferação de células estromais provenientes de indivíduos controle (doadores de medula óssea com idades inferiores a 16 anos) e crianças com SMD e observamos uma tendência de aumento de proliferação em células estromais provenientes de crianças com SMD quando comparadas com indivíduos controle. Em nossos experimentos de *cDNA microarray* um dos genes que apresentou alta expressão tanto em SMD como em SMD/LMA foi o inositol 1,4,5 trifosfato quinase C o qual cataliza a fosforilação do inositol – 3-fostato potencialmente envolvido em vias de sinalização de proliferação. Observamos a redução de expressão apenas em SMD/LMA (tabela 10) do gene CDKN2D, o qual codifica o inibidor de CDK4 (fase G1 do ciclo celular) conhecido como p19^{INK4D} podendo indicar uma redução do seu papel de supressor de tumor em SMD/LMA. Em paralelo, a hipermetilação de genes que codificam outros membros da família de INK4: p16^{INK4A} e P15^{INK4B} foram descritos por serem associados ao escape de células leucêmicas aos sinais inibitórios proveniente do microambiente medular (Quesnel et al., 1998) em células hematopoéticas de SMD de adultos contribuindo para a evolução da SMD/LMA. O gene MCM2 já comentado anteriormente e o gene CDK2AP1 apresentaram aumento de expressão tanto em células estromais provenientes de crianças com SMD quanto com SMD/LMA (tabela 11). O produto deste gene é uma proteína que se associa especificamente a CDK2

podendo apresentar papel na inibição do crescimento celular em queratinócitos (Hu et al., 2004).

Vários processos celulares como a proliferação celular podem ser orquestrados pela ação de fatores transcricionais. O gene GATA4, apresentando expressão gradativamente aumentada ao longo da evolução da SMD (tabela 7), codifica um membro da família GATA que interage com a região promotora de vários genes relacionados à embriogenese e a diferenciação do miocárdio (Pikkarainen et al, 2004). Da família GATA, somente o gene GATA1 foi descrito por ser aumentado em células derivadas do clone hematopoético transformado e relacionado a distúrbios transitórios da mielopoese em recém-nascidos com síndrome de Down (Groet et al., 2003).

Os Genes NFIL3, MYC, NFBYB e ZFP36L1 apresentaram-se reduzidos tanto em SMD como em SMD/LMA (tabela 12). O gene NFIL3 foi descrito por controlar a regulação da expressão da IL-3 em linfócitos, sendo importante na sinalização da via não-apoptótica nestas células (Ikushima et al., 1997). O produto dos genes ZFP36L1 e NFBYB foram descritos por reconhecerem regiões promotoras de uma variedade de genes. Dentre estes genes podemos destacar o MYC que codifica uma proteína responsável pela transativação de citocinas (GM-CSF) em fibroblastos do microambiente hematopoético *in vitro*. De acordo, com nossos resultados de RPA observamos redução de expressão de GM-CSF (5X) em todas as SMD e uma pequena redução da expressão em SMD/LMA. Dentre os genes que apresentam função de fatores transcricionais com expressão aumentada somente em SMD/LMA (tabela 9) podemos destacar NAB1 e SOX9. O gene NAB1 inibe a expressão de EGR1 o qual está relacionado a proliferação e

diferenciação de células hematopoéticas em resposta a estímulos externos, no caso de células de origem não-hematopoética a família de EGRs foram descritas como associadas com a expressão de FasL e TNF (Droin et al., 2003). O gene SOX9 foi descrito inicialmente por controlar a região promotora do gene que codifica a cadeia $\alpha 1$ do colágeno 2 (Bell et al., 1997) e mais tarde por regular a expressão de N-caderina (Panda et al., 2001) descrita como sendo importante na retenção de células progenitoras hematopoéticas primordiais no microambiente medular (Puch et al., 2001). Em nossa presente análise não observamos alterações na expressão gênica de COL2A1, mas observamos uma redução apenas em pacientes com SMD/LMA (tabela 10) de genes associados ao processamento de colágeno, tais como LOXL2, P4HB e PLOD. Dentre estes genes podemos destacar o gene LOXL2 que codifica a enzima 2 similar a lisil oxidase que cataliza a ligação entre colágeno e elastina e o gene PLOD o qual catalisa a hidroxilação de resíduos lisina na sequência X-lys-gly aumentando a estabilidade das ligações entre as fibras de colágeno e elastina. Outro gene desta família, PLOD2, que codifica uma das isoformas de PLOD foi observado como reduzido em ambas as células estromais provenientes de SMD e SMD/LMA (tabela 12). Alterações nas interligações entre as moléculas de colágeno e elastina são relacionados ao acúmulo de colágenos em tecidos com fibrose (van der Slot et al., 2003). Interessantemente, a fibrose na medula óssea de pacientes com SMD (adultos) está associada a pior prognóstico e anomalias associadas a eritropoese e principalmente a megacariopoese (Thiele et al., 2004). Outro gene associado com megacariócitos que apresentou redução de expressão em SMD/LMA (tabela 10) foi THBS1, a qual já havia sido mencionado como participando da via de

apoptose pelo Fas, a proteína codificada por este gene foi descrita por participar na agregação de megacariócitos independente de seu estágio de diferenciação (Voit et al., 2003) e da megacariopoese. Em geral, o aumento de THBS1 induz a expressão de PLAU o qual em nossa análise foi reduzido tanto em SMD como em SMD/LMA (tabela 12). A proteína codificada por este gene sofre inibição da atividade pela proteína codificada pelo gene SERPINB2 o qual apresentou em nossa análise expressão gradativamente reduzida ao longo da evolução da SMD para SMD/LMA (tabela 8). Os genes PLAU e SERPINB2, e o gene PLAT reduzido apenas em SMD/LMA (tabela 10) são associados a via de coagulação a qual apresenta anomalias em SMD de adultos como a hiper-expressão de alguns marcadores de coagulação (ex. complexos trombina-antitrombina, fragmentos de protrombina 1+2 e dímeros D (Chojnowski et al., 2002). Entretanto estas ultimas alterações foram comumente atribuídas a trombocitopenia (Mittelman et al., 2000) sugerindo estarem associadas a características do microambiente em SMD e SMD/LMA e sua participação na falha da megacariopoese.

O gene PRG1 classicamente expresso por células do clone hematopoético foi observado em nossa análises com expressão reduzida somente em células estromais de SMD/LMA (tabela 10) e codifica a proteoglicana serglicina, a qual se liga a outras proteínas tais como citocinas e outros componentes da matriz extracelular, por exemplo, fibronectina e colágenos. Em contraste, o gene LUM que apresentou aumento em SMD/LMA (tabela 9) codifica outra proteoglicana (lumican) descrita como o principal componente da matriz extracelular na córnea, sendo um marcador da transição epitélio-mesênquima mediada pela sinalização de Smad3 via

TGF β (Saika et al., 2004). Em adiço, o decrscimo de lumican em embries de camundongos foi descrito por inibir a apoptose via fas (Vij et al., 2004).

Em concluso , a anlise dos resultados de *cDNA microarray* indicaram que clulas estromais provenientes de medula ssea de crianas normais, com SMD e SMD/LMA apresentam genes com padres de expresso alterados ao longo da transformao. As alteraes de perfil, incluem genes que codificam molculas tais como receptores de adeso que podem ser mediadores para vias das GTPases, envolvidas em vrios processos celulares. Variaes de genes associados a molculas do citoesqueleto poderiam alterar a sua organizao podendo influenciar o trafico pela membrana citoplasmtica, o que pode afetar a integridade de microtubulos, resultando em um possvel descontrole do ponto de checagem mittico. Estas alteraes podero afetar a ao de fatores transcrionais, a proliferao e a apoptose da clula estromal ao longo da transformao da SMD (figura 14). Em nossos resultados a maior parte dos genes que apresentam padres estabelecidos de expresso e so associados entre si, apresentaram uma reduo de expresso. Um exemplo claro foi dos genes relacionados apoptose que se apresentaram com padres de expresso diminudos, permitindo sugerir uma evaso destas clulas estromais do programa de morte celular pela via do fas. A importncia desta via e se estas alteraes no microambiente afetariam a hematopoese em SMD sero objetivos de estudos futuros. Em adio, genes com funo desconhecida como o C6orf69 que apresentam expresso gradativamente reduzida durante a evoluo para SMD/LMA podem ser alvos de estudos futuros que podero sugerir uma possvel importncia da perda deste gene no desenvolvimento da SMD na infncia.

Outros genes descritos também em células hematopoéticas de indivíduos com SMD adultos ou crianças (ex. TOP2A) foram observados como alterados em células estromais, tanto em SMD como em SMD/LMA, sugerindo que possa existir um certo paralelismo de alterações nos dois clones (hematopoético e estromal) durante o processo de estabelecimento da patologia.

Entre os genes diferencialmente expressos em células estromais de SMD/LMA podemos considerar principalmente genes associados a megacariopoese, em especial os relacionados ao processamento de colágeno que poderia resultar em acúmulo deste componente em um microambiente que apresenta ainda alteração de proteases e proteoglicanas.

Os genes diferencialmente expressos por *cDNA microarray* devem ser considerados como possíveis candidatos em estudos futuros utilizando métodos de transfecção ou de RNAi (RNA de interferência) para entender a contribuição das alterações observadas durante a evolução da SMD (ex: generalizada redução da expressão de genes associados a apoptose) em células estromais na fisiopatologia das SMD na infância.

CONCLUSÃO

1. Culturas primárias de células estromais caracterizadas como miofibroblastos isentas de macrófagos ou qualquer outra célula proveniente do clone hematopoético transformado, obtidas a partir de medula óssea coletada de crianças com SMD ou SMD/LMA apresentam uma assinatura genética diferente daquela observada em culturas de células estromais de crianças normais;
2. Dentre os genes diferencialmente expressos a partir da comparação entre os grupos de células estromais de crianças normais, SMD e SMD/LMA foi possível determinar seis grupos de genes com padrões específicos de expressão ao longo da transformação e evolução para SMD/LMA. Genes associados com padrões de expressão reduzido constituem um número maior de genes (n=153) em comparação daqueles que apresentam padrão de expressão aumentado (n=92);
3. A análise dos genes acima permitiu verificar em células estromais de SMD e SMD/LMA a variação da expressão de genes associados a GTPases, organização de microtubulos, componentes da matriz extracelular, simultaneamente ao aumento dos níveis de expressão de genes associados ao tráfico pela membrana citoplasmática e de controle da formação de fusos mitóticos, todos importantes em vários processos celulares como proliferação, apoptose e ação de fatores transcricionais;
4. Ao longo da transformação importantes genes associados a apoptose pelas vias de IL1, TNF e do Fas foram observados como tendo a

expressão reduzida em células estromais de crianças com SMD e SMD/LMA;

5. As células estromais de crianças com SMD/LMA apresentaram principalmente variação de expressão de genes associados a megacariopoese e proteoglicanas.

ANEXOS

Anexo 1

Desenho experimental da primeira série de experimentos para determinar a expressão diferencial de genes em células estromais de crianças com SMD.

Anexo 2

Genes hiper-expressos exclusivamente em células estromais de indivíduos adultos saudáveis quando comparada com uma criança normal

	Anotação	Símbolo
1	DKFZp564O1763 (from clone DKFZp564O1763)	DKFZp564O1763
2	GRB2-associated binding protein 1	GAB1
3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1 (ABCD1)	ABCD1
4	COP9 subunit 6 (MOV34 homolog, 34 kD)	MOV34-34KD
5	myeloid leukemia factor 2 (MLF2)	MLF2
6	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system)	SLC7A9
7	lysosomal-associated membrane protein 3	LAMB3
8	hypothetical protein FLJ21868 (FLJ21868)	FLJ21868
9	ribosomal protein L13	RPL13
10	nuclear dual-specificity phosphatase	SBF1
11	Snf2-related CBP activator protein	SRCAP
12	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate-5-dioxygenase (Lysine hydroxylase)-2	PLOD2
13	collagen type XII alfa1	COL12A1
14	KIAA1109 protein	KIAA1109
15	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform lb, alpha subunit (45kD)	PAFAH1B
16	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 1 (7kD, MNLL)	NDUFB1
17	coatomer protein complex, subunit alpha	COPA
18	cDNA FLJ12727, clone NT2RP2000027	FLJ12727
19	protein kinase C, mu	PRKCM
20	KIAA0461 protein	KIAA0461
21	chromosome 11open reading frame	C11orf9
22	BCL2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3	BNIP3
23	ribophorin II (RPN2)	RPN2
24	lamin B receptor	LBR
25	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	ME1
26	phorbolin-like protein MDS019	MDS019
27	KIAA0618 gene product	KIAA0618
28	cDNA FLJ14014 fis, clone HEMBA1000290	FLJ14014
29	actin binding LIM protein 1 (ABLIM)	ABLIM
	collagen, type VI, alpha 2	COL6A2
30	diphtheria toxin resistance protein required for diphthamide biosynthesis (Saccharomyces)-like 1	DPH2L1
31	GAP-like protein	LOC51306

32	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	EFEMP1
33	FLJ23067 protein	FLJ23067
34	nuclear factor of activated T-cells	NFAT5
35	Rho GTPase activating protein	ARHGAP5
36	HSPC025	HSPC025
37	catenin (cadherin-associated protein), beta 1 (88kD)	CTNNB1
38	crystallin, alpha B	CRYAB
39	hypothetical protein FLJ20686	FLJ20686
40	adrenergic, beta, receptor kinase 2	ADRBK2
41	heat shock transcription factor 4	HSF4
42	cDNA FLJ12046 fis, clone HEMBB1001962	FLJ12046
43	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)	PTPN22
44	ribosomal protein S2	RPS2
45	HSPC162 protein	HSPC162
46	zinc finger protein 193	ZNF193
47	interferon regulatory factor 2	IRF2
48	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4	GOLGA4
49	integrin beta 1 binding protein (melusin) 2	ITGB1BP2
50	glucose regulated protein, 58kD	GRP58
51	glyoxalase I	GLO1
52	peptidyl-prolyl isomerase G	PPIG
53	laminin, beta 3 (nicein (125kD), kalinin (140kD), BM600 (125kD))	LAMB3
54	cathepsin B	CTSB
55	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	PSME2
56	hypothetical protein MGC14832	MGC14832
57	hypothetical protein MGC861	MG861
58	insulin-like growth factor-binding protein	IGFBP4
59	myosin 5C	MYO5C
60	coatamer protein complex, subunit	COPB
61	major histocompatibility complex, class I,	HLA-A
62	peroxiredoxin 5	PRDX5
63	KIAA0430 gene product	KIAA0430
64	growth arrest-specific 7 (GAS7)	GAS7
65	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	APLP2
66	hypothetical protein FLJ11240	FLJ11240

Anexo 3

Genes hiper-expressos em células estromais de crianças com SMD e normais adultos quando comparado a uma criança normal

	Anotação	Símbolo
1	zinc finger protein 183 (RING finger, C3HC4 type),	ZNF183
2	ribosomal protein S9	RPS9
3	collagen, type I, alpha 2	COL1A2
4	keratin 19	KRT19
5	nidogen 2	NID2
6	collagen, type I, alpha 2	COL1A2
7	cDNA FLJ10273 fis, clone HEMBB1001137, highly similar to Homo sapiens mRNA for putative phospholipase	FLJ10273
8	Homo sapiens U5 snRNP-specific protein (220 kD), ortholog of S. cerevisiae Prp8p (PRP8)	PRP8
9	mRNA for pentaxin (PTX3)	PTX3
10	zinc finger protein 175	ZNF 175
11	CDC37 (cell division cycle 37, S. cerevisiae, homolog)	CDC37
12	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump) membrane sector associated protein M8-9	APT6M8-9
13	cleft lip and palate associated transmembrane protein 1	CLPTM1
14	lactotransferrin	LTF
15	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC
16	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	EEF1A1
17	SH3-domain binding protein 1	SH3BP1
18	protein kinase C substrate 80K	PRKCSH
19	Cip1-interacting zinc finger protein	CIZ1
20	dual specificity phosphatase 5	DUSP5
21	LIM domain kinase 1 (LIMK1), transcript variant 1	LIMK1
22	insulin-like growth factor-binding protein 4	IGFBP4
23	sprouty (Drosophila) homolog 4	SPRY4
24	tubulin-specific chaperone d	TBCD
25	pre-mRNA splicing factor similar to S. cerevisiae Prp16	PRP16
26	tubulin, alpha, ubiquitous	K-ALPHA-1
27	5'-nucleotidase (purine), cytosolic type B	NT5B
28	thrombopoietin 1	THBS1
29	testis enhanced gene transcript	TEGT
30	cDNA FLJ14324 fis, clone PLACE4000100, highly similar to Homo sapiens hydroxypyruvate	GRHPR
31	serine protease inhibitor, Kunitz type 1	SPINT1
32	osteoblast specific factor 2 (fasciclin-I)	OSF-2
33	upregulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3 (VDUP1)	VDUP1

34	poly(A)-binding protein, cytoplasmic 1	PABPC1
35	cDNA DKFZp564H2023 (from clone DKFZp564H2023)	DKFZp564H2023
36	nuclear RNA export factor 1	NXF1

Anexo 4

Desenho experimental da segunda série de experimentos para determinar a expressão diferencial de genes em células estromais de crianças com SMD.

Anexo 5

Imagem representativa da lamina 4.8K002 de *cDNA array*, composta de 4 colunas e 12 linhas, onde esta circundada uma região composta por 10 colunas por 10 linhas, no total há 5616 seqüências. Após a hibridização a imagem captada foi avaliada utilizando o programa GeneQuant: em vermelho esta representado a amostra de interesse marcada com Cy3, em verde a amostra referência marcada com Cy5, finalmente a lamina composta resultante da sobreposição das duas intensidades de fluorescência.

Anexo 6

I

II

Representa os gráficos de dispersão (A e B) expressos como o $\log_2$ dos valores de intensidade de fluorescência para cada fluorocromo, sendo eliminados aqueles elementos da lamina cujo sinal foi similar ao observado nos controles negativos. Assim, de forma representativa podemos verificar em I-A e I-B, um pequeno número de pontos eliminados (cinza), o que pode ser confirmado nas figuras I-C e I-D, onde somente os pontos referentes ao controle negativo estão em destaque. Em Contraste, apresentamos os mesmos gráficos para uma amostra (II) que seria excluída da análise.

Anexo 7

Genes diferencialmente expressos em células estromais de crianças com SMD quando comparado com crianças normais

Anotação	Símbolo	Genelid	ClusterId	Razão
ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), Class I, type 8A, member 1	ATP8A1	BE145691	Hs.291385	1,71
2 GATA binding protein 4	GATA4	NM_002052	Hs.243987	1,71
adrenergic, beta-1-, 3 receptor	ADRB1	J03019	Hs.99913	1,72
flavoprotein 4 oxidoreductase MICAL2	MICAL2	BF369033	Hs.309674	1,72
5 HSPC135 protein	HSPC135	BF768476	Hs.127496	1,72
6 HSPC166 protein	HSPC166	BF829152	Hs.279836	1,72
glucuronyl C5- 7 epimerase	GLCE	BE170776	Hs.183006	1,72
DKFZP434P1750 8 protein	DKFZP434P1750	AW889003	Hs.136581	1,73
tetratricopeptide repeat 9 domain 1	TTC1	AW748763	Hs.7733	1,74
similar to RNA polymerase B 1 transcription factor 3	MGC23908	BG946015	Hs.429839	1,74
helicase with zinc finger 1 domain	HELZ	BE828156	Hs.99437	1,75
1: KIAA0073 protein	KIAA0073	BE694447	Hs.1191	1,75
1: formin binding protein 1 alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi 1 polypeptide	FNBP1 ADH5	BE840939 BQ371339	Hs.440808 Hs.78989	1,76 1,76
1: CGI-85 protein eukaryotic translation initiation factor 4E 1 binding protein 2	CGI-85 EIF4EBP2	AW805726 AK057643	Hs.442630 Hs.278712	1,76 1,77
1 spinster-like	SPINL	BI011327	Hs.379091	1,77

1: KIAA0638 protein	KIAA0638	BQ304239	Hs.149653	1,78
ARP1 actin-related protein 1 homolog A,				
1: centractin alpha (yeast)	ACTR1A	BG996718	Hs.153961	1,78
transforming growth				
2: factor, beta 2	TGFB2	BE167718	Hs.169300	1,79
splicing factor				
proline/glutamine rich				
(polypyrimidine tract				
binding protein				
2 associated)	SFPQ	BF819565	Hs.180610	1,79
hypothetical protein				
2: MGC3047	MGC3047	BG995089	Hs.470704	1,79
sperm associated				
2: antigen 9	SPAG9	AK023512	Hs.500367	1,80
2: KIAA1416 protein	KIAA1416	BE818371	Hs.397426	1,81
2: fructosamine-3-kinase	FN3K	BE159100	Hs.151135	1,82
secretory leukocyte				
protease inhibitor				
2: (antileukoproteinase)	SLPI	BE184402	Hs.251754	1,82
myosin, heavy				
polypeptide 10, non-				
2: muscle	MYH10	BF924195	Hs.280311	1,83
hypothetical protein				
2: BC010682	LOC90550	BE931770	Hs.4896	1,83
2: netrin 4	NTN4	BF822399	Hs.102541	1,83
chondroitin sulfate				
proteoglycan 2				
3: (versican)	CSPG2	BE933719	Hs.434488	1,83
3: thioredoxin reductase 3	TXNRD3	BF819586	Hs.20030	1,83
Kruppel-like factor 5				
3: (intestinal)	KLF5	AW997477	Hs.84728	1,83
centrosome-associated				
3: protein 350	CAP350	BG009597	Hs.413045	1,83
3: flotillin 2	FLOT2	AW375362	Hs.18799	1,84
3: fibulin 1	FBLN1	AF217999	Hs.445240	1,84
cat eye syndrome				
chromosome region,				
3: candidate 2	CECR2	AB051527	Hs.116885	1,84
branched chain				
aminotransferase 1,				
3: cytosolic	BCAT1	BG006669	Hs.438993	1,84

interleukin 6 signal transducer (gp130, 3: oncostatin M receptor)	IL6ST	AB015706	Hs.71968	1,87
fatty-acid-Coenzyme A 3: ligase, long-chain 3	FACL3	BF336317	Hs.268012	1,88
hypothetical protein 4: MGC2865	MGC2865	BF856397	Hs.242889	1,88
topoisomerase (DNA) II 4: alpha 170kDa	TOP2A	AW391543	Hs.156346	1,90
BRAF35/HDAC2 4: complex (80 kDa)	BHC80	BI042281	Hs.104888	1,90
4: lysyl oxidase-like 3	LOXL3	AW380911	Hs.334702	1,91
heterogeneous nuclear 4: ribonucleoprotein A2/B1	HNRPA2B1	AW992255	Hs.232400	1,92
LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. 4: cerevisiae)	LSM4	AJ238096	Hs.76719	1,92
Rho GDP dissociation 4: inhibitor (GDI) alpha	ARHGDIA	BC024258	Hs.159161	1,92
Homo sapiens cDNA FLJ13267 fis, clone 4: OVARC1000964.		AK023329	Hs.57079	1,92
potassium channel tetramerisation domain 4: containing 2	KCTD2	AW799250	Hs.4935	1,92
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4: 17	ARHGEF17	BF821347	Hs.45180	1,93
5: kallikrein 2, prostatic signal sequence	KLK2	BE827763	Hs.181350	1,94
receptor, beta (translocon-associated 5: protein beta)	SSR2	BF360273	Hs.74564	1,94
hypothetical protein 5: FLJ12875	FLJ12875	BF853420	Hs.10101	1,95
G protein-coupled receptor kinase- 5: interactor 1	GIT1	BC005031	Hs.369441	1,96
likely ortholog of mouse membrane bound C2 domain containing 5: protein	MBC2	AB018290	Hs.8309	1,98
Huntingtin interacting 5: protein C	HYPIC	BF747873	Hs.33104	2,00
MCM2 minichromosome 5: maintenance deficient	MCM2	BQ300376	Hs.57101	2,00

2, mitotin (<i>S. cerevisiae</i>)				
5: KIAA1055 protein	KIAA1055	AL109773	Hs.438702	2,02
potassium channel, 5: subfamily K, member 2	KCNK2	BE819344	Hs.202696	2,05
5: PRO0659 protein	PRO0659	BF770608	Hs.6451	2,07
UBX domain containing 6: 1	UBXD1	AW793772	Hs.435255	2,09
6- pyruvoyltetrahydropterin 6 synthase	PTS	AW373992	Hs.415877	2,11
6: agrin	AGRN	BC007649	Hs.273330	2,12
hypothetical protein 6: FLJ10074	FLJ10074	AW814453	Hs.71573	2,14
kynurenine 3- monooxygenase (kynurenine 3- 6: hydroxylase)	KMO	BE935505	Hs.409081	2,17
chromosome 14 open 6: reading frame 120	C14orf120	AW878300	Hs.9043	2,17
cell division cycle 6: associated 8	CDCA8	BG958887	Hs.48855	2,19
6: sphingosine kinase 1	SPHK1	AJ245504	Hs.68061	2,20
6: KIAA0870 protein	KIAA0870	AL110264	Hs.18166	2,21
UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, 6: polypeptide 5	B4GALT5	BQ334593	Hs.107526	2,22
MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (<i>S.</i> 7: <i>cerevisiae</i>)	MRE11A	BF084768	Hs.20555	2,26
7: PRO1073 protein	PRO1073	BE818267	Hs.187199	2,27
sparc/osteonectin, cwc and kazal-like domains 7: proteoglycan (testican)	SPOCK	BE767012	Hs.93029	2,27
hypothetical protein 7: LOC201562	LOC201562	BF327496	Hs.5957	2,30
inositol 1,4,5- trisphosphate 3-kinase 7: C	ITPKC	BC026903	Hs.21453	2,31
microtubule-associated 7: protein, RP/EB family,	MAPRE2	BF884651	Hs.446375	2,33

member 2				
TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)	TPX2	BI044030	Hs.9329	2,36
LSM3 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	LSM3	BF851976	Hs.111632	2,40
7: copine III	CPNE3	BE087056	Hs.14158	2,40
mitochondrial ribosomal protein L44	MRPL44	BE774695	Hs.203559	2,41
CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	CSE1L	AF053641	Hs.90073	2,41
acid acyltransferase-epsilon	LPAAT-e	AK021722	Hs.281895	2,42
mesoderm specific transcript homolog (mouse)	MEST	BQ312371	Hs.440459	2,44
family with sequence similarity 8, member A1	FAM8A1	AW391535	Hs.95260	2,49
alpha-2-glycoprotein 1, zinc	AZGP1	NM_001185	Hs.512643	2,51
hypothetical protein FLJ20618	FLJ20618	BE831724	Hs.52184	2,53
8: KIAA1805 protein	KIAA1805	BE816271	Hs.294122	2,54
8: desmocollin 3	DSC3	AK001100	Hs.41690	2,74
sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	SCNN1A	BI019208	Hs.446415	2,78
mitochondrial ribosomal protein S28	MRPS28	AW393825	Hs.55097	2,89
T-cell activation protein phosphatase 2C	TA-PP2C	BF959926	Hs.13854	2,95
fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 6	FACL6	BI042292	Hs.14945	3,00
9: cyclin M3	CNNM3	BF912294	Hs.414042	3,00
BET1 homolog (S. cerevisiae)	BET1	AW892707	Hs.23103	3,06
SRY (sex determining region Y)-box 17	SOX17	BE843326	Hs.98367	3,10
tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-	TFPI	BF086665	Hs.102301	3,27

associated coagulation inhibitor)				
hypothetical protein 9i FLJ39963	FLJ39963	BF874151	Hs.44298	3,29
odd-skipped-related 2A 9i protein	OSR2	AW796618	Hs.152823	3,33
protein regulator of 9i cytokinesis 1	PRC1	BE006198	Hs.344037	3,35
CDK2-associated 9i protein 1	CDK2AP1	AW370132	Hs.433201	3,93
mitochondrial ribosomal 1i protein L47	MRPL47	BE159811	Hs.283734	3,95
Homo sapiens cDNA: FLJ21545 fis, clone 1i COL06195		AK054860	Hs.83623	4,11
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686H2244 (from clone 1i DKFZp686H2244)		AF131819	Hs.188536	4,26
osteoblast specific 1i factor 2 (fasciclin I-like)	OSF-2	BE156625	Hs.136348	4,99

Anexo 8

Genes diferencialmente expressos em células estromais de crianças normais quando comparado com crianças com SMD

1	Anotação	Símbolo	Genelid	ClusterId	Razão
2	neuropilin 2	NRP2	BE833229	Hs.368746	1,80
3	pre-B-cell leukemia transcription factor 3	PBX3	BI004571	Hs.294101	1,81
4	death-associated protein	DAP	BE938522	Hs.75189	1,81
5	RB1-inducible coiled-coil 1	RB1CC1	BE003669	Hs.151202	1,81
6	zinc finger protein 36, C3H type-like 1	ZFP36L1	BE767943	Hs.85155	1,81
7	KIAA0830 protein	KIAA0830	BF930333	Hs.167115	1,81
8	BTB (POZ) domain containing 6	BTBD6	BE837766	Hs.7367	1,82
9	ZAP3 protein	ZAP3	BE082138	Hs.303775	1,82
10	sorting nexin 8	SNX8	BF091364	Hs.12169	1,82
11	FYVE and coiled-coil domain containing 1	FYCO1	AW606669	Hs.257267	1,82
12	cystatin A (stefin A)	CSTA	BE840748	Hs.412999	1,83
13	Ku70-binding protein 3	KUB3	BE826160	Hs.61188	1,83
14	adipose differentiation-related protein	ADFP	BF086797	Hs.3416	1,83
15	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	YWHAH	AW383636	Hs.226755	1,84
16	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	MMP2	BF848244	Hs.367877	1,84
17	crystallin, lambda 1	CRYL1	AW371798	Hs.108896	1,84
18	catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1	CTNNAL1	BF733585	Hs.58488	1,84
19	yeast Sec31p homolog	KIAA0905	AW394283	Hs.436549	1,84

20	mannosidase alpha class 2B member 2	KIAA0935	BF918784	Hs.200661	1,85
21	quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)	QKI	AK027309	Hs.153355	1,85
22	feline sarcoma oncogene	FES	BF748528	Hs.7636	1,85
23	high-mobility group protein 2-like 1	HMG2L1	AW374294	Hs.92260	1,86
24	PHD finger protein 11	PHF11	AW382377	Hs.308220	1,86
25	Wolfram syndrome 1 (wolframin)	WFS1	AW901637	Hs.26077	1,87
26	B-cell CLL/lymphoma 7B	BCL7B	BQ314808	Hs.408219	1,87
27	TNFRSF1A-associated via death domain	TRADD	BF881199	Hs.89862	1,88
28	F-box and leucine-rich repeat protein 8	FBXL8	AW373827	Hs.75486	1,88
29	karyopherin alpha 3 (importin alpha 4)	KPNA3	AW369095	Hs.407765	1,88
30	decidual protein induced by progesterone	DEPP	BF154683	Hs.93675	1,88
31	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	SLC7A2	AL512749	Hs.432978	1,89
32	ephrin-B2	EFNB2	BE003476	Hs.30942	1,89
33	apoptosis related protein APR-3	38080	BQ329642	Hs.9527	1,89
34	x 010 protein	MDS010	BF962776	Hs.231750	1,89
35	WW domain-containing adapter with a coiled-coil region	WAC	AW809205	Hs.370152	1,89
36	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	LCP1	BE770023	Hs.381099	1,90
37	degenerative spermatocyte homolog, lipid desaturase (Drosophila)	DEGS	AW881634	Hs.299878	1,90
38	nuclear transcription factor Y, gamma	NFYC	BF830955	Hs.285133	1,91
39	ADP-ribosylation factor 4-like	ARF4L	BI001853	Hs.183153	1,91
40	kelch domain containing 2	KLHDC2	BI006287	Hs.415236	1,91

41	KIAA1698 protein	KIAA1698	D42041	Hs.76847	1,92
42	periphrin 1	PPHLN1	BF807986	Hs.371140	1,92
43	PTK2 protein tyrosine kinase 2	PTK2	BQ325851	Hs.434281	1,93
44	KIAA1189 protein	KIAA1189	AW902229	Hs.23941	1,93
45	testis expressed sequence 27	TEX27	BE836906	Hs.6120	1,93
46	hepatitis B virus x associated protein	HBXAP	AW383259	Hs.20509	1,93
47	myosin ID	MYO1D	BQ318611	Hs.39871	1,93
48	profilin 2	PFN2	BE769495	Hs.91747	1,94
49	endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin-like protein	ESDN	BE176208	Hs.173374	1,94
50	phytanoyl-CoA hydroxylase (Refsum disease)	PHYH	BE928759	Hs.172887	1,95
51	microsomal glutathione S-transferase 3	MGST3	BE714658	Hs.212507	1,95
52	KIAA0564 protein	KIAA0564	BE826011	Hs.405457	1,95
53	hypothetical protein FLJ10521	FLJ10521	BG961592	Hs.436849	1,96
54	signal recognition particle 72kDa	SRP72	BF856810	Hs.237825	1,96
55	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	PTPN12	BG001122	Hs.62	1,96
56	translation factor sui1 homolog	GC20	BF906575	Hs.315230	1,97
57	sorting nexin 6	SNX6	BE002625	Hs.283443	1,98
58	stannin	SNN	BF154504	Hs.76691	1,98
59	ligatin	LGTN	AW374990	Hs.274151	1,98
60	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3	SLC37A3	BF806721	Hs.439590	1,99
61	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase) 2	PLOD2	BQ304779	Hs.41270	2,00

62	guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 12	GNA12	BI032676	Hs.182874	2,00
63	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)	AKR1B10	BE711936	Hs.116724	2,00
64	estrogen-related receptor beta like 1	ESRRBL1	BE156247	Hs.170318	2,01
65	UDP-N-acetyl-alpha-D-Galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11 (GalNAc-T11)	GALNT11	BF379035	Hs.314421	2,01
66	tumor suppressing subtransferable candidate 1	TSSC1	AW601765	Hs.4992	2,01
67	glycogenin	GYG	BF954150	Hs.174071	2,01
68	hypothetical protein HSPC177	HSPC177	BF888598	Hs.415534	2,01
69	KIAA0247 gene product	KIAA0247	BE166432	Hs.82426	2,01
70	receptor-interacting serine-threonine kinase 2	RIPK2	AW385642	Hs.103755	2,02
71	methyl-CpG binding domain protein 2	MBD2	BI010180	Hs.25674	2,02
72	likely ortholog of mouse fibronectin type III repeat containing protein 1	FRCP1	BF948097	Hs.27836	2,03
73	CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2	CD2BP2	BE837825	Hs.202677	2,03
74	hypothetical protein LOC51240	LOC51240	BC005200	Hs.512600	2,04
75	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8, 19kDa	NDUFA8	BE076416	Hs.31547	2,05
76	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A, 41kDa	ARPC1A	BF763891	Hs.291981	2,05
77	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	ACTR3	BE695452	Hs.433512	2,06
78	stem-loop (histone) binding protein	SLBP	Z71188	Hs.251574	2,06
79	butyrate-induced transcript 1	HSPC121	BF839730	Hs.458288	2,09

80	PTX1 protein	PTX1	BF809685	Hs.26813	2,09
81	myotubularin related protein 4	MTMR4	AW373537	Hs.141727	2,10
82	SPTF-associated factor 65 gamma	STAF65(gamma)	BE695277	Hs.6232	2,11
83	cullin 2	CUL2	BQ317121	Hs.82919	2,11
84	B lymphoma Mo-MLV insertion region (mouse)	BMI1	BC011652	Hs.380403	2,11
85	BH3 interacting domain death agonist	BID	BF362267	Hs.300825	2,11
86	steroidogenic acute regulatory protein	STAR	AW875596	Hs.440760	2,11
87	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	SERPINB2	BG012063	Hs.75716	2,12
88	pro-oncosis receptor inducing membrane injury gene	PORIMIN	BQ375379	Hs.172089	2,12
89	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1	PPFIA1	BF808639	Hs.128312	2,12
90	KIAA0625 protein	KIAA0625	BI014579	Hs.460317	2,12
91	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	ELK3	AW804215	Hs.288555	2,12
92	hypothetical protein CL25084	CL25084	AW902389	Hs.438336	2,14
93	sialyltransferase	STHM	AW361013	Hs.288215	2,15
94	NCK adaptor protein 2	NCK2	BF087415	Hs.101695	2,15
95	BTB and kelch domain containing 1	BKLHD1	BF876289	Hs.20237	2,17
96	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 7	SLC9A7	BF093907	Hs.154353	2,18
97	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	TNFSF13	AW840780	Hs.54673	2,18
98	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	IMPA2	AW381525	Hs.5753	2,18

99	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide, olfactory type	GNAL	BE148651	Hs.136295	2,19
100	KIAA0303 protein	KIAA0303	BQ368557	Hs.212787	2,20
101	polyhomeotic-like 2 (Drosophila)	PHC2	BF821433	Hs.165263	2,21
102	hypothetical protein DKFZp762C1112	DKFZp762C1112	BE092433	Hs.88594	2,21
103	hypothetical protein FLJ10305	FLJ10305	BF935406	Hs.445061	2,21
104	latexin protein	LXN	AW368459	Hs.124491	2,22
105	nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1	NGFRAP1	BG993540	Hs.448588	2,24
106	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2	CAPZA2	BF993159	Hs.369579	2,24
107	neutrophil cytosolic factor 2 (65kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 2)	NCF2	BI004008	Hs.949	2,25
108	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	S100A6	BE838215	Hs.275243	2,26
109	diaphanous homolog 2 (Drosophila)	DIAPH2		Hs.226483	2,26
110	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	MARCKS	AK027274	Hs.318603	2,28
111	integral membrane protein 2B	ITM2B	BF092878	Hs.446450	2,28
112	chromosome 1 open reading frame 24	C1orf24	AW864873	Hs.48778	2,28
113	likely ortholog of mouse semaF cytoplasmic domain associated protein 3	SEMACAP3	BF735828	Hs.177635	2,29
114	fucosidase, alpha-L- 1, tissue	FUCA1	AW798550	Hs.576	2,32
115	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A	PPP1R12A	AW604265	Hs.377908	2,32
116	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	PAWR	BC007018	Hs.406074	2,32

117	nuclear factor, interleukin 3 regulated	NFIL3	U26173	Hs.79334	2,34
118	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	C1QB	BF951235	Hs.8986	2,35
119	hypothetical protein DKFZp564O043	DKFZP564O 043	AW890978	Hs.112605	2,36
120	glyoxylate reductase/hydroxypyruv ate reductase	GRHPR	BQ343325	Hs.155742	2,37
121	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	ITGB1	BE825832	Hs.287797	2,37
122	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	ME1	AW582154	Hs.14732	2,38
123	DKFZP434J154 protein molecule possessing ankyrin repeats induced by lipopolysaccharide (MAIL), homolog of mouse	DKFZP434J1 54 MAIL	BQ322431	Hs.226372	2,38
124	headcase homolog (Drosophila)	HECA	AW384954	Hs.6679	2,39
126	desmin	DES	BQ376821	Hs.279604	2,40
127	carbonyl reductase 1	CBR1	AW884081	Hs.88778	2,40
128	carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 12	CHST12	BF093043	Hs.25204	2,42
129	heme oxygenase (decycling) 1	HMOX1	BE010132	Hs.202833	2,42
130	RAB4A, member RAS oncogene family	RAB4A	BI050688	Hs.296169	2,42
131	protein S (alpha)	PROS1	BF761019	Hs.64016	2,47
132	chromosome 7 open reading frame 20	C7orf20	BF874571	Hs.107387	2,52
133	WD repeat and FYVE domain containing 1	WDFY1	BE093856	Hs.44743	2,54
134	hypothetical protein FLJ22611	FLJ22611	BE826727	Hs.388751	2,56
135	plasminogen activator, urokinase	PLAU	BF087461	Hs.77274	2,57

136	ribosomal protein L18	RPL18	AW361909	Hs.409634	2,58
137	interleukin 1, beta	IL1B	AW362995	Hs.126256	2,58
138	insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	BE709006	Hs.1516	2,59
139	hippocampus abundant gene transcript 1	HIAT1	AW838469	Hs.21015	2,60
140	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	GZMB	BF877856	Hs.1051	2,61
141	catalase	CAT	AW377644	Hs.395771	2,61
142	metallothionein 1X	MT1X	AW804615	Hs.374950	2,62
143	hypothetical protein from EUROIMAGE 1967720	LOC56931	AW576982	Hs.284297	2,66
144	insulin receptor substrate 1	IRS1	AW608384	Hs.390242	2,67
145	ras homolog gene family, member E	ARHE	AW821812	Hs.6838	2,68
146	superoxide dismutase 2, mitochondrial	SOD2	BC012423	Hs.384944	2,73
147	coated vesicle membrane protein	RNP24	BE843445	Hs.75914	2,73
148	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 5	GOLGA5	BE767811	Hs.241572	2,73
149	APMCF1 protein	APMCF1	BF825465	Hs.12152	2,76
150	glioma tumor suppressor candidate region gene 2	GLTSCR2	BF803043	Hs.421907	2,76
151	protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit	PRKAG2	AW363105	Hs.259842	2,76
152	tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	BE929496	Hs.438231	2,78
153	centaurin, gamma 3	CENTG3	BF955135	Hs.249728	2,78
154	phosphogluconate dehydrogenase	PGD	BF994020	Hs.392837	2,81
155	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	AW387479	Hs.8867	2,81
156	methyltransferase like 3	METTL3	AK000222	Hs.168799	2,82

157	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2	DNAJA2	BE698761	Hs.368078	2,84
158	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4B	SEMA4B	BI044773	Hs.416077	2,84
159	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	MYC	AW384219	Hs.202453	2,84
160	CD207 antigen, langerin	CD207	BQ300473	Hs.199731	2,86
161	nuclear transcription factor Y, beta	NFYB	BC005317	Hs.84928	2,86
162	hypothetical protein, clone 2746033	HSA272196	BG994639	Hs.8179	2,88
163	PP2135 protein	PP2135	BF807866	Hs.132569	2,89
164	transforming growth factor, alpha	TGFA	BE707239	Hs.170009	2,93
165	transmembrane 4 superfamily member 10	TM4SF10	AW895519	Hs.8769	2,95
166	ubiquitin-conjugating enzyme E2B (RAD6 homolog)	UBE2B	AW379482	Hs.385986	3,05
167	benzodiazapine receptor (peripheral)	BZRP	BF892305	Hs.202	3,07
168	STARD3 N-terminal like	STARD3NL	BE927669	Hs.13467	3,09
169	small protein effector 1 of Cdc42	SPEC1	BF229686	Hs.22065	3,11
170	dipeptidylpeptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	DPP4	AW385724	Hs.44926	3,13
171	SET and MYND domain containing 3	SMYD3	BE826020	Hs.8109	3,17
172	chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20	AW391386	Hs.75498	3,19
173	hypothetical protein BC016658	LOC144455	BF331960	Hs.416375	3,25
174	glycoprotein, synaptic 2	GPSN2	AF222742	Hs.306122	3,34
175	hypothetical protein FLJ12953 similar to Mus musculus D3Mm3e	FLJ12953	BI027777	Hs.323537	3,34

176	hypothetical protein FLJ22757	FLJ22757	BF378548	Hs.236449	3,39
177	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	BE839751	Hs.81328	3,43
178	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	NT5E	BC015940	Hs.153952	3,45
179	basonuclin	BNC	BE939420	Hs.64025	3,56
180	hypothetical protein FLJ10055	FLJ10055	BF333655	Hs.9398	3,62
181	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	GSN	BE168172	Hs.446537	3,68
182	hypothetical protein FLJ10539	FLJ10539	BF943453	Hs.301198	3,96
183	plasma glutamate carboxypeptidase	PGCP	BQ375071	Hs.197335	4,07
184	hypothetical protein BC009264	LOC151534	BF810949	Hs.437641	4,16
185	chromosome 6 open reading frame 69	C6orf69	AW948976	Hs.188757	4,16
186	chromosome 20 open reading frame 45	C20orf45	BQ319589	Hs.3945	4,51
187	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	GNG11	BF998279	Hs.83381	5,26
188	ribosomal protein S11	RPS11	AW804519	Hs.433529	6,54
189	normal mucosa of esophagus specific 1	NMES1	BG945328	Hs.112242	8,06
190	cysteine knot superfamily 1, BMP antagonist 1	CKTSF1B1	BF881941	Hs.40098	16,16

Anexo 9

Genes diferencialmente expressos em células estromais de crianças com SMD quando comparado com crianças com SMD/LMA

Anotação	Símbolo	Genelid	ClusterId	Razão
G protein-coupled receptor 3	GPR3	BF767420	Hs.66542	1,70
LAG1 longevity assurance homolog 2 (S. cerevisiae)	LASS2	BE812075	Hs.285976	1,71
SNARE protein Ykt6	YKT6	BI002616	Hs.296244	1,71
hypothetical protein LOC162427	LOC162427	AW993033	Hs.432850	1,71
S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1	AHCYL1	AL049954	Hs.41113	1,71
ribosomal protein S11	RPS11	AW804519	Hs.433529	1,71
likely ortholog of mouse synembryn	RIC-8	BF805261	Hs.19306	1,71
eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4	EIF2AK4	BI010882	Hs.412102	1,72
hypothetical protein PRO2730	PRO2730	BF808559	Hs.194110	1,72
flavoprotein oxidoreductase MICAL2	MICAL2	BF369033	Hs.309674	1,72
PHD protein Jade-1	Jade-1	BG996473	Hs.12420	1,72
Mov10, Moloney leukemia virus 10, homolog (mouse)	MOV10	BI000596	Hs.512586	1,73
myeloid leukemia factor 2	MLF2	AW867146	Hs.79026	1,73
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 (GalNAc-T5)	GALNT5	AW752583	Hs.443716	1,73
SH3-domain kinase binding protein 1	SH3KBP1	BG009484	Hs.153260	1,74
chromosome 20 open reading frame 3	C20orf3	AW876791	Hs.22391	1,74
DIRAS family, GTP-binding RAS-like 1	DIRAS1	BE718141	Hs.172753	1,74
activating transcription factor 7	ATF7	X57197	Hs.405395	1,74
serine/threonine kinase 25 (STE20 homolog, yeast)	STK25	BF087374	Hs.155206	1,75
ring finger protein 40	RNF40	BF091480	Hs.65238	1,75

aminomethyltransferase (glycine cleavage system protein T)	AMT	BF769126	Hs.102	1,76
chromosome 13 open reading frame 11	C13orf11	BE004431	Hs.27337	1,77
procollagen-proline, 2- oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase; thyroid hormone binding protein p55)	P4HB	BE710887	Hs.410578	1,77
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A	PPP1R12A	AW604265	Hs.377908	1,77
transcription factor 7-like 1 (T- cell specific, HMG-box)	TCF7L1	BE094462	Hs.318517	1,77
transmembrane protein 8 (five membrane-spanning domains)	TMEM8	BF879798	Hs.288940	1,77
uveal autoantigen with coiled- coil domains and ankyrin repeats	UACA	AW607658	Hs.49753	1,77
ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 1	ARFGAP1	BE062864	Hs.25584	1,77
hepatocellular carcinoma- associated antigen 59	LOC51759	AW993261	Hs.278429	1,77
transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2	TRPV2	BF082381	Hs.279746	1,77
transcriptional adaptor 3 (NGG1 homolog, yeast)-like	TADA3L	BF800708	Hs.386390	1,78
transforming growth factor, beta 2	TGFB2	BE005145	Hs.169300	1,78
hypothetical protein FLJ20308	FLJ20308	AW368610	Hs.356770	1,78
polyhomeotic-like 2 (Drosophila)	PHC2	BF821433	Hs.165263	1,79
neural precursor cell expressed, developmentally down- regulated 9	NEDD9	BF985269	Hs.388589	1,79
cysteine conjugate-beta lyase; cytoplasmic (glutamine transaminase K, kynurenine aminotransferase)	CCBL1	BF951903	Hs.382311	1,79
major vault protein	MVP	BE158326	Hs.80680	1,80
HLA class II region expressed gene KE4	HKE4	AW388636	Hs.278721	1,81
exportin 7	XPO7	AW797454	Hs.172685	1,81

hypothetical protein FLJ12875	FLJ12875	BF853420	Hs.10101	1,81
Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 4, p53 binding protein (mouse)	MDM4	BG959649	Hs.432374	1,82
exportin 6	XPO6	BE170158	Hs.150684	1,82
Lysosomal-associated multispanning membrane protein-5	LAPTM5	BI003038	Hs.436200	1,84
lecithin-cholesterol acyltransferase	LCAT	BF744668	Hs.387239	1,84
Melanoma associated gene	D2S448	AW852329	Hs.118893	1,85
pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	PTTG1IP	BE819480	Hs.369026	1,85
sphingosine kinase 1	SPHK1	AJ245504	Hs.68061	1,85
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 1	ATP6AP1	AW369186	Hs.6551	1,85
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	DNAJB1	BC002352	Hs.82646	1,86
Ran GTPase activating protein 1	RANGAP1	BE151898	Hs.183800	1,86
elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 1	ELOVL1	BE833076	Hs.25597	1,86
bromodomain containing 2	BRD2	BF828876	Hs.75243	1,86
p21(CDKN1A)-activated kinase 4	PAK4	BG878328	Hs.20447	1,86
transketolase (Wernicke- Korsakoff syndrome)	TKT	BQ303375	Hs.89643	1,87
formin binding protein 1	FNBP1	BE840939	Hs.440808	1,87
abl-interactor 2	ABI-2	BF996824	Hs.387906	1,88
PRO1073 protein	PRO1073	BE818267	Hs.187199	1,88
microtubule-associated protein 1B	MAP1B	BE701597	Hs.103042	1,88
hypothetical protein FLJ10849	FLJ10849	BG004781	Hs.386784	1,88
FAST kinase	FASTK	BC011770	Hs.75087	1,88
hypothetical protein FLJ22649 similar to signal peptidase SPC22/23	FLJ22649	BE933907	Hs.42194	1,88

secreted frizzled-related protein 1	SFRP1	BE005493	Hs.7306	1,89
E2F transcription factor 2	E2F2	AW842540	Hs.231444	1,89
cAMP responsive element binding protein 3 (human)	CREB3	BE091492	Hs.287921	1,89
insulin receptor tyrosine kinase substrate	LOC55971	BE071837	Hs.23449	1,89
dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase	DDOST	BI057815	Hs.301882	1,89
forkhead box P1	FOXP1	BG998789	Hs.235860	1,89
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 4 delta, 44kDa	EIF3S4	BF922602	Hs.28081	1,90
deleted in liver cancer 1	DLC1	BE708499	Hs.8700	1,90
pleiomorphic adenoma gene-like 1	PLAGL1	BE178648	Hs.132911	1,90
spinster-like	SPINL	BI011327	Hs.379091	1,91
casein kinase 1, delta	CSNK1D	BE827689	Hs.378918	1,91
retinoblastoma-associated factor 600	RBAF600	BE003409	Hs.287616	1,92
ubiquitin specific protease 13 (isopeptidase T-3)	USP13	AW175991	Hs.85482	1,93
integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	ITGB1	BE825832	Hs.287797	1,94
Homo sapiens cDNA: FLJ21452 fis, clone COL04505		AK025105	Hs.287666	1,95
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3	PSMD3	AW602109	Hs.9736	1,95
seryl-tRNA synthetase	SARS	BF090251	Hs.444261	1,95
fatty acid desaturase 1	FADS1	BF081837	Hs.503546	1,96
BCL2-associated X protein	BAX	BG978807	Hs.159428	1,96
myotrophin	MTPN	BF894088	Hs.21321	1,97
golgi membrane protein SB140	SMAP-5	AW364013	Hs.5672	1,98
coactosin-like 1 (Dictyostelium)	COTL1	BE841696	Hs.289092	1,98

CD99 antigen-like 2	CD99L2	BE834569	Hs.169388	1,98
SEC22 vesicle trafficking protein-like 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	SEC22L3	BF922603	Hs.12942	1,98
kelch-like 5 (<i>Drosophila</i>)	KLHL5	AK002174	Hs.272251	1,99
transmembrane 9 superfamily member 1	TM9SF1	BE717116	Hs.91586	1,99
neutrophil cytosolic factor 2 (65kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 2)	NCF2	BI004008	Hs.949	2,00
kangai 1 (suppression of tumorigenicity 6, prostate; CD82 antigen (R2 leukocyte antigen, antigen detected by monoclonal and antibody IA4))	KAI1	BF853745	Hs.323949	2,00
CTL2 gene	CTL2	BF995787	Hs.105509	2,03
protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3	PACSIN3	BI044831	Hs.334639	2,03
testis-specific kinase 1	TESK1	BG954375	Hs.79358	2,03
pumilio homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	PUM1	BF336739	Hs.153834	2,04
centrosome-associated protein 350	CAP350	BG009597	Hs.413045	2,04
chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20	AW391386	Hs.75498	2,04
ras homolog gene family, member E	ARHE	AW821812	Hs.6838	2,05
F-box and WD-40 domain protein 1B	FBXW1B	BQ345739	Hs.280385	2,06
zinc finger protein 213	ZNF213	BI052591	Hs.115284	2,06
actin filament associated protein	AFAP	BC015900	Hs.115912	2,07
Rho interacting protein 3	RHOIP3	BF083089	Hs.430725	2,08
interferon, gamma-inducible protein 30	IFI30	BG004211	Hs.14623	2,09
downregulated in ovarian cancer 1	DOC1	BC027860	Hs.15432	2,09
connective tissue growth factor	CTGF	BE926068	Hs.410037	2,09
low density lipoprotein receptor-related protein 10	LRP10	BF844001	Hs.28368	2,09
diacylglycerol kinase, alpha 80kDa	DGKA	BF873454	Hs.172690	2,09

transmembrane 4 superfamily member 10	TM4SF10	AW895519	Hs.8769	2,10
solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 1	SLC37A1	AW361928	Hs.369452	2,10
RAB5C, member RAS oncogene family	RAB5C	BE082655	Hs.479	2,12
karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)	KPNA6	AK000724	Hs.372741	2,12
phospholipase D3	PLD3	BF811734	Hs.257008	2,14
cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	CDKN2D	BC001822	Hs.435051	2,15
proteoglycan 1, secretory granule	PRG1	BE840880	Hs.1908	2,15
catechol-O-methyltransferase	COMT	BF376147	Hs.240013	2,16
decidual protein induced by progesterone	DEPP	BF154683	Hs.93675	2,17
transforming growth factor, beta 2	TGFB2	BE167718	Hs.169300	2,17
BAI1-associated protein 1	BAIAP1	BE833257	Hs.169441	2,18
hypothetical protein FLJ12666	FLJ12666	AW998995	Hs.23767	2,19
MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	MARK3	BG990012	Hs.437625	2,20
capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	CAPZB	BF837672	Hs.333417	2,21
hypothetical protein FLJ21616	FLJ21616	BG952038	Hs.458684	2,25
protein transport protein SEC61 alpha subunit isoform 1	SEC61A1	BF925570	Hs.306079	2,26
karyopherin alpha 3 (importin alpha 4)	KPNA3	AW369095	Hs.407765	2,26
neuroendocrine differentiation factor	NEDF	BE831566	Hs.512608	2,27
thioredoxin reductase 1	TXNRD1	BF885865	Hs.434367	2,28
v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)	CRK	BC008506	Hs.511822	2,28
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 17	ARHGEF17	BF821347	Hs.45180	2,28
damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa	DDB1	BE711484	Hs.290758	2,29
collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type	COL3A1	BC028178	Hs.443625	2,31

IV, autosomal dominant)				
REV1-like (yeast)	REV1L	AW368473	Hs.443077	2,31
RAB5A, member RAS oncogene family	RAB5A	BF379614	Hs.73957	2,34
T-cell activation leucine repeat-rich protein	TA-LRRP	D86984	Hs.387915	2,34
tetracycline transporter-like protein	TETTRAN	BI014981	Hs.157145	2,36
paralemmin 2	PALM2	BF986322	Hs.42322	2,37
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	SLC7A2	AL512749	Hs.432978	2,38
heat shock regulated 1	XLHSRF-1	BF804749	Hs.9740	2,38
serine protease inhibitor, Kunitz type, 2	SPINT2	BG997034	Hs.31439	2,38
BET1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	BET1	AW892707	Hs.23103	2,40
golgi apparatus protein 1	GLG1	BF737415	Hs.78979	2,40
RAB3B, member RAS oncogene family	RAB3B	NM_002867	Hs.123072	2,47
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686H2244 (from clone DKFZp686H2244)		AF131819	Hs.188536	2,47
formyltetrahydrofolate synthetase domain containing 1	FTHFSDC1	BQ374854	Hs.44155	2,47
hypothetical protein FLJ14525	FLJ14525	AW882998	Hs.26812	2,50
neurexin 3	NRXN3	BF944974	Hs.247837	2,55
short-chain dehydrogenase/reductase 1	SDR1	BF944874	Hs.17144	2,55
serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)	STK3	BE843446	Hs.166684	2,57
3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	PAPSS2	AW937798	Hs.274230	2,58
ankyrin repeat and SOCS box-containing 9	ASB9	AW387862	Hs.19404	2,58
hypothetical protein 628	LOC56270	AW371654	Hs.201390	2,61
zinc finger protein 189	ZNF189	AW862084	Hs.50123	2,64
likely ortholog of neuronally expressed calcium binding	FLJ13612	BI014388	Hs.289242	2,65

protein				
diaphorase (NADH) (cytochrome b-5 reductase)	DIA1	BG984618	Hs.274464	2,67
lysyl oxidase-like 2	LOXL2	BE832867	Hs.83354	2,69
calmodulin binding transcription activator 2	CAMTA2	AW370722	Hs.107362	2,71
thioredoxin interacting protein	TXNIP	BI031027	Hs.179526	2,73
actinin, alpha 4	ACTN4	BG945440	Hs.443619	2,76
tumor necrosis factor, alpha- induced protein 3	TNFAIP3	AW393875	Hs.211600	2,77
procollagen-lysine, 2- oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase, Ehlers- Danlos syndrome type VI)	PLOD	AW370562	Hs.75093	2,81
insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	BE709006	Hs.1516	2,88
plasminogen activator, tissue	PLAT	AW394127	Hs.274404	3,05
guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2	GNAI2	BE840018	Hs.77269	3,21
sorting nexin 19	SNX19	BE069936	Hs.409862	3,24
filamin-binding LIM protein-1	FBLP-1	AW938874	Hs.8728	3,25
carbonic anhydrase XIV	CA14	BF326181	Hs.192491	3,26
flotillin 2	FLOT2	AW375362	Hs.18799	3,39
WW domain-containing adapter with a coiled-coil region	WAC	AW809205	Hs.370152	3,43
6-pyruvoyltetrahydropterin synthase	PTS	AW373992	Hs.415877	3,46
ornithine decarboxylase antizyme inhibitor	OAZIN	AW939302	Hs.223014	3,51
myosin, light polypeptide kinase serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	MYLK SERPINB2	BE836934 BG012063	Hs.506692 Hs.75716	3,54 3,69
synaptopodin 2	SYNPO2	BE840322	Hs.24192	4,10
hypothetical protein MGC3047	MGC3047	BG995089	Hs.470704	4,22

hypothetical protein MGC2865	MGC2865	BF856397	Hs.242889	4,70
glioma tumor suppressor candidate region gene 2	GLTSCR2	BF803043	Hs.421907	4,90
thrombospondin 1	THBS1	BC015134	Hs.164226	4,92
tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	TFPI	BF086665	Hs.102301	5,26
chromosome 6 open reading frame 69	C6orf69	AW948976	Hs.188757	7,66

Anexo 10

Genes diferencialmente expressos em células estromais de crianças com SMD/LMA quando comparado com crianças com SMD

Anotação	Símbolo	Genelid	ClusterId	Razão
hypothetical protein 1 FLJ20373	FLJ20373	BF929566	Hs.6631	1,65
nuclear matrix protein 2 NXP2	NXP2	AW854050	Hs.421150	1,65
hypothetical protein 3 MGC2747	MGC2747	BC001948	Hs.356467	1,65
mitochondrial ribosomal 4 protein L27	MRPL27	BE811192	Hs.7736	1,65
5 cathepsin C	CTSC	BG994232	Hs.128065	1,66
NGFI-A binding protein 1 6 (EGR1 binding protein 1)	NAB1	AW363474	Hs.107474	1,66
heme oxygenase 7 (decycling) 1	HMOX1	BE010132	Hs.202833	1,67
replication protein A1, 8 70kDa	RPA1	BF093541	Hs.84318	1,67
hypothetical protein 9 FLJ10702	FLJ10702	BC013131	Hs.277255	1,67
hypothetical protein 10(MGC2628)	MGC2628	AK027901	Hs.436348	1,68
chromosome 6 open 11reading frame 170	C6orf170	BF767127	Hs.348745	1,68
hypothetical protein 12FLJ10539	FLJ10539	BF943453	Hs.301198	1,69
aldehyde dehydrogenase 3 13family, member A2	ALDH3A2	BI038780	Hs.440662	1,70
ariadne homolog 2 14(Drosophila)	ARIH2	BC000422	Hs.241558	1,71
mitochondrial ribosomal 15protein L16	MRPL16	BG996722	Hs.291898	1,71
16C2f protein	C2F	BG999376	Hs.135643	1,71
CSE1 chromosome 17segregation 1-like (yeast)	CSE1L	AF053641	Hs.90073	1,72
hypothetical protein 18FLJ10700	FLJ10700	AK000147	Hs.295909	1,73
interleukin 6 signal transducer (gp130, 19oncostatin M receptor)	IL6ST	AB015706	Hs.71968	1,75

2Cglycogenin	GYG	BF954150	Hs.174071	1,75
McKusick-Kaufman 21syndrome	MKKS	AW892880	Hs.46743	1,76
chromosome 6 open 22reading frame 49	C6orf49	BE702842	Hs.269254	1,77
T-cell activation protein 2Cphosphatase 2C	TA-PP2C	BF959926	Hs.13854	1,77
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), 24member 8	SLC7A8	AF171669	Hs.22891	1,77
hypothetical protein 2FLJ22757	FLJ22757	BF378548	Hs.236449	1,78
chromosome 13 open 2reading frame 10	C13orf10	AW374022	Hs.408487	1,78
27Rab9 effector p40	RAB9P40	BC000503	Hs.19012	1,78
2Esperm associated antigen 9	SPAG9	AK023512	Hs.500367	1,78
N-acylsphingosine amidohydrolase (acid 2ceramidase) 1	ASAH1	BF363417	Hs.324808	1,78
3Calpha-2-glycoprotein 1, zinc	AZGP1	NM_001185	Hs.512643	1,78
helicase with SNF2 domain 311	HELSNF1	BQ300495	Hs.444045	1,79
mitochondrial ribosomal 32protein L15	MRPL15	BI057804	Hs.18349	1,79
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha 3Csubcomplex, 8, 19kDa	NDUFA8	BE076416	Hs.31547	1,79
rab3 GTPase-activating protein, non-catalytic 34subunit (150kD)	RAB3-GAP150	BE926775	Hs.197289	1,80
3EGATA binding protein 4	GATA4	NM_002052	Hs.243987	1,81
mitochondrial ribosomal 36protein L44	MRPL44	BE774695	Hs.203559	1,82
mitochondrial ribosomal 37protein S6	MRPS6	BF963911	Hs.268016	1,82
gap junction protein, alpha 3E1, 43kDa (connexin 43)	GJA1	BC026329	Hs.74471	1,84
3Enucleobindin 2	NUCB2	AF450266	Hs.423095	1,84
metastasis-associated 1- 4Clike 1	MTA1L1	AB016591	Hs.173043	1,85

41adlican	DKFZp564I1922	BI003055	Hs.72157	1,87
protein phosphatase 42methylesterase-1	PME-1	BF842437	Hs.63304	1,87
43annexin A4	ANXA4	AW865864	Hs.422986	1,88
alpha-methylacyl-CoA 44racemase	AMACR	AF158378	Hs.49598	1,88
cellular repressor of E1A- 45stimulated genes	CREG	BE833326	Hs.5710	1,89
family with sequence 46similarity 8, member A1	FAM8A1	AW391535	Hs.95260	1,89
likely ortholog of mouse 47embryonic epithelial gene 1	EEG1	BF377286	Hs.99962	1,90
48basonuclin	BNC	BE939420	Hs.64025	1,91
hypothetical protein 49FLJ21156	FLJ21156	BF881754	Hs.26058	1,91
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade I 50(neuroserpin), member 1	SERPINI1	BE086602	Hs.78589	1,92
hypothetical protein 51DKFZp761H0421	DKFZp761H0421	BF090114	Hs.218182	1,92
52synaptogyrin 3	SYNGR3	AJ002309	Hs.435277	1,92
capping protein (actin 53filament), gelsolin-like	CAPG	BG003832	Hs.82422	1,92
nudix (nucleoside diphosphate linked moiety 54X)-type motif 5	NUDT5	BE713442	Hs.410205	1,93
55kallikrein 2, prostatic	KLK2	BE827763	Hs.181350	1,94
56metallothionein 1X	MT1X	AW804615	Hs.374950	1,95
lung type-I cell membrane- 57associated glycoprotein	T1A-2	BI057336	Hs.468675	1,96
retinoic acid receptor responder (tazarotene 58induced) 3	RARRES3	BC009678	Hs.17466	1,96
59BDG-29 proten	BDG29	BQ318493	Hs.81505	1,97
chromosome 13 open 60reading frame 9	C13orf9	AW367296	Hs.109520	1,99
hypothetical protein, clone 612746033	HSA272196	BG994639	Hs.8179	2,00

sialyltransferase 9 (CMP-NeuAc:lactosylceramide alpha-2,3-sialyltransferase; 62GM3 synthase)	SIAT9	BC009887	Hs.415117	2,01
cytochrome c oxidase 62subunit Vb	COX5B	BF812924	Hs.1342	2,01
hypothetical protein from 64EUROIMAGE 1967720	LOC56931	AW576982	Hs.284297	2,02
phosphogluconate 65dehydrogenase	PGD	BF994020	Hs.392837	2,05
ubiquitously-expressed 66transcript	UXT	BG945225	Hs.172791	2,05
chromosome 7 open 67reading frame 20	C7orf20	BF874571	Hs.107387	2,05
estrogen-related receptor 68beta like 1	ESRRBL1	BE156247	Hs.170318	2,06
galactosylceramidase 69(Krabbe disease)	GALC	L23116	Hs.408273	2,06
70(KIAA0564 protein)	KIAA0564	BE826011	Hs.405457	2,10
71fructosamine-3-kinase	FN3K	BE159100	Hs.151135	2,12
SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, 72autosomal sex-reversal)	SOX9	BE003539	Hs.2316	2,12
73metastasis suppressor 1	MTSS1	BF920939	Hs.77694	2,12
likely ortholog of mouse tumor necrosis-alpha-induced adipose-related 74protein	FLJ23153	BE714106	Hs.44208	2,14
superoxide dismutase 2, 75mitochondrial	SOD2	BC012423	Hs.384944	2,15
76UBX domain containing 1	UBXD1	AW793772	Hs.435255	2,15
heat shock factor binding 77protein 1	HSBP1	BQ328009	Hs.250899	2,20
microsomal glutathione S- 78transferase 3	MGST3	BE714658	Hs.212507	2,20
79insulin receptor substrate 1	IRS1	AW608384	Hs.390242	2,20
granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 8(1))	GZMB	BF877856	Hs.1051	2,25

ecotropic viral integration 81site 2B	EVI2B	BF897809	Hs.5509	2,26
heterogeneous nuclear 82ribonucleoprotein H3 (2H9)	HNRPH3	AW878310	Hs.156481	2,28
RAB31, member RAS 83oncogene family	RAB31	AF183421	Hs.223025	2,29
84cathepsin Z	CTSZ	AW392304	Hs.252549	2,30
eukaryotic translation initiation factor 4E binding 85protein 2	EIF4EBP2	AK057643	Hs.278712	2,30
carbonic anhydrase III, 86muscle specific	CA3	AW606293	Hs.82129	2,33
nucleolar protein family A, member 3 (H/ACA small 87nucleolar RNPs)	NOLA3	AW368601	Hs.14317	2,34
88catalase	CAT	AW377644	Hs.395771	2,35
dual specificity 89phosphatase 1	DUSP1	BF833125	Hs.171695	2,36
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large 90(multifunctional protease 2)	PSMB9	AW939036	Hs.381081	2,39
91lumican	LUM	U21128	Hs.406475	2,40
dipeptidylpeptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing 92protein 2)	DPP4	AW385724	Hs.44926	2,41
93cathepsin H	CTSH	BQ330435	Hs.114931	2,42
very low density lipoprotein 94receptor	VLDLR	AW863578	Hs.370422	2,44
pre-B-cell leukemia transcription factor 95interacting protein 1	PBXIP1	BF087424	Hs.505806	2,44
likely ortholog of mouse semaF cytoplasmic domain 96associated protein 3	SEMACAP3	BF735828	Hs.177635	2,46
potassium inwardly- rectifying channel, 97subfamily J, member 15	KCNJ15	BE172254	Hs.17287	2,48
BCG-induced gene in 98monocytes, clone 103	BIGM103	BE000998	Hs.284205	2,52
zinc finger protein 19 (KOX 9912)	ZNF19	BE075857	Hs.512717	2,54

1(transmembrane protein 9 platelet derived growth 1(factor C	TMEM9 PDGFC	BG986387 BF088063	Hs.181444 Hs.43080	2,59 2,66
nuclear receptor subfamily 1(4, group A, member 2	NR4A2	AW582172	Hs.82120	2,67
1(beta-2-microglobulin hypothetical protein 1(BC010682	B2M LOC90550	BI010276 BE931770	Hs.48516 Hs.4896	2,76 2,80
1(protein S (alpha) hypothetical protein 1(FLJ20105	PROS1 FLJ20105	BF761019 BE695263	Hs.64016 Hs.89306	2,88 3,01
lymphocyte cytosolic 1(protein 1 (L-plastin)	LCP1	BE770023	Hs.381099	3,06
synaptosomal-associated 1(protein, 25kDa	SNAP25	BF952515	Hs.221974	3,37
regulator of G-protein 1(signalling 16	RGS16	BC006243	Hs.413297	3,44
SPTF-associated factor 65 11gamma	STAF65(gamma)	BE695277	Hs.6232	3,92
guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 1111	GNG11	BF998279	Hs.83381	4,13
FBJ murine osteosarcoma 11viral oncogene homolog B	FOSB	BF880644	Hs.75678	4,16
regulator of G-protein 11signalling 2, 24kDa	RGS2	BE066709	Hs.78944	4,32
11fibulin 1	FBLN1	AF217999	Hs.445240	4,67

Anexo 11

Genes diferencialmente expressos em células estromais de crianças normais quando comparado com crianças com SMD/LMA

1	Anotação	Símbolo	GenelId	ClusterId	Razã o
2	periphilin 1	PPHLN1	BF807986	Hs.371140	2,13
3	zinc finger protein 36, C3H type-like 1	ZFP36L1	BE767943	Hs.85155	2,13
4	plasminogen activator, urokinase	PLAU	BF087461	Hs.77274	2,13
5	desmin	DES	BQ376821	Hs.279604	2,13
6	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3	SLC37A3	BF806721	Hs.439590	2,14
7	WD repeat and FYVE domain containing 1	WDFY1	BE093856	Hs.44743	2,14
8	exportin 7	XPO7	AW797454	Hs.172685	2,15
9	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)	CRK	BC008506	Hs.511822	2,16
10	KIAA0472 protein	KIAA0472	BF893580	Hs.6874	2,16
11	phospholipase D3	PLD3	BF811734	Hs.257008	2,16
12	transmembrane protein 8 (five membrane-spanning domains)	TMEM8	BF879798	Hs.288940	2,17
13	calmodulin binding transcription activator 2	CAMTA2	AW370722	Hs.107362	2,17
14	hepatitis B virus x associated protein	HBXAP	AW383259	Hs.20509	2,17
15	chromosome 13 open reading frame 11	C13orf11	BE004431	Hs.27337	2,17
16	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1	GGA1	BF935697	Hs.405689	2,18
17	hypothetical protein FLJ20580	FLJ20580	BC010908	Hs.146861	2,18
18	neuroendocrine differentiation factor	NEDF	BE831566	Hs.512608	2,18
19	BH3 interacting domain death agonist	BID	BF362267	Hs.300825	2,19
20	actin-related protein 10 homolog (S. cerevisiae)	ACTR10	BE939541	Hs.248569	2,19
21	adiponectin receptor 1	ADIPOR1	BF848195	Hs.5298	2,20

22	calponin 1, basic, smooth muscle	CNN1	BG979976	Hs.21223	2,20
23	quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)	QKI	AK027309	Hs.153355	2,20
24	feline sarcoma oncogene	FES	BF748528	Hs.7636	2,20
25	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 4 delta, 44kDa	EIF3S4	BF922602	Hs.28081	2,21
26	hypothetical protein LOC348262	LOC348262	BE831904	Hs.285165	2,22
27	stannin	SNN	BF154504	Hs.76691	2,22
28	SET and MYND domain containing 3	SMYD3	BE826020	Hs.8109	2,23
29	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	ME1	AW582154	Hs.14732	2,23
30	actinin, alpha 4	ACTN4	BG945440	Hs.443619	2,23
31	interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL6	BE812262	Hs.512234	2,24
32	SUMO-1 activating enzyme subunit 2	UBA2	NM_005499	Hs.511739	2,24
33	nuclear factor, interleukin 3 regulated	NFIL3	U26173	Hs.79334	2,25
34	PTX1 protein	PTX1	BF809685	Hs.26813	2,26
35	crystallin, lambda 1	CRYL1	AW371798	Hs.108896	2,26
36	hypothetical protein FLJ12666	FLJ12666	AW998995	Hs.23767	2,26
37	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase	DDOST	BI057815	Hs.301882	2,27
38	ligatin	LGTN	AW374990	Hs.274151	2,28
39	B-cell CLL/lymphoma 7B cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	BCL7B	BQ314808	Hs.408219	2,29
40		CDKN2D	BC001822	Hs.435051	2,29
41	transmembrane 9 superfamily member 1	TM9SF1	BE717116	Hs.91586	2,29
42	RAB4A, member RAS oncogene family	RAB4A	BI050688	Hs.296169	2,29
43	ribosomal protein L18	RPL18	AW361909	Hs.409634	2,31

44	fatty acid desaturase 1	FADS1	BF081837	Hs.503546	2,31
45	fer-1-like 3, myoferlin (C. elegans)	FER1L3	BE768663	Hs.362731	2,31
46	major vault protein	MVP	BE158326	Hs.80680	2,31
47	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11 (GalNAc-T11)	GALNT1	BF379035	Hs.314421	2,32
48	filamin-binding LIM protein-1	FBLP-1	AW938874	Hs.8728	2,32
49	hypothetical protein FLJ10539	FLJ10539	BF943453	Hs.301198	2,34
50	hypothetical protein MGC3047	MGC3047	BG995089	Hs.470704	2,35
51	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase) 2	PLOD2	BQ304779	Hs.41270	2,35
52	dynein, cytoplasmic, light intermediate polypeptide 2	DNCL12	AW997536	Hs.369068	2,36
53	BTB (POZ) domain containing 6	BTBD6	BE837766	Hs.7367	2,36
54	testis expressed sequence 27	TEX27	BE836906	Hs.6120	2,37
55	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	CAPZB	BF837672	Hs.333417	2,37
56	cyclin I	CCNI	D50310	Hs.369110	2,37
57	hypothetical protein FLJ11336	FLJ11336	NM_018393	Hs.22383	2,38
58	insulin receptor tyrosine kinase substrate	LOC55971	BE071837	Hs.23449	2,38
59	degenerative spermatocyte homolog, lipid desaturase (Drosophila)	DEGS	AW881634	Hs.299878	2,39
60	integrin, beta 5	ITGB5	BI011964	Hs.149846	2,39
61	KIAA0247 gene product	KIAA0247	BE166432	Hs.82426	2,40
62	serine protease inhibitor, Kunitz type, 2	SPINT2	BG997034	Hs.31439	2,42
63	centaurin, gamma 3	CENTG3	BF955135	Hs.249728	2,43
64	Wolfram syndrome 1 (wolframin)	WFS1	AW901637	Hs.26077	2,44
65	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	COTL1	BE841696	Hs.289092	2,45

66	butyrate-induced transcript 1	HSPC121	BF839730	Hs.458288	2,46
		FLJ2047			
67	hypothetical protein FLJ20473	3	AW875716	Hs.247547	2,47
68	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	MYC	AW384219	Hs.202453	2,47
69	tetracycline transporter-like protein	TETRAN	BI014981	Hs.157145	2,48
		MGC286			
70	hypothetical protein MGC2865	5	BF856397	Hs.242889	2,50
71	phosphofructokinase, platelet	PFKP	AW891548	Hs.498489	2,50
72	short-chain dehydrogenase/reductase 1	SDR1	BF944874	Hs.17144	2,51
73	downregulated in ovarian cancer 1	DOC1	BC027860	Hs.15432	2,55
		KIAA062			
74	KIAA0625 protein	5	BI014579	Hs.460317	2,55
75	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	BE839751	Hs.81328	2,55
76	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase; thyroid hormone binding protein p55)	P4HB	BE710887	Hs.410578	2,55
77	parvin, alpha	PARVA	BE930452	Hs.44077	2,55
78	APMCF1 protein	APMCF1	BF825465	Hs.12152	2,56
79	hepatocellular carcinoma-associated antigen 59	LOC5175 9	AW993261	Hs.278429	2,56
80	microtubule-associated protein 1B	MAP1B	BE701597	Hs.103042	2,57
81	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	ACTR3	BE695452	Hs.433512	2,57
82	NCK adaptor protein 2	NCK2	BF087415	Hs.101695	2,58
83	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	S100A6	BE838215	Hs.275243	2,59
84	neurexin 3	NRXN3	BF944974	Hs.247837	2,59
85	stanniocalcin 1	STC1	BI010260	Hs.25590	2,60
		STARD3			
86	STARD3 N-terminal like	NL	BE927669	Hs.13467	2,60

87	golgi apparatus protein 1	GLG1	BF737415	Hs.78979	2,60
		KIAA118			
88	KIAA1189 protein	9	AW902229	Hs.23941	2,61
89	homer homolog 1 (Drosophila)	HOMER1	AF093262	Hs.129051	2,64
90	death-associated protein	DAP	BE938522	Hs.75189	2,67
91	F-box and leucine-rich repeat protein 8	FBXL8	AW373827	Hs.75486	2,69
92	karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)	KPNA6	AK000724	Hs.372741	2,69
93	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 7	SLC9A7	BF093907	Hs.154353	2,69
		BC00896			
94	hypothetical gene BC008967	7	BF944256	Hs.148258	2,70
95	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	MARK3	BG990012	Hs.437625	2,70
96	ARP1 actin-related protein 1 homolog B, centractin beta (yeast)	ACTR1B	AW363155	Hs.2477	2,72
97	hypothetical protein FLJ12953 similar to Mus musculus D3Mm3e	FLJ12953	BI027777	Hs.323537	2,72
98	transcriptional adaptor 3 (NGG1 homolog, yeast)-like	TADA3L	BF800708	Hs.386390	2,73
		LOC1494			
99	casein kinase	20	BF798801	Hs.29911	2,73
100	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	PAWR	BC007018	Hs.406074	2,74
101	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase, Ehlers-Danlos syndrome type VI)	PLOD	AW370562	Hs.75093	2,75
102	interferon, gamma-inducible protein 30	IFI30	BG004211	Hs.14623	2,77
103	molecule possessing ankyrin repeats induced by lipopolysaccharide (MAIL), homolog of mouse	MAIL	BE937385	Hs.390476	2,81
104	abl-interactor 2	ABI-2	BF996824	Hs.387906	2,81
105	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	TNFAIP3	AW393875	Hs.211600	2,82
106	CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2	CD2BP2	BE837825	Hs.202677	2,83
107	transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome)	TKT	BQ303375	Hs.89643	2,83

		FLJ1030			
108	hypothetical protein FLJ10305	5	BF935406	Hs.445061	2,84
109	carbonic anhydrase XIV	CA14	BF326181	Hs.192491	2,84
110	CTL2 gene	CTL2	BF995787	Hs.105509	2,85
111	transforming growth factor, alpha	TGFA	BE707239	Hs.170009	2,87
	likely ortholog of neuronally expressed calcium binding protein	FLJ1361			
112		2	BI014388	Hs.289242	2,88
113	tumor suppressing subtransferable candidate 1	TSSC1	AW601765	Hs.4992	2,88
114	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2	DNAJA2	BE698761	Hs.368078	2,89
115	connective tissue growth factor	CTGF	BE926068	Hs.410037	2,89
116	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	MARCKS	AK027274	Hs.318603	2,90
117	paralemmin 2	PALM2	BF986322	Hs.42322	2,92
118	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3	PACSIN3	BI044831	Hs.334639	2,96
119	chromosome 20 open reading frame 45	C20orf45	BQ319589	Hs.3945	2,96
		KIAA169			
120	KIAA1698 protein	8	D42041	Hs.76847	2,96
121	ubiquitin-conjugating enzyme E2B (RAD6 homolog)	UBE2B	AW379482	Hs.385986	2,97
122	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4B	SEMA4B	BI044773	Hs.416077	2,99
123	forkhead box P1	FOXP1	BG998789	Hs.235860	3,00
124	kangai 1 (suppression of tumorigenicity 6, prostate; CD82 antigen (R2 leukocyte antigen, antigen detected by monoclonal and antibody IA4))	KAI1	BF853745	Hs.323949	3,02
125	signal recognition particle 72kDa	SRP72	BF856810	Hs.237825	3,07
126	tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	BE929496	Hs.438231	3,11
127	nuclear transcription factor Y, beta	NFYB	BC005317	Hs.84928	3,11

128	catechol-O-methyltransferase likely ortholog of mouse fibronectin type III repeat containing protein 1	COMT	BF376147	Hs.240013	3,11
129		FRCP1	BF948097	Hs.27836	3,13
130	DKFZP434J154 protein	DKFZP43 4J154	BQ322431	Hs.226372	3,14
131	low density lipoprotein receptor-related protein 10	LRP10	BF844001	Hs.28368	3,14
132	CD207 antigen, langerin	CD207	BQ300473	Hs.199731	3,16
133	hippocampus abundant gene transcript 1	HIAT1	AW838469	Hs.21015	3,18
134	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 5	GOLGA5	BE767811	Hs.241572	3,20
135	hypothetical protein FLJ22649 similar to signal peptidase SPC22/23	FLJ2264 9	BE933907	Hs.42194	3,24
136	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	NT5E	BC015940	Hs.153952	3,26
137	interleukin 1, beta	IL1B	AW362995	Hs.126256	3,46
138	thioredoxin interacting protein	TXNIP	BI031027	Hs.179526	3,60
139	hypothetical protein FLJ10055	FLJ1005 5	BF333655	Hs.9398	3,61
140	plasma glutamate carboxypeptidase	PGCP	BQ375071	Hs.197335	3,66
141	protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit	PRKAG2	AW363105	Hs.259842	3,69
142	plasminogen activator, tissue	PLAT	AW394127	Hs.274404	3,70
143	proteoglycan 1, secretory granule	PRG1	BE840880	Hs.1908	3,74
144	polyhomeotic-like 2 (Drosophila)	PHC2	BF821433	Hs.165263	3,95
145	RAB3B, member RAS oncogene family	RAB3B	NM_002867	Hs.123072	3,99
146	sorting nexin 19	SNX19	BE069936	Hs.409862	4,00
147	decidual protein induced by progesterone	DEPP	BF154683	Hs.93675	4,07
148	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A	PPP1R12 A	AW604265	Hs.377908	4,10
149	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	GSN	BE168172	Hs.446537	4,12

150	methyltransferase like 3	METTL3	AK000222	Hs.168799	4,13
151	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2	GNAI2	BE840018	Hs.77269	4,13
152	synaptopodin 2	SYNPO2	BE840322	Hs.24192	4,15
153	hypothetical protein BC009264	LOC151534	BF810949	Hs.437641	4,21
154	karyopherin alpha 3 (importin alpha 4)	KPNA3	AW369095	Hs.407765	4,23
155	PP2135 protein	PP2135	BF807866	Hs.132569	4,24
156	lysyl oxidase-like 2	LOXL2	BE832867	Hs.83354	4,29
157	myosin, light polypeptide kinase	MYLK	BE836934	Hs.506692	4,39
158	coated vesicle membrane protein	RNP24	BE843445	Hs.75914	4,45
159	neutrophil cytosolic factor 2 (65kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 2)	NCF2	BI004008	Hs.949	4,48
160	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	SLC7A2	AL512749	Hs.432978	4,49
161	hypothetical protein 628	LOC56270	AW371654	Hs.201390	4,52
162	small protein effector 1 of Cdc42	SPEC1	BF229686	Hs.22065	4,55
163	ornithine decarboxylase antizyme inhibitor	OAZIN	AW939302	Hs.223014	4,56
164	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	ITGB1	BE825832	Hs.287797	4,60
165	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	AW387479	Hs.8867	4,66
166	hypothetical protein BC016658	LOC144455	BF331960	Hs.416375	4,79
167	benzodiazapine receptor (peripheral)	BZRP	BF892305	Hs.202	4,86
168	normal mucosa of esophagus specific 1	NMES1	BG945328	Hs.112242	5,25
169	glycoprotein, synaptic 2	GPSN2	AF222742	Hs.306122	5,50
170	ras homolog gene family, member E	ARHE	AW821812	Hs.6838	5,51

171	transmembrane 4 superfamily member 10	TM4SF10	AW895519	Hs.8769	6,19
172	WW domain-containing adapter with a coiled-coil region	WAC	AW809205	Hs.370152	6,50
173	chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20	AW391386	Hs.75498	6,52
174	thrombospondin 1	THBS1	BC015134	Hs.164226	6,73
175	insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	BE709006	Hs.1516	7,44
176	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	SERPINB2	BG012063	Hs.75716	7,81
177	ribosomal protein S11	RPS11	AW804519	Hs.433529	11,20
178	cysteine knot superfamily 1, BMP antagonist 1	CKTSF1B1	BF881941	Hs.40098	12,23
179	glioma tumor suppressor candidate region gene 2	GLTSCR2	BF803043	Hs.421907	13,52
180	chromosome 6 open reading frame 69	C6orf69	AW948976	Hs.188757	31,88

nexo 12

Genes diferencialmente expressos em células estromais de crianças com SMD/LMA quando comparado com crianças normais

	Anotação	Símbolo	Genelid	ClusterId	Razã o
1	F-box only protein 5	FBXO5	BE844109	Hs.27202 7	1,97
2	cytochrome c oxidase subunit Vb	COX5B	BF812924	Hs.1342	1,97
3	docking protein 4	DOK4	BC001540	Hs.27983 2	1,98
4	MAX dimerization protein 4	MXD4	AW577006	Hs.51175 2	1,99
5	serum/glucocorticoid regulated kinase	SGK	AW885738	Hs.29632 3	2,01
6	tetratricopeptide repeat domain 1	TTC1	AW748763	Hs.7733	2,01
7	hypothetical protein FLJ23186	FLJ23186	BC017064	Hs.43424 7	2,02
8	netrin 4	NTN4	BF822399	Hs.10254 1	2,03
9	LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	LSM4	AJ238096	Hs.76719	2,03
10	zinc finger protein 217	ZNF217	BE076155	Hs.15504 0	2,03
11	hypothetical protein FLJ10074	FLJ10074	AW814453	Hs.71573	2,03
12	CDC-like kinase 1	CLK1	BI042253	Hs.43373 2	2,04
13	TTK protein kinase	TTK	AW795371	Hs.16984 0	2,04
14	lipocalin 7	LCN7	BC009048	Hs.17350 8	2,04
15	KIAA1423 protein	KIAA1423	BE181145	Hs.99145	2,05
16	cell division cycle associated 8	CDCA8	BG958887	Hs.48855	2,06
17	C2f protein	C2F	BG999376	Hs.13564 3	2,07
18	KIAA0062 protein	KIAA0062	BE708537	Hs.30174 3	2,07
19	likely ortholog of mouse tumor necrosis-alpha- induced adipose-related	FLJ23153	BE714106	Hs.44208	2,07

protein				
20 cathepsin Z	CTSZ	AW392304	Hs.25254 9	2,08
21 potassium channel, subfamily K, member 2	KCNK2	BE819344	Hs.20269 6	2,09
22 ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), Class I, type 8A, member 1	ATP8A1	BE145691	Hs.29138 5	2,10
23 synaptosomal- associated protein, 25kDa	SNAP25	BF952515	Hs.22197 4	2,11
24 lung type-I cell membrane-associated glycoprotein	T1A-2	BI057336	Hs.46867 5	2,11
25 hypothetical protein FLJ31455	FLJ31455	AW899432	Hs.31293	2,12
26 chromosome 14 open reading frame 109	C14orf109	AL080118	Hs.27535 2	2,12
27 sortilin 1	SORT1	BI002054	Hs.39460 9	2,13
28 9 transmembrane protein	TMEM9	BG986387	Hs.18144 4	2,15
29 Kruppel-like factor 5 (intestinal)	KLF5	AW997477	Hs.84728	2,16
30 ubiquitously-expressed transcript	UXT	BG945225	Hs.17279 1	2,16
31 ecotropic viral integration site 2B	EVI2B	BF897809	Hs.5509	2,21
32 hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	HMMR	U29343	Hs.72550	2,22
33 KIAA1416 protein	KIAA1416	BE818371	Hs.39742 6	2,22
34 Fraser syndrome 1	FRAS1	BF828421	Hs.15420	2,24
35 hypothetical protein MGC2628	MGC2628	AK027901	Hs.43634 8	2,24
36 agrin	AGRN	BC007649	Hs.27333 0	2,24
37 Kell blood group	KEL	BF082447	Hs.42032 2	2,25
38 block of proliferation 1	BOP1	BF799598	Hs.51194 5	2,26
39 gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	GJA1	BC026329	Hs.74471	2,27

hypothetical protein			Hs.30098	
40 FLJ12221	FLJ12221	BG003347	0	2,28
hypothetical protein	DKFZP564K			
41 DKFZp564K0322	0322	BF843131	Hs.97876	2,29
sialyltransferase 9 (CMP- NeuAc:lactosylceramide alpha-2,3- sialyltransferase; GM3 synthase)			Hs.41511	
42	SIAT9	BC009887	7	2,29
43 KIAA1138 protein	KIAA1138	BG984423	Hs.19247 7	2,30
44 KIAA1805 protein	KIAA1805	BE816271	Hs.29412 2	2,30
likely ortholog of mouse embryonic epithelial gene 1				
45	EEG1	BF377286	Hs.99962	2,32
topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa			Hs.15634	
46	TOP2A	AW391543	6	2,34
CDK2-associated protein 1			Hs.43320	
47	CDK2AP1	AW370132	1	2,35
zinc finger protein 19 (KOX 12)			Hs.51271	
48	ZNF19	BE075857	7	2,36
49 tumor protein D52	TPD52	AW902185	Hs.16208 9	2,36
hypothetical protein			Hs.29590	
50 FLJ10700	FLJ10700	AK000147	9	2,39
pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1			Hs.50580	
51	PBXIP1	BF087424	6	2,43
kynurenine 3- monooxygenase (kynurenine 3- hydroxylase)			Hs.40908	
52	KMO	BE935505	1	2,43
MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)				
53	MRE11A	BF084768	Hs.20555	2,44
chemokine-like factor super family 4			Hs.32582	
54	CKLFSF4	BE168307	5	2,47
NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)			Hs.10747	
55	NAB1	AW363474	4	2,47
mitochondrial ribosomal protein L27				
56	MRPL27	BE811192	Hs.7736	2,49
57 adican	DKFZp564I1 922	BI003055	Hs.72157	2,49
mitochondrial ribosomal protein S21			Hs.40588	
58	MRPS21	BF800122	0	2,49

59	adrenergic, beta-1-, receptor	ADRB1	J03019	Hs.99913	2,50
60	secretory leukocyte protease inhibitor (antileukoproteinase)	SLPI	BE184402	Hs.25175 4	2,50
61	galactosylceramidase (Krabbe disease)	GALC	L23116	Hs.40827 3	2,50
62	SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)	SOX9	BE003539	Hs.2316	2,51
63	Huntingtin interacting protein C	HYP C	BF747873	Hs.33104	2,52
64	KIAA0601 protein	KIAA0601	AK000297	Hs.34851 5	2,53
65	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional protease 2)	PSMB9	AW939036	Hs.38108 1	2,54
66	chromosome 6 open reading frame 49	C6orf49	BE702842	Hs.26925 4	2,57
67	beta-2-microglobulin	B2M	BI010276	Hs.48516	2,62
68	KIAA1055 protein	KIAA1055	AL109773	Hs.43870 2	2,63
69	regulator of G-protein signalling 16	RGS16	BC006243	Hs.41329 7	2,63
70	metastasis-associated 1-like 1	MTA1L1	AB016591	Hs.17304 3	2,68
71	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	RGS2	BE066709	Hs.78944	2,72
72	Rab9 effector p40	RAB9P40	BC000503	Hs.19012	2,73
73	protein phosphatase methylesterase-1	PME-1	BF842437	Hs.63304	2,74
74	potassium inwardly- rectifying channel, subfamily J, member 15	KCNJ15	BE172254	Hs.17287	2,75
75	sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	SCNN1A	BI019208	Hs.44641 5	2,75
76	thioredoxin reductase 3 MCM2	TXNRD3	BF819586	Hs.20030	2,77
77	minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (<i>S. cerevisiae</i>)	MCM2	BQ300376	Hs.57101	2,77

78	LSM3 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	LSM3	BF851976	Hs.11163 2	2,82
79	fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 6	FACL6	BI042292	Hs.14945	2,84
80	hypothetical protein FLJ20618	FLJ20618	BE831724	Hs.52184	2,85
81	hypothetical protein DKFZp761H0421	DKFZp761H0421	BF090114	Hs.21818 2	2,89
82	KIAA0870 protein	KIAA0870	AL110264	Hs.18166	2,95
83	mitochondrial ribosomal protein S28	MRPS28	AW393825	Hs.55097	2,98
84	G protein-coupled receptor kinase-interactor 1	GIT1	BC005031	Hs.36944 1	3,03
85	acid acyltransferase-epsilon	LPAAT-e	AK021722	Hs.28189 5	3,04
86	rab3 GTPase-activating protein, non-catalytic subunit (150kD)	RAB3-GAP150	BE926775	Hs.19728 9	3,06
87	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	MAPRE2	BF884651	Hs.44637 5	3,09
88	GATA binding protein 4	GATA4	NM_002052	Hs.24398 7	3,10
89	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)	TPX2	BI044030	Hs.9329	3,13
90	sperm associated antigen 9	SPAG9	AK023512	Hs.50036 7	3,19
91	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	IL6ST	AB015706	Hs.71968	3,26
92	lumican	LUM	U21128	Hs.40647 5	3,37
93	very low density lipoprotein receptor	VLDLR	AW863578	Hs.37042 2	3,46
94	protein regulator of cytokinesis 1	PRC1	BE006198	Hs.34403 7	3,46
95	copine III	CPNE3	BE087056	Hs.14158	3,49
96	desmocollin 3	DSC3	AK001100	Hs.41690	3,49
97	chromosome 14 open reading frame 120	C14orf120	AW878300	Hs.9043	3,57

inositol 1,4,5- trisphosphate 3-kinase 98 C	ITPKC	BC026903	Hs.21453	3,59
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 99 (2H9)	HNRPH3	AW878310	Hs.15648 1	3,70
10 kallikrein 2, prostatic	KLK2	BE827763	Hs.18135 0	3,76
odd-skipped-related 2A 10 protein	OSR2	AW796618	Hs.15282 3	3,82
SRY (sex determining 10 region Y)-box 17	SOX17	BE843326	Hs.98367	3,84
10 fructosamine-3-kinase	FN3K	BE159100	Hs.15113 5	3,85
eukaryotic translation initiation factor 4E 10 binding protein 2	EIF4EBP2	AK057643	Hs.27871 2	4,06
10 cyclin M3	CNNM3	BF912294	Hs.41404 2	4,08
CSE1 chromosome segregation 1-like 10 (yeast)	CSE1L	AF053641	Hs.90073	4,15
mitochondrial ribosomal 10 protein L44	MRPL44	BE774695	Hs.20355 9	4,38
osteoblast specific 10 factor 2 (fasciclin I-like)	OSF-2	BE156625	Hs.13634 8	4,43
alpha-2-glycoprotein 1, 10 zinc	AZGP1	NM_00118 5	Hs.51264 3	4,48
UBX domain containing 11 1	UBXD1	AW793772	Hs.43525 5	4,50
family with sequence 11 similarity 8, member A1	FAM8A1	AW391535	Hs.95260	4,70
hypothetical protein 11 FLJ39963	FLJ39963	BF874151	Hs.44298	5,05
hypothetical protein 11 BC010682	LOC90550	BE931770	Hs.4896	5,11
T-cell activation protein 11 phosphatase 2C	TA-PP2C	BF959926	Hs.13854	5,21
Homo sapiens cDNA: FLJ21545 fis, clone 11 COL06195		AK054860	Hs.83623	5,22
mitochondrial ribosomal 11 protein L47	MRPL47	BE159811	Hs.28373 4	5,32
FBJ murine osteosarcoma viral 11 oncogene homolog B	FOSB	BF880644	Hs.75678	5,46
11 fibulin 1	FBLN1	AF217999	Hs.44524 0	8,59

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aizawa S, Hiramoto M, Hoshi H, Toyama K, Shima D, Handa H. Establishment of stromal cell line from na MDS RA patient which induced na apoptotic change in hematopoietic and leukemic cells in vitro. (2000) Exp. Hematol. 28 (2): 148 – 55.

Allan VJ, Schroer TA. Membrane motors. Curr Opin Cell Biol. 1999;11(4):476-82.

Alvi S, Shaher A, Shetty V, Henderson B, Dangerfield B, Zorat F, Joshi L, Anthwal S, Lisak L, Little L, Gezer S, Mundle S, Reddy PL, Allampallam K, HuangX, Galili N, Borok RZ, Raza A. Successful establishment of long-term bone marrow cultures in 103 patients with myelodysplastic syndromes. Leuk Res. 2001;25(11):941-54

Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, Inuzuka M. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. Biochem Biophys Res Commun. 2004;314(3):902-7.

Baugh LR, Hill AA, Brown EL, Hunter CP. Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. Nucleic Acids Res. 2001;29(5):E29.

Beardmore VA, Ahonen LJ, Gorbsky GJ, Kallio MJ. Survivin dynamics increases at centromeres during G2/M phase transition and is regulated by microtubule-attachment and Aurora B kinase activity. J Cell Sci. 2004;117(Pt 18):4033-42.

Behrens P, Brinkmann U, Wellmann A. CSE1L/CAS: its role in proliferation and apoptosis. *Apoptosis*. 2003;8(1):39-44.

Behrens R, Nurse P. Roles of fission yeast *tea1p* in the localization of polarity factors and in organizing the microtubular cytoskeleton. *J Cell Biol*. 2002;157(5):783-93.

Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet*. 1997;16(2):174-8.

Bennett J. The World Health Organization (WHO) classification of the acute leukemias and the myelodysplastic syndromes. *Intern. J. Hematol*. 2000, 72: 131 – 133.

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

Bernard R, Greenberg R, Wilson F, Woo L. Granulopoietic effects of human bone marrow fibroblastic cells and abnormal in the “granulopoietic microenvironment”. *Blood*, 1981; 58 (3): 557 – 564.

Blow JJ, Hodgson B. Replication licensing--defining the proliferative state? *Trends Cell Biol*. 2002;12(2):72-8.

Borojevic R, Carvalho MA, Correa-Junior JD, Arcanjo K, Gomes L, Joazeiro PP, Balduino A, Wettreich A, Coelho-Sampaio T. Stroma-mediated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) control of myelopoiesis: spatial organisation of intercellular interactions. *Cell Tissue Res.* 2003;313(1):55-62.

Borojevic R, Roela RA, Rodarte RS, Thiago LS, Pasini FS, Conti FM, Rossi MI, Reis LF, Lopes LF, Brentani MM. Bone marrow stroma in childhood myelodysplastic syndrome: Composition, ability to sustain hematopoiesis in vitro, and altered gene expression. *Leuk Res.* 2004;28(8):831-44.

Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, BarryFP. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res.* 1998;13(4):655-63.

Camargo AA, Samaia HPB, Dias-Neto E, Simão DF, Migotto IA, Briones MRS, Costa FF, Nagai MA, Verjovski-Almeida S, Zago MA, Andrade LEC, Carrer H, El-Dorry HFA, Espreafico EM, Habr- Gama A, Giannella-Neto D, Goldman GH, Gruber A, Hackel C, Kimura ET, Maciel RMB, Marie SKN, Martins EAL, Nóbrega MP, Paçó-Larson ML, Pardini MIMC, Pereira GG, Pesquero JB, Rodrigues V, Rogatto SR, Silva IDCG, Sogayar MC, Sonati MF, Tajara EH, Valentini SR, Alberto FL, Amaral MEJ, Aneas I, Arnaldi LAT, Assis AM, Bengston MH, Bergamo NA, Bombonato V, Camargo MER, Canevari RA, Carraro DM, Cerutti JM, Corrêa MLC, Corrêa RFR, Costa MCR, Curcio C, Hokama POM, Ferreira AJS, Furuzawa GK, Gushiken T, Ho PL, Kimura E,

Krieger JE, Leite LCC, Majumder P, Marins M, Marques ER, Melo ASA, Melo M, Mestriner CA, Miracca EC, Miranda EC, Nascimento ALTO, Nóbrega FG, Ojopi EPB, Padolfi JRC, Pessoa LG Prevedel AC, Rahal P, Rainho CA, Reis EMR, Ribeiro ML, Rós N, Sá RG, Sales MM, Sant'anna SC, Santos ML, Silva AM, Silva NP, Silva W, Silveira RA, Sousa JF, Stecconi D, Tsukumo F, Valente V, Soares F, Moreira ES, Nunes DN, Correa RG, Zalcborg H, Carvalho AF, Reis LF, Brentani RR, Simpson AJG, Souza SJ. (2001) The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of human transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98 (21): 12103 – 12108.

Chessels JM. Chapter 4 - Myelodysplastic syndromes by Judith M. second edition. *Pediatric Hematology*. Edited by John Lilleyman, Ian Hann and Victor Blanchette. Churchill Livingstone, 1998: 83 – 101.

Chichester CO, Fernandez M, Minguell JJ. Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts. *Cell Adhes Commun*. 1993;1(2):93-9.

Chojnowski K, Trelinski J, Wawrzyniak E, Sobolewska M, Mielicki W. Assessment of coagulation disorders and cancer procoagulant activity in patients with myelodysplastic syndromes. *Neoplasma*. 2002;49(3):155-8.

Chomczynski P & Sacchi N (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162: 156-159.

Church GM & Gilbert W. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984; 81: 1991 – 1995.

Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1999;181(1):67-73.

Coutinho LH, Geary CG, Chang J, Harrison C, Testa NG. Functional studies of bone marrow haemopoietic and stromal cells in the myelodysplastic syndrome (MDS). *Brit J Haematol* 1990;75:16-25.

Deeg HJ, Beckham C, Loken MR, Bryant E, Lesnikova M, Shulman HM, Gooley T. Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma.* 2000 Apr;37(3-4):405-14.

Deryugina EI, Muller-Sieburg CE. Stromal cells in long-term cultures: keys to the elucidation of hematopoietic development? *Crit Rev Immunol.* 1993;13(2):115-50.

Droin NM, Pinkoski MJ, Dejardin E, Green DR. Egr family members regulate nonlymphoid expression of Fas ligand, TRAIL, and tumor necrosis factor during immune responses. *Mol Cell Biol.* 2003;23(21):7638-47.

Dührsen U, Hossfeld DK. Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. *Ann. Hematol.*, 1996; 73: 53 – 70.

Fenaux P, Chomienne C. Biology and treatment of acute promyelocytic leukemia. *Curr Opin Oncol*. 1996;8(1):3-12. Review.

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

Galmiche MC, Koteliensky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*. 1993;82(1):66-76.

Gardner H, Haas OA. Experience in pediatric myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1992; 6: 655 – 672.

Glover DM. Aurora A on the mitotic spindle is activated by the way it holds its partner. *Mol Cell*. 2003 ;12(4):797-9.

Gomez AM, Kerfant BG, Vassort G, Pappano AJ. Autonomic regulation of calcium and potassium channels is oppositely modulated by microtubules in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(6):H2065-71.

Gosset P, Ghezala GA, Korn B, Yaspo ML, Poutska A, Lehrach H, Sinet PM, Creau N. A new inward rectifier potassium channel gene (KCNJ15) localized on chromosome 21 in the Down syndrome chromosome region 1 (DCR1). *Genomics*. 1997;44(2):237-41.

Groet J, McElwaine S, Spinelli M, Rinaldi A, Burtscher I, Mulligan C, Mensah A, Cavani S, Dagna-Bicarelli F, Basso G, Cotter FE, Nizetic D. Acquired mutations in GATA1 in neonates with Down's syndrome with transient myeloid disorder. *Lancet*. 2003;361(9369):1617-20.

Gupta P, Oegema TR Jr, Brazil JJ, Dudek AZ, Slungaard A, Verfaillie CM. Structurally specific heparan sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche. *Blood*. 1998;92(12):4641-51.

Hangoc G, Daub R, Maze RG, Falkenburg JH, Broxmeyer HE, Harrington MA. Regulation of myelopoiesis by murine fibroblastic and adipogenic cell lines. *Exp Hematol*. 1993;21(4):502-7.

Hasle H, Heim S, Schroder H. Transient pancytopenia preceding acute lymphoblastic leukemia (pre-ALL). *Leukemia*, 1995; 9: 605 – 608.

Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 1992;13(1):81-8.

Hirayama Y, Kohgo Y, Matsunaga T, Ohi S, Sakamaki S, Niitsu Y. Cytokine mRNA expression of bone marrow stromal cells from patients with aplastic anaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 1993, 85(4):676-83.

Hu MG, Hu GF, Kim Y, Tsuji T, McBride J, Hinds P, Wong DT. Role of p12(CDK2-AP1) in transforming growth factor-beta1-mediated growth suppression. *Cancer Res*. 2004 Jan 15;64(2):490-9.

Ikushima S, Inukai T, Inaba T, Nimer SD, Cleveland JL, Look AT. Pivotal role for the NFIL3/E4BP4 transcription factor in interleukin 3-mediated survival of pro-B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(6):2609-14.

Jiang W, Jimenez G, Wells NJ, Hope TJ, Wahl GM, Hunter T, Fukunaga R. PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. *Mol Cell*. 1998;2(6):877-85.

Kamohara H, Sakamoto K, Ishiko T, Masuda Y, Abe T, Ogawa M. Leukemia inhibitory factor induces apoptosis and proliferation of human carcinoma cells through different oncogene pathways. *Int J Cancer*. 1997;72(4):687-95.

Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 1996 Jul 12;273(5272):245-8.

Koller MR, Bender JG, Miller WM, Papoutsakis ET. Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. *Exp Hematol*. 1992;20(2):264-70.

Kouides PA, Bennett JM. Understanding the myelodysplastic syndromes. *Oncologist* 1997;2:389-401.

Lee YT, Miller LD, Gubin AN, Makhoul F, Wojda U, Barrett J, Liu ET, Miller JL. Transcription patterning of uncoupled proliferation and differentiation in myelodysplastic bone marrow with erythroid-focused arrays. *Blood*, 2001;98: 1914-1921.

Lopes LF, Lorand-Metze I. Childhood myelodysplastic syndromes in Brazilian population. *Pediatric hematology and Oncology* 1999, 16: 347 – 353.

Luna-Fineman S, Shannon KM, Lange BJ. Childhood monosomy 7: epidemiology, biology and mechanistic implications. *Blood* 1995, 85:1985 - 1999.

Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in Children. Luiz Fernando Lopes & Henrik Hasle. Ed. Lemar, Capítulo 18 – Experience on MDS and JMML from Brazil. Capítulo 6: The importance of Bone Marrow histology in MDS. Lorand-Metze I. . 2003, p. 89 – 102.

Martin PE, Evans WH. Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions. *Cardiovasc Res*. 2004;62(2):378-87.

Martin-Subero JI, Harder L, Gesk S, Schoch R, Novo FJ, Grote W, Calasanz MJ, Schlegelberger B, Siebert R. Amplification of ERBB2, RARA, and TOP2A genes in a myelodysplastic syndrometransforming to acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;127(2):174-6.

Maughan NJ, Lewis FA, Smith V. An introduction to arrays. *Journal of Pathology*, 2001; 195: 3 – 6.

Mauritzson N, Albin M, Rylander L, Billstrom R, Ahlgren T, Mikoczy Z, BjorkJ, Stromberg U, Nilsson PG, Mitelman F, Hagmar L, Johansson B. Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001. *Leukemia*. 2002;16(12):2366-78.

Meraldi P, Draviam VM, Sorger PK. Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell*. 2004;7(1):45-60.

Mittelman M, Zeidman A. Platelet function in the myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol*. 2000;71(2):95-8.

Miyazato A, Ueno S, Ohmine K, Ueda M, Yoshida K, Yamashita Y, Kaneko T, Mori T, Kirito K, Toshima M, Nakamura Y, Saito K, Kano Y, Furusawa S, Ozawa K, Mano H. Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 2001, 98: 422 – 427.

Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in Children. Luiz Fernando Lopes & Henrik Hasle. Ed. Lemar, Capítulo 18 – Experience on MDS and JMML from Brazil. Luiz Fernando Lopes & Maria do Rosário Dias Latorre. 2003, p. 259 – 270.

Narendran A, Hawkins LM, Ganjavi H, Vanek W, Gee MF, Barlow JW, Johnson G, Malkin D, Freedman MH. Characterization of bone marrow stromal abnormalities in a patient with constitutional trisomy 8 mosaicism and myelodysplastic syndrome. *Pediatr Hematol Oncol*. 2004;21(3):209-21.

Neubauer A, Dodge RK, George SL, Davey FR, Silver RT, Schiffer CA, Mayer RJ, Ball ED, Wurster-Hill D, Bloomfield CD, et al. Prognostic importance of mutations in the ras proto-oncogenes in de novo acute myeloid leukemia. *Blood*. 1994;83(6):1603-11.

Neubauer A, Shannon K, Liu E. Mutations of the ras proto-oncogene in childhood monosomy 7. *Blood*, 1991; 77(3): 594-598.

Noiges R, Eichinger R, Kutschera W, Fischer I, Nemeth Z, Wiche G, Propst F. Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: light chains determine distinct functional properties. *J Neurosci*. 2002;22(6):2106-14.

Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(8):592-603.

Oshima Y, Ueda M, Yamashita Y, Choi YL, Ota J, Ueno S, Ohki R, Koinuma K, Wada T, Ozawa K, Fujimura A, Mano H. DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2003;17(10):1990-7.

Panda DK, Miao D, Lefebvre V, Hendy GN, Goltzman D. The transcription factor SOX9 regulates cell cycle and differentiation genes in chondrocytic CFK2 cells. *J Biol Chem*. 2001;276(44):41229-36.

Paquette RL, Landaw EM, Pierre RV, N-Ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. *Blood* 1993, 82: 590 – 599.

Perdersen-Bjergaard J, Perdersen M, Roulston D, Philip P. Different genetic pathway in leukemogenesis for patients presenting with therapy-related myelodysplasia and therapy-related acute myeloid leukemia. *Blood* 1995, 9: 3542 – 3552.

Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, Ruskoaho H. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res*. 2004;63(2):196-207.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284(5411):143-7.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-4.

Puch S, Armeanu S, Kibler C, Johnson KR, Muller CA, Wheelock MJ, Klein G. N-cadherin is developmentally regulated and functionally involved in early hematopoietic cell differentiation. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 8):1567-77.

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

Quackenbush SL, Rovnak J, Casey RN, Paul TA, Bowser PR, Sutton C, Casey JW. Genetic relationship of tumor-associated piscine retroviruses. *Mar Biotechnol (NY)*. 2001 (Supplement 1):S88-99.

Quesnel B, Guillermin G, Vereecque R, Wattel E, Preudhomme C, Bauters F, Vanrumbeke M, Fenaux P. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood*. 1998;91(8):2985-90.

Raza A, Gezer S, Mundle S, Gao X, Alvi S, Borok R, Rifkin S, Iftikhar A, Shetty V, Parcharidou A, Loew J, Marcus R, Preisler H. Apoptosis in bone marrow biopsy sample involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*, 1995a; 86: 268 – 276.

Raza A, Mundle S, Gezer S, Gao X, Alvi S, Borok R, Rifkin S, Iftikhar A, Shetty V, Parcharidou A, Loew J, Marcus R, Preisler H. Simultaneous assessment of kinetics and programmed cell death in bone marrow biopsies of myelodysplasias reveals extensive apoptosis as probable basis for ineffective hematopoieses. *Am J Hematol*. 1995b; 48: 143 – 154.

Raza A, Mundle S, Shetty V, Alvi S, Chopra H, Span L, Parcharidou A, Dar S, Venugopal P, Borok R, Gezer S, Showel J, Loew J, Robin E, Rifkin S, Alston D, Hernandez B, Shah R, Kaizer H, Gregory S. Novel insights into the

biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. *Int J Hematol*. 1996 Jun;63(4):265-78.

Raza A. Initial transforming event in myelodysplastic syndromes may be viral: case for cytomegalovirus. *Med Oncol*. 1998;15(3):165-73.

Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol*. 2003;23(12):4219-29.

San Miguel JF, Hernandez JM, Gonzalez-Samienro R. Acute leukemia after a primary myelodysplastic syndrome: immunophenotypic, genotypic, and clinical characteristics. *Blood*. 1991, 78: 768 – 774.

Schofield KP, Humphries MJ, de Wynter E, Testa N, Gallagher JT. The effect of alpha4 beta1-integrin binding sequences of fibronectin on growth of cells from human hematopoietic progenitors. *Blood*. 1998;91(9):3230-8.

Simmons DJ, Seitz P, Kidder L, Klein GL, Waeltz M, Gundberg CM, Tabuchi C, Yang C, Zhang RW. Partial characterization of rat marrow stromal cells. *Calcif Tissue Int*. 1991;48(5):326-34.

Sperr WR, Wimazal F, Kundi M, Fonatsch C, Thalhammer-Scherrer R, Scherthaner GH, Schwarzingner I, Haas OA, Geissler K, Lechner K, Valent P. Survival analysis and AML development in patients with de novo myelodysplastic syndromes: comparison of six different prognostic scoring systems. *Ann Hematol* 2001, 80: 272 – 277.

Tehranchi R, Fadeel B, Forsblom AM, Christensson B, Samuelsson J, Zhivotovsky B, Hellstrom-Lindberg E. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits spontaneous cytochrome c release and mitochondria-dependent apoptosis of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitors. *Blood*. 2003;101(3):1080-6.

Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A. Acute panmyelosis with myelofibrosis. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(4):681-7.

Timar J, Diczhazi C, Bartha, Ladanyi A, Tarcsafalvi A, Lapis K. PMA induces shift from chondroitin to heparan sulphate on proteoglycans correlating with fibronectin adhesion of MDS human leukemia cells. *Anticancer Res*. 1994;14(3A):1227-31.

Twal WO, Czirok A, Hegedus B, Knaak C, Chintalapudi MR, Okagawa H, Sugi Y, Argraves WS. Fibulin-1 suppression of fibronectin-regulated cell adhesion and motility. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 24):4587-98.

Ueda M, Ota J, Yamashita Y, Choi YL, Ohki R, Wada T, Koinuma K, Kano Y, Ozawa K, Mano H. DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 2003;123(2):288-96.

van der Slot AJ, Zuurmond AM, Bardoel AF, Wijmenga C, Pruijs HE, Sillence DO, Brinckmann J, Abraham DJ, Black CM, Verzijl N, DeGroot J, Hanemaaijer R, TeKoppele JM, Huizinga TW, Bank RA. Identification of PLOD2 as

telo peptide lysyl hydroxylase, an important enzyme in fibrosis. *J Biol Chem.* 2003;278(42):40967-72.

Verfaillie CM. Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis. *Blood.* 1992;79(11):2821-6.

Verfaillie CM. Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. *Blood,* 1998; 92(8): 2609 – 2612.

Vij N, Roberts L, Joyce S, Chakravarti S. Lumican suppresses cell proliferation and aids Fas-Fas ligand mediated apoptosis: implications in the cornea. *Exp Eye Res.* 2004;78(5):957-71.

Voit S, Udelhoven M, Lill G, Aktas B, Nieswandt B, Schror K, Weber AA. The C-terminal peptide of thrombospondin-1 stimulates distinct signaling pathways but induces an activation-independent agglutination of platelets and other cells. *FEBS Lett.* 2003;544(1-3):240-5.

Wang E, Miller LD, Otnmacht GA, LIU ET, Marincola FM. High-fidelity mRNA amplification for gene profile. *Nat Biotechnol.* 2000; 18(4): 457-9.

Weinstein R, Riordan MA, Wenc K, Kreczko S, Zhou M, Dainiak N. Dual role of fibronectin in hematopoietic differentiation. *Blood.* 1989;73(1):111-6.

Wellmann A, Krenacs L, Fest T, Scherf U, Pastan I, Raffeld M, Brinkmann U. Localization of the cell proliferation and apoptosis-associated CAS protein in lymphoid neoplasms. *Am J Pathol.* 1997;150(1):25-30.

Westwood NB, Mufti GJ. Apoptosis in the myelodysplastic syndromes. *Curr Hematol Rep.* 2003;2(3):186-92.

Winter SS, Hanissian GA, Harville TO, Ware RE. Tumor necrosis factor-alpha suppresses hematopoiesis in children with myelodysplasia. *Med Pediatr Oncol.* 1997;28(1):69-74.

Yang YL, Chuang LY, Guh JY, Liu SF, Hung MY, Liao TN, Huang YL. Thrombospondin-1 mediates distal tubule hypertrophy induced by glycated albumin. *Biochem J* 2004; 379 (Pt 1): 89-97.

APÊNDICE