



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

ANA CAROLINA DOS SANTOS FERREIRA

“Efeito de HDACi combinado com quimioterápico e PI3Ki na proliferação e migração de células do linfoma de Burkitt”

Orientadora: Prof. Dr^a Claudete Esteves Klumb.

**RIO DE JANEIRO
2015**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

ANA CAROLINA DOS SANTOS FERREIRA

“Efeito de HDACi combinado com quimioterápico e PI3Ki na proliferação e migração de células do linfoma de Burkitt”

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia

Orientadora: Prof. Dr^a Claudete Esteves Klumb.

**RIO DE JANEIRO
2015**

F383e Ferreira, Ana Carolina dos Santos.

Efeito de HDACi combinado com quimioterápico e PI3Ki na proliferação e migração de células do Linfoma de Burkitt / Ana Carolina dos Santos Ferreira. – Rio de Janeiro, 2015.

183 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2015.

Orientador: Claudete Esteves Klumb.

1. Linfoma de Burkitt. 2. HDACi. 3. Proliferação de Células. 4. PI3K. 5. miRNA. 6. Movimento Celular. I. Klumb, Claudete Esteves (orient). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99442



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

ANA CAROLINA DOS SANTOS FERREIRA

“Efeito de HDACi combinado com quimioterápico e PI3Ki na proliferação e migração de células do linfoma de Burkitt”

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Claudete Esteves Klumb

Aprovada em: 30/03/2015

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego
Prof. Dr^a. Etel Rodrigues Pereira Gimba
Prof. Dr. Franklin Rumjanek
Prof. Dr^a. João Paulo de Biase Viola
Prof. Dr^a. Jose Morgado Dias
Prof. Dr^a. Morgana Teixeira Lima Castelo Branco

**RIO DE JANEIRO
2015**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

*À minha família: bem mais
precioso que eu poderia ter*



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dr^a Claudete Klumb pela confiança, pelo apoio e pela dedicação durante toda a realização do projeto da tese e também por acreditar nas minhas ideias malucas e repentinas como a inclusão do estudo de migração.

À Dr^a Raquel Maia, chefe do nosso laboratório, pelo incentivo e por nos proporcionar ótimas condições de trabalho.

Aos meus companheiros do grupo dos linfomas, Marcela e Luciano que tornaram os dias mais divertidos e as discussões científicas extremamente proveitosas principalmente quando o Luciano fazia café.

A todos os alunos, ex-alunos e funcionários que passaram pelo Laboratório de Hemato-Oncologia durante os 13 anos que estive por lá. Obrigada pelo companheirismo, amizade e pelo convívio que me proporcionou crescimento pessoal e profissional.

À Dr^a Lidia Maria Magalhães pelo auxílio na seleção dos casos de pacientes a serem estudados.

À Dr^a Patrícia Severino por todo o apoio nos experimentos e análises de microarranjo de DNA e sua aluna Flávia Maziero que além de auxiliar na execução do experimento se tornou uma amiga muito querida.

À Dr^a Patrícia Favaro e sua infinita paciência ao me orientar, por telefone e e-mail, na realização dos ensaios com *transwells*.

À Dr^a Anne Ridley por ter recebido de braços abertos uma garota desconhecida que pegou um avião e bateu na porta do seu laboratório no *King's College London* com uma mala na mão, uma ideia na cabeça e um sonho no coração.

Aos amigos Tállita, Luccas e Rodolfo pela amizade, brincadeiras, gargalhadas, pelos sábados à noite na Lapa e pelos almoços de domingo também.

À Gabriela e à Fran que junto com a Tállita, o Luccas, Rodolfo e Tavares formaram por um período a minha família de alojamento.

Aos meus pais, irmãos e tia que me forneceram todo o equilíbrio necessário para prosseguir.

Aos “Black hand”. Acho que a palavra tudo resume bem o motivo dos agradecimentos.

À amiga Jolie por tudo o que me ensinou e a cima de tudo por me mostrar que ciência é feita de amor, dedicação e persistência.

À Débora (Dimenó), Déborah e Diogo pela amizade iniciada no laboratório e que não se perdeu com o tempo e a distância.

Ao trio da secretaria da pós-graduação que agilizou toda a burocracia para a defesa.

Aos órgãos de fomento, FAPERJ e Capes e ao Programa de Oncobiologia que financiaram o projeto.

E por último, porém não menos importante, aos Beatles e ao Bloco do Sargento Pimenta que preservaram minha sanidade mental incluindo a música na minha vida toda quarta à noite.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-
graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

“EFEITO DE HDACi COMBINADO COM QUIMIOTERÁPICO E PI3Ki NA PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DO LINFOMA DE BURKITT”

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Ana Carolina dos Santos Ferreira

O Linfoma de Burkitt (LB) é o subtipo de linfoma de células B mais comum na infância. As recentes descobertas relacionadas à patogênese do LB evidenciaram a ativação da via de PI3K em cooperação com c-Myc no desenvolvimento do LB. Neste estudo, observamos que a via de PI3K/Akt é alvo de Inibidores de Histona Deacetilase (HDACi) em células do LB. A combinação do HDACi (NaB) e quimioterapia (VP-16) inibiu a proliferação e levou a parada do ciclo celular em G2/M com concomitante diminuição na fase S. Análises de microarranjo mostraram regulação diferencial de 500 genes após o tratamento com VP-16, 729 genes com NaB e 1413 genes com a combinação NaB/VP-16, indicando uma possível ação sinérgica dessa combinação. As análises transcricionais revelaram alterações nos níveis de RNAm relacionados com processos como: parada no ciclo celular, vias relacionadas com p53, reparo de DNA e fosforilação, incluindo a desregulação de PI3K. Além disso, a inibição do crescimento celular foi relacionada com a redução da fosforilação de Akt e diminuição da expressão de c-Myc em aproximadamente 60% ($p \leq 0.005$). Adicionalmente, HDACi levou ao aumento da expressão de miRNAs envolvidos na via de PI3K/Akt e proliferação celular como miR-101, miR-143 e miR-145 em linhagem celular de LB. Os níveis dos mesmos miRNAs estavam extremamente reduzidos em 46 amostras tumorais de pacientes com LB. Uma vez determinada a participação da via de PI3K/Akt na resposta ao tratamento com HDACi, investigamos o efeito da combinação de HDACi (SAHA) e inibidor de PI3K LY294002 nas células do LB. Observamos que a combinação é capaz de promover parada das células em G0/G1 com diminuição da proliferação celular. Quando avaliamos o efeito da combinação SAHA/LY294002 na capacidade de migração celular observamos diminuição da capacidade de migração. Ao analisar a expressão de α -tubulina e f-actina observamos que o tratamento combinado diminuiu o número de células polarizadas, corroborando o resultado do ensaio de migração celular. Entretanto, isso não foi correlacionado com a expressão de Cdc42, uma RhoGTPase envolvida com a polarização celular. Adicionalmente, o tratamento com SAHA resultou em aumento da acetilação de tubulina, alvo de HDAC6. A análise da expressão gênica das famílias *Rho A, B, C*; *Rac 1, 2 e 3* e *Rnd 1, 2 e 3* revelou aumento de expressão de todos os genes. No entanto, apenas a expressão protéica de RhoB apresentou correlação com os dados obtidos através do ensaio de qPCR. Em conclusão, nossos resultados apontam para a potencialidade de combinação de HDACi com outras drogas alvo cuja ação envolve as novas vias de sinalização alteradas no LB. Esta abordagem terapêutica pode melhorar o resultado do tratamento nos casos de LB refratário não responsivo à primeira linha de tratamento, além de contribuir para a compreensão da patogênese.

Palavras-chave: Linfoma de Burkitt, HDACi, proliferação celular, PI3K, miRNA, migração celular



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

ABSTRACT

Burkitt lymphoma (BL) is a B-cell lymphoma more common in children. The recent discovery in BL pathogenesis highlighted the activation of PI3K pathway in cooperation with Myc in BL development. In this study we demonstrated that PI3K/Akt pathway is a target to HDACi in BL cells. The combination of HDACi (NaB) and chemotherapy (VP16), inhibited the proliferation and enhanced the blockage of the cell cycle progression at G2/M with a concurrent decrease in the S phase. Microarray profile showed a synergistic action of NaB/VP-16 combination through the differential regulation of 1413 genes compared to 500 genes regulated by VP-16 and 729 by NaB. Transcriptional analyses showed changes in mRNA levels of pathways related to p53, DNA repair, phosphorylation, PI3K deregulation. Besides, the inhibition of the cell growth was related to reduced Akt phosphorylation, and decrease of c-Myc protein expression by about 60% ($p \leq 0.005$). Moreover, HDACi enhanced the expression of miRNAs related to PI3K/Akt pathway and proliferation as miR-101, miR-143, and miR-145 in BL cell line. The same miRs were found to be extremely downregulated in 46 paediatric BL samples. Since PI3K/Akt pathway is involved in HDACi treatment response, we investigated the effect of HDACi SAHA and PI3Ki LY294002 combination in BL cells. The combination leads to cell cycle arrest in G0/G1 fase, cell proliferation inhibition. The SAHA/LY294002 treatment also inhibits the cell migration. The combined treatment decreased the number of polarized cells, observed by α -tubulin and f-actin staining. However it was not related to Cdc42 expression. In addition, SAHA treatment leads to tubulin acetylation, which is HDAC6 target. Rho family as *Rho A, B, C; Rac 1, 2 e 3 e Rnd 1, 2 e 3* expression increased. Nevertheless, only RhoB protein levels were correlated to qPCR data. In conclusion, our data suggest that a combinatorial approach complementing existing chemotherapy strategies is promising for BL treatment.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O Linfoma de Burkitt como Modelo de Estudo	1
1.2 Myc translocado: possível alvo terapêutico?	5
1.3 Via de sinalização de PI3K/Akt	7
1.4 Inativação de $p16^{INK4a}$ contribuindo com a proliferação do LB	10
1.5 Epigenética	12
1.5.1 Modificações em Histonas	12
1.5.2 Os microRNAs	13
1.6 Migração Celular	17
1.6.1 Mecanismos celulares e moleculares relacionados com a migração celular	18
1.6.2 O papel da família Rho <i>GTPase</i> na migração celular	20
1.7 Novas abordagens terapêuticas	23
1.7.1 Os inibidores de Histona Deacetilase	23
1.7.2 Os inibidores de PI3K	26
1.8 Justificativa para o estudo	27
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo principal	28
2.2 Objetivos secundários	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Seleção de pacientes	29
3.2 Cultura de Células	29

3.3 Identificação das Linhagens Celulares	30
3.4 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)	30
3.5 Viabilidade celular por exclusão com azul de tripan	31
3.6 Ensaio de Indução de Apoptose (Annexin V)	31
3.7 Análise do ciclo celular	32
3.8 Perfil de expressão gênica	32
3.9 Marcação de Proteínas Intracelulares	33
3.10 Dosagem de Proteína pelo Método de Lowry	33
3.11 Western Blotting	34
3.12 Pirosequenciamento	35
3.13 PCR quantitativo em tempo real	37
3.14 Quantificação de miRNA em amostras de pacientes	40
3.15 Avaliação da migração celular	40
3.16 Imunofluorescência	41
3.17 Avaliação da Ativação de RhoA	42
3.18 Análise Estatística	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Investigação do efeito da combinação NaB/VP-16 na inibição do crescimento e parada no ciclo celular na linhagem derivada de LB	43
4.2 Avaliação da participação da via de PI3K/Akt na inibição do crescimento celular mediada pelo tratamento com NaB/VP-16	45
4.3 Análise da expressão de c-Myc e o efeito na proliferação celular	49
4.4 Análise dos níveis de expressão de proteína e de RNAm de <i>p16^{INK4a}</i> nas células do LB	50
4.5 Avaliação da expressão dos microRNAs miR-101, miR-143 e miR-145 na linhagem Raji e nas amostras de pacientes com LB	51
4.6 Análise do efeito da inibição da via de PI3K isoladamente ou combinada com a inibição de HDAC na viabilidade de linhagens celulares derivadas de LB	53
4.7 Avaliação da combinação de HDACi e PI3Ki na indução de morte	56

celular no LB	
4.8 Determinação da influência da combinação SAHA/LY na distribuição do ciclo celular	58
4.9 Investigação do efeito mediado pelo SAHA, LY e suas combinações na via de PI3K/Akt	60
4.10 Avaliação da modulação da expressão dos miR-143 e -145 mediada por SAHA e LY	61
4.11 Avaliação da capacidade de migração celular após a inibição de PI3K e HDAC	62
4.12 Avaliação do efeito dos inibidores isolados e combinados na morfologia celular	63
4.13 Efeito da inibição de HDAC e PI3K na expressão e atividade de Rho GTPases	67
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES	75
7. NOTA	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ANEXOS

ANEXO I – Artigo publicado durante o aperfeiçoamento

ANEXO II – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO III – Material suplementar I

ANEXO IV – Material suplementar II

ANEXO V – Material suplementar III

ANEXO VI e VII – Prêmios recebidos durante o doutorado

ANEXO VIII – Artigo publicado durante o doutorado

LISTA DE ABREVIACOES

Akt	Protein Kinase B
AMPK	5' AMP-activated protein kinase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Trifosfato de adenosina
BAK	Matador/ antagonista de Bcl-2
BAX	Proteína X ligada à Bcl-2
BCL-2	Proteína de linfoma de células B-2
BCL-XL	Proteína do linfoma de células B extra grandes
BFM	Berlin-Frankfurt-Munich
BIM	B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death
BSA	Albumina sérica bovina
CCND3	Ciclina D3
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
c-DNA	DNA complementar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EBV	Vírus Epstein-Barr
FFPE	Tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina
FS	Fosfatidilserina
GAPs	<i>GTPase-activating proteins</i>
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitors</i>
GEFs	<i>guanine nucleotide exchange factors</i>
GEO	Gene Expression Omnibus
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
HATs	Histona acetiltransferases
HDAC	Histona deacetilases
HDACi	Inibidores de histona deacetilase
ID3	Inhibitor of DNA binding 3
Igs	Imunoglobulinas
KATs	Lisina acetiltransferases
KDMs	Lisina demetilases

KMT	Lisina metiltransferases
LAGC	Linfoma anaplásico de grandes células
LB	Linfoma de Burkitt
LDGCB	Linfoma Difuso de Grandes Células B
LL	Leucemia/Linfoma Linfoblástico
LNH	Linfoma não-Hodgkin
MAD1	mitotic arrest-deficient protein
MAX	myc-associated factor X
MCL-1	Proteína de leucemia de células mielóides-1
miRs	microRNAs
mRNA	RNA mensageiro
MTOC	<i>microtubule organizing centre</i>
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-di-metiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazólio brometo
NaB	Butirato de Sódio
NFκB	Factor nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
PACT	Preoteína ativadora de PKR
PBS	Solução salina de fosfato
PCR	Reação de cadeia da polimerase
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PI	Fosfatidilinositol
PI	Iodeto de propídio
PI3K	Quinases fosfatidilinositol 3
PI3Ki	Inibidor de PI3K
pSG	Probabilidade de Sobrevida Global
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RNAm	RNA mensageiro
RhoA	<i>RAS homologue gene family member</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RTK	Receptores de tirosina quinase

SAHA	Vorinostat
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SG	Sobrevida global
STR	Short Tandem Repeat
TBS	Solução salina de Tris
TCF3	Transcription factor 3
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TRBP	HIV-1 TAR RNA binding protein
TSA	Tricostatina A
TSC	tuberous sclerosis complex
U.S. FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
VP-16	Etoposide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Frequência dos subtipos de Linfoma não-Hodgkin.	2
Figura 1.2: Modelo esquemático representando a inativação de vias apoptóticas e ativação de vias de proliferação.	4
Figura 1.3: Vias moduladas pela desregulação de Myc.	7
Figura 1.4: Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR.	8
Figura 1.5: Biossíntese dos miRNAs.	15
Figura 1.6: Morfologia celular e tipos de migração	19
Figura 1.7: Polarização de leucócitos e Rho GTPases	20
Figura 1.8: Rho GTPases de camundongos	21
Figura 1.9: Papel de Rho GTPases na migração transendotelial	23
Figura 1.10: Efeitos moleculares e fisiológicos do tratamento com HDACi	24
Figura 1.11: A via de PI3K/AKT/mTOR.	26
Figura 3.1: Representação esquemática do princípio do Pirosequenciamento.	35
Figura 3.2: Esquema representativo do ensaio de migração celular.	41
Figura 4.1: Efeito do NaB e VP-16 isolados ou combinados na linhagem Raji.	44
Figura 4.2: Parada no ciclo celular induzida por HDACi mais quimioterapia no LB.	44
Figura 4.3: Diagrama de Venn ilustrando os genes expressos de forma comum ou exclusiva entre células tratadas com NaB, VP-16 e NaB/VP.	46
Figura 4.4: Efeito do tratamento combinado nos níveis de expressão de AKT na linhagem Raji.	49
Figura 4.5: Diminuição da expressão de c-Myc mediada por HDACi.	50
Figura 4.6: Efeito do tratamento combinado nos níveis de expressão de <i>p16^{INK4a}</i> nas células Raji.	51
Figura 4.7: Efeito do HDACi e VP-16 na expressão de miRNAs.	52
Figura 4.8: Perfil de expressão dos <i>miR-101</i>, <i>miR-143</i>, e <i>miR-145</i> em tumorais amostras de pacientes com LB.	53
Figura 4.9: Curva de dose e resposta ao SAHA nas linhagens Namalwa, Daudi e Raji.	54
Figura 4.10: Curva de dose e resposta ao LY nas linhagens Namalwa, Daudi e Raji.	55

Figura 4.11: Efeito do HDACi SAHA isolado, ou combinado com o PI3Ki LY nas linhagens Namalwa, Daudi e Raji.	56
Figura 4.12: Efeito do HDACi SAHA isolado, ou combinado com o PI3Ki LY nas linhagens Namalwa e Daudi.	57
Figura 4.13: Avaliação do efeito do HDACi SAHA isolado, ou combinado com o PI3Ki LY na expressão de proteínas relacionadas com a apoptose na linhagem Namalwa.	58
Figura 4.14: Avaliação do efeito do HDACi SAHA isolado, ou combinado com o PI3Ki LY na distribuição do conteúdo de DNA.	59
Figura 4.15: Avaliação da ativação de vias de proliferação	60
Figure 4.16: Efeito do HDACi SAHA isolado, ou combinado com o PI3Ki LY na fosforilação de proteínas relacionadas com a via de PI3K.	61
Figura 4.17: Efeito do HDACi SAHA isolado, ou combinado com o PI3Ki LY na expressão de miRNAs na linhagem Namalwa.	62
Figure 4.18: Efeito do HDACi SAHA isolado, ou combinado com o PI3Ki LY na capacidade de migração da linhagem Namalwa.	63
Figura 4.19: Alterações no formato celular mediadas por SAHA e LY.	65
Figura 4.20: Quantificação das imagens de fluorescência.	66
Figura 4.21: Avaliação da expressão de Cdc42 e acetilação de tubulina.	67
Figura 4.22: Efeito de SAHA e LY na expressão e atividade de membros da família Rho GTPases.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Sequência dos pares de primers utilizados nas reações de qPCR.	39
Tabela 3.2: Detalhamento dos ciclos da reação de qPCR.	40
Tabela 4.1: Termos de Ontologia gênica (GO) e Kegg (has) significativamente representados considerando genes expressos diferencialmente nos tratamentos VP-16 e NaB/VP-16 vs células não tratadas.	47
Tabela 4.2: Termos de Ontologia gênica (GO) significativamente representados considerando genes expressos diferencialmente apenas no tratamento NaB/VP-16 comparado com células não tratadas.	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Linfoma de Burkitt como Modelo de Estudo

Os linfomas constituem aproximadamente 10-12% de todas as malignidades em pacientes pediátricos (BIRCH *et al.*, 2003; CHIU; WEISENBURGER, 2003; HEEREMA *et al.*, 2005). Desses casos, 7-10% são linfomas não-Hodgkin (LNH) e 4-7% são linfomas de Hodgkin (CHIU; WEISENBURGER, 2003). Em relação à incidência dos casos de LNH, é notório um aumento do número de casos na população ocidental nos últimos anos, principalmente entre os pacientes adultos (CLARKE; GLASER, 2002; HEEREMA *et al.*, 2005), enquanto que abaixo dos 15 anos de idade a incidência de LNH tem permanecido constante com um discreto aumento na faixa de 15 a 18 anos. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer – RJ – Brasil, estimam-se 4.940 casos novos de linfoma não Hodgkin (LNH) em homens e 4.850 em mulheres para o Brasil, no ano de 2014 em adultos. Tais valores correspondem a um risco estimado de 5,04 casos novos a cada 100 mil homens e 4,77 a cada 100 mil mulheres.

Na infância e adolescência, a incidência do LNH no Brasil é semelhante aquela dos países em desenvolvimento correspondendo a 8.8 por milhão para LNH e, mais especificamente, 2.9 por milhão para o linfoma de Burkitt (LB), (FERREIRA, J. M. *et al.*, 2012).

O LNH pediátrico difere do adulto no que diz respeito ao comportamento biológico, ao sistema de estadiamento, protocolos de tratamento e resposta terapêutica. Enquanto que em adultos são mais frequentes os linfomas de baixo e intermediário grau de malignidade, a maioria dos LNH da infância são linfomas de alto grau de malignidade (SANDLUND; DOWNING; CRIST, 1996). Existe uma considerável variação geográfica na incidência e distribuição dos subtipos de linfomas. Na África Equatorial, quase 50% dos cânceres infantis são linfomas com predomínio do LB. Nos países ocidentais, aproximadamente um terço dos LNH da infância são Leucemia/Linfoma Linfoblástico (LL), 40% LB, 10-20% Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) e 10-20% são diagnosticados como Linfoma anaplásico de grandes células (LAGC).

Dentre os LNH, o LB é uma neoplasia de células B altamente agressiva que constitui a maioria dos linfomas de células B da infância e minoria dos linfomas de células B do adulto (Figura 1.1) (HOCHBERG *et al.*, 2009). Esse linfoma pode ser classificado em três variantes de acordo com sua distribuição geográfica, incidência e associação com o vírus Epstein-Barr (EBV): a) endêmico, com 98% de associação com o EBV; b) esporádico, com 15- 30% de associação ao

EBV; c) LB de pacientes associado à AIDS com 30-40% de associação com o EBV (BRADY; MACARTHUR; FARRELL, 2007).

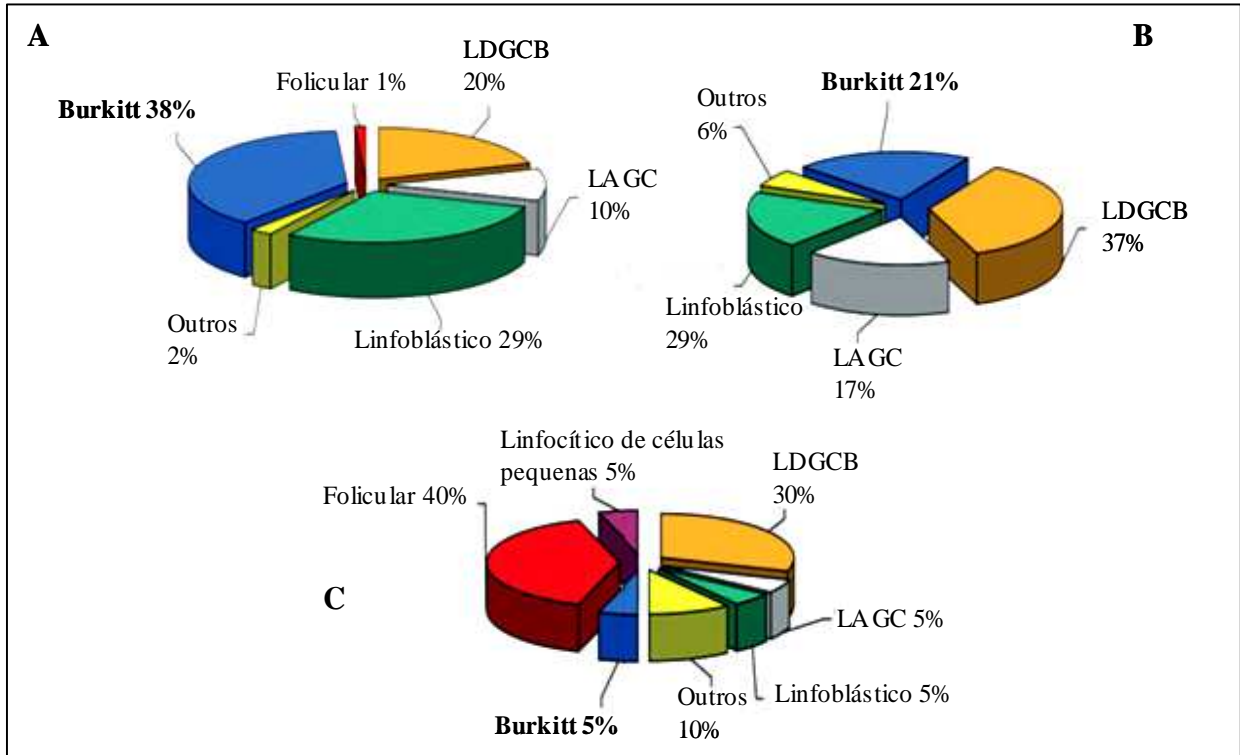


Figura 1.1: Frequência dos subtipos de Linfoma não-Hodgkin, mostrando a maior incidência do LB na infância comparado com a fase adulta: (A) 0-14 anos, (B) 15-19 anos e (C) 20 anos ou mais. Adaptado de Hochberg et al. (HOCHEBERG et al., 2009).

Como características comuns a todos os subtipos de LB, temos que todos surgem a partir de linfócitos B diferenciados derivados do centro germinativo e apresentam hipermutação somática na região variável da cadeia pesada da imunoglobulina do receptor de célula B, indicando que a expansão clonal ocorreu em uma célula B do centro germinativo. Do ponto de vista histológico, o LB é caracterizado por células de tamanho médio, monomórficas que apresentam cromatina grosseira com múltiplos nucléolos e moderado citoplasma basofílico, frequentemente contendo vacúolos lipídicos. O LB apresenta um padrão difuso de infiltração e uma aparência característica de “céu estrelado” devido à alta taxa proliferativa, apoptose frequente e presença de numerosos macrófagos contendo células tumorais fagocitadas. As células do LB são positivas para CD10/CD20/IgM/BCL-6 e tipicamente negativas para BCL-2 (MOLYNEUX *et al.*, 2012). A assinatura molecular do LB é a ativação do oncogene *c-Myc*

através de translocações que envolvem o lócus do gene *c-Myc* no cromossomo 8q24, para os loci das imunoglobulinas (Igs) no cromossomo 14q32 (cadeia pesada μ), 2p11 (cadeia leve κ) ou 22q11 (λ). Estas translocações justapõem toda a seqüência codificante do gene *c-Myc* ao ativador transcricional dos genes da *Igs* (LINDSTROM; WIMAN, 2002). Como resultado dessa ativação a proteína c-Myc passa a ser expressa de forma constitutiva ativando genes relacionados a diversos processos celulares como divisão celular, metabolismo celular, apoptose, atividade do telômero, entre outros (HECHT; ASTER, 2000). Desta forma, a ativação de c-Myc resulta em proliferação celular descontrolada no LB, uma das principais características da maioria dos cânceres humanos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Como resultado, é típica a alta taxa de proliferação celular observada no LB e evidenciada pela detecção do antígeno de proliferação celular Ki-67 em mais de 95% das células tumorais. Esta característica é utilizada como um dos critérios para diagnóstico histopatológico do LB (MOLYNEUX et al., 2012). Além do perfil proliferativo, as células do LB apresentam elevados índices de apoptose. Como forma de conter os estímulos apoptóticos favorecendo a proliferação e o desenvolvimento tumoral, ocorrem eventos secundários que levam à inativação de vias proapoptóticas exemplificados pela inibição das proteínas Bim e Puma (membros pro-apoptóticos da família BCL-2), aumento de expressão de RNAs e MicroRNAs virais, mutações em *TP53* (KLUMB et al., 2003) e silenciamento de *p16^{INK4a}* (Figura 1.2).

Apesar da alta taxa de proliferação do tumor, com tempo de duplicação celular em torno de 24 horas, o prognóstico dos pacientes com LB mudou drasticamente nas duas últimas décadas com a introdução de quimioterapia intensiva de curta duração (KLUMB et al., 2004; PATTE et al., 2001). Recentemente, o foco tem sido a modificação do tratamento para regimes eficazes, porém com menor toxicidade principalmente nas crianças (PATTE et al., 2007). Outro foco é a exploração do conhecimento da biologia molecular da doença para o desenvolvimento de estratégias de terapia que possam resgatar os pacientes refratários ao tratamento, ou que apresentam recidiva visto que, em geral, estes pacientes apresentam pobre resposta à terapia nesta circunstância (HAGEMEISTER, 2002). O LB é um caso ímpar de doença maligna em que um tratamento utilizado inicialmente em crianças foi aplicado em pacientes adultos resultando em melhora da resposta e sobrevida (MAGRATH et al., 1996). No entanto, o emprego de regimes intensivos em adultos está relacionado a uma maior toxicidade incluindo, neurotoxicidade, mucosite severa e toxicidade hematológica.

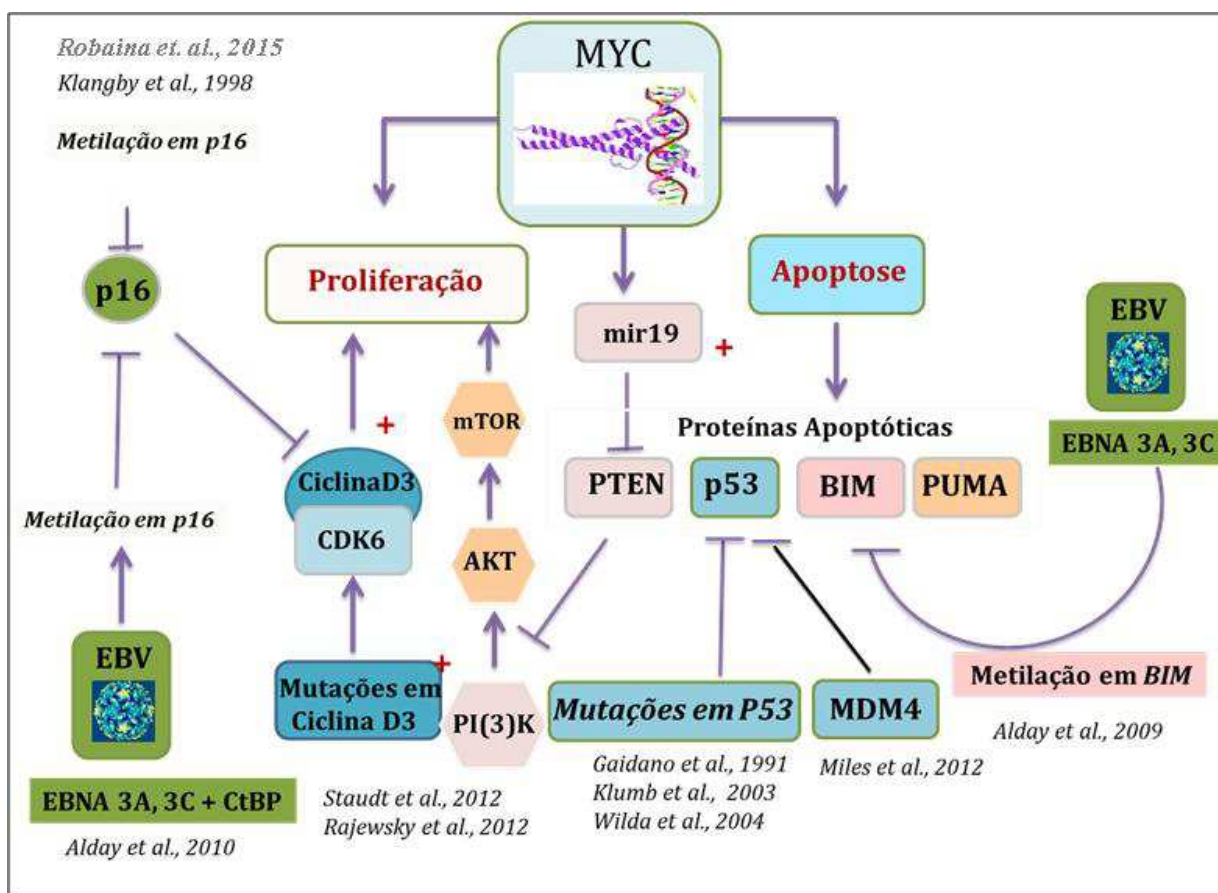


Figura 1.2: Modelo esquemático representando a inativação de vias apoptóticas e ativação de vias de proliferação, favorecendo o estabelecimento tumoral no LB. O aumento da expressão de Myc leva a estímulos proliferativos e apoptóticos. Porém, com a inativação de eventos apoptóticos ocorre predominância dos estímulos de proliferação mediados pela via de PI3K. Adaptação de Klumb, C.E.

Portanto, os estudos atuais buscam o desenvolvimento de estratégias de terapia que possam resgatar os pacientes refratários, ou que apresentem recidiva, além de regimes de tratamentos eficazes com menor toxicidade. Recentemente, novos estudos vêm elucidando os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese do LB, quebrando paradigmas bem estabelecidos até então. Sabidamente, o LB é uma neoplasia com alta taxa de proliferação, normalmente associada à expressão constitutiva de c-Myc. Entretanto, Sander 2012 e Schmitz, 2012 (SANDER *et al.*, 2012; SCHMITZ *et al.*, 2012) mostraram de forma muito elegante o envolvimento da via de PI3K/Akt de forma cooperativa com Myc translocado. De acordo com Sander e colaboradores, combinando a expressão constitutiva de c-Myc e a atividade de PI3K em células do centro germinativo de camundongos ocorreu a formação de tumores como o LB, extremamente relacionados com o LB humano no que diz respeito à histologia, marcadores de

superfície e perfil de expressão gênica. Estes resultados indicaram que a desregulação de *c-Myc* e a atividade de PI3K cooperam na patogênese do LB. Schmitz e colaboradores. (SCHMITZ et al., 2012) utilizando técnicas como sequenciamento de RNA e RNA de interferência, delinearam vias regulatórias que cooperam com *c-Myc* e seu papel oncogênico no LB. Em 38% dos casos de LB esporádicos, ocorrem mutações no gene *CCND3* levando a produção de isoformas de Ciclina D3 estáveis que favorecem a progressão do ciclo celular. Em 70% dos casos, essas mutações afetam o fator de transcrição *TCF3 (E2A)*, ou o seu regulador negativo *ID3*. *TCF3* ativa a sinalização de sobrevivência via PI3K, possivelmente através do aumento constitutivo da sinalização de receptor de linfócitos B (Figura 1.2). Os dados desses dois trabalhos sugerem novas oportunidades no tratamento de pacientes com LB. Ainda de acordo com Sander e Rajewsky, 2012 (SANDER; RAJEWSKY, 2012), o modelo *in vivo* de LB desenvolvido a partir de mutagênese constitui uma importante ferramenta para testes de novas estratégias de tratamento, levando-se em consideração a fisiologia normal e o sistema imune funcional. Além disso, possibilita o estudo de mecanismos envolvidos na disseminação do LB para o sistema nervoso central (SNC), testículos e ovário.

1.2 Myc translocado: possível alvo terapêutico?

O proto-oncogene *c-Myc* está normalmente desregulado na maioria dos cânceres humanos. Esse fator de transcrição regula diversos genes envolvidos em transdução de sinais, regulação de ciclo celular, metabolismo, apoptose, adesão celular e biossíntese de proteínas (CHANG *et al.*, 2008). Para que *Myc* possa se ligar ao DNA e exercer seu papel de ativador transcricional, é necessário que ocorra a formação do heterodímero *Myc/MAX* que pode ser inibido pela ligação competitiva de *MAX* a *MAD1*. O complexo *MAX/MAD* recruta histona deacetilases (HDACs) que reprimem a expressão gênica (KLAPPROTH; WIRTH, 2010). A regulação da expressão de *c-Myc* é um processo complexo que pode ocorrer transcionalmente ou através de alterações pós traducionais que vão alterar sua estabilidade (LUSCHER, 2012). A ativação da transcrição de *c-Myc* é mediada pela ligação das histonas acetil transferases *CBP/p300* e *TIP60/GCN5* ou do fator de transcrição *P-TEFb*, enquanto que sua repressão transcricional é modulada por diversos mecanismos que incluem a interação desses complexos com o fator de transcrição *MIZ-1* prevenindo o recrutamento da molécula de ativação *p300* (LUSCHER; VERVOORTS, 2012). Em células normais, *c-Myc* apresenta uma meia vida curta e

difícilmente pode ser detectado por *western blotting*. Entretanto, células tumorais, como as células do LB (ênfase desse estudo), incorporam eventos mutacionais à sobreposição de vias de sinalização e por isso apresentam e toleram altos níveis de expressão de c-Myc. Myc é capaz de regular a expressão de 10 a 15% de todos os genes humanos. Em células normais, c-Myc, além de ser responsável por promover a síntese de proteínas relacionadas ao ribossomo, que vão garantir a massa celular necessária antes da divisão celular, c-Myc promove a divisão celular através do aumento da expressão de genes como ciclina *D*, *E2F* e *CDK4*, e da repressão da expressão de genes envolvidos na parada de ciclo celular como *p27*, *p15*, *p21*, *p57*, promovendo a passagem da fase G0/G1 para S (BOUCHARD; STALLER; EILERS, 1998). Dessa forma, a desregulação de c-Myc é um potente indutor da proliferação em linfócitos. Entretanto, a superexpressão desse proto-oncogene induz respostas antiproliferativas e apoptóticas como a inibição de membros antiapoptóticos da família BCL-2 (*BCL-2*, *BCLXL*) ou superexpressão de membros proapoptóticos (*BIM*, *PUMA*) (Figura 1.3) que devem ser sobrepujadas para que ocorra a linfomagenese como mencionado anteriormente. Dentre a vasta gama de genes regulados por c-Myc, podemos incluir a regulação de um grande número de microRNAs (miRs) com funções oncogênicas e ou supressores tumorais. Myc leva a superexpressão do *cluster* oncogênico miR 17-92, mas a maioria dos miRs diretamente regulados por c-Myc apresentam-se com expressão diminuída (CHANG et al., 2008; SANDER; BULLINGER; WIRTH, 2009). Essas alterações em miRs serão discutidas posteriormente no tópico que abordará as alterações epigenéticas.

O papel oncogênico de c-Myc tem estimulado a busca por estratégias terapêuticas que visam neutralizar seus efeitos. Porém, a proteína c-Myc *per se* não é considerada um alvo terapêutico promissor e por isso estão surgindo novas estratégias que visam reduzir sua expressão interferindo na dimerização com MAX, ou na sua ligação ao DNA, ou mesmo interferindo na expressão de genes situados mais abaixo na cascata de sinalização iniciada por c-Myc. Entretanto, a maioria dessas estratégias ainda apresentam dificuldades de aplicação em modelos *in vivo* (ALBIHN; JOHNSEN; HENRIKSSON, 2010; BERG, 2011). Nesse contexto, torna-se extremamente importante a investigação de vias que cooperam com c-Myc levando a proliferação celular como a via de PI3K/Akt considerada atualmente um promissor alvo terapêutico uma vez que, isoladamente, a desregulação de c-Myc não é suficiente para promover a linfomagenese (KLAPPROTH; WIRTH, 2010).

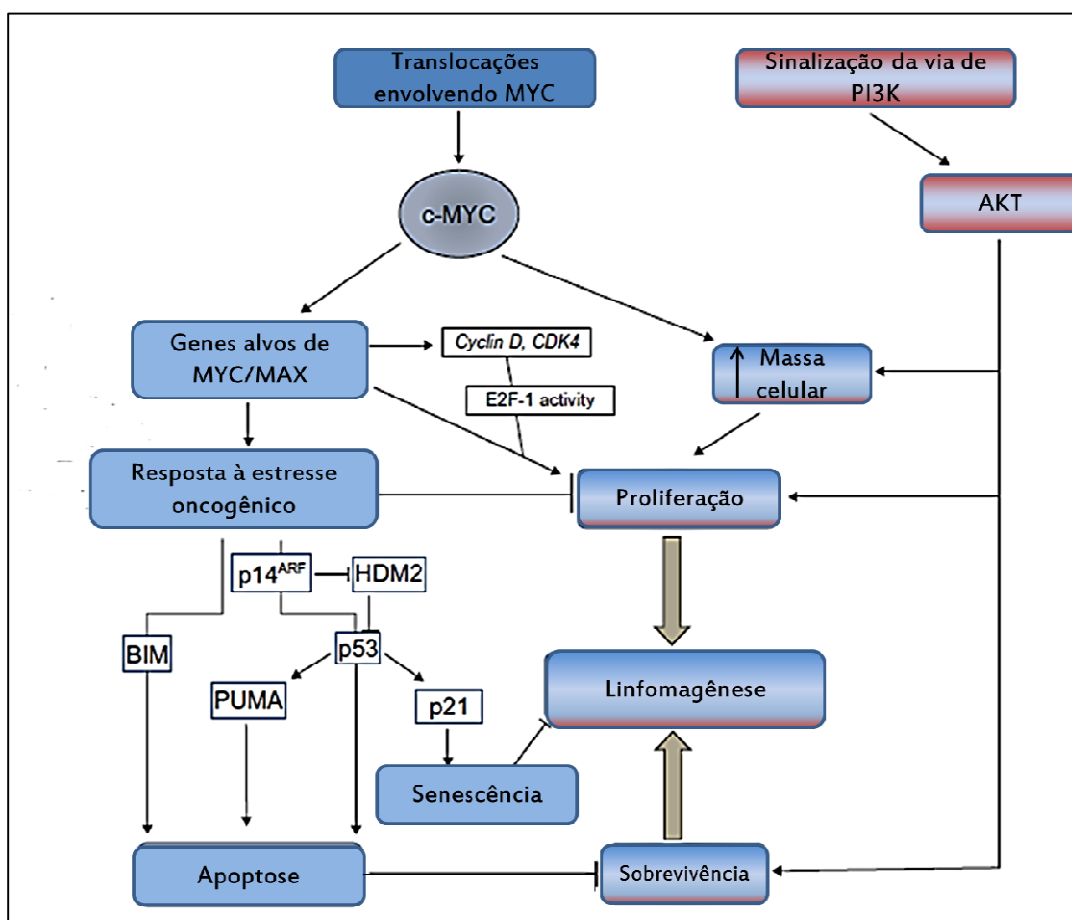


Figura 1.3: Vias moduladas pela desregulação de Myc: A desregulação de Myc leva a alteração em vias relacionadas com proliferação, sobrevivência e morte celular. Adaptado de Spender & Inman (SPENDER; INMAN, 2014).

1.3 Via de sinalização de PI3K/Akt

As quinases fosfatidilinositol 3 (PI3Ks) são agrupadas em três classes (I-III) que diferem em sua estrutura e função (FRUMAN; MEYERS; CANTLEY, 1998; VANHAESEBROECK *et al.*, 1997; VANHAESEBROECK; WATERFIELD, 1999). As enzimas de classe I têm sido muito bem estudadas e estão sendo consideradas importantes alvos terapêuticos para o câncer e doenças do sistema imunológico. Essa classe de enzimas é dividida em classe IA que é ativada via sinalização de receptores de tirosina quinase (RTK) e classe IB que é ativada por receptores acoplados a proteína G (GPCR). São enzimas heterodiméricas que consistem de uma unidade catalítica chamada p110 α , β ou δ (codificada pelos genes *PIK3CA*, *PIK3CB* e *PIK3CD*, respectivamente) que se associam a uma subunidade regulatória, p85. A classe I de PI3Ks age em

três substratos: fosfatidilinositol (PI), inositolmonofosfato (PI(4)P) e bifosfato (PI(4,5)P₂) adicionando grupamento fosfato no anel inositol e gerando PI(3)P, PI(3,4)P₂ e PI(3,4,5)P₃, também chamado de PIP₃ (Figura 1.4) que funciona como um importante segundo mensageiro na célula sendo considerado o principal mediador da atividade de PI3K (CARPENTER *et al.*, 1990). PIP₃ está constitutivamente elevado na maioria das células tumorais e recruta proteínas citoplasmáticas para regiões específicas de membrana promovendo uma cascata de sinalização oncogênica.

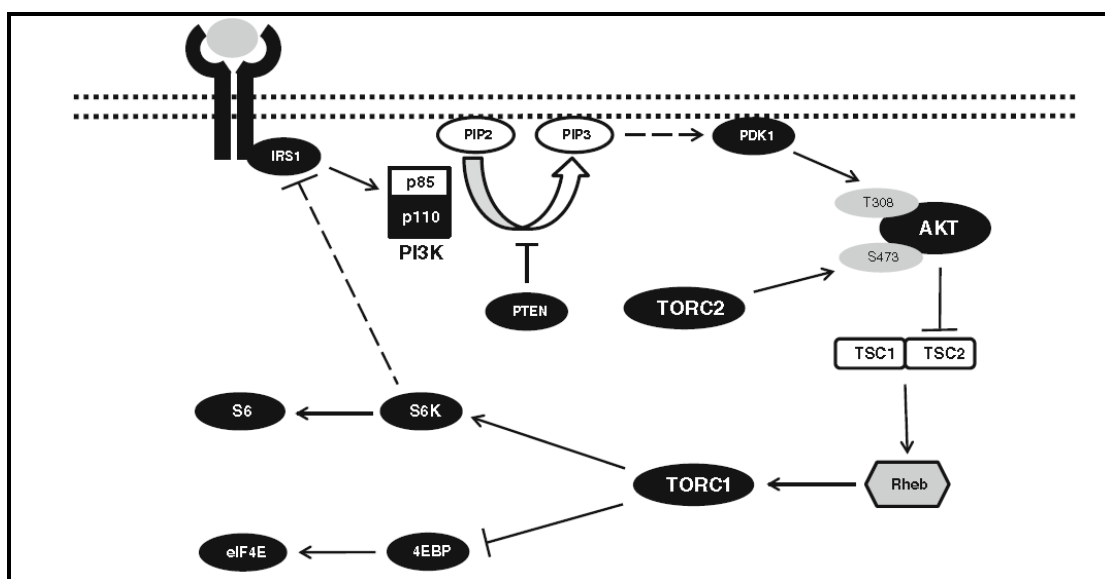


Figura 1.4: Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR evidenciando a fosforilação dos substratos derivados de inositolfosfato por enzimas específicas. Adaptado de Cho (CHO, D. C., 2014).

As proteínas oncogênicas recrutadas incluem membros da família de quinase AGC (Akt), família de tirosina quinase TEC e diversos moduladores da atividade de pequenas GTPases (VANHAESEBROECK *et al.*, 2001). Embora a classe II esteja relacionada com a regulação da adesão celular e reorganização de actina durante a migração celular (DOMIN *et al.*, 2005; MAFFUCCI *et al.*, 2005), suas funções e importância ainda estão subestimadas devido à limitação de ferramentas farmacológicas para seu estudo (DOMIN *et al.*, 1997; VIRBASIUS; GUILHERME; CZECH, 1996). A atividade de PI3K pode ser inibida diretamente através da remoção do grupamento fosfato do fosfatidilinositol mediado pela fosfatase PTEN produto do gene *PTEN*, o gene supressor tumoral mais frequentemente mutado em tumores (LI *et al.*, 1997; MAEHAMA; DIXON, 1998). Os estudos recentes que avaliaram expressão gênica sugerem que

a via de PI3K é a mais alterada nos tumores humanos, sendo o gene *PIK3CA* o segundo oncogene mais frequentemente mutado (SONG; SALMENA; PANDOLFI, 2012). Embora outras quinases abaixo de PI3K como GSK3 e BTK apresentem relevância no contexto tumoral, a via clássica descrita apresenta Akt como o principal alvo regulado por PI3K, regulando a expressão de diversas proteínas envolvidas no crescimento celular, proliferação, migração, adesão, neovascularização e apoptose. Uma vez localizada na membrana, Akt é ativada por fosforilação dependente de PDK1 e complexo 2 mTOR (TORC2) em dois resíduos, Thr308 e Ser473, respectivamente (QIU; KUNG, 2000; TESSIER; WOODGETT, 2006). A quinase mTOR é um efetor crítico abaixo de Akt e se apresenta em dois complexos com funções distintas, TORC1 e TORC2. PI3K/Akt regula a atividade de TORC1 que é o principal regulador do crescimento celular, uma vez que controla a tradução de proteínas em resposta a diversos fatores como a disponibilidade de oxigênio e nutrientes, ATP e aminoácidos (LAPLANTE; SABATINI, 2012). Em condições favoráveis para o crescimento tumoral, TORC1 fosforila diversos substratos, promovendo um processo anabólico e suprimindo processos catabólicos como a autofagia. O principal regulador da atividade de TORC1 é o complexo contendo as proteínas TSC1, TSC2 e TBC1D7 (DIBBLE *et al.*, 2012; HUANG, J.; MANNING, 2008). A fosforilação de TSC2 via Akt leva a supressão do efeito inibitório do complexo TSC em TORC1. TORC1 age através de seus efetores como 4E-BP e S6K que fosforilam TSC2 em resíduos distintos de Akt estimulam a síntese de proteínas e a entrada na fase G1 do ciclo celular. Já TORC2 regula a sobrevivência e proliferação celular através da fosforilação de Akt, GSK3 e AMPK que também são capazes de fosforilar TSC2. (LAPLANTE; SABATINI, 2012). Levando-se em consideração o papel central dessa via na proliferação e crescimento celular, não é surpreendente, que as células tumorais desenvolvam mecanismos que mantenham a via de PI3k/Akt/mTOR constitutivamente ativa. Em diversos tipos tumorais já foram descritos mecanismos de ativação de RTKs como mutações e amplificações que culminam na ativação da via de PI3k/Akt/mTOR. No LB, recentemente os trabalhos vêm demonstrando a expressão constitutiva da via de PI3K cooperando com c-Myc translocado como um novo paradigma na patogênese desse linfoma como já mencionado anteriormente. Dessa forma, a via de sinalização atualmente definida por PI3K, Akt e mTOR é extremamente importante no contexto de sobrevivência da célula tumoral, controlando as principais vias relacionadas com a tumorigênese como: ciclo celular, sobrevivência, metabolismo, migração e instabilidade genômica (BEAGLE; FRUMAN, 2011), e ainda contribuindo com a progressão tumoral promovendo angiogênese e recrutamento de células

inflamatórias (HIRSCH *et al.*, 2013) sendo extremamente atrativa para o desenvolvimento de terapias alvo.

1.4 Inativação de $p16^{INK4a}$ contribuindo com a proliferação no LB

$P16^{INK4a}$, também conhecido como CDKN2A, MTS1, INK4a e CDK4I é uma das proteínas mais estudadas na última década devido ao seu importante papel desempenhado no controle do ciclo celular, na senescência e no desenvolvimento de vários tipos de câncer (GIL; PETERS, 2006; SHARPLESS, 2005). O gene $p^{16INK4a}$ está localizado no cromossomo 9p21, no locus INK4a/ARF que codifica além de $p16^{INK4a}$ também outra proteína derivada em região promotora diferente, P14ARF (*alternating reading frame*). Ambas são consideradas proteínas supressoras tumorais envolvidas nas vias controladas pelas proteínas Rb e p53, respectivamente (SERRANO *et al.*, 1996).

$P16^{INK4a}$ é membro da família de proteínas inibidoras das ciclinas dependentes de quinase, capaz de promover uma parada no ciclo celular, na fase G1 (SERRANO *et al.*, 1996). $P16$ liga-se às CDK4 ou 6 inibindo a formação do complexo entre a ciclina D e a CDK 4/6 que é responsável pela fosforilação de membros da família Rb. À medida que permanece não fosforilada, Rb liga-se fortemente ao E2F, um fator de transcrição de genes que codificam proteínas que regulam a passagem da fase G1 para S, impedindo a progressão do ciclo celular e, conseqüentemente, a proliferação celular (SERRANO *et al.*, 1996). Desse modo, a perda da expressão de $P16^{INK4a}$ tem um impacto na regulação de um grupo de genes envolvidos no controle da progressão do ciclo celular, permitindo que a célula entre na fase S, ultrapassando o ponto de checagem G1/S (SHERR; ROBERTS, 1995). Recentemente tem sido demonstrado que $P16^{INK4a}$ também está relacionada com o processo de senescência celular (Schmitt *et al.*, 2002). A expressão de $P16^{INK4a}$ aumenta acentuadamente com o envelhecimento na maioria dos tecidos de camundongos, e em tecidos humanos da pele e do rim (RESSLER *et al.*, 2006; ZINDY *et al.*, 1997). No entanto, ainda não são compreendidos totalmente os sinais que desencadeiam a senescência e o papel da $P16^{INK4a}$ neste processo (ROMAGOSA *et al.*, 2011). Além disso, são atribuídas outras funções à $P16^{INK4a}$ como envolvimento no processo de apoptose, angiogênese e invasão celular. Em relação à apoptose tem sido observado em linhagens celulares neoplásicas que a superexpressão de $P16^{INK4a}$ é capaz de induzir a apoptose tanto dependente quanto independente de p53 (CALBO *et al.*, 2004; KATSUDA *et al.*, 2002). Por último, $P16^{INK4a}$ parece contribuir substancialmente para

a hematopoese, promovendo a diferenciação e apoptose de células eritróides através da modulação da proteína antiapoptótica BCL-X e do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF-kB) (MINAMI *et al.*, 2003).

Inativação e alterações gênicas em $p16^{INK4a}$ são identificadas comumente como forma de inibição do controle do ciclo celular em vários tipos de tumores incluindo os de origem hematológica (PINYOL *et al.*, 1998; SERRANO *et al.*, 1996). Este gene é considerado um dos genes mais frequentemente mutados nos cânceres humanos (SHERR; ROBERTS, 2004). A inativação geralmente é decorrente de deleções homozigotas, perda de heterozigosidade, mutações pontuais e hipermetilação do DNA (ORTEGA; MALUMBRES; BARBACID, 2002; SHARPLESS, 2005). O tipo de inativação é específica para cada tipo de tumor, no entanto, mais frequentemente são encontradas deleções homozigotas e hipermetilação do DNA (ORTEGA *et al.*, 2002). A perda da expressão de $p16^{INK4a}$ é frequente nos linfomas agressivos, pois representa uma vantagem para o desenvolvimento da célula tumoral (HERMAN *et al.*, 1997; VILLUENDAS *et al.*, 1998). Sendo assim, a presença da metilação de $p16^{INK4a}$ em linfomas de células linfóides B tem sido associada à perda da expressão proteica (KLANGBY *et al.*, 1998; VILLUENDAS *et al.*, 1998).

No LB, a frequência de metilação detectada nos tumores destes pacientes foi aproximadamente de 40% e também correlacionada com diminuição do nível de expressão proteica. Entretanto, estudos correlacionando a presença de metilação e perda de expressão de $p16^{INK4a}$ no LB não avaliaram o impacto no prognóstico (HERMAN *et al.*, 1997; KLANGBY *et al.*, 1998). Recentemente, nosso grupo mostrou em uma série de 51 pacientes que a metilação em $p16^{INK4a}$ ocorre em uma frequência maior que a relatada previamente em outros estudos, sugerindo um mecanismo adicional na patogênese do LB (ROBAINA *et al.*, 2015).

Há algumas evidências de que c-Myc é capaz de promover a superexpressão de $P16^{INK4a}$ em células humanas (GIL; PETERS, 2006). Desse modo, é sugerido que as alterações genéticas e/ou epigenéticas são importantes na patogênese dos LB uma vez que são necessárias para bloquear os efeitos da ativação de $P16^{INK4A}$ como a parada no ciclo celular e a senescência (LINDSTROM; KLANGBY; WIMAN, 2001). Nos últimos anos as alterações epigenéticas têm sido foco de estudo em virtude de seu envolvimento em diversos tipos de câncer, notavelmente, também nos linfomas e serão descritas no tópico a seguir.

1.5 Epigenética

O termo epigenética é usado para descrever diferentes fenômenos biológicos que não seguem os princípios genéticos de herdabilidade. Esse termo foi descrito primeiramente na década de 40 e desde então diversos eventos biológicos que não estão codificados na sequência de DNA vem sendo classificados como eventos epigenéticos. Os estudos recentes mostram que esse fenômeno biológico apresenta mecanismos comuns que envolvem metilação do DNA, modificação em histonas e alterações de microRNAs, sendo os dois últimos o foco deste trabalho. Atualmente, o termo epigenética refere-se a todas as alterações estáveis de traços fenotípicos que não são codificados na própria sequência de DNA (BAYLIN, 2005; FEINBERG; OHLSSON; HENIKOFF, 2006; ROUNTREE *et al.*, 2001). Os mecanismos epigenéticos possuem um papel crítico na resposta fisiológica normal a estímulos ambientais, estabelecendo os padrões de expressão gênica apropriados. Entretanto, exposições a agentes químicos, físicos e infecciosos podem induzir alterações epigenéticas levando a processos neoplásicos. Estudos funcionais mostraram que as principais alterações encontradas na célula tumoral como silenciamento de genes supressores tumorais, ativação de oncogenes, defeito na maquinaria de reparo do DNA e desregulação da morte celular podem ser desencadeadas direta ou indiretamente por desregulação epigenética. Entretanto, a real contribuição das alterações epigenéticas em cânceres específicos permanece desconhecida, embora alguns estudos apontem que o silenciamento gênico contribua para seleção de mutações específicas que favorecem a progressão tumoral (BAYLIN; OHM, 2006).

1.5.1 Modificações em Histonas

A estrutura da cromatina é influenciada por diversas modificações em histonas que apresentam um papel importante na regulação da expressão gênica e na carcinogênese (ELLIS; ATADJA; JOHNSTONE, 2009; ESTELLER, 2008). Cada nucleossomo apresenta aproximadamente 146 pb de DNA envolvidos em um octâmero de histonas que consiste em duas subunidades de H2A, H2B, H3 e H4 (ZHANG, Y. *et al.*, 1999). As histonas coordenam as alterações entre heterocromatina – DNA extremamente enovelado e inacessível à maquinaria de transcrição – e eucromatina – DNA exposto e capaz de se ligar aos fatores que vão regular sua transcrição (LUND; VAN LOHUIZEN, 2004). As modificações em histonas ocorrem em regiões

demoninadas caudas que consistem na sua região N-terminal, sendo o principal alvo de modificações pós-traducionais. Essas modificações incluem metilação, acetilação, fosforilação, sumoilação, biotinação e ubiquitinação, sendo responsáveis por instruir as alterações transcricionais relacionadas à diferenciação celular. Entretanto, os mecanismos pelos quais a célula define, nas fases precoces do desenvolvimento, seu estado específico de diferenciação permanece desconhecido. As modificações em histonas controlam a expressão gênica levando a ativação ou silenciamento de diversos genes. A cromatina de genes expressos em determinadas células é marcada com modificações em histonas como metilação em H3K4 e acetilação de H4 que levam à transcrição gênica, enquanto que a mesma cromatina quando apresenta marcações relacionadas à repressão da expressão gênica como metilação na H3K27, leva ao silenciamento gênico. A maioria das modificações ocorrem em resíduos de lisinas, argininas e serinas nas caudas de H3 e H4 (ELLIS et al., 2009). A metilação e acetilação nas lisinas de histonas são processos enzimaticamente reversíveis e são “escritos” por lisina metiltransferases (KMTs) e lisina acetiltransferases (KATs) e “apagadas” por lisina demetilases (KDMs) e histonas deacetilases (HDACs), sendo as enzimas histona acetiltransferases (HATs) e HDACs as principais enzimas responsáveis por esse processo (IACOBUZIO-DONAHUE, 2009). As HDACs e HAT compreendem um grande grupo de enzimas que estão divididas em famílias. A atividade enzimática dessas proteínas não está restrita apenas a histonas. Diversos substratos diferentes de histonas já foram identificados. Em geral, os “escritores” e as “borrachas” de marcas em histonas, leem proteínas que contêm domínios especializados em ligações de modificação de histonas e por isso controlam diversas funções fisiológicas nas células e vêm sendo considerados importantes alvos para o tratamento de neoplasias (HABERLAND; MONTGOMERY; OLSON, 2009; WANG, Z. *et al.*, 2008)

1.5.2 Os microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) surgem a partir de um grupo de genes especializados que, após sua transcrição, dão origem a sequências de RNA com regiões complementares dentro da mesma fita simples. Estas regiões pareiam entre si e formam estruturas em forma de alça, ou grampo de cabelo (hairpin). Cada miRNA reconhece diversos RNA mensageiros (mRNA) e, quando ligados a sequências 3'UTR destes, alteram a estabilidade do mRNA ou bloqueiam sua tradução (BARTEL, 2004; LIM *et al.*, 2005). Mais de 10.000 miRNAs já foram identificados e dentre

estes aproximadamente 940 são detectados em humanos (SAYED; ABDELLATIF, 2011). Os miRNAs são RNAs pequenos e não codificantes com aproximadamente 22 nucleotídeos que alteram a expressão de genes alvos envolvidos em diversas vias inclusive as relacionadas ao tratamento do câncer e mecanismos de quimioresistência (VASILATOU; . 2010). Em 1993, foi descoberto que o gene chamado *lin-4* não codificava uma proteína no *Caenorhabditis elegans* e esse foi o primeiro miRNA descoberto capaz de regular negativamente a expressão da proteína *lin-4* (LEE, R. C.; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Desde então, o número de estudos relacionados a essas moléculas vêm crescendo mundialmente.

A biossíntese dos miRNAs é extremamente complexa e se inicia a partir transcrição realizada pelas enzimas RNA polimerase II e III. O transcrito primário é chamado de pri-miRNA e se mantém no núcleo para um processamento mediado por um complexo constituído por Drosha, uma Rnase, e DGCR8 que atua como um cofator. O pri-miRNA é clivado em uma estrutura em forma de grampo de aproximadamente 70nt chamado de miRNA precursor (pre-miRNA). O pre-miRNA é transportado através dos poros nucleares para o citoplasma pelo receptor exportina-5. No citoplasma, através de uma reação de hidrólise catalisada pela Dicer em conjunto com outras proteínas como TRBP e PACT, o pre-miRNA torna-se um miRNA maduro. Dicer produz um miRNA de fita dupla miRNA/miRNA* com aproximadamente 20 nt. A fita passageira (miRNA*) é removida e o miRNA maduro é incorporado à família de proteínas Argonautas formando o complexo efetor de silenciamento, RISC (Figura 1.5) (WAHID, 2010)

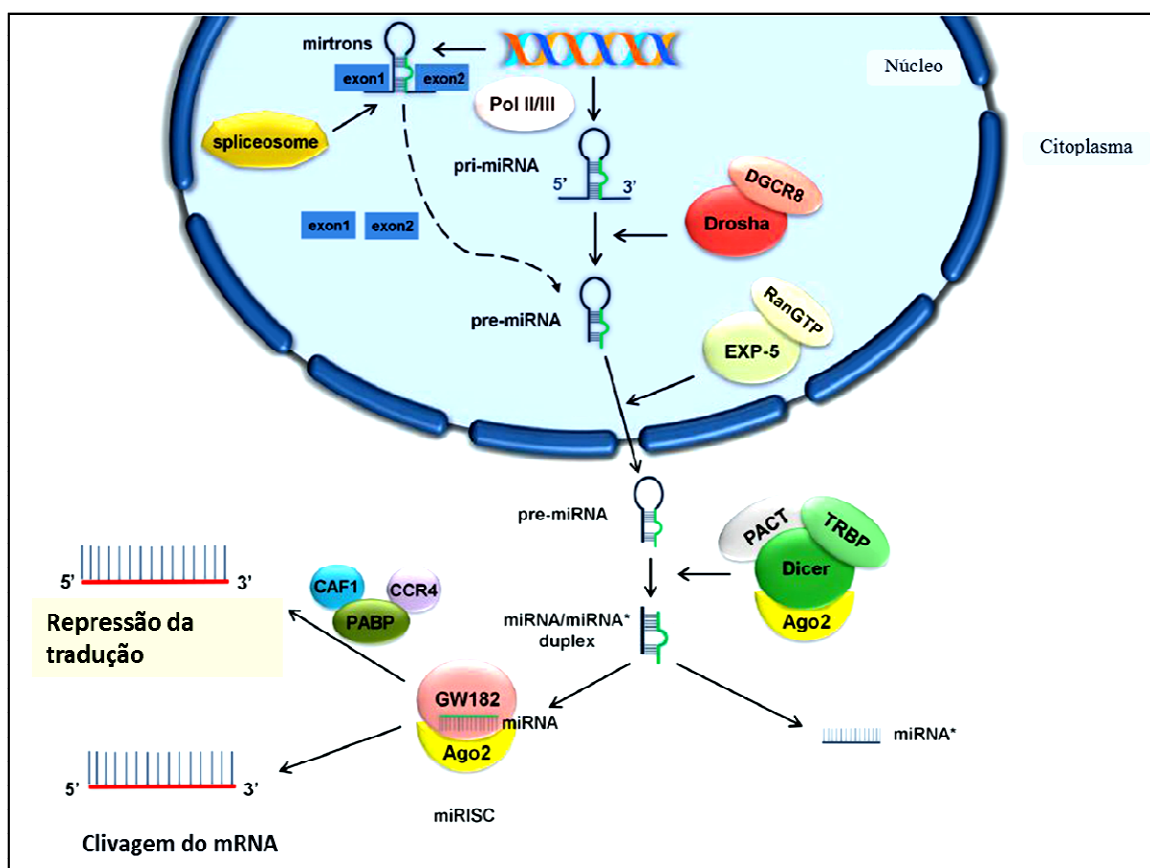


Figura 1.5: Biossíntese dos miRNAs. Os miRNAs são sintetizados no núcleo e exportados para o citoplasma, onde serão processados por complexos de enzimas específicas, gerando RNA fita simples com aproximadamente 22 nucleotídeos capazes de reprimir a expressão de proteínas. Adaptado de Gargalionis & Brasda (GARGALIONIS; BASDRA, 2013).

Os estudos recentes mostram que além da via canônica descrita acima, existem diferenças no processamento de alguns miRNAs como os mirtrons que são miRNAs derivados de introns através de *splicing* alternativo (WINTER *et al.*, 2009). O aumento ou diminuição da expressão dessas moléculas podem estar diretamente ligados à resposta dos pacientes à quimioterapia (ALLEN; WEISS, 2010). Além disso, por serem moléculas pequenas, são mais estáveis que o mRNA e podem ser detectadas em amostras fixadas e incluídas em parafina, assim como em fluidos corporais. Estas características sugerem que os miRNAs possam ser biomarcadores promissores (FERRACIN; VERONESE; NEGRINI, 2010). A descoberta de biomarcadores é importante na determinação do curso e da resposta ao tratamento, além de possibilitar a diminuição dos custos dos tratamentos através da disponibilidade de terapias específicas.

Muitos trabalhos mostram a importância dos miRNAs na maturação da célula B e no desenvolvimento de linfomas de células B (DI LISIO *et al.*, 2012). O oncogene *c-Myc* possui um

papel importante na linfomagenese da célula B, principalmente no LB e vêm sendo apontado como regulador da expressão de até 60 miRNAs. Nos últimos anos, muitos trabalhos foram publicados com o objetivo de caracterizar o perfil de expressão de miRNAs em diversos tumores. Esses trabalhos visam aumentar o número de ferramentas que auxiliem no diagnóstico preciso e no acompanhamento da resposta ao tratamento dos pacientes. Em relação ao LB, Di Lisio e colaboradores (DI LISIO *et al.*, 2012) mostraram que num total de 35 miRNAs desregulados, 14 tinham expressão aumentada e 21 apresentavam expressão diminuída, quando comparado a outros LNH. Os membros do *cluster miR-17-92* como *miR-17-3p*, *miR-18a*, *mir-19a*, *miR-19b* e *miR-92* apresentaram expressão aumentada, enquanto que a família *let-7* é comumente pouco expressa nesses tumores (SAMPSON *et al.*, 2007). Também os miRNAs *miR-155*, *miR-146a* e a família *miR-29* (a, b, c) que regula p53, estavam com expressão diminuída. Esses achados corroboram trabalhos anteriores que mostraram a regulação positiva do *cluster miR-17-92* em amostras derivadas de LB. Entretanto, o aumento da expressão desse *cluster* também foi observado em amostras que não apresentavam c-Myc translocado, mas apresentavam amplificação da região 13q31.3, mostrando que o *cluster miR-17-92* relacionado com a aceleração do desenvolvimento tumoral (HE, L. *et al.*, 2005) pode ter sua expressão alterada por amplificação gênica e não só pela superexpressão de c-Myc (ROBERTUS *et al.*, 2010). Acredita-se que o *cluster miR-17-92* esteja relacionado com a tumorigênese, pois leva a supressão da expressão de diversos reguladores negativos das vias de PI3K e NFκB, e inibe a via mitocondrial da apoptose (JIN *et al.*, 2013). Dentre os outros miRNAs regulados por c-Myc, *mir-101* foi descrito apresentar expressão reduzida 6 vezes no LB (ROBERTUS *et al.*, 2010). Este miRNA faz parte de uma família de miRNAs envolvida em funções celulares como proliferação, invasão e angiogênese (SEMAAN *et al.*, 2011; SMITS *et al.*, 2010). *miR-101* induz apoptose e suprime a tumorigênese *in vivo* e *in vitro* e inibe a invasão e migração de células derivadas de tumores gástricos (WANG, H. J. *et al.*, 2010). *miR-101* também está relacionado com a apoptose induzida por cisplatina em células de carcinoma hepatocelular (HE, X. P. *et al.*, 2012). Além disso, o *miR-101* apresenta expressão reduzida em câncer de pulmão (CHO, H. M. *et al.*, 2011), câncer gástrico (WANG, H. J. *et al.*, 2010) e no LB (CHANG *et al.*, 2008). A expressão ectópica de *miR-101* diminui a capacidade de células de hepatoma de formarem colônias *in vitro* e desenvolverem tumores em camundongos *nude* (SU *et al.*, 2009). De acordo com a base de dados *miRecords* (Biolead.org), esse miRNA apresenta 7 alvos validados (MYCN, ICOS, MCL1, PTGS2, EZH2 e ATM). Dentre eles, destacamos a proteína antiapoptótica MCL1, membro da

família BCL2, cuja diminuição da expressão foi relacionada com à apoptose induzida por HDACi em células derivadas do LB em estudo recente de nosso grupo (DOS SANTOS FERREIRA *et al.*, 2012).

O *miR-145* pertence a uma classe de possíveis supressores tumorais uma vez que está frequentemente pouco expresso na maioria dos tumores. Tanto o *miR-143* quanto o *miR-145* estão localizados a uma distância de aproximadamente 1,3 kb um do outro no cromossomo 5q33 (HIO *et al.*, 2010). Nos tecidos normais humanos a expressão dos *miR-143* e *-145* é detectada, mas em diversos tumores como câncer de colon, câncer gástrico, leucemia linfocítica crônica e linfomas de células B (DI LISIO *et al.*, 2012), além de diversas linhagens tumorais humanas, o nível de expressão desses miRNAs encontra-se extremamente reduzido (AKAO *et al.*, 2010). Mais especificamente, a baixa expressão de *miR-143* e *-145* foi demonstrada em neoplasias de células B e em linhagens celulares derivadas do LB. Corroborando esses dados, a transfecção da linhagem Raji derivada do LB com os precursores dos *miR-143* ou *-145* maduros leva à inibição do crescimento celular (AKAO *et al.*, 2007). O achado mais relevante relacionado ao *miR-145* foi originado do trabalho de Sachdeva *et al.* que definiu o papel do *miR-145* na regulação pós-transcricional de *c-Myc*. *miR-145* tem o oncogene *c-Myc* como seu alvo direto e sua inibição pode ser dependente ou independente de p53 de acordo com os níveis de *miR-145* na célula (SACHDEVA *et al.*, 2009). Além disso, esse trabalho também demonstrou que o *miR-145* é expresso em resposta ao estresse através das vias de PI3K/Akt e p53. *miR-143* e *-145* estão com expressão reduzida em linfomas de células B, entretanto ainda não está claro como esses miRNAs contribuem com a tumorigênese no LB.

1.6 Migração Celular

O aumento da capacidade migratória de células tumorais está diretamente relacionado com o desenvolvimento tumoral. A migração celular permite que as células, além de escaparem dos tecidos acometidos e penetrarem em órgãos e tecidos adjacentes (invasão), disseminem para órgãos distantes com a subsequente formação de novos nódulos tumorais (metástase) (ALEXANDROVA, 2014). Este processo é responsável pela maioria das causas de morte em pacientes oncológicos. Para que isso ocorra, as células tumorais precisam apresentar características novas, completamente diferentes, que permitam uma migração efetiva sob novas condições de microambiente. Essas alterações são fundamentais para romper barreiras

intersticiais, penetrar através da membrana basal e através de diferentes tipos de matriz extracelular, bem como alcançar vasos sanguíneos e linfáticos para então colonizarem regiões remotas do corpo (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Acredita-se que a aquisição de novas características que suportam a proliferação descontrolada e facilitam a disseminação e sobrevivência em novos microambientes é sustentada pela instabilidade genômica dessas células, que leva ao surgimento e consolidação de novas adaptações e à progressão tumoral (ALEXANDROVA, 2014).

1.6.1 Mecanismos celulares e moleculares relacionados com a migração celular

Cada uma das propriedades relacionadas com a progressão tumoral como: atividade migratória aumentada, proliferação exacerbada e sobrevivência em condições adversas são devido a mecanismos moleculares complexos. A aquisição do fenótipo de motilidade está associada a alterações no citoesqueleto, distúrbios no contato célula-célula, alterações na morfologia celular, aumento da atividade de metaloproteinases, assim como alterações em diversos outros mecanismos (CLARKE; GLASER, 2002).

A migração de leucócitos ocorre devido a forças geradas e transmitidas pelo esqueleto de actomiosina, assim como ocorre na maioria das células eucariotas (VICENTE-MANZANARES; SANCHEZ-MADRID, 2004). Os diferentes tipos celulares podem adotar formas distintas de migração, que são normalmente categorizadas de acordo com a estrutura e dinâmica da borda do tecido e da organização do citoesqueleto. As principais categorias de migração celular são: migração individual - amebóide ou mesenquimal - e coletiva - migração de unidades multicelulares coesas (Figura 1.6). A migração amebóide, normalmente refere-se ao movimento de células arredondadas que perdem as adesões focais maduras e as fibras de estresse (FRIEDL; BORGMANN; BROCKER, 2001; LAMMERMANN; SIXT, 2009). Existem dois subtipos de movimento amebóide. No primeiro ocorre o movimento das células através da formação de *blebby* de membrana. Essas células não aderem nem mesmo "puxam" o substrato para a migração. Já no segundo subtipo, ocorre em células amebóides ligeiramente mais alongadas que geram um filopódia rico em actina, apresentando uma fraca interação com o substrato (FRIEDL; WOLF, 2010).

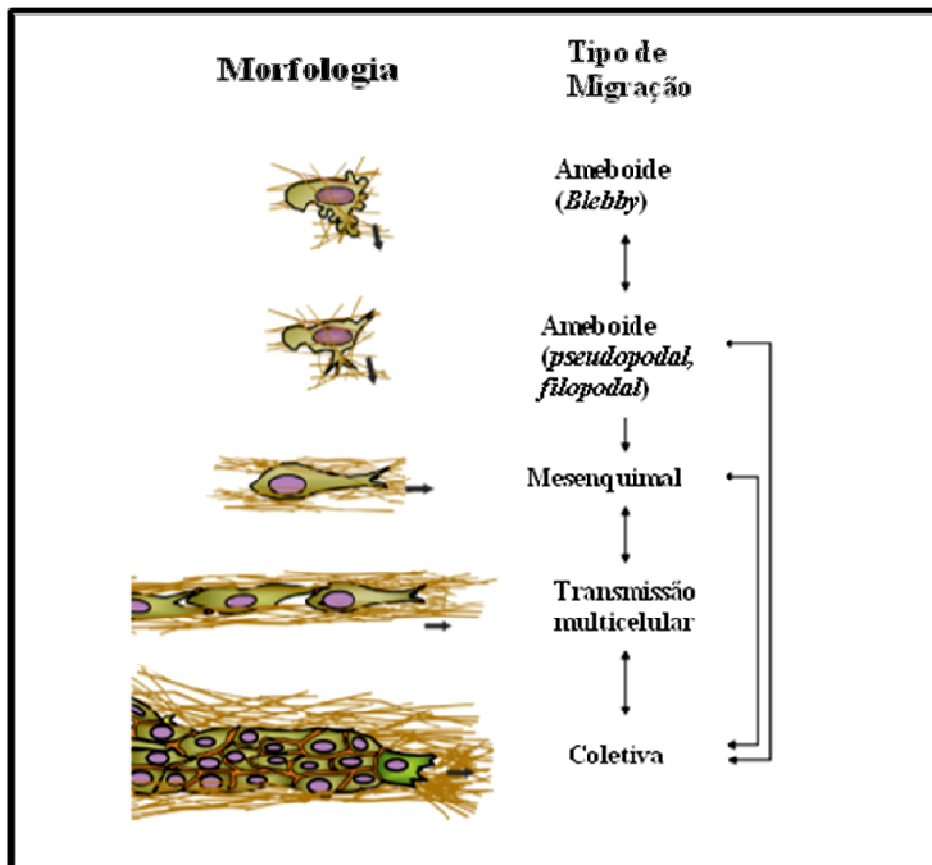


Figura 1.6: Morfologia celular e tipos de migração: A nomenclatura dos tipos de migração é baseada na morfologia celular. Cada tipo de migração é controlada por um mecanismo molecular diferente que pode ser regulado de acordo com o modo de migração. Adaptado de Friedl (FRIEDL; WOLF, 2010).

Os leucócitos migram de forma individual, portanto de forma amebóide. Durante a migração celular, ocorre a segregação de *small GTPases* como: RhoA, Rac e Cdc42 que serão responsáveis pela polarização característica da migração celular (Figura 1.7) (LAMMERMANN; SIXT, 2009) e cujo papel será descrito a seguir.

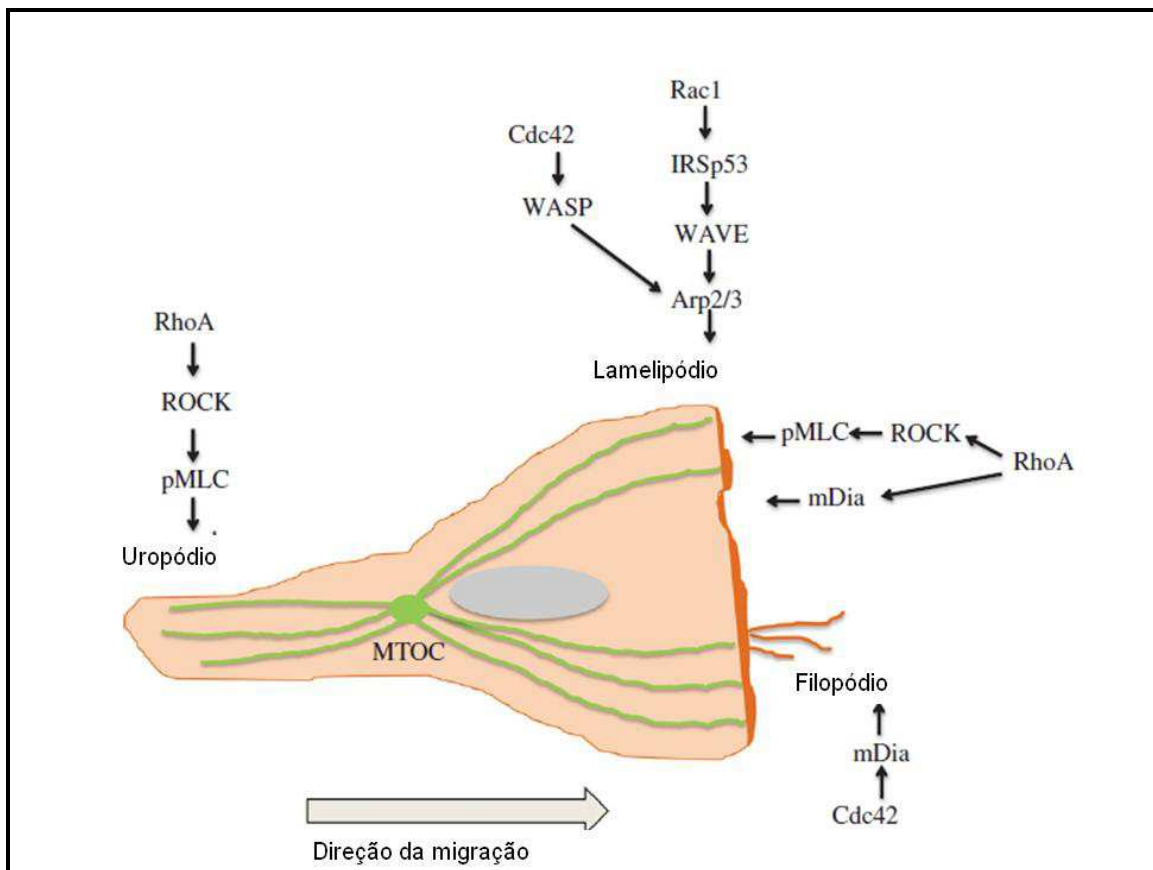


Figura 1.7: Polarização de leucócitos e Rho GTPases: Vias de sinalização e localização de proteínas relacionadas com a formação de filopódio e uropódio durante a polarização celular. MTOC (*microtubule organizing centre*). Adaptado de Infante & Ridley (INFANTE; RIDLEY, 2013).

1.6.2 O papel da família Rho GTPase na migração celular

A família de GTPases Rho vem sendo reconhecida como crucial na transdução de sinais por mais de 20 anos. As análises em membros da família como RhoA (*RAS homologue gene family member*), Rac1 e Cdc42 (*cell division cycle 42*) indicaram papel importante dessas proteínas no citoesqueleto. Essas proteínas também apresentam papel essencial na divisão celular, sobrevivência, migração e adesão (TYBULEWICZ; HENDERSON, 2009). A família compreende 23 membros com estruturas primárias relacionadas e de acordo com análises filogenéticas, os membros da família foram divididos em subfamílias (Figura 1.8).

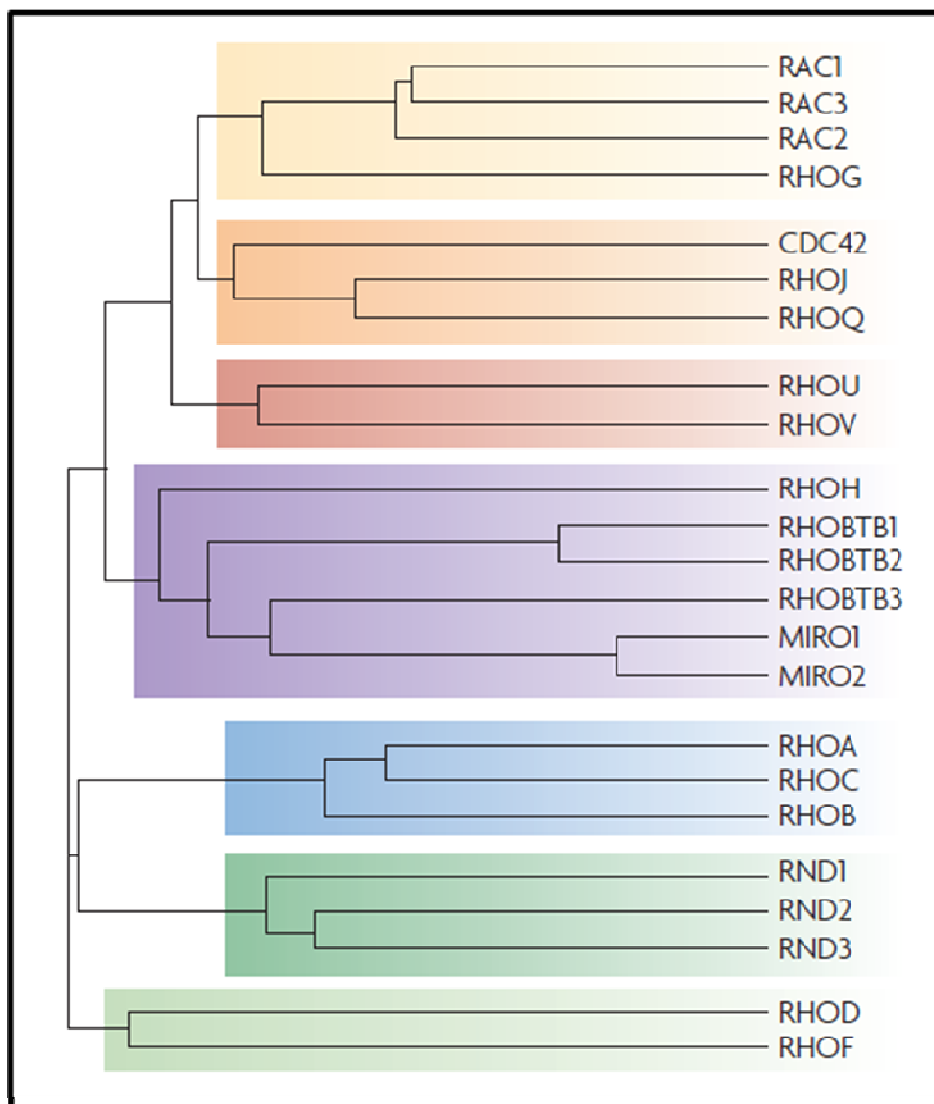


Figura 1.8: Rho GTPases de camundongos: Árvore filogenética das 23 Rho GTPases de camundongo, mostrando como são agrupadas em subfamílias. Adaptado de Tybulewicz & Henderson (TYBULEWICZ; HENDERSON, 2009).

A maioria dos membros da família Rho é capaz de se ligar a GTP (forma ativa) ou GDP (forma inativa) (JAFFE; HALL, 2005). Quando ativos, são capazes de transduzir sinais ligando-se a proteínas efetoras. Alguns membros como: Rnd, RhoBTB, RhoH, RhoU e RhoV não apresentam esse tipo de regulação, sendo basicamente ligados a GTP. Esses membros apresentam sua expressão regulada através de fosforilação e outros mecanismos que aumentem sua estabilidade. A troca entre a forma ligada a GTP e GDP é regulada por GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) e GAPs (*GTPase-activating proteins*). GEFs ativam a família de Rho GTPase promovendo a liberação de GDP, permitindo a ligação ao GTP, enquanto que os GAPs inativam as enzimas promovendo a hidrólise de GTP. Além disso, existem modificações em suas porções

terminais que serão responsáveis por sinalizar para a sua localização na membrana plasmática, onde sua função de sinalização celular será exercida, uma vez que muitas das proteínas efetoras estão associadas a membranas. Por isso, a forma inativa de Rho GTPases é sequestrada no citosol por GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) que se ligam ao grupamento prenil na porção C-terminal de Rho, prevenindo sua associação à membranas (GARCIA-MATA; BOULTER; BURRIDGE, 2011). Isso faz com que as Rho GTPases sejam capazes de regular sinais de acordo com a sua localização subcelular.

O conceito de que as Rho GTPases estão envolvidas na organização da arquitetura celular durante a migração celular foi construído por Hall, Ridley e Nobes que, já na década de 90, demonstraram que a Rho GTPase Rac promove a formação de lamelipódia em resposta ao estímulo de PDGF (RIDLEY *et al.*, 1992), enquanto que RhoA estimula a formação de fibras de actinmiosina contrácteis com a sinalização com LPA (RIDLEY; HALL, 1992). Poucos anos depois, Nobes mostrou que Cdc42 é capaz de promover a formação de filopódia e ativar Rac (NOBES; HALL, 1995). Esses achados demonstram que existe uma interação entre os membros da família Rho GTPase e as proteínas efetoras que incluem: proteínas cinases, fosfolipases e proteínas adaptadoras, que culminarão em alterações do citoesqueleto necessárias para a migração celular. Entretanto, a expressão das Rho GTPases varia de acordo com o tecido e é regulada por diversos estímulos (HEASMAN; RIDLEY, 2008).

No contexto de leucócitos mais especificamente, para que ocorra a migração é necessária a polarização celular como dito anteriormente. Durante a migração, os leucócitos apresentam na região frontal, lamelipódios ricos em F-actina e na região caudal um uropódio contrátil (HEASMAN *et al.*, 2010). Durante a transmigração, os leucócitos estendem o lamelipódios e o filopódios abaixo do endotélio (Figura 1.9). Essas alterações conformacionais são reguladas pelas Rho GTPases Rac1 e Rac2 que regulam a polimerização da actina através de uma cascata de ativação de efetores que é iniciada no complexo WAVE e culmina na polimerização da actina através da ativação do complexo Arp2/3 (ROUGERIE; DELON, 2012) que também pode ser ativado via Cdc42 (HARRIS; TEPASS, 2010). A despolimerização da actina pode ocorrer através da ativação de cofilina, que por sua vez tem a atividade inibida por Rho e Rac. Dessa forma, as *small* GTPases são capazes de não somente induzir a polimerização de actina, como também impedir a despolimerização da mesma durante a migração de leucócitos (KIUCHI *et al.*, 2007). Além disso, a contração do uropódio também depende de sinalização mediada por membros da família de Rho GTPases como RhoA e seu efetor ROCK (SANCHEZ-MADRID; SERRADOR,

2009). Outras Rho GTPases também participam da migração de leucócitos como RhoH que quando pouco expressa altera o *homing* de leucócitos para medula óssea (TROEGER *et al.*, 2012). Entretanto, ainda há a necessidade de mais estudos para a compreensão da participação de outros membros da família na migração de leucócitos, assim como a utilização dessas moléculas como alvo terapêutico.

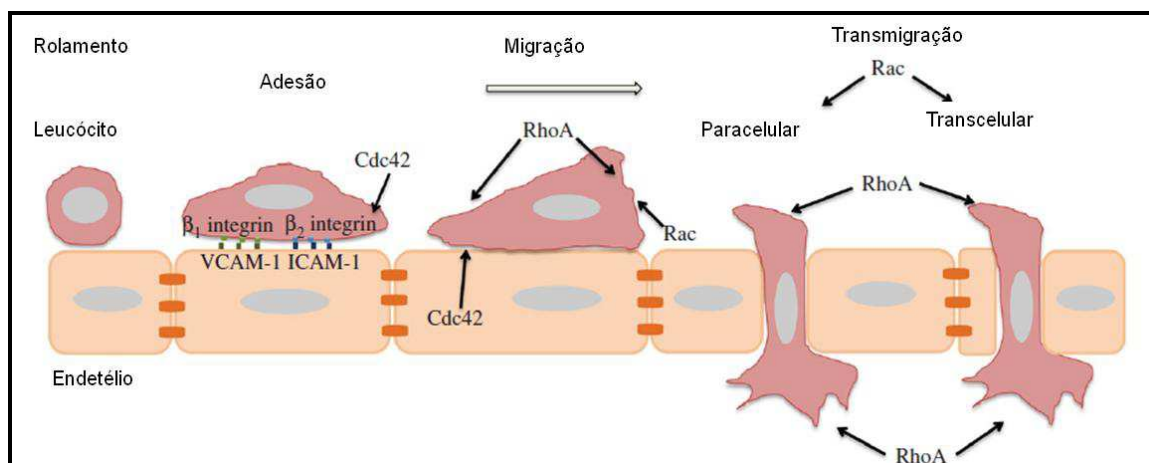


Figura 1.9: Papel de Rho GTPases na migração transendotelial: O esquema demonstra a participação de diferentes membros da família de Rho GTPases nas distintas fases da migração transendotelial. Adaptado de Infante & Ridley (INFANTE; RIDLEY, 2013).

1.7 Novas abordagens terapêuticas

1.7.1 Os inibidores de Histona Deacetilase

Os inibidores de histona deacetilase (HDACi) são uma nova classe de agentes antineoplásicos capazes de causar alterações na expressão gênica. Dentre os efeitos citotóxicos desses compostos estão: a inibição da proliferação celular, a inibição do ciclo celular e a apoptose (Figura 1.10). Por isso, estas drogas estão sendo consideradas uma nova ferramenta para a denominada terapia epigenética (BATTY; MALOUF; ISSA, 2009).

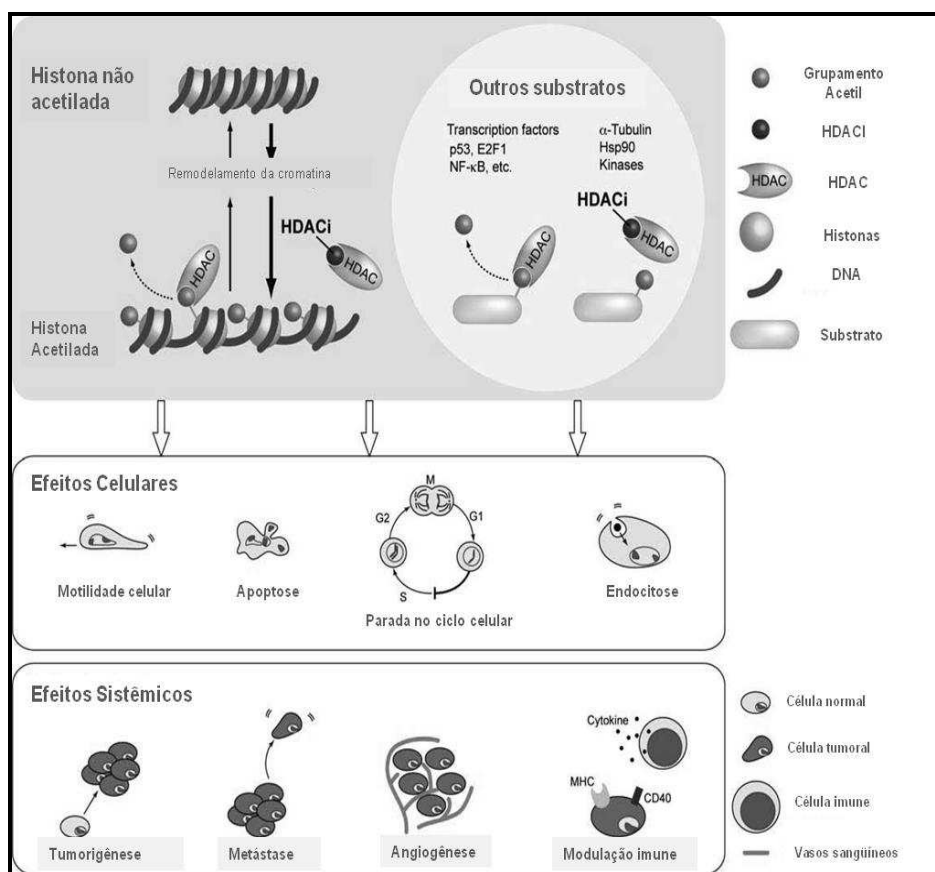


Figura 1.10: Efeitos moleculares e fisiológicos do tratamento com HDACi. HDACi previnem a deacetilação de histonas, resultando na estrutura da cromatina aberta e favorecendo a atividade transcricional, levando a efeitos celulares e sistêmicos como a apoptose, parada no ciclo celular e diminuição da metástase. Além disso, substratos não histônicos como tubulina, Hsp90 e quinases podem ter seu perfil de acetilação alterado frente a utilização desses inibidores. Adaptado de Walkinshaw & Yang (WALKINSHAW; YANG, 2008).

HDACis representam uma família de compostos químicos que apresentam quatro classes estruturais: ácidos graxos de cadeia pequena como o Butirato de Sódio, hidroxamatos como o Vorioestat ou SAHA, benzoamidas e tetrapeptídeos cíclicos. Cada classe apresenta afinidade distinta às histonas deacetilases (HDAC). Apenas a classe dos hidroxamatos, é capaz de inibir todas as HDACs clássicas e por isso são chamados de Pan-HDACi (WALKINSHAW; YANG, 2008). Dentre os HDACi de origem natural, os mais estudados são o Butirato de Sódio (NaB) – ácido graxo derivado da fermentação bacteriana de fibras no cólon (ROY *et al.*, 2006)– e a Tricostatina A (TSA) – hidroxamato isolado de *streptomyces* (YOSHIDA *et al.*, 2003). Em relação aos mecanismos envolvidos na supressão tumoral promovida pelos HDACi, é descrito que essas moléculas funcionam como co-repressores transcricionais. Estima-se que 2%-10% dos genes são alterados pelo tratamento com HDACi. Essas alterações envolvem tanto o aumento

quanto a diminuição da expressão gênica (XU; PARMIGIANI; MARKS, 2007). Além de participar da regulação da expressão gênica, esses inibidores alteram o perfil de acetilação de alvos não histônicos como tubulina, Hsp90, p53 entre outros fatores de transcrição (WALKINSHAW; YANG, 2008).

A apoptose é a principal forma pela qual os HDACi induzem morte celular. Entretanto, evidências mostram que a apoptose induzida por HDACi é independente de ativação de p53 e dependente da ativação de proteínas da família BCL-2 como BAX, BID e BIM (LINDEMANN *et al.*, 2007) e pode ser inibida pela superexpressão de proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 e BCL-XL (SUBRAMANIAN *et al.*, 2005). O mecanismo molecular responsável pela sensibilidade seletiva das células tumorais aos HDACi ainda não é bem conhecido. Algumas evidências sugerem que as células tumorais são caracterizadas por apresentarem histonas hipoacetiladas e que a superexpressão de HDAC está envolvida na tumorigênese (LIU, T. *et al.*, 2006; MAHLKNECHT; HOELZER, 2000). Outros autores acreditam que a apoptose induzida pelos HDACi depende da elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e que baixos níveis de tioredoxina presentes nas células tumorais não seriam suficientes para exercer seu papel anti-oxidante (BUTLER *et al.*, 2002).

Além da seletividade por células transformadas, os HDACi apresentam a capacidade de aumentar os efeitos citotóxicos de drogas antineoplásicas. Estudos recentes em linhagens celulares de leucemia linfoblástica T (DOS SANTOS *et al.*, 2009), em linfoma cutâneo de células T (HEIDER *et al.*, 2009), em linhagens celulares de câncer de tireóide (CATALANO *et al.*, 2007) e também, em tumores sólidos avançados (RAMALINGAM *et al.*, 2007) mostraram que é evidente a potencialização do efeito citotóxico de quimioterápicos utilizados no tratamento dessas neoplasias. Isso sugere a possibilidade de redução da dose dos quimioterápicos, mantendo os mesmos efeitos citotóxicos, consolidando a idéia da utilização de HDACi como drogas adjuvantes no tratamento, no intuito de reduzir os efeitos colaterais tóxicos observados nos protocolos de tratamento quimioterápico (DOS SANTOS *et al.*, 2009).

Até a presente data, três inibidores foram aprovados pela U.S. FDA (*United States Food and Drug Administration*) para o tratamento do linfoma cutâneo de células T (LCCT): 1- ácido hidroxâmico suberoylanilida, também chamado de vorinostat ou SAHA (Zolinza, Merck and Co., Inc.); 2- romidepsina, também chamado de depsipeptide e FK228 (Istodax, Gloucester Pharmaceuticals), utilizados para tratamento de LCCT em novembro de 2009 e para o tratamento de linfoma de células T periférico (LCTP) em maio de 2011; 3- Belinostat, também chamado de

PXD101 (Beleodaq, Spectrum Pharms, Inc.) foi aprovado em Julho de 2014 para o tratamento de LCTP (Drugs@FDA).

1.7.2 Os inibidores de PI3K

Existem seis classes de agentes inibidores da via PI3K–Akt–mTOR já sendo testadas em ensaios clínicos: pan inibidores da classe I de PI3K, inibidores de isoformas seletivas, análogos de rampamicina, inibidores de sítios ativos de mTOR, inibidores pan-PI3K-mTOR e inibidores de Akt (Figura 1.11).

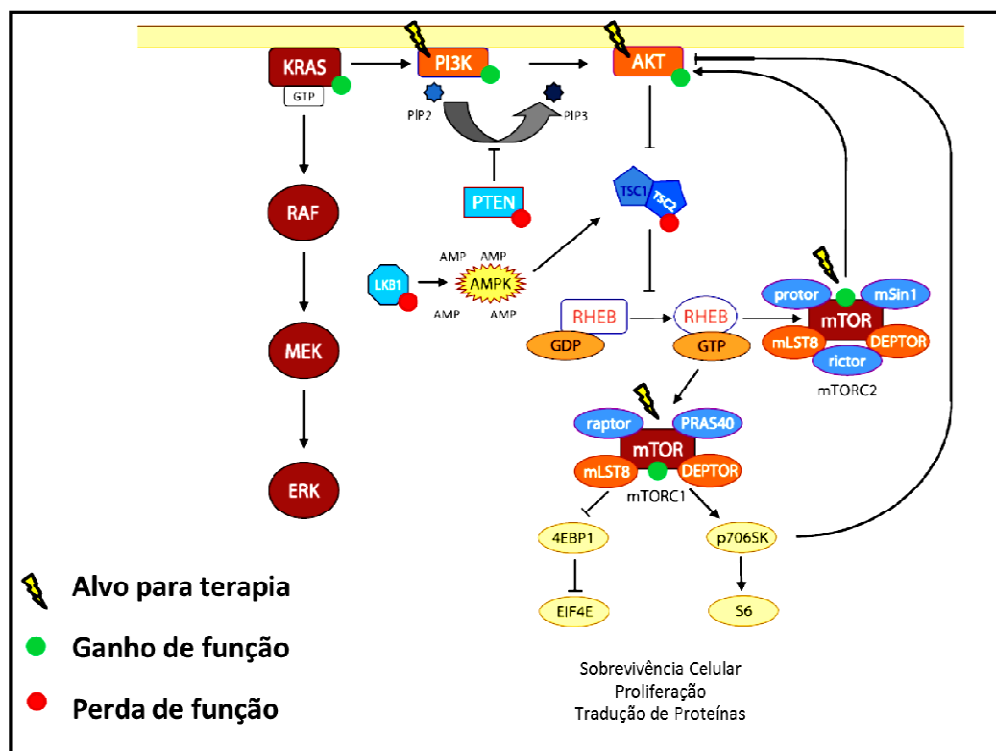


Figura 1.11: A via de PI3K/AKT/mTOR. Alvos moleculares para terapia anticâncer e as alterações mais comuns: ganho de função em verde e perda de função em vermelho. Adaptado de Polivka & Janku (POLIVKA; JANKU, 2014).

No nosso estudo daremos foco aos pan-inibidores. Estes foram os primeiros inibidores da via de PI3K a entrarem em estudos de fase clínica. Esses agentes inibem a atividade quinase de várias isoformas da subunidade p110, competindo de forma reversível pelo sítio de ligação a ATP. Muitos desses compostos passaram por fase I de estudos clínicos e foram testados em diversas doenças. Os estudos clínicos iniciais sugerem que em geral esses inibidores são bem

tolerados (BENDELL *et al.*, 2012), porém existe toxicidade relacionada ao tratamento como hiperglicemia, lesões de pele, estomatite e efeitos colaterais gastro-intestinais como náuseas, vômitos e diarreia. Embora alguns efeitos de supressão tumoral tenham sido observados, ainda não foi atingida uma resposta robusta quando esses compostos são utilizados como monoterapia, exceto em tumores com alterações conhecidas na via de PI3K/Akt/mTOR. Isso ocorre uma vez que a via de PI3K está relacionada a diversos processos fisiológicos e mTOR é a via referida como sensor de nutrientes e fatores de crescimento das células em divisão (ENGELMAN; LUO; CANTLEY, 2006). Por essas razões, as pesquisas atuais visam a busca por novos alvos que possam potencializar os efeitos encontrados com os inibidores da via de PI3K além de diminuir as doses preconizadas, que muitas vezes são intoleráveis.

1.8 Justificativa para o estudo

A busca por alvos moleculares torna-se importante no processo de tentativa de novas abordagens terapêuticas em diversos tipos de câncer, especialmente, em uma situação de falha ao tratamento. Os estudos recentes visam à identificação de biomarcadores para pacientes de risco elevado de falha ao tratamento – que seriam candidatos para os novos agentes a serem incorporados aos já existentes – no intuito de obter uma melhor resposta ao tratamento com consequente aumento de probabilidade de sobrevida. Em um estudo anterior, publicado durante o estágio de aperfeiçoamento II do Programa de Bolsas de INCA e realizado no Laboratório de Hemato-oncologia Celular e Molecular do Programa de Hemato-Oncologia Molecular, observamos que o HDACi, NaB, era capaz de potencializar a morte celular promovida por quimioterápicos utilizados no tratamento dos pacientes com LB que apresentam recidiva ou refratariedade ao tratamento de primeira linha (Anexo I). Em sequência àquele estudo, a proposta atual foi conduzida visando determinar os mecanismos envolvidos na morte celular promovida por esses compostos em células do LB, além de investigar novas vias moduladas por HDACis que contribuem para resposta ao tratamento no LB e possam ser potencializadas através de combinações de drogas alvos mais específicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal:

Analisar a expressão gênica, proteica e de miRNAs envolvidos na indução da apoptose, e na inibição da proliferação e migração celular mediada por HDACi associado à quimioterapia, ou a inibidores da via PI3K em células do LB.

2.2 Objetivos Secundários:

- Avaliar a indução de apoptose/inibição da proliferação e distribuição do ciclo celular mediados pelo Butirato de Sódio (NaB) isolado ou combinado com Etoposide (VP-16);
- Analisar o perfil de expressão gênica e as alterações transcricionais após o tratamento de linhagens do LB com NaB isolado ou combinado VP-16;
- Elucidar a participação da via de PI3K/Akt na resposta ao tratamento com NaB, VP-16 e NaB/VP em linhagem do LB;
- Avaliar o efeito do tratamento com NaB e VP-16 isolados ou combinados na expressão de c-Myc e p16 em linhagem do LB;
- Analisar a expressão dos *miR-101*, *-143* e *-145* em linhagem tratada ou não com NaB e VP-16 isolados ou combinados, e em amostras tumorais de pacientes com LB obtidas ao diagnóstico;
- Investigar a influência da expressão dos *miR-101*, *-143* e *-145* na probabilidade de sobrevida global dos pacientes com LB;
- Avaliar a sensibilidade das linhagens derivadas do LB ao PI3Ki combinado, ou não, com HDACi;
- Investigar o efeito da combinação PI3Ki e HDACi na distribuição do ciclo celular;
- Elucidar a participação da via de PI3K/Akt na resposta ao tratamento com PI3Ki e HDACi;
- Avaliar o efeito da combinação PI3Ki/HDACi na capacidade de migração das células do LB.
- Avaliar o efeito da combinação PI3Ki/HDACi na expressão gênica, protéica e na ativação de membros da família Rho GTPase

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de Pacientes

Amostras tumorais de 46 pacientes pediátricos com diagnóstico de LB matriculados no Serviço de Hematologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA) foram selecionadas retrospectivamente no período de Janeiro de 1998 a Junho de 2008. Todas as amostras foram obtidas ao diagnóstico e os pacientes tratados de acordo com o protocolo LNH-98, adaptado dos protocolos BFM 86-90. Os pacientes receberam inicialmente citorredução com ciclofosfamida e prednisona. Em seguida, os pacientes foram tratados com 4 a 6 ciclos de poliquimioterapia de acordo com o grupo de risco (KLUMB et al., 2004). O subtipo histológico do LNH-B foi classificado de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) (SABATTINI et al., 2010). Quanto ao estadiamento dos pacientes, foi utilizado o sistema *St Jude Children's Research Hospital* que classifica em uma escala de I a IV o estágio da doença, levando em consideração características observadas ao diagnóstico como o sítio e número de regiões de envolvimento da doença (MURPHY et al., 1989). Antes do início da análise, o estudo já havia sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no INCA – CEP n° 047/07, como parte do projeto INCT-Câncer (Anexo II). O critério para inclusão no estudo foi confirmação do diagnóstico de LB, idade de 1 a 18 anos e disponibilidade de material tumoral incluído em parafina no momento do estudo, e como critério de exclusão a associação do LB ao vírus da imunodeficiência humana.

3.2 Cultura de Células

As linhagens celulares Raji (ATCC® CCL-86™), Daudi gentilmente cedida pela Dr^a Emmanuelle Boulanger, na época do Laboratório de Pesquisa sobre o Timo - FIOCRUZ e Namalwa, gentilmente cedida pela Dr^a Patrícia Favaro do Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Hemocentro da Unicamp, ambas positivas para a presença do vírus Epstein Barr e com mutações no gene *p53*, foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 2mM de l-glutamina (Gibco®) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (R20) em estufa com ambiente úmido a 37 ° C com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a concentração de células mantidas nas garrafas era de 2x10⁵ células/mL de meio de cultura. Todas as linhagens foram testadas e certificadas da ausência de contaminação por micoplasma por PCR.

3.3 Identificação das Linhagens Celulares

3.3.1 Análise dos STR (*Short Tandem Repeat*) de Locos Humanos

Para a determinação dos genótipos das linhagens celulares, enviamos as amostras de DNA das linhagens para o Laboratório SONDA-UFRJ que procedeu as reações de PCR para análise dos STR de locos humanos: D2S1338, D19S433, CSF1PO, TPOX, TH01, vWA, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, FGA, D3S1358, D18S51, D8S1179, D21S11 e Amelogenina. A presença do vírus Epstein-Barr (EBV) foi detectada através da análise da expressão gênica do EBV por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando o método TaqMan®

3.4 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

O ensaio de viabilidade celular foi realizado para verificar a citotoxicidade dos quimioterápicos e inibidores nas linhagens cultivadas com diferentes concentrações de HDACi Butirato de Sódio (NaB), ácido suberoilânido hidroxâmico (SAHA; vorinostat) e PI3Ki LY294002 (LY) e Etoposide (VP-16). O método MTT é um ensaio colorimétrico que consiste na medição da atividade da desidrogenase mitocondrial e, dessa forma, avalia a viabilidade celular. Este método baseia-se na capacidade das células vivas reduzirem o sal 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo ao produto formazana (MOSMANN, 1983). Após o plaqueamento das células, as placas de 96 poços foram mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37° C por um período de 24, 48 ou 72 horas. Quatro horas antes de terminar o tempo estabelecido foram adicionados 20µL de MTT (Sigma), (concentração final de 5 mg/mL). Após a incubação retirou-se 180µL do sobrenadante de cada poço e depois foram adicionados 150µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) homogeneizando para a completa dissolução dos cristais de sal formados pelo metabolismo mitocondrial resultando assimem uma coloração. A coloração obtida possuía densidades ópticas diferentes de acordo com o metabolismo mitocondrial após tratamento das células com as drogas. As placas de 96 poços foram lidas pelo espectrofotômetro (DTX 800 Multimode Detector) (Beckman Coulter) utilizando o comprimento de onda de 492nm. Os resultados foram analisados através da absorvância de cada poço. O percentual de viabilidade foi obtido através da seguinte fórmula: [(Absorvância das células

tratadas/Absorvância das células não tratadas) x 100]. Três experimentos independentes foram realizados e para cada concentração foram feitas triplicatas.

3.5 Viabilidade celular por exclusão com azul de Tripán

Após o tratamento das linhagens celulares com NaB e VP-16 ou SAHA e LY isolados, ou combinados por 24 ou 48h, a uma alíquota das células foi adicionado azul de Tripán (Sigma) 0,04% (p/v) e analisada em microscópio em uma câmara de Neubauer. As células azuis foram contadas como células não viáveis, enquanto que as células que não apresentam o corante azul foram contadas como viáveis. A viabilidade celular foi expressa como porcentagem de células vivas e calculada em relação às células não tratadas (100% de viabilidade).

3.6 Ensaio de Indução de Apoptose (Annexin V)

O ensaio de detecção de apoptose foi utilizado para determinar a porcentagem de apoptose induzida pelos quimioterápicos nas linhagens estudadas, conforme estudos conduzidos anteriormente pelo nosso grupo (VASCONCELOS *et al.*, 2007). O annexin V faz parte de uma família de proteínas que possuem capacidade de se ligar a fosfolipídios da membrana plasmática de forma dependente de cálcio. Durante o processo de apoptose ocorrem várias alterações celulares dentre elas a perda da simetria da membrana plasmática, resultando na exposição de fosfatidilserina (FS) na face externa da membrana celular. A inversão da FS da face interna para a face externa da membrana é um evento precoce da apoptose (VAN ENGELAND *et al.*, 1998). O annexin V não é capaz de penetrar na membrana plasmática e por isso não se liga a células viáveis. Para diferenciar células vivas das células em apoptose inicial e tardia, das células em necrose, foi necessário utilizar um marcador de DNA. Neste estudo, foi utilizado como marcador de DNA o iodeto de propídeo (PI) na concentração de 50 mg/mL. Desta forma, células vivas não são marcadas nem por annexin V nem por PI; células em apoptose inicial apresentam marcação positiva para annexin V e negativa para PI; célula sem apoptose tardia são positivas tanto para annexin V quanto para PI; e células em necrose apresentam marcação positiva somente para PI (VAN ENGELAND *et al.*, 1998). Utilizamos o Kit Annexin V da InvitrogenTM para quantificação da morte celular induzida pelo tratamento com os quimioterápicos. Após incubação com NaB e VP-16, ou SAHA e LY isoladamente, ou em associação, um total de 2×10^5 células foram

centrifugadas e ao sedimento foi adicionado uma solução contendo 10 µL de tampão de ligação 10x, 2,0 µL de annexin V conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e 78 µL de água deionizada e incubado por 15 minutos, na ausência de luz em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 400 µL de tampão de ligação 1x. No momento da leitura no citometro de fluxo FACScan foi adicionado 5 µL de iodeto de propídeo (PI). A leitura foi efetuada nos canais FL-1 (530nm) para o annexin V e FL-2 (585nm) para o PI. Um total de 10.000 eventos foi adquirido por amostra e os dados foram analisados pelo software Summit v.4.3.

3.7 Análise do ciclo celular

Após incubação com NaB e VP-16 ou SAHA e LY isoladamente ou em associação, um total de 2×10^5 células das linhagens Raji, Daudi e Namalwa foram centrifugadas e ao sedimento foi adicionado 500 µl de PI (PI 50 µg/ml diluído em tampão citrato 4 mM e Triton X-100 0,3%) e RNase (ribonuclease A 100 µg/ml diluído em tampão citrato 40 mM) por 15min a temperatura ambiente. O conteúdo de DNA foi determinado analisando um total de 10.000 eventos por amostra e os dados foram analisados pelo software Summit v.4.3.

3.8 Perfil de expressão gênica

O microarranjo de DNA foi utilizado para avaliar a modulação da expressão gênica global após o tratamento da linhagem Raji com NaB ou VP-16 e a combinação NaB/VP-16 por 24h. O RNA total da linhagem foi extraído utilizando Trizol[®]. A expressão gênica das células tratadas foi comparada com as células não tratadas (controles). As análises do microarranjo foram realizadas utilizando o *Agilent Whole Human Genome Microarray 4×44K* e *One Color Quick Amp Labeling Kit* (Agilent Technologies). Duas replicatas biológicas foram incluídas para cada condição experimental. A hibridização e as lavagens foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (Agilent Technologies). Os *chips* foram escaneados utilizando o *GenePix 4000B Scanner* (Axon) e analisados no software Agilent Feature extraction (v.9.5). Para a análise das funções biológicas realizamos análise de enriquecimento de termos de ontologia gênica e o mapeamento de vias foi realizado no *KEGG pathway* através da plataforma DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). Os dados podem ser acessados

através do número de acesso GSE48399 no *Gene Expression Omnibus* (GEO). Esses experimentos e análises foram realizados em parceria com a Dra Patrícia Severino no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brasil.

3.9 Marcação de Proteínas Intracelulares

A marcação de proteínas intracelulares foi realizada para avaliarmos os efeitos na expressão de proteínas relacionadas com as vias de apoptose e proliferação nas linhagens de LB após o tratamento isolado ou combinado dos HDACis NaB e SAHA com VP-16, e do composto LY. Após a incubação por 24h em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37° C na presença, ou ausência de VP-16 (0,1µM) isoladamente ou em associação com 1mM de NaB ou SAHA 0,5µM isoladamente, ou SAHA em associação com LY (5,0µM), aproximadamente 5x10⁵ células foram permeabilizadas com 500 µL de Solução de Lise 10% (BD Bioscience) em temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugadas e lavadas com 4 mL de PBS pH 7,40, 5% de Tween-20 (LGC Biotecnologia). Para o bloqueio das ligações inespecíficas utilizamos 500 µL de PBS pH 7,4 2% SFB por 15 minutos. Em seguida, à centrifugação foi adicionado ao sedimentado 5µL do anticorpo anti-caspase-3 ativada conjugado a PE (BD PharmingenTM), 5 µL de anti-c-Myc 1:10 (Santa Cruz Biotechnology), ou 5 µL de anti-p-GSK3β (Ser9) – fosforilação relacionada com a regulação negativa da atividade enzimática - 1:10 (Cell Signalling) e realizada incubação por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após esta etapa, foram realizadas duas lavagens com 4 mL de PBS pH 7,4 0,5% de Tween-20 (LGC Biotecnologia) e as amostras foram fixadas em PBS pH 7,4 1% de formaldeído (Vetec®) para posterior leitura em Citômetro de Fluxo. Um total de 10.000 eventos foi adquirido por amostra, e os dados foram analisados pelo *software* Summit v.4.3.

3.10 Dosagem de Proteína pelo Método de Lowry

As dosagens de proteínas foram realizadas como uma etapa da preparação das amostras utilizadas para a técnica de *Western Blotting*. Para essa dosagem utilizamos o kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad). As linhagens celulares previamente tratadas ou não foram submetidas à lise em um tampão de ressuspensão contendo 40 mM de Tris-HCl, pH 7,5 e 10 mM de EDTA. Em

seguida foram acrescentados 20 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%. As amostras foram então expostas a uma temperatura de 100°C por 15 minutos para desnaturação completa das proteínas e armazenadas em freezer -80°C para posterior quantificação de proteína que foi realizada da seguinte forma: em placa de 96 poços, foi adicionado 5 µL de amostra, 25 µL de solução 1 (1 mL do reagente A + 20µL do reagente S) e 200 µL do reagente B e realizada uma incubação de 15 minutos. As leituras foram realizadas a 690nm em espectrofotômetro (Beckman DU600) contra a reação controle, utilizando uma solução 1:1 de tampão de ressuspensão e SDS em substituição à amostra protéica. As concentrações das amostras foram determinadas com base na curva padrão feita com 0,1g% de Albumina Bovina fração V (Sigma) (LOWRY *et al.*, 1951).

3.11 Western Blotting

A técnica de Western blotting foi utilizada para avaliarmos a expressão das proteínas Procaspase-3, Caspase-3, Mcl-1, c-Myc, Akt, P-Akt e p16 nas linhagens celulares tratadas com HDACi e quimioterápico, ou HDACi e inibidor de PI3K, isoladamente, ou em associação. Após a dosagem de proteínas foram acrescentados 50 µg de proteína e 10 µL de tampão de amostra contendo 0,06 M Tris-HCl, pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol e 0,025% de azul de bromofenol e 2-mercaptoetanol. As amostras foram então aplicadas em um gel para realização da eletroforese. Para realização da técnica foram utilizados géis compostos de duas partes: a parte superior contendo o gel de empilhamento composto por uma solução de acrilamida/bisacrilamida 29:1 a uma concentração de 6% em tampão Tris-HCl 375 mM 0,1% SDS pH 6.8 e a parte inferior, mais concentrada, chamada de gel de separação, composto por um solução de acrilamida:bisacrilamida 29:1 a uma concentração de 15% em tampão Tris-HCl 375mM 0,1% SDS pH 8,8. As corridas eletroforéticas foram realizadas por 18 horas a uma voltagem de 70 Volts com um tampão de corrida (Tris 25mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; pH 8,4). As transferências foram feitas em câmara semi-úmida com membrana de nitrocelulose (*Hybond-ECL* – Amersham Biosciences), embebida em tampão de transferência (25 mM Tris, 0,2 M Glicina, metanol 20%). As transferências foram realizadas por 2 horas com mili-amperagem correspondente a 0,8 x área em cm² do gel. Para a marcação de caspases, após a transferência, as membranas foram lavadas com TBS 1 vez por 5 minutos, incubadas com glutaldeído 1% em PBS pH7,4 por 30 minutos e, em seguida, lavadas com TBS 1 vez por 5 minutos. Para o bloqueio de marcação inespecífica as membranas foram incubadas por 2 horas com uma solução de TBS-T

(Tris 50mM pH7,5; NaCl 150mM; Tween 20 0,05%) contendo 5% de leite em pó desnatado. Posteriormente, as membranas foram lavadas por 3 vezes durante 5 minutos com TBS-T. Depois, as membranas foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário Procaspase-3, Caspase-3 (1:1000) (R&D systems), anti-MCL-1 (1:250) (R&D systems), anti-c-Myc (1:1000) (Epitomics), anti-Akt, anti-Phospo-Akt (Ser473) (1:1000) (Cell Signalling Technology), anti-P16 (1:100) (Santa Cruz Biotechnology) ou HSC70 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology) diluído em TBS-T 5% leite e, lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS-T. Após esse procedimento as membranas foram incubadas por mais 1 hora com os respectivos anticorpos secundários ligados a HRP e diluídos em TBS-T 5% leite sendo, subsequentemente, lavadas 4 vezes com TBS-T por 10 minutos. As membranas foram então incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos com uma mistura de volumes iguais de duas soluções (ECL Solution A + ECL Solution B) (Amersham Biosciences) para a reação de quimioluminescência, e foram expostas a um filme de raio X (Kodak Diagnostic Film/Min-R 18x24 cm) por 15 minutos. Para a marcação das caspases, as membranas foram expostas a um filme de autoradiografia de alta performance (Amersham HyperfilmTM MP). Posteriormente, os filmes foram revelados na processadora Kodak X-OMAT. A análise densitométrica das bandas foi realizada através do programa *VisionWorksLS*. Os resultados foram apresentados como razão entre a expressão da proteína teste e a expressão protéica da β -actina (controle constitutivo).

3.12 Pirosequenciamento

A linhagem celular Raji foi tratada com 1mM de NaB, 0,1 μ M de VP-16, ou a combinação NaB/VP por 24h. O DNA da linhagem celular foi extraído a partir de 6x10⁶ células utilizando o *kit Qiamp DNA* (Qiagen, Valencia, CA). O DNA foi quantificado com auxílio do NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As alíquotas de DNA foram submetidas ao tratamento químico com o bissulfito de sódio. Este agente promove a deaminação de citosinas não metiladas transformando-as em uracila (que após a reação de PCR são convertidas em timinas), mantendo as citosinas metiladas como citosinas já que o grupamento metil protege contra a reação de deaminação. O tratamento foi realizado com o *Epitect Bissulfite Kit*, Qiagen, utilizando 500ng de DNA conforme as especificações do fabricante. Esta modificação no DNA pelo bissulfito de sódio foi necessária para os estudos posteriores de avaliação da metilação do DNA por pirosequenciamento.

O pirosequenciamento baseia-se em um sequenciamento por síntese que é a análise por sequenciamento de pequenos fragmentos de DNA durante a síntese de fita complementar. A leitura da sequência é realizada a partir de uma combinação de reações enzimáticas que se inicia com a liberação de um pirofosfato, oriundo da adição de um desoxinucleotídeo à fita molde de DNA. Em seguida, o pirofosfato é convertido em ATP, pela sulfurylase, sendo esta utilizada pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal luminoso que é capturado por uma câmera charge-coupled device (CCD) acoplada ao sistema e convertido em um pico pelo Pirogram™. A luz emitida é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados. Posteriormente a enzima apirase degrada os nucleotídeos que não foram incorporados e o ATP em excesso (Figura 3.1).

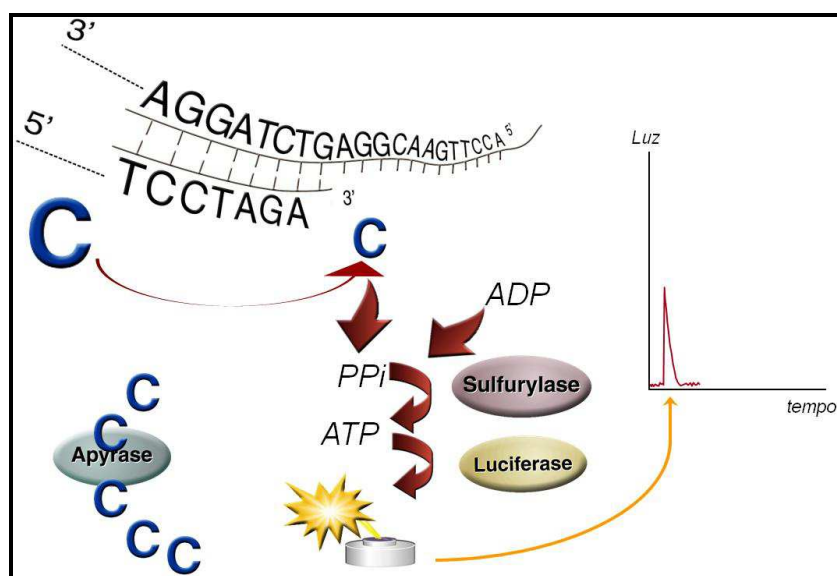


Figura 3.1: Representação esquemática do princípio do Pirosequenciamento. A adição de um nucleotídeo libera pirofosfato que é convertido em ATP pela enzima sulfurylase. O ATP é o substrato para a luciferase gerar luz que é detectada pela câmera CCD e convertida em picos pelo Picogram™. Paralelamente a enzima apirase degrada os nucleotídeos que não foram incorporados.

Adaptado de <http://cals.arizona.edu/research/cottylab/research/howweknowwhereatoxis.html>. Acessado em 01/03/2014

Primeiramente amplifica-se a região de interesse do DNA convertido com bissulfito através de uma reação de PCR convencional sendo um dos *primers* (*forward* ou *reverse*) biotilado e purificado por HPLC. Os *primers* foram sintetizados para amplificar um produto dentro da região promotora do gene selecionado. O *primer* para a região promotora do gene *p16^{INK4a}* foi sintetizado de acordo com Vasiljevic e colaboradores (VASILJEVIC *et al.*, 2011)

tendo como prioridade gerar amplicons na faixa de até 140pb que também facilita a amplificação do DNA proveniente de material incluído em parafina que se apresenta bastante degradado. As informações referentes aos *primers* estão na tabela 3.2. A reação de PCR foi realizada com os reagentes Pyromark PCR Kit (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. As condições de termociclagem foram: 95°C por 15 minutos para ativação da Taq DNA polimerase Hot Start, seguidos de ciclos de 94° por 30 segundos (desnaturação), temperatura de anelamento por 30 segundos, 72°C por 30 segundos repetidos durante 45 vezes, e extensão final a 72°C durante 10 minutos. Ao final foram aplicados 5 µL da reação de PCR em gel de agarose a 2,0% e realizada eletroforese para verificar se houve amplificação e/ou formação de dímeros de *primer*. Em sequência foi realizada a hibridização do produto de PCR com as *beads* de sefarose (GE). Foram utilizados 20 µL do produto de PCR e adicionados 2 µL de beads, 40 µL de binding buffer (Qiagen) e 18 µL de água Milli-Q. Todos os reagentes foram adicionados a uma placa e lacrada com um adesivo, alocadas no agitador por 10 minutos a 1400rpm à temperatura ambiente a fim de que as *beads* se liguem à biotina. Paralelamente a placa foi programada para o sequenciamento pelo programa *Pyro ID* no modo CpG definindo a sequência a ser analisada para obtenção das quantidades necessárias de enzimas, substratos e nucleotídeos para a reação. Após a hibridização das *beads* a placa foi levada rapidamente para a estação de lavagem (Vacum Prep Workstation), e através de sondas conectadas a um sistema à vácuo, a reação de PCR foi aspirada da placa. As sondas contendo os *amplicons* foram inseridas em recipientes contendo etanol 70% por 5s, tampão desnaturante (Qiagen) por 5s e tampão de lavagem 1X (Qiagen) por 10s. Posteriormente as sondas foram colocadas na placa do pirosequenciador contendo os *primers* (0,3 µM) de sequenciamento e aquecidas a 80°C durante 2 minutos. Em seguida, a placa permaneceu durante 5 minutos à temperatura ambiente sendo posteriormente colocada no aparelho Pyromark Q24 (Qiagen) utilizando os reagentes *PyroGold Pyromark Q24* (Qiagen). A análise dos resultados foi feita através da observação dos pirogramas. Para cada gene foi incluído um controle de tratamento com bissulfito para certificação de que a conversão foi eficiente na região analisada, evitando assim resultados falsos positivos.

3.13 PCR quantitativo em tempo real

A fração contendo RNAs pequenos das linhagens celulares foi extraída utilizando o *kit mirVana miRNA Isolation* (Ambion, Lifetechnologies), quantificadas em NanoDrop 1000

(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) e o cDNA foi sintetizado usando o *kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). PCR quantitativo em tempo real foi realizado utilizando *kit TaqMan® primer-específico* (Applied Biosystems) para transcrição reversa do *miR-101* (Part 4427975, Assay ID 002253), *miR-143* (Part 4427975, Assay ID 002249) e *miR-145* (Part 4427975, Assay ID 002278) seguido por qPCR com *TaqMan® Universal PCR Master Mix*. Os níveis de miRNA foram normalizados através da expressão dos níveis do miRNA controle *RNU6B* (Part 4427975, Assay ID 1093). As reações foram realizadas em triplicata no Applied Biosystems StepOne™, e os resultados foram expressos através da média de dois experimentos e normalizados pela expressão em células não tratadas. Para análise da expressão de *p16^{INK4a}*, o cDNA foi gerado utilizando o *Ready-to-go* (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). O PCR quantitativo em tempo real foi realizado no Applied Biosystems StepOne™ utilizando o *kit primer-specific TaqMan®* (Applied Biosystems). A expressão foi normalizada utilizando os níveis de *GAPDH* e expressa em relação aos níveis de *p16^{INK4a}* em células não tratadas.

Para a detecção da expressão de genes relacionados com a migração celular, o RNA das células previamente tratadas ou não com PI3Ki e HDACi foi extraído utilizando-se o Rneasy Mini kit (Qiagen) de acordo com as informações do fabricante e purificado através do DNase-free kit (Ambion). A quantificação do RNA, assim como a verificação da sua integridade foi realizada no Nanodrop. Para a reação do qPCR, utilizamos o kit Brilliant III ultra-fast SYBR Green QRT-PCR master mix (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação utilizamos 100ng de RNA e pares de primers na concentração de 300 mM. A sequência de pares de primers utilizada e os detalhes dos ciclos da reação encontram-se na tabela 3.1 e 3.2 respectivamente. Como controle endógeno, utilizamos o gene *GAPDH*. As reações foram realizadas em duplicata no equipamento Mx300P. As análises foram realizadas de acordo com o método $\Delta\Delta CT$.

Tabela 3.1: Sequência dos pares de primers utilizados nas reações de qPCR

Alvo	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
<i>RhoA</i>	CAA-CTA-TGA-TTA-TTA- ACG-ATG-TCC-AAC-C	TGG-TGT-GTC-AGG-TGG- GAG-TG
<i>RhoB</i>	GCC-ACG-CGC-GCC-GCG- GCC-GCG-CTG-CA	CCG-GCA-GGG-GCA-GGC- GCG-AC
<i>RhoC</i>	ACC-TGC-CTC-CTC-ATC- GTC-TTC	CAC-CTG-CTT-GCC-GTC- CAC
<i>Rac1</i>	ACA-CTT-GCT-CTC-CTA- TGT-AGT-TCT-C	TCA-CTC-CAT-TAC-AGT- ACA-ATG-TTA-TGT-C
<i>Rac2</i>	GCA-AGA-CCT-GCC-TTC- TCA-TCA	GCT-GTC-CAC-CAT-CAC- ATT-GG
<i>Rac3</i>	GTA-CAT-CCC-CAC-CGT- TTT-TG	GGC-TCA-CCA-GAG-AGA- AGC-AG
<i>Rnd1</i>	CTA-TCC-AGA-GAC-CTA- TGT-GCC	CGG-ACA-TTA-TCG-TAG- GGA-G
<i>Rnd2</i>	TCC-TGA-TTC-TGA-TGC- TGT-GCT-C	ATT-GGG-GCA-GAA-CTC- TTG-AGT-C
<i>Rnd3</i>	GAC-AGT-GTC-CTC-AAA- AAG-TGG-AAA	CTG-GCG-TCT-GCC-TGT- GAT-T
<i>GAPDH</i>	GTG-AAG-GTC-GGA-GTC- AAC-G	TGA-GGT-CAA-TGA-AGG- GGT-C

Tabela 3.2: Detalhamento dos ciclos da reação de qPCR

Ciclos	Duração do Ciclo	Temperatura
1	10 min	50°C
1	3 min	95°C
40	20s	95°C
	20s	60°C

3.14 Quantificação de miRNA em amostras de pacientes

Quarenta e seis amostras tumorais de LB pediátrico foram obtidas nos arquivos da Divisão de Patologia do Instituto Nacional de Câncer no Rio de Janeiro, Brasil. Antes das análises, o diagnóstico histopatológico foi confirmado pela patologista colaboradora do estudo (LMMR). O PCR quantitativo em tempo real foi realizado utilizando miRNA isolado de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (FFPE) utilizando o *kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (Ambion®). Cinco amostras de tecido de linfonodos reacionais FFPE foram utilizadas como amostras controle. qRT-PCR foi realizado utilizando-se o *kit primer-specific TaqMan®* (Applied Biosystems) para *miR-101*, *miR-143* e *miR-145*. Os níveis de miRNA foram normalizados através da expressão dos níveis do miRNA controle *RNU6B* e expressos em relação aos níveis dos transcritos de *miR-101*, *miR-143* e *miR-145* em relação ao linfonodo reacional.

3.15 Avaliação da migração celular

Para a avaliação da capacidade de migração celular foi realizado o ensaio de migração celular utilizando placas com insertos da *Costar Transwell™*. Estes ensaios foram realizados em placas de polipropileno com 24 poços e 12 insertos com poros de 8,0 µm (Figura 3.2). Os insertos foram lavados duas vezes com PBS e bloqueados com RPMI 0,5% BSA por 1h a 37°C. 5×10^5 células em RPMI 0,5% BSA foram tratadas com SAHA 0,5 mM ou LY 5,0 µM, isoladamente, e com a combinação SAHA/LY e aplicadas tanto nos poços sem inserto quanto na parte superior

dos poços com inserto. Na região inferior dos poços com inserto e nos poços sem insertos, adicionamos CXCL12 200ng/mL. Após 24 e 48h de incubação, contamos em câmara de Neubauer as células dos poços sem inserto e as células da parte inferior dos poços com inserto. Para o cálculo do percentual de células que migraram do inserto para a parte inferior do poço, consideramos o número de células do poço sem inserto como 100% e calculamos a % de células que migraram em relação a este poço.

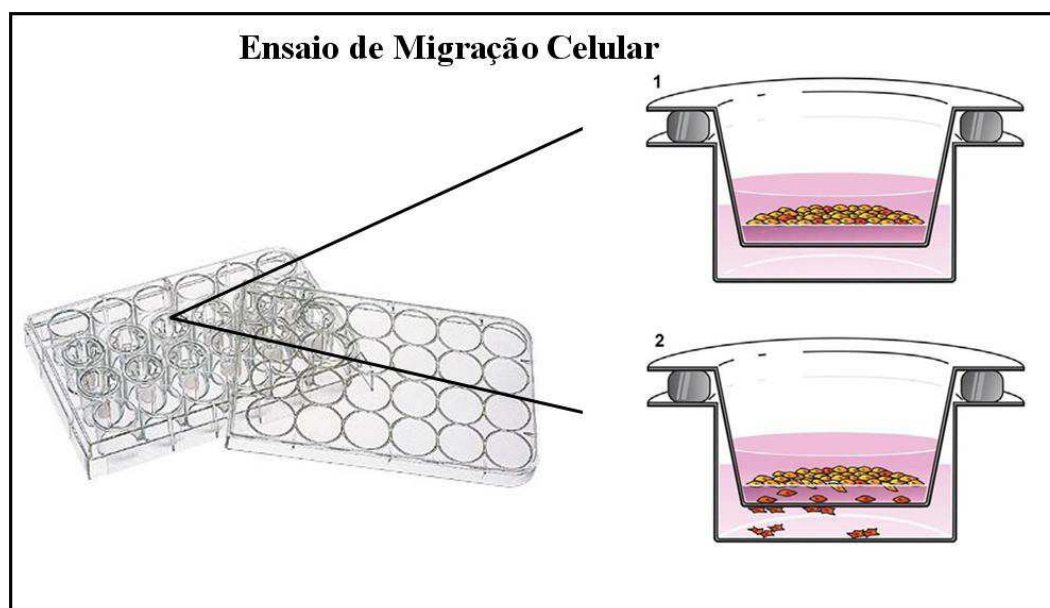


Figura 3.2: Esquema representativo do ensaio de migração celular. As células são colocadas na parte superior de insertos contidos em placas de 24 poços. Na parte inferior adicionamos CXCL12 para a geração de um gradiente de citocina. É realizada então a contagem do número de células que migram do interior do inserto para a parte de baixo da placa para a determinação da porcentagem de células capazes de migrar.

3.16 Imunofluorescência

Aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células foram tratadas por 24h com os inibidores SAHA (0,1 mM) e LY (5,0 μ M) isolados ou combinados em placas de 24 poços. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado o “meio de migração” (RPMI 0,5% BSA). As células foram transferidas para placas de 24 poços contendo lamínulas redondas para que aderissem por 15 min. As lamínulas haviam sido previamente revestidas com fibronectina 10 μ g/ml overnight, lavadas com PBS 3 vezes e bloqueadas com PBS 2,5% BSA por 1h. Após a

adesão das células nas lamínulas, o meio foi removido para a retirada das células que não aderiram e foram adicionados 500 μ L de RPMI 0,5% BSA contendo 1ng/ml de CXCL12 (Peprotech). Após 15 min, o meio foi retirado e as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 10 min, lavadas 3 vezes com PBS, permeabilizadas com PBS Triton-X-100 0,1% por 5 min e lavadas 3 vezes com PBS. Para o bloqueio das ligações inespecíficas, utilizamos PBS 2,5% BSA por 30 min. As células foram incubadas a temperatura ambiente, em câmara úmida com anticorpo primário anti α -tubulina (Sigma Aldrich) 1:500 por 2 h, lavadas com PBS 3 vezes e incubadas por 1 h com anticorpo secundário ou faloidina Alexa Fluor-546 (Invitogen) 1:200 para detecção de F-actina quando indicado. As células foram então lavadas 3 vezes por 5 min cada com PBS e em uma das lavagens foi adicionado Dapi 1:10000 para a visualização dos núcleos. As lamínulas foram montadas em lâminas utilizando-se o meio de montagem Dako e visualizadas em microscópio confocal LSM510 com a objetiva Plan-Apochromat 63x/1.40 NAOil DIC M27. Para a análise das imagens foram utilizados os softwares Zen 2009 Light Edition e Image J.

3.17 Avaliação da Ativação de RhoA

A atividade de RhoA foi verificada utilizando-se o kit G-LISA® RhoA Activation Assay Biochem Kit™ (Cytoskeleton, CO, USA) de acordo com as informações do fabricante. O kit RhoA G-LISA® contém proteína na forma Rho-GTP ligada aos poços de placas de 96 poços. A forma ativa de Rho (GTP-bound) presente nos lisados se ligará aos poços, enquanto que a forma inativa (GDP-bound) será removida durante as etapas de lavagem. A forma ativa de RhoA ligada aos poços é detectada utilizando-se anticorpo específico e quimioluminescência, lida em luminômetro (Veritas, Turner BioSystems). Como controle positivo da reação utilizamos RhoA ativa purificada e a quantidade de proteína utilizada em cada reação foi padronizada para 1,0 mg/mL.

3.18 Análise Estatística

Para análise dos dados relativos às linhagens celulares foi calculada a média \pm desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes. A análise estatística destes dados foi realizada através do teste t de Student com valor de p considerado significativo se inferior a 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Investigação do efeito da combinação NaB/VP-16 na inibição do crescimento e parada no ciclo celular na linhagem derivada de LB

A fim de avaliar a influência da combinação NaB/VP-16 na proliferação celular, contamos o número total de células após 24, 48 e 72h de incubação da linhagem Raji com o HDACi NaB e o quimioterápico VP-16 isolados ou combinados. As células sem tratamento foram consideradas 100% de viabilidade e a viabilidade celular após o tratamento foi calculada em relação às células não tratadas. A escolha das doses utilizadas foram baseadas em estudo prévio do grupo (DOS SANTOS FERREIRA et al., 2012). O NaB 1,0 mM não alterou o perfil de proliferação da linhagem Raji; VP-16 0,1 μ M inibiu 37% da proliferação, enquanto que o tratamento combinado inibiu 51% após 24h de tratamento. Quando analisamos tempos prolongados, vimos que o tratamento combinado leva a uma grande inibição da proliferação: 84 e 88% após 48 e 72h de tratamento, respectivamente. Entretanto, o VP-16 isoladamente foi capaz de inibir 84% da proliferação em 72h de incubação (Figura 4.1). Como observado previamente por nosso grupo (DOS SANTOS FERREIRA et al., 2012), o HDACi NaB potencializa a apoptose induzida por quimioterápicos em linhagens celulares derivadas de LB. Para confirmar esses dados e elucidar os mecanismos envolvidos na potencialização da apoptose, analisamos a distribuição do conteúdo do DNA na linhagem Raji por iodeto de propídeo antes e após o tratamento isolado e combinado com NaB e VP-16. Após 24h, o tratamento com NaB isoladamente levou a diminuição da porcentagem de células na fase S. O tratamento com VP-16, um clássico inibidor de topoisomerase levou a parada de aproximadamente 70% das células na fase G2/M, enquanto que a combinação NaB/VP-16 levou ao aumento da parada em G2/M com uma concomitante diminuição do percentual de células na fase S. Apesar de observarmos o mesmo perfil após 48h de tratamento, após 72h de incubação com VP-16 isolado ou combinado com NaB observamos parada em G2/M juntamente com um processo apoptótico que afetou a porcentagem de células em G1 (Figura 4.2).

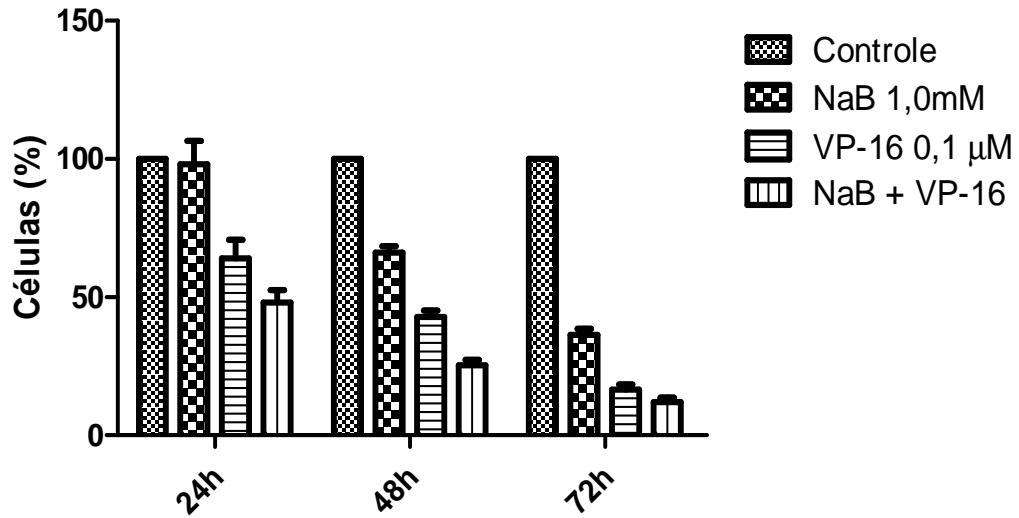


Figura 4.1: Efeito do NaB e VP-16 isolados ou combinados na linhagem Raji: As células derivadas de LB foram expostas ao NaB 1,0 mM isolado ou em combinação com VP-16 0,1 μM por 24h. O número total de células foi determinado através de contagem em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como % de células viáveis em relação às células não tratadas (controle). Os dados são média ± DP de três experimentos independentes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

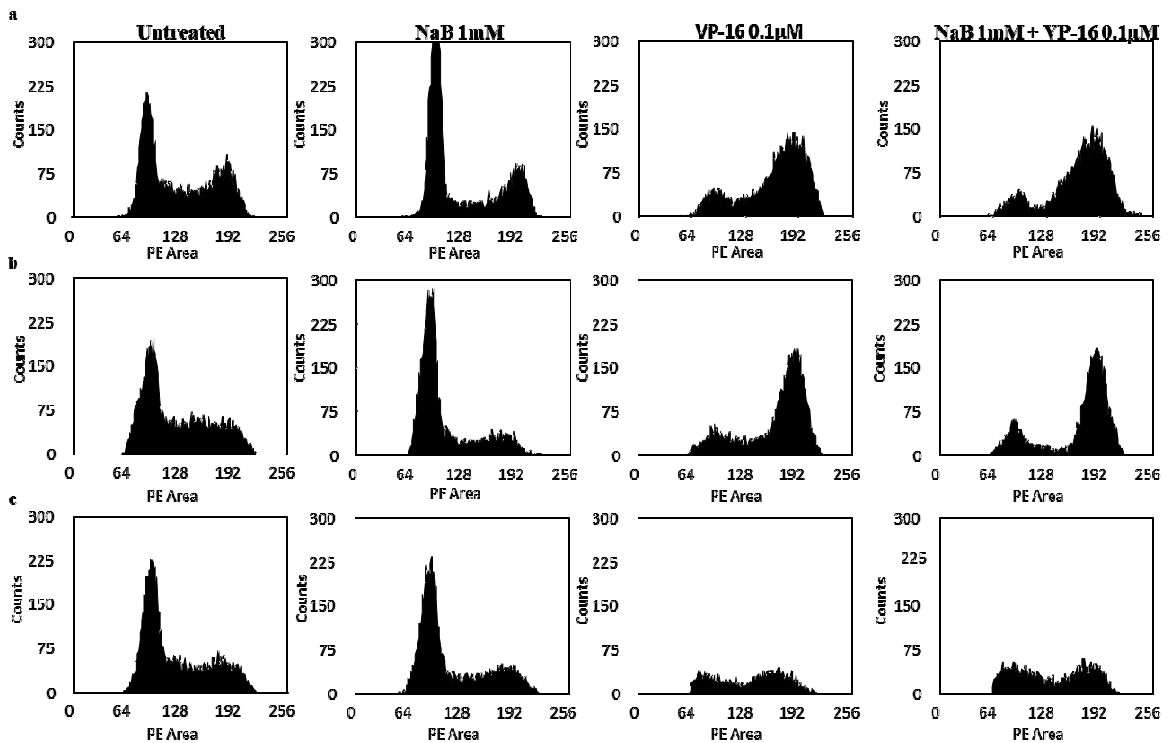
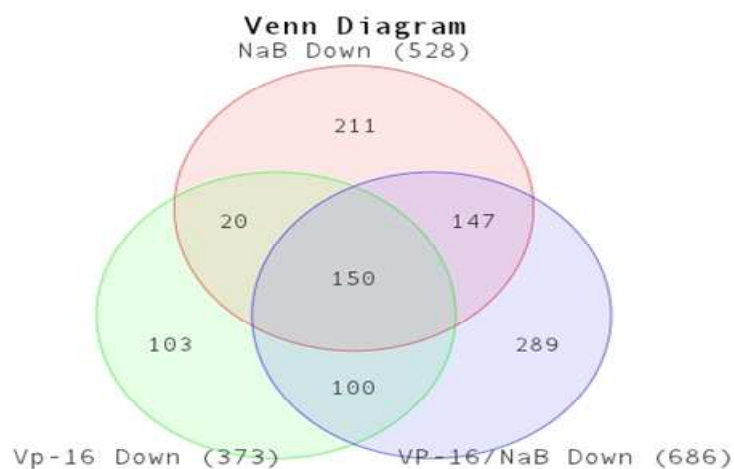


Figura 4.2: Parada no ciclo celular induzida por HDACi mais quimioterapia no LB. Após 24, 48 e 72 h de tratamento, as células Raji foram incubadas com iodeto de propídeo e o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. Gráfico representativo de três experimentos independentes.

4.2 Avaliação da participação da via de PI3K/Akt na inibição do crescimento celular mediada pelo tratamento com NaB/VP-16

Realizamos um microarranjo de DNA para delinear os mecanismos envolvidos na resposta ao tratamento da linhagem Raji com NaB, VP-16 e NaB/VP-16. O microarranjo de DNA nos permite avaliar o perfil de expressão gênica global. Observamos um perfil de expressão gênica diferencial entre os tratamentos. O tratamento com VP-16 levou a alteração da expressão de 500 genes, 729 genes foram alterados após o tratamento com NaB, enquanto que a combinação levou a alteração de 1413 genes indicando uma possível ação sinérgica da combinação NaB/VP-16 (Anexos III, IV e V respectivamente). O tratamento com VP-16 resultou no aumento de expressão de 127 genes e diminuição da expressão de 373 genes. O NaB levou ao aumento na expressão de 200 genes e diminuição de 528. Já a combinação aumentou a expressão de 727 genes e diminuiu a expressão de 686 genes (Figura 4.3). Dentre os genes desregulados após o tratamento combinado estão seis genes relacionados com a via de p53 (*hsa04115*) (*CDKN1A*, *CCND1*, *FAS*, *CHEK2*, *MDM4* e *SESN2*). A ativação dessa via de sinalização é normalmente induzida por estresse e leva a parada no ciclo celular. Identificamos também genes que apresentaram alterações na expressão e estão relacionados com morte e ciclo celular (Tabela 4.1). Quando consideramos o efeito sinérgico da combinação NaB/VP-16, identificamos desregulação em processos biológicos como replicação e reparo do DNA e desregulação da expressão de genes relacionados com fosforilação (Tabela 4.2). Dentre os genes relacionados com fosforilação podemos observar alterações na expressão do gene *PIK3CA* (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-kinase, subunidade catalítica alfa) que é responsável pela fosforilação de fosfatidilinositol, gerando PIP3 que está envolvido na proliferação celular e sobrevivência através da ativação de Akt (BADER *et al.*, 2005). Para confirmar o envolvimento da via de Akt nesse processo, realizamos a detecção da proteína Akt na sua forma total e fosforilada por *western blotting*. As análises revelaram que o tratamento combinado NaB/VP-16 reduz os níveis de fosforilação de Akt (Figura 4.4).

a Genes com expressão diminuída: Tratamento vs controle



b Genes com expressão aumentada: Tratamento vs controle

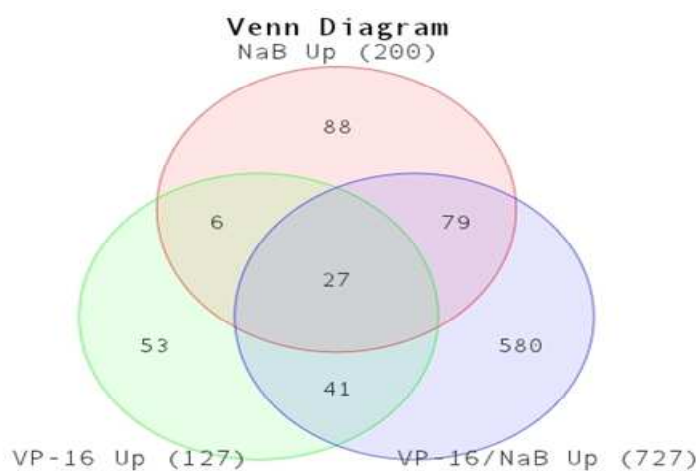


Figura 4.3: Diagrama de Venn ilustrando os genes expressos de forma comum ou exclusiva entre células tratadas com 1mM de NaB, 0,1µM de VP-16 e NaB/VP por 24h. Genes com expressão diminuída em células tratadas com NaB, VP-16 e NaB/VP comparadas com o controle (células não tratadas) (a). Genes com expressão aumentada em células tratadas com NaB, VP-16 e NaB/VP comparadas com o controle (células não tratadas) (b). Resultados representam a média de dois experimentos independentes.

Tabela 4.1: Termos de Ontologia gênica (GO) e Kegg (has) significativamente representados considerando genes expressos diferencialmente nos tratamentos VP-16 0,1 μ M e NaB/VP-16 vs células não tratadas.

Termo	Genes	Valor de <i>p</i>
hsa04115: via de p53	CDKN1A, CCND1, FAS, CHEK2, MDM4, SESN2	5.84E-03
GO:0007049: Ciclo celular	YEATS4, CCPG1, CDC14A, CEP135, PIM1, SKP2, CHEK2, UBE2C, SESN2, DDIT3, MIS12, CCND1, CDKN1A, PLK3, DUSP1, DMTF1, PLK1, TFDP2, PSMD2, TUBE1, HBP1, MDM4, CHFR, PPP1R15A	4.14E-03
GO:0010941: regulação da morte celular	CEBPB, NOL3, SLC25A4, IL7, CEBPG, PIM1, LGALS12, SKP2, NFKBIA, TNFRSF8, NR4A1, HSPA1A, WRN, CHEK2, DDIT3, ATF5, CDKN1A, DUSP1, TIAM2, JUN, BIK, FAS, TNFAIP3, RASA1	7.40E-03

Tabela 4.2: Termos de Ontologia gênica (GO) significativamente representados considerando genes expressos diferencialmente apenas no tratamento NaB/VP-16 comparado com células não tratadas.

Termo	Genes	Valor de <i>p</i>
GO:0006259 Processos metabólicos relacionado a DNA	KIF22, HMGB2, RAG1AP1, DBF4, MGMT, PML, CDC34, POLA2, XRCC1, OBFC2A, TK1, CDT1, CCNE2, CDKN2A, SLK, POLE3, ORC6L, POLN, FBXO4, PMS2CL, POLQ, PMS1, WDR33, RECQL5, RAD51AP1, USP1, TP53BP1, GINS4, NEIL1, RAD9B, APTX, SMC6, SIRT1, CDC25A, RAD51, TNKS1BP1, RNF8, PNKP, RECQL, CCDC111, VCP, RRM2, POLD2, TBRG1, TEP1, AICDA, NHEJ1	1.70E-03
GO:0006260 Replicação do DNA	HMGB2, DBF4, GINS4, RAD9B, CDC34, POLA2, SIRT1, CDC25A, TK1, RAD51, CDT1, TNKS1BP1, CCNE2, PNKP, CCDC111, POLE3, RRM2, POLD2, ORC6L, TBRG1, POLN, POLQ	3.50E-03
GO:0006281 Reparo do DNA	KIF22, HMGB2, MGMT, PML, OBFC2A, XRCC1, SLK, POLN, PMS2CL, POLQ, PMS1, WDR33, RAD51AP1, RECQL5, USP1, TP53BP1, NEIL1, APTX, SMC6, RAD9B, SIRT1, RAD51, RNF8, PNKP, RECQL, VCP, POLD2, NHEJ1	8.25E-03
GO:0006796 Processos Metabólicos Relacionado a Fosfato	BCKDK, PRPF4B, EFNA1, SYNJ1, PINK1, TTK, AURKA, TIMM50, CLK1, FER, DMPK, NDUFS5, SLK, AAK1, PLA2G1B, PIK3CA , PAK1, ADAM9, MINPP1, DBNL, TRPM7, CDK8, PRKCH, PRKCE, CDKL3, CDKL5, SACM1L, MAP4K3, DDR1, ATP6V1A, PNKP, PRKD2, MAST2, MAPK8, TXK, RAGE, CSNK1G3, EIF2AK3, NEK6, NEK7, PRKCZ, MVD, ADORA2B, PPM1A, HK2, MAPKAPK3, PML, DUSP12, ATP5G1, NDUFB1, GALK1, MTM1, GNPTAB, PPP2CA, LMTK2, CAMK2B, MTMR6, PTPRC, LTK, PTPN2, RYK, PDK3, NADK, HGF, CDC25A, NDUFV3, PLK4, RPS6KA1, GMFG, SLC17A4, PTP4A1, ATP6V1E1, IKBKB, BMP7	1.43E-02

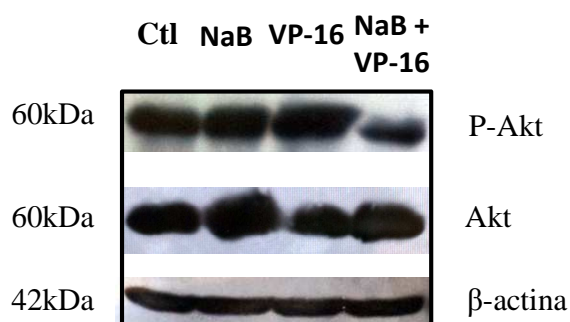


Figura 4.4: Efeito do tratamento combinado nos níveis de expressão de Akt na linhagem Raji. As células foram tratadas com NaB 1mM ou VP-16 0,1 μ M isoladamente ou em combinação. Após 24h, os níveis de fosforilação de Akt foram avaliados por *Western blotting*. Figura representativa de três experimentos independentes.

4.3 Análise da expressão de c-Myc e o efeito na proliferação celular

Uma vez que os novos trabalhos que descrevem o modelo de patogênese do LB mostram que o perfil proliferativo encontrado nesse tumor está diretamente relacionado com expressão aumentada de c-Myc que interage com a via de PI3K/Akt, avaliamos a expressão de c-Myc antes e após o tratamento com NaB e VP-16 isolados, ou combinados. Após 48h de tratamento, a expressão da proteína c-Myc diminuiu em aproximadamente 60% ($p \leq 0.005$) quando comparada com as células não tratadas, corroborando os resultados anteriores que mostram a inibição do crescimento celular após o tratamento com a combinação NaB/VP-16 (Figura 4.5). Esses resultados estão de acordo com o observado em relação ao marcador de proliferação MIB-1 (Ki-67) que apresentou diminuição da sua expressão em 1,6 vezes após o tratamento combinado (GSE48399) (DOS SANTOS FERREIRA *et al.*, 2014).

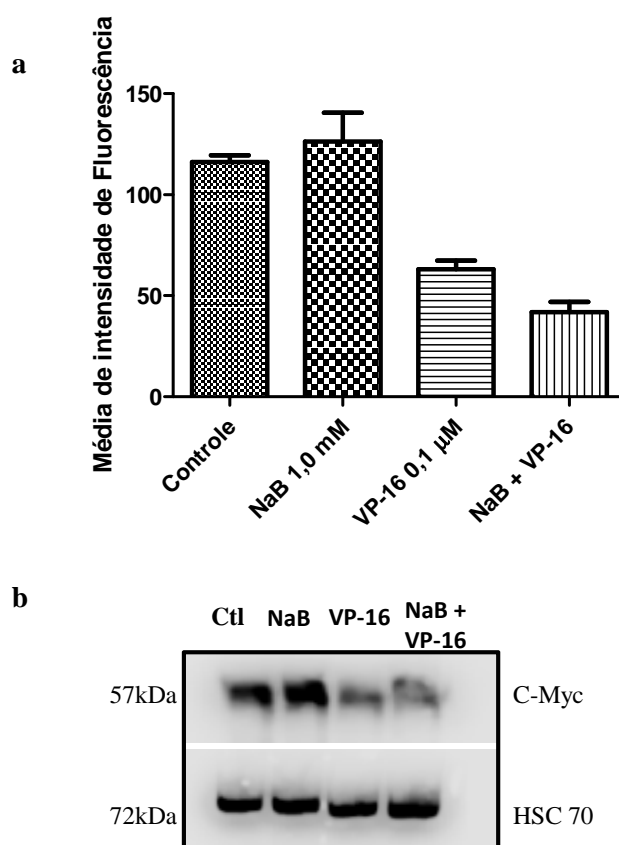


Figura 4.5: Diminuição da expressão de c-Myc mediada por HDACi. A linhagem celular Raji foi tratada com NaB 1,0 mM isoladamente ou em combinação com VP-16 0,1 μM. Após 24h, a expressão de c-Myc foi analisada por citometria de fluxo (a) e confirmada por *Western blotting* (b). Dados expressam a média de três experimentos independentes. Significância em relação ao tratamento simples ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.4 Análise dos níveis de expressão de proteína e de RNAm de $p16^{INK4a}$ nas células do LB

O $p16^{INK4a}$ é um gene supressor tumoral crítico na regulação do ciclo celular e por isso avaliamos a expressão dos níveis de RNAm e proteína antes e após o tratamento com NaB, VP-16 e suas combinações durante 24h. Observamos que o tratamento leva ao aumento da expressão tanto dos níveis de RNAm quanto dos níveis da proteína. Uma vez que já foi demonstrado que o aumento na acetilação de histonas está relacionado com uma diminuição significativa na metilação global (OU *et al.*, 2007), avaliamos o percentual de metilação no promotor do gene $p16^{INK4a}$ na linhagem Raji e observamos 96% de metilação. Após 24h de tratamento com a combinação NaB/VP-16 houve uma discreta diminuição no percentual de metilação da região promotora de $p16^{INK4a}$ (Figura 4.6).

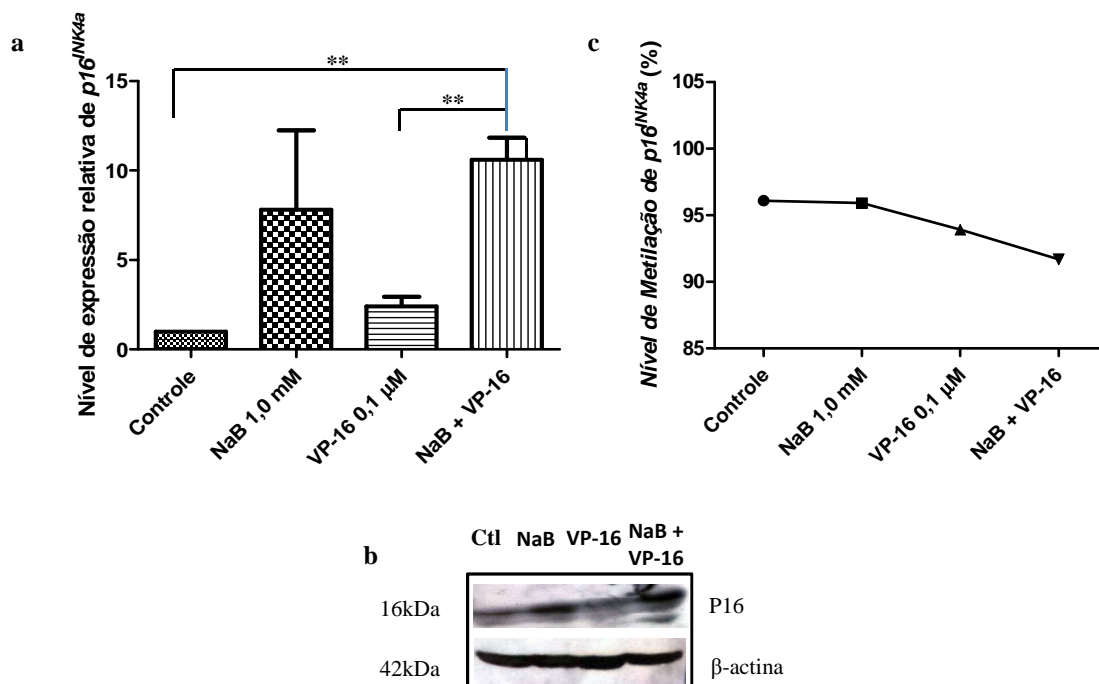


Figura 4.6: Efeito do tratamento combinado nos níveis de expressão de $p16^{INK4a}$ nas células Raji. A linhagem foi tratada com o HDACi NaB, e quimioterápico por 24h. Os níveis de expressão de $p16^{INK4a}$ após o tratamento foram avaliados por qPCR (a) e os níveis de proteína por *Western blotting* (b). O perfil de metilação do promotor de $p16^{INK4a}$ foi verificado por pirosequenciamento (c). Dados demonstram média de três experimentos independentes. Significância em relação ao tratamento simples: $**p < 0.01$

4.5 Avaliação da expressão dos microRNAs *miR-101*, *miR-143* e *miR-145* na linhagem Raji e em amostras tumorais de pacientes com LB

Baseados na premissa de que a inibição do crescimento celular depende de diferentes vias que envolvem tanto a regulação da transcrição quanto a regulação pós transcricional, avaliamos se a inibição do crescimento celular mediado pelo tratamento combinado NaB/VP-16 estaria relacionada com alterações na expressão de miRNAs que possuem como alvo genes relacionados com a via de PI3K/Akt visto a cooperação desta via descrita recentemente como importante na patogênese do LB.

Para avaliar o efeito do tratamento com NaB, VP-16 ou NaB/VP-16 combinados, verificamos os níveis de expressão de *miR-101*, *miR-143* e *miR-145*, por PCR em tempo real, após 24h de tratamento. Observamos que o tratamento combinado NaB/VP-16 levou ao aumento da expressão de todos os miRNAs estudados. Entretanto, quando analisamos a expressão do *miR-145* podemos

observar um grande aumento, em aproximadamente 14 vezes na sua expressão quando comparado com as células não tratadas (Figura 5.7). Analisamos ainda a expressão dos mesmos miRNAs em 46 amostras de pacientes com LB. Encontramos 86% das amostras tumorais com uma expressão extremamente baixa dos *miR-143* e *miR-145* e 95% dos casos apresentaram baixa expressão do *miR-101* comparado com a expressão encontrada em 5 linfonodos reacionais que foram utilizados como controle (Figura 4.8).

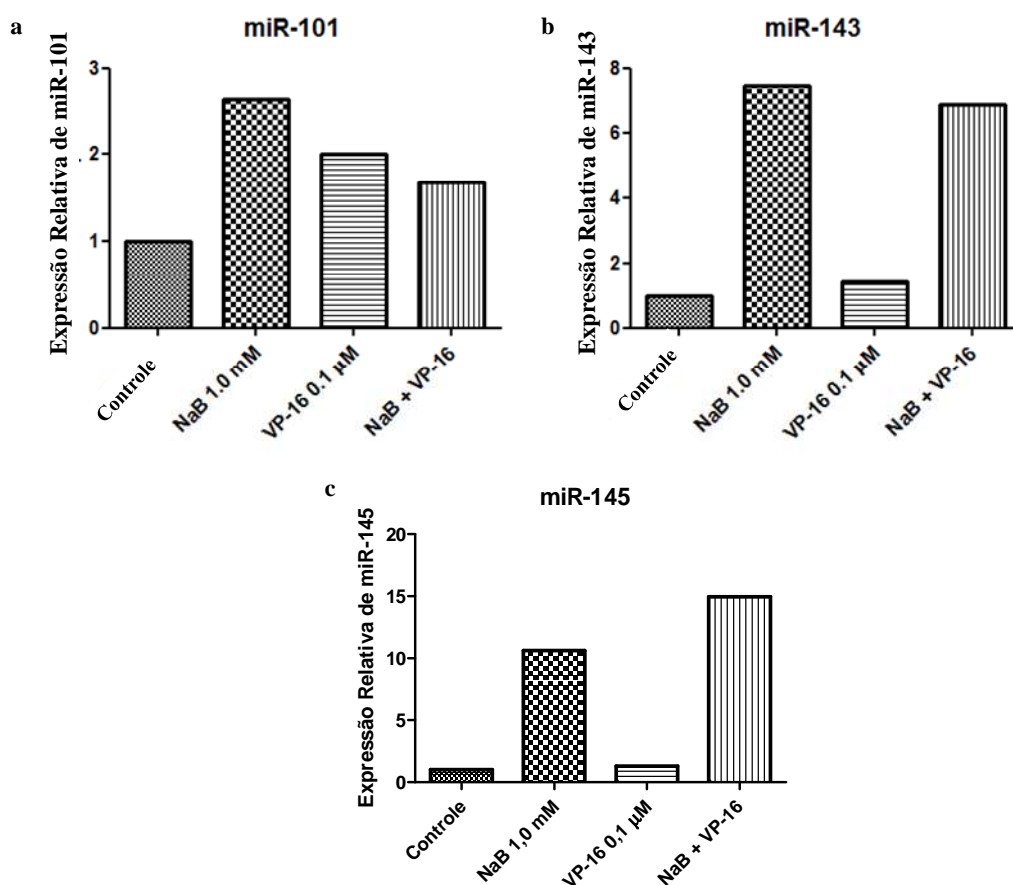


Figura 4.7: Efeito do HDACi e VP-16 na expressão de miRNAs. Após 24h de tratamento, o miRNA total foi extraído e *miR-101* (a), *miR-143* (b) e *miR-145* (c) foram amplificados e analisados utilizando qPCR Taqman. Gráfico representando a média de 2 experimentos independentes.

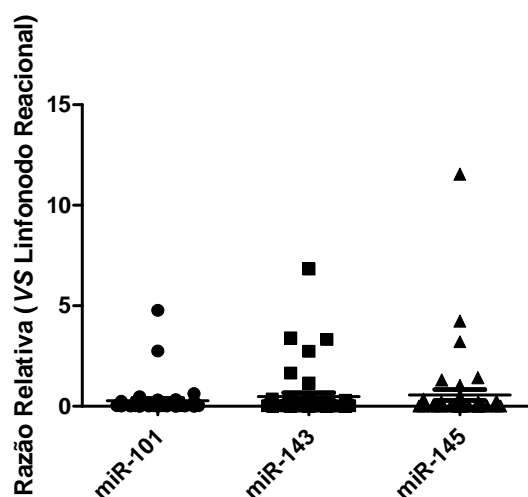


Figura 4.8: Perfil de expressão dos *miR-101*, *miR-143*, e *miR-145* em amostras de pacientes com LB. Os miRNAs de 46 casos de LB pediátricos foram isolados de tecido FFPE e a expressão dos *miR-101*, *-143* e *-145* foi avaliada utilizando qPCR. A expressão relativa dos miRNAs de amostras de pacientes foi comparada com a média de expressão de 5 miRNA em cinco amostras de linfonodos reacionais.

4.6 Análise do efeito da inibição da via de PI3K isoladamente ou combinada com a inibição de HDAC na viabilidade de linhagens celulares derivadas de LB

Uma vez que os resultados anteriores demonstraram o envolvimento da via de PI3K/Akt na proliferação celular, avaliamos se a inibição desta via era capaz de potencializar os efeitos do HDACi SAHA em linhagens derivadas do LB. Realizamos ensaio de viabilidade celular por MTT utilizando as linhagens Namalwa, Daudi e Raji tratadas ou não SAHA (0 - 5,0 μM) (Figura 4.9) e LY (0 - 10,0 μM) por 24, 48 e 72h (Figura 4.10).

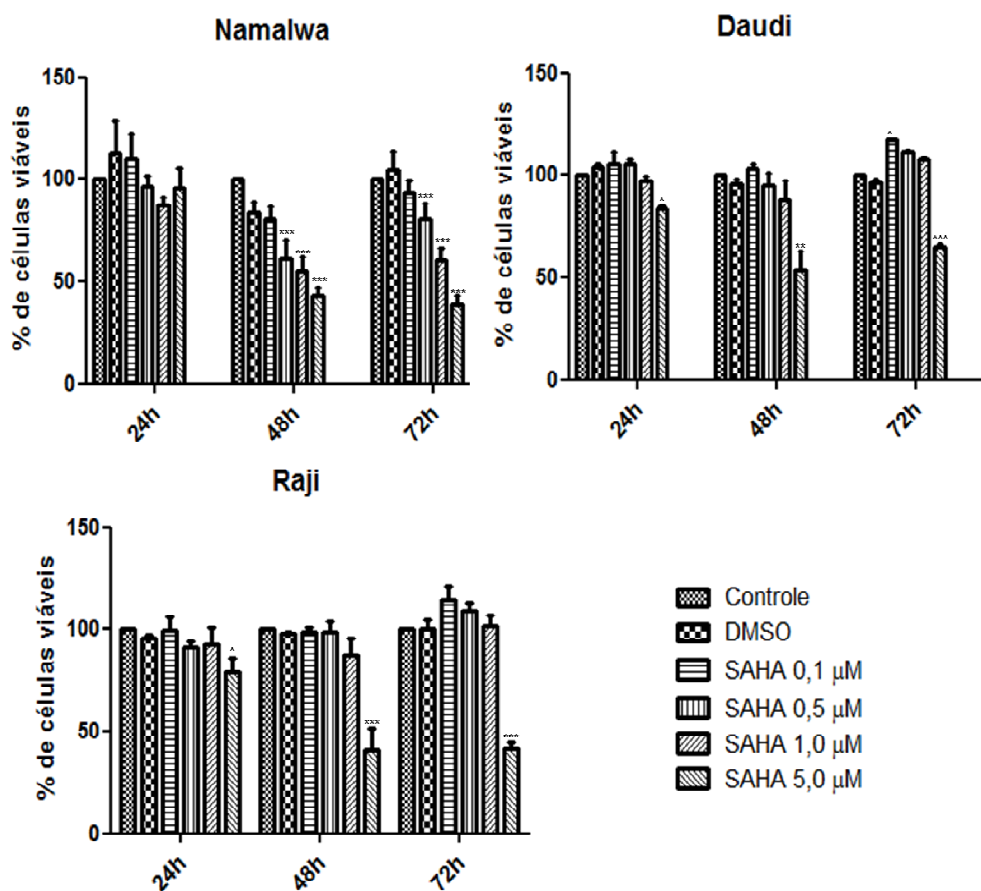


Figura 4.9: Curva de dose e resposta ao SAHA nas linhagens Namalwa, Daudi e Raji. As linhagens foram tratadas ou não com SAHA (0 - 5,0 μ M) por 24, 48 e 72h. A viabilidade celular foi avaliada por MTT. Dados são expressos através de média \pm DP de três experimentos independentes. Significância em relação às células não tratadas: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

O ensaio de MTT foi realizado para determinarmos as concentrações dos inibidores que seriam utilizadas nos próximos experimentos. Para a avaliação do efeito da combinação dos inibidores, as linhagens foram tratadas com SAHA 0,5 μ M e Ly 5,0 μ M isolados ou combinados por 48h e contadas com azul de Tripán. A combinação potencializou a inibição da proliferação nas linhagens Namalwa e Daudi (Figura 4.11).

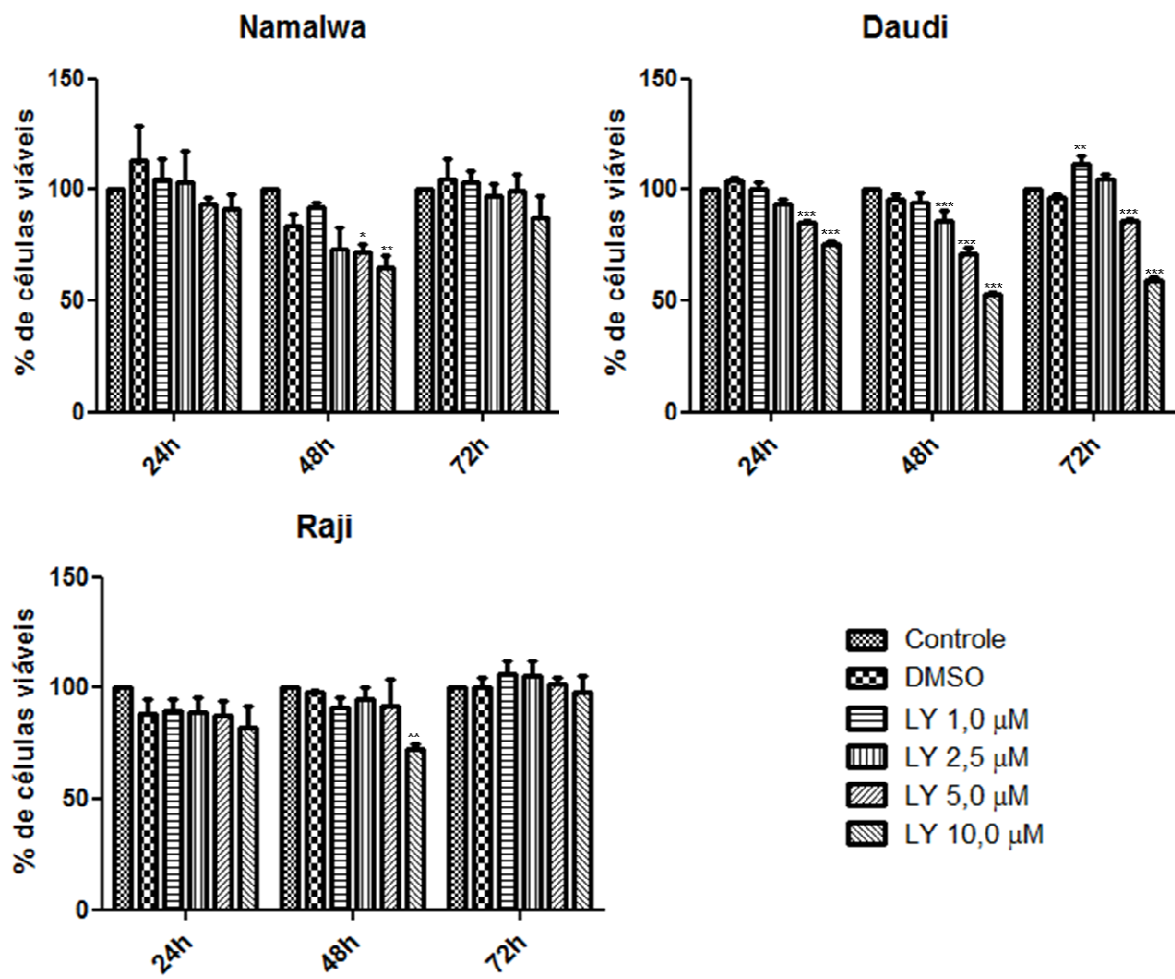


Figura 4.10: Curva de dose e resposta ao LY nas linhagens Namalwa, Daudi e Raji. As linhagens foram tratadas ou não com LY (0 - 10,0 μM) por 24, 48 e 72h. A viabilidade celular foi avaliada por MTT. Dados são expressos através de média ± DP de três experimentos independentes. Significância em relação às células não tratadas: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

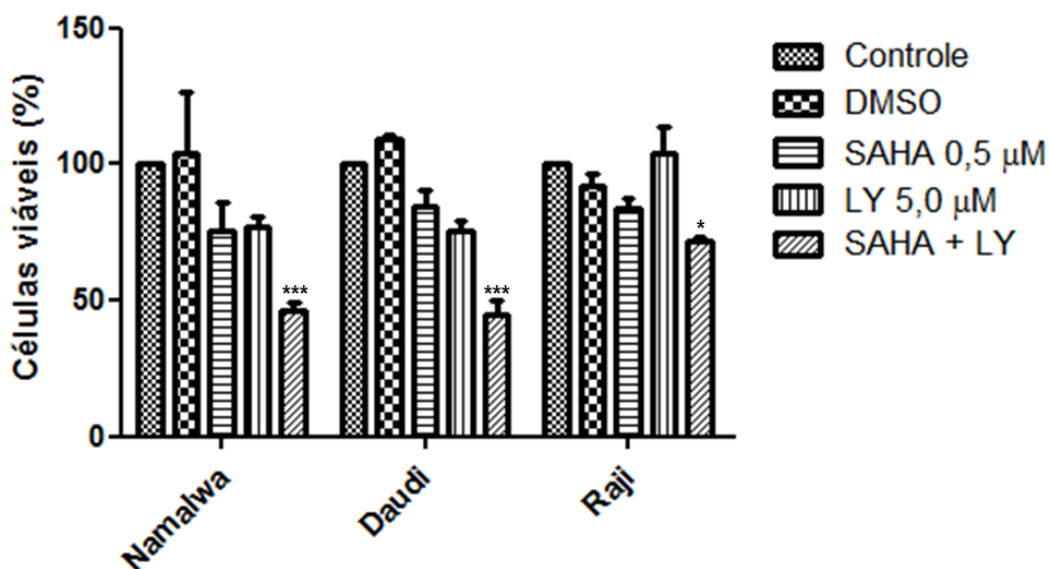


Figura 4.11: Efeito do HDACi SAHA isolado ou combinado com o PI3Ki LY nas linhagens Namalwa, Daudi e Raji. As linhagens foram tratadas ou não com SAHA 0,5 µM, LY 5,0 µM ou a combinação SAHA + LY por 48h. A viabilidade celular foi avaliada por exclusão por azul de Tripán. Dados são expressos através de média ± DP de três experimentos independentes. Significância em relação às células não tratadas: *P<0,05; ***P<0,001

4.7 Avaliação da combinação de HDACi e PI3Ki na indução de morte celular no LB

Para avaliar e caracterizar a indução de morte celular promovida pelo SAHA e LY isolados ou combinados, realizamos o ensaio de anexina V após a incubação das linhagens Namalwa e Daudi com SAHA 0,5 µM, LY 5,0 µM e a combinação SAHA/LY por 48h. Os inibidores isolados foram capazes de levar a uma pequena porcentagem de marcação com anexina V, enquanto que a combinação não foi capaz de potencializar de forma significativa a marcação por anexina V (Figura 4.12). Por *western blotting*, observamos a clivagem da caspase 3 e diminuição de MCL1 após o tratamento combinado na linhagem Namalwa (Figura 4.13), indicando a ativação de apoptose.

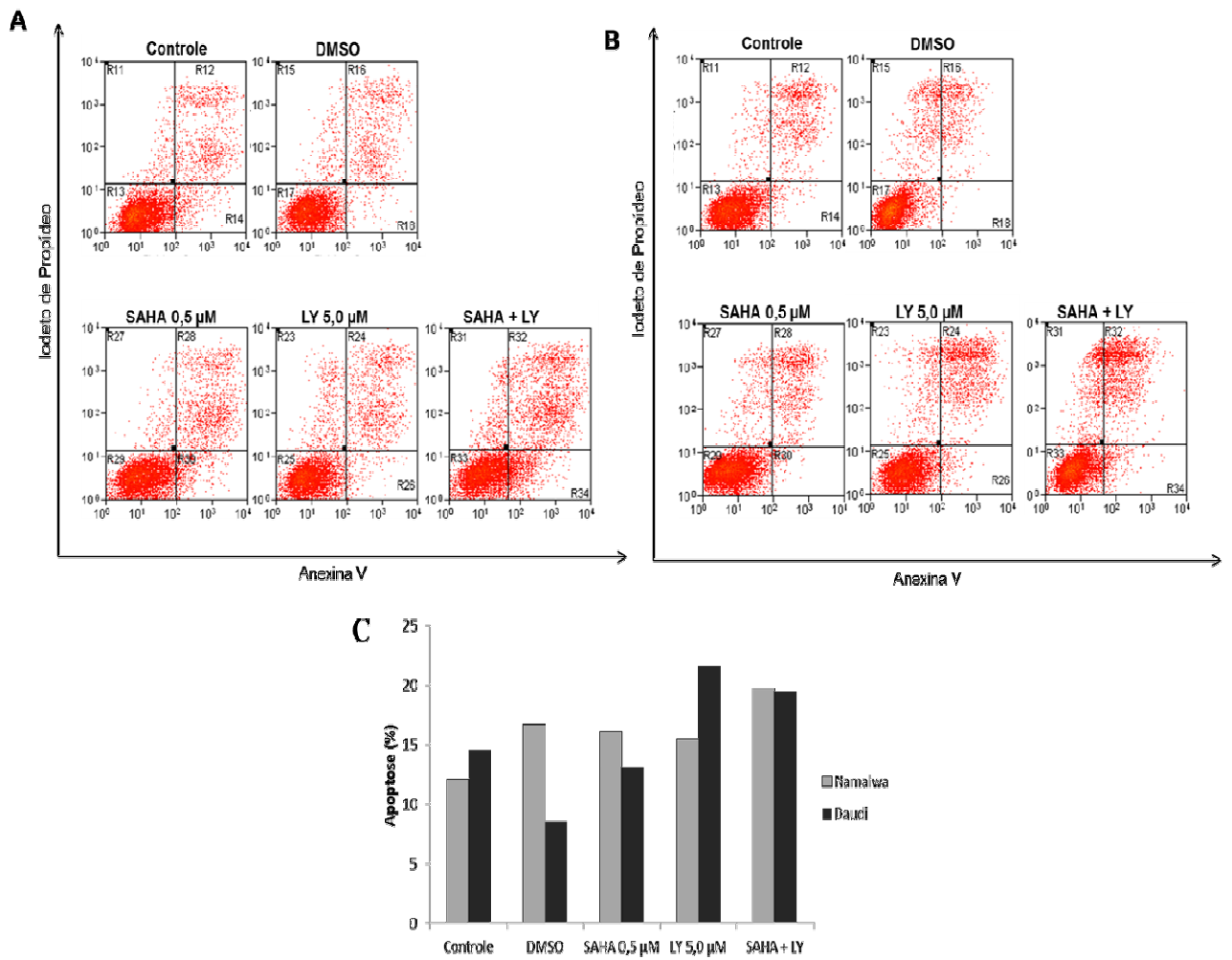


Figura 4.12: Efeito do HDACi SAHA isolado ou combinado com o PI3Ki LY nas linhagens Namalwa e Daudi. As linhagens foram tratadas ou não com SAHA 0,5 μ M, LY 5,0 μ M ou a combinação SAHA + LY por 48h. A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com Anexina V e Iodeto de próideio. Gráfico representativo de três experimentos independentes.

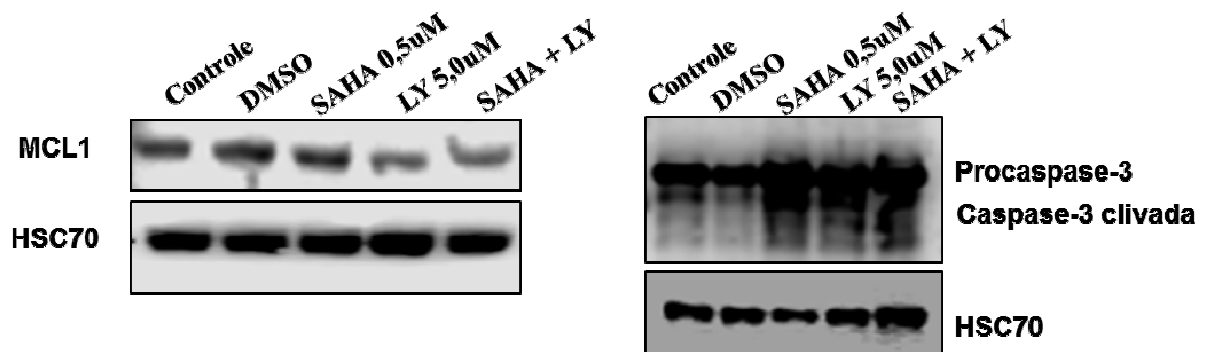


Figura 4.13: Avaliação do efeito do HDACi SAHA isolado ou combinado com o PI3Ki LY na expressão de proteínas relacionadas com a apoptose na linhagem Namalwa. A linhagem foi tratada ou não com SAHA 0,5 µM, LY 5,0 µM ou a combinação SAHA + LY por 48h. A expressão das proteínas antiapoptótica MCL1 e proapoptótica Caspase-3 foi avaliada por *western blotting*. Experimento representativo de três experimentos independentes.

4.8 Determinação da influência da combinação SAHA/LY na distribuição do ciclo celular

Avaliamos a distribuição do conteúdo de DNA das linhagens Namalwa e Daudi tratadas ou não com os inibidores isolados e combinados. O HDACi SAHA não alterou de forma significativa a distribuição do conteúdo de DNA. O tratamento com o inibidor de PI3K levou a uma parada das células na fase G0/G1 na linhagem Namalwa e Daudi. Enquanto que a combinação potencializou a parada do ciclo celular em G0/G1 com concomitante diminuição da fase S, confirmando o seu efeito de inibição da proliferação observado anteriormente no ensaio de exclusão por azul de Tripán (Figura 4.14).

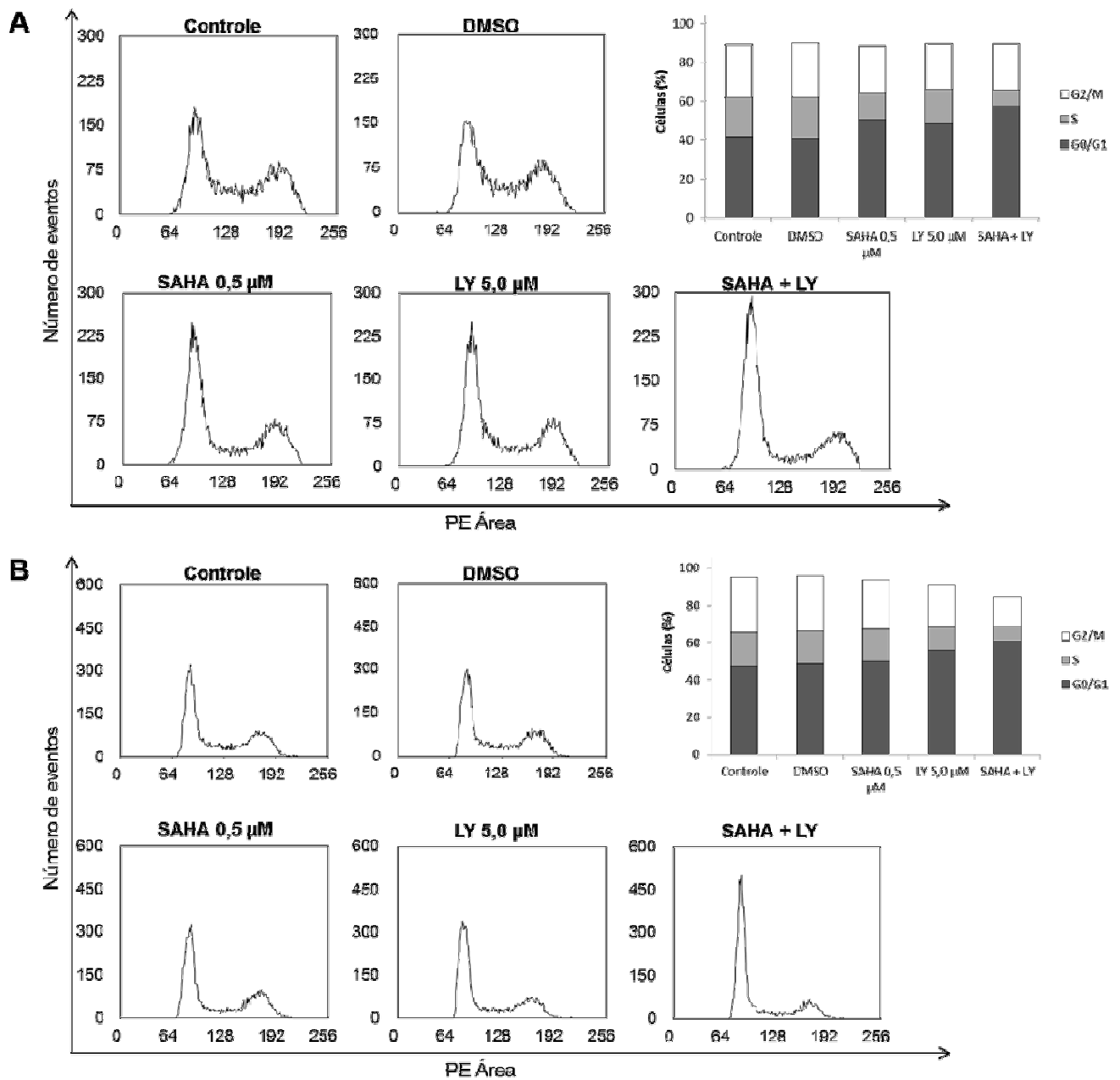


Figura 4.14: Avaliação do efeito do HDACi SAHA isolado ou combinado com o PI3Ki LY na distribuição do conteúdo de DNA. As linhagens Namalwa (A) e Daudi (B) foram tratadas ou não com SAHA 0,5 μM , LY 5,0 μM ou a combinação SAHA + LY por 48h. O conteúdo de DNA foi avaliado por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes.

4.9 Investigação do efeito mediado pelo SAHA, LY e suas combinações na via de PI3K/Akt

A fim de caracterizar as vias envolvidas na inibição da proliferação celular mediada pelo tratamento das linhagens derivadas de LB com a combinação SAHA/LY, avaliamos a expressão de proteínas relacionadas com as vias de proliferação antes e após o tratamento das células com os inibidores isolados ou combinados na linhagem Namalwa e/ou Daudi. O tratamento com LY 5,0 μM isolado ou combinado com SAHA 0,5 μM levou a diminuição da fosforilação de ERK 1/2 e Akt nas linhagens Daudi e Namalwa, demonstrando seu efeito específico de inibir PI3K (Figura 4.15). Avaliamos também a fosforilação de GSK3 β na serina 9 que é capaz de inibir GSK3 β . Quando não fosforilada e dessa forma ativa, GSK3 β apresenta um papel essencial em diversos processos celulares que incluem: proliferação, diferenciação, inflamação, motilidade e sobrevivência. Observamos diminuição de fosforilação de GSK3 β na linhagem Namalwa após 48h de tratamento com SAHA e LY isolados. (Figura 4.16).

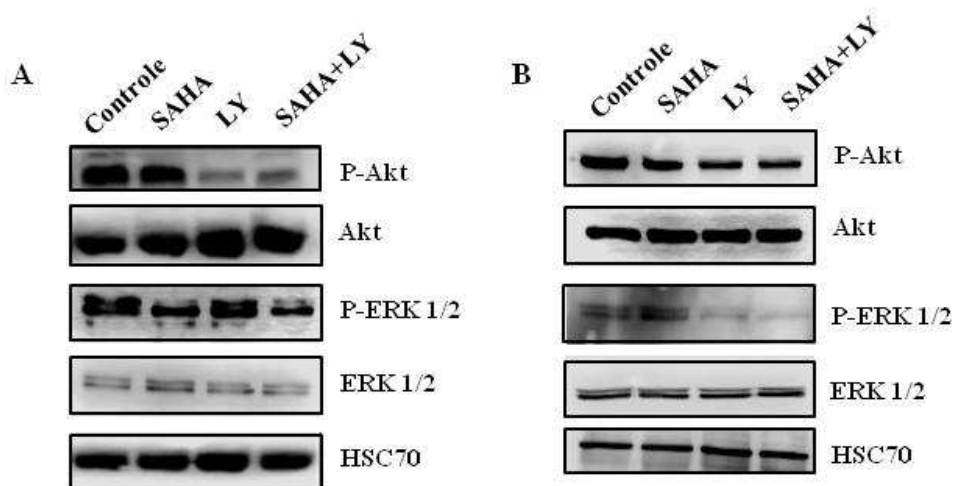


Figura 4.15: Avaliação da ativação de vias de proliferação: As linhagens Namalwa (A) e Daudi (B) foram tratadas com os HDACi e PI3Ki isolados ou combinados. Os níveis de fosforilação de Akt e ERK1/2 foram avaliados por *western blotting*. Figura representativa de três experimentos independentes.

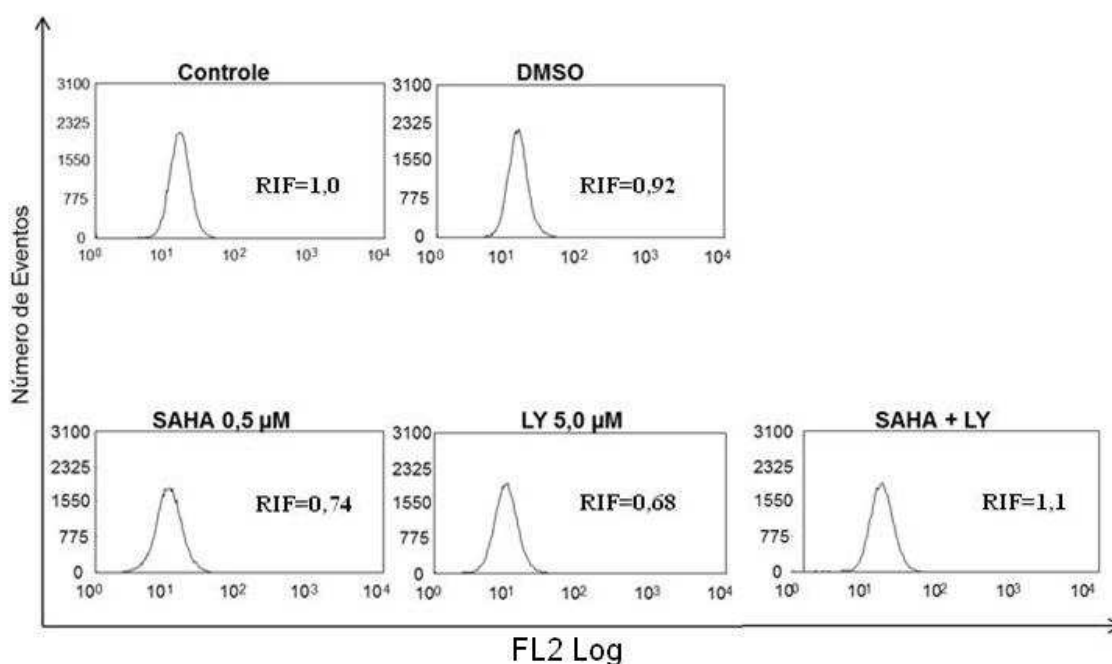


Figura 4.16: Efeito do HDACi SAHA isolado ou combinado com o PI3Ki LY na fosforilação de proteínas relacionadas com a via de PI3K. A linhagem Namalwa foi tratada ou não com SAHA 0,5 μM, LY 5,0 μM ou a combinação SAHA + LY por 48h. A fosforilação de GSK3β foi avaliada por citometria de fluxo. Experimento representativo de dois experimentos independentes. RIF = Razão de intensidade de fluorescência.

4.10 Avaliação da modulação da expressão dos *miR-143* e *-145* mediada por SAHA e LY

Com a finalidade de avaliar a participação dos miRNAs envolvidos na via de PI3K e portanto na migração celular, na resposta ao tratamento com o inibidor de PI3K e HDACi isolados ou combinados, investigamos por PCR em tempo real a expressão dos *miR-143* e *-145* 48h após os tratamentos isolados ou combinados com SAHA e LY na linhagem Namalwa. Resultados preliminares sugerem que a combinação é capaz de elevar em até 2x os níveis desses miRNAs na linhagem estudada (Figura 4.17).

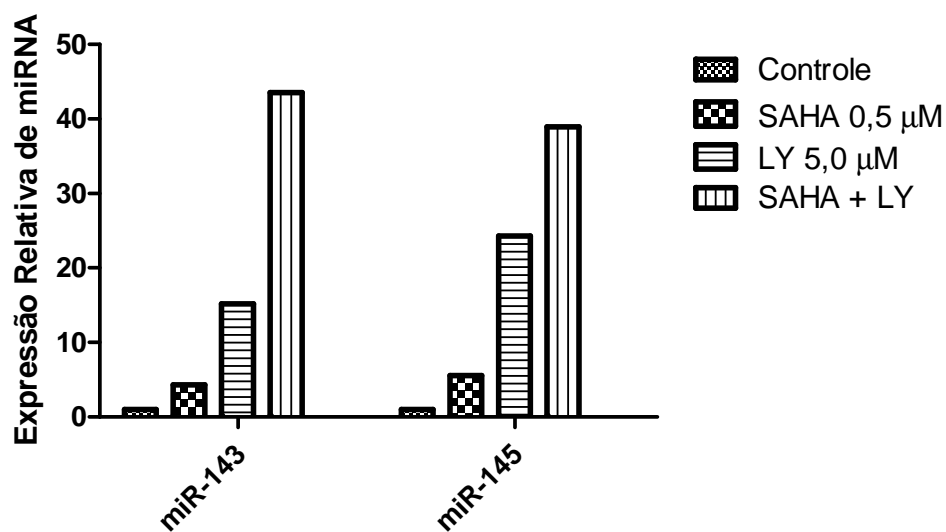


Figura 4.17: Efeito do HDACi SAHA isolado ou combinado com o PI3Ki LY na expressão de miRNAs na linhagem Namalwa. As células da linhagem Namalwa foram tratadas ou não com SAHA 0,5 µM, LY 5,0 µM ou a combinação SAHA + LY por 48h. A expressão dos *miR-143* e *miR-145* foi verificada por PCR em tempo real. Gráfico representa a média de dois experimentos independentes. Controle são células tratadas somente com o veículo DMSO

4.11 Avaliação da capacidade de migração celular após a inibição de PI3K e HDAC

Uma vez que está demonstrada a participação da via de PI3K no processo de migração celular e seu envolvimento nos mecanismos envolvidos na metástase tumoral, o alvo de continuidade de nosso estudo está sendo avaliar a mecanismos envolvidos na disseminação do LB para SNC, MO, testículos e ovário. Através da utilização de uma linhagem derivada do LB avaliamos a capacidade de inibição da migração celular dos inibidores SAHA e LY isolados ou combinados na linhagem Namalwa após 24 e 48h de tratamento. O ensaio de migração utilizando *transwells*, revelou que SAHA 0,5 µM é capaz de inibir a migração da linhagem Namalwa em 16% já em 24h de incubação. Como o esperado, LY inibiu 32% da migração e a combinação inibiu 43%. Uma vez que o inibidor LY é descrito classicamente como um inibidor com um espectro de ação mais amplo, inibindo não somente PI3K como todo o eixo PI3K-Akt-mTOR, utilizamos um inibidor específico para a isoforma Delta de PI3K, para determinar se o efeito na inibição da migração celular era independente ou não da inibição de mTOR. Inicialmente realizamos curvas de dose e resposta em concentrações e tempos distintos, para determinar o tempo e concentração de utilização do inibidor Delta (Figura 4.18). De forma semelhante ao LY,

o inibidor Delta foi capaz de inibir a migração da linhagem Namalwa após 24h de tratamento e a combinação do inibidor Delta com SAHA foi capaz de aumentar o efeito inibitório da migração, sugerindo ausência de participação da sinalização via mTOR nesse contexto.

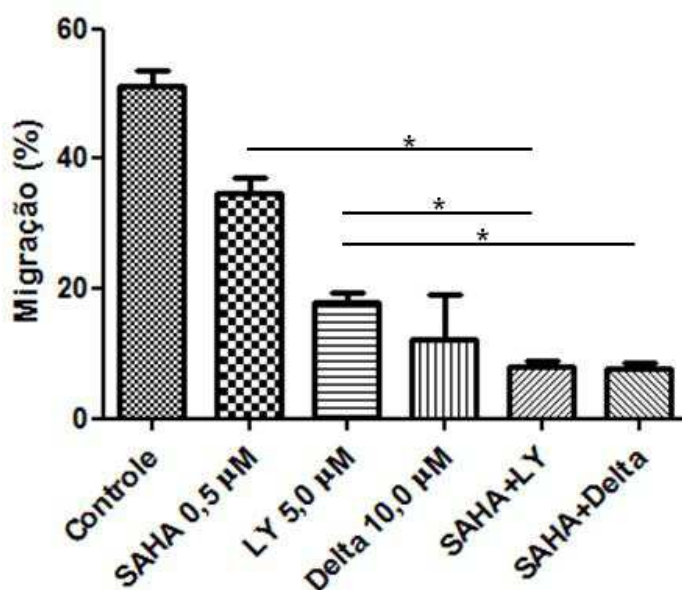


Figura 4.18: Efeito do HDACi SAHA isolado ou combinado com os PI3Ki LY ou Delta na capacidade de migração da linhagem Namalwa. As células da linhagem Namalwa foram tratadas ou não com SAHA 0,5 μM, LY 5,0 μM, Delta 10,0 μM ou a combinação SAHA + LY ou SAHA + Delta por 24h. A migração celular foi avaliada pelo ensaio de *transwell*. Dados são expressos através de média ± DP de três experimentos independentes. *P<0,05.

4.12 Avaliação do efeito dos inibidores isolados e combinados na morfologia celular

A fim de caracterizar o efeito dos inibidores e as alterações celulares e moleculares promovidas pela combinação da inibição de HDAC e PI3K, realizamos imunofluorescência nas células da linhagem Namalwa após 24h de tratamento com SAHA 0,5μM, LY 5,0μM e a combinação SAHA/LY, além do veículo (DMSO) como controle. Após a marcação com anticorpos fluorescentes contra α-tubulina, f-actina e marcação com Dapi para a visualização do núcleo, as células foram analisadas em microscópio confocal para a determinação das alterações do formato celular frente aos tratamentos (Figura 4.19). Observamos, diminuição do número de células polarizadas – caracterizadas pela presença de actina na região posterior e tubulina na

região anterior das células- após os tratamentos (Figura 4.20 A). Além disso, observamos a diminuição da área celular (Figura 4.20 B), sem alteração significativa na circularidade (Figura 4.20 C). Além disso, verificamos os níveis protéicos de Cdc42, proteína relacionada com a polarização celular e os níveis de acetilação de tubulina, alvo de HDAC6 (Figura 4.21), que estavam aumentados após o tratamento com SAHA.

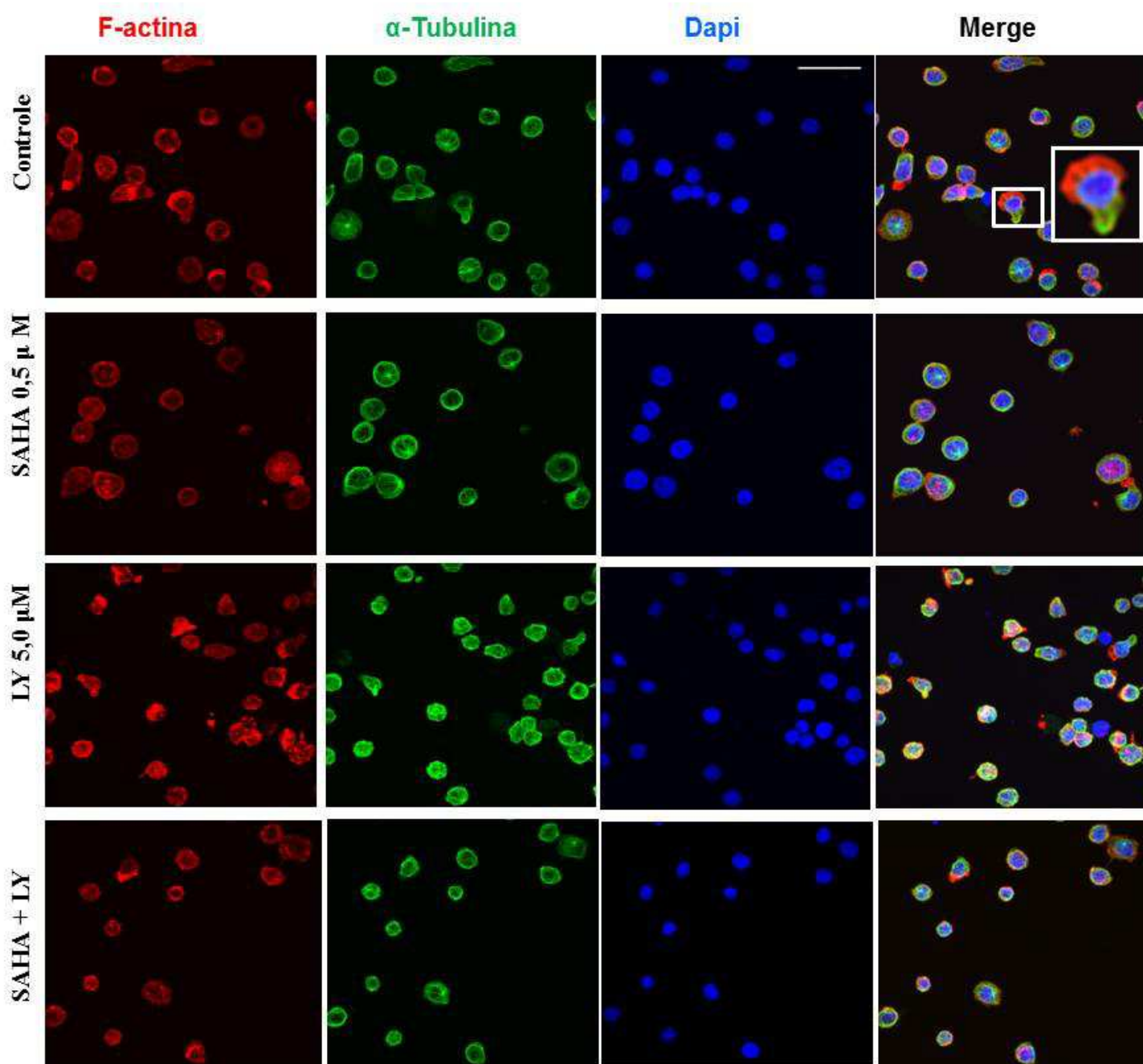


Figura 4.19: Alterações no format celular mediadas por SAHA e LY. Após o tratamento com SAHA isolado ou combinado com LY, as células da linhagem Namalwa foram incubadas com anticorpo anti- α -tubulina (verde), faloidina (vermelho) e Dapi (Azul). O zoom mostra uma célula tipicamente polarizada. Barra = 10 μ M

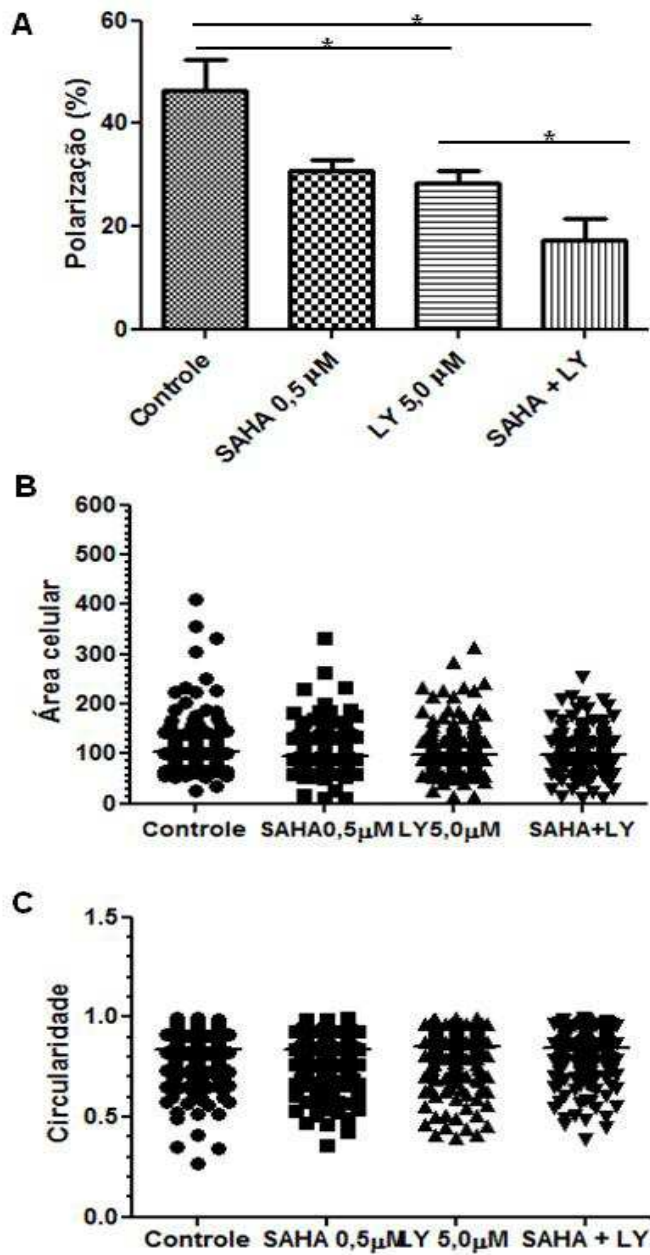


Figura 4.20: Quantificação das imagens de fluorescência: A partir das imagens de fluorescência, realizamos a quantificação do percentual de células polarizadas (A), e verificação da área (B) e a circularidade celular (C) utilizando o software ImageJ. Um total de 300 células foram analisadas em cada experimento. Foram realizados três experimentos independentes.

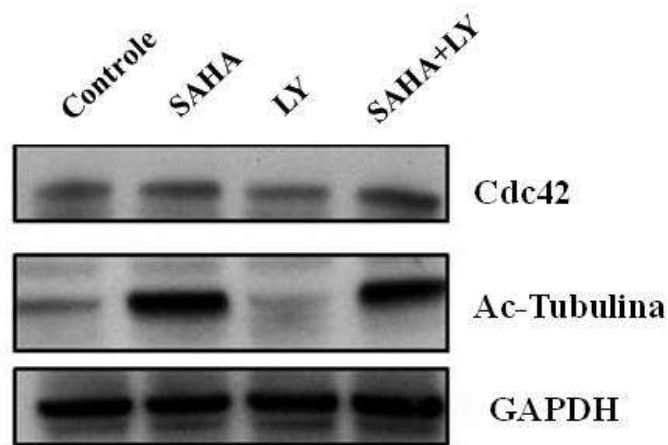


Figura 4.21: Avaliação da expressão de Cdc42 e acetilação de tubulina. As células da linhagem Namalwa foram tratadas com SAHA 0,5 μ M, LY 5,0 μ M ou a combinação SAHA/LY por 24h. Os níveis proteicos foram avaliados por *western blotting*. Experimento representativo de três experimentos independentes

4.13 Efeito da inibição de HDAC e PI3K na expressão e atividade de Rho GTPases

Uma vez demonstrado o efeito dos inibidores isolados e combinados na migração celular, investigamos alguns dos mecanismos já bem descritos na literatura como responsáveis por alterações no citoesqueleto que culminam em alterações no perfil migratório da célula. Avaliamos por qPCR a expressão de três famílias de RhoGTPases: *RhoA*, *RhoB*, *RhoC*, *Rac1*, *Rac2*, *Rac3*, *Rnd1*, *Rnd2* e *Rnd3* (Figura 4.22 A, B, C respectivamente). Os tratamentos levaram ao aumento da expressão do mRNA de todas as RhoGTPases estudadas. Em paralelo, avaliamos por *western blotting* a expressão protéica de RhoA, RhoB e RhoC (Figura 4.22 E). Não observamos alteração nos níveis protéicos de RhoA e RhoC, nem mesmo, observamos alterações significativas na atividade de RhoA (Figura 4.22 D) que foi analisada pelo ensaio de G-LISA, após o tratamento combinado com SAHA/LY. Entretanto, observamos aumento nos níveis protéicos de RhoB após o tratamento com SAHA (Figura 4.22 F), sugerindo uma regulação epigenética na expressão dessa proteína.

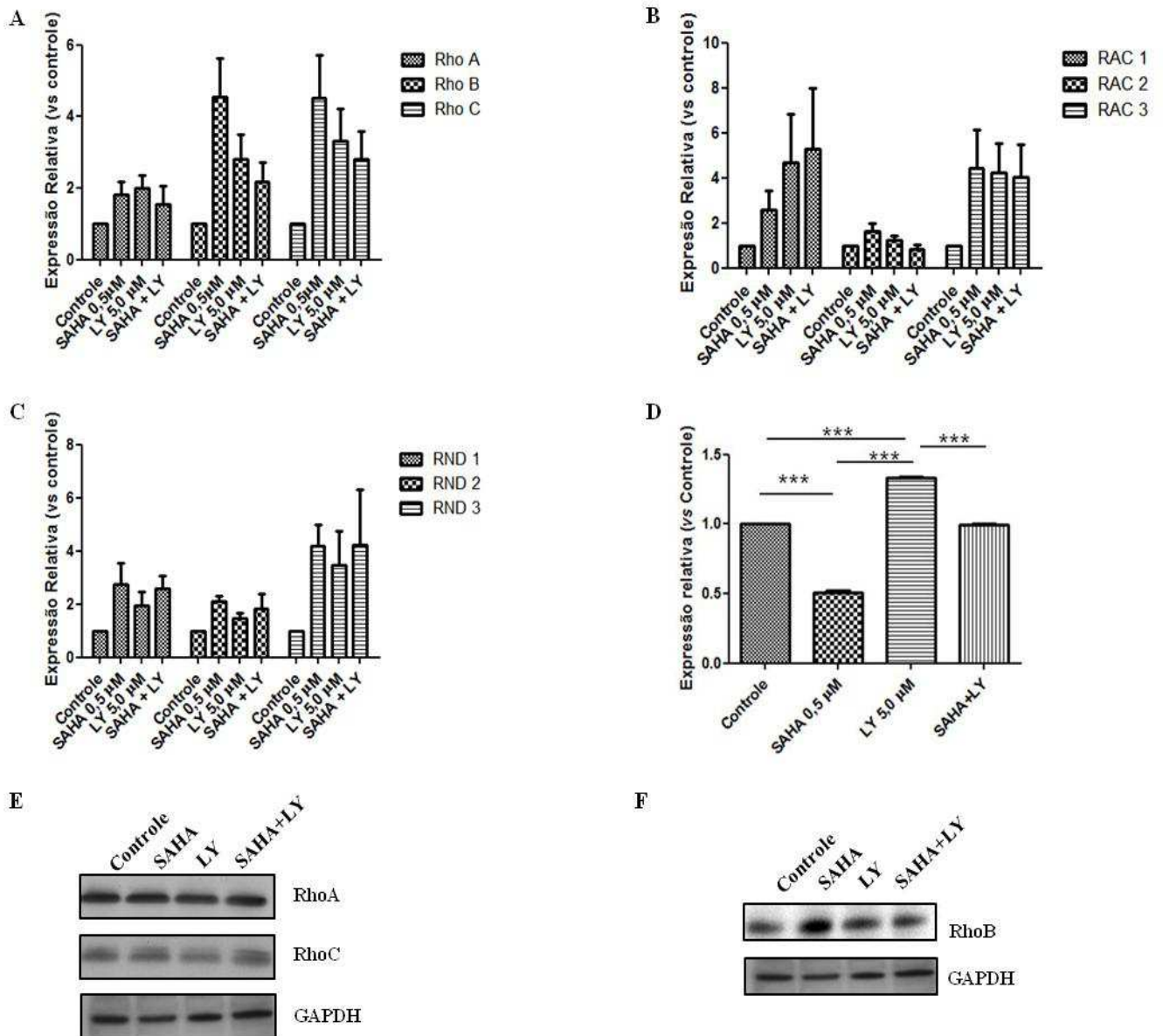


Figura 4.22: Efeito de SAHA e LY na expressão e atividade de membros da família Rho GTPases. As células da linhagem Namalwa foram tratadas com os inibidores isolados e combinados por 24h. Os níveis de RNAm de *RhoA*, *B* e *C* (A), *Rac1*, *2*, *3* (B) e *Rnd1*, *2*, *3* (C) foram avaliados por qPCR, os níveis protéicos de RhoA, C (E) e RhoB (F) por *western blotting*. A atividade de RhoA (D) foi avaliada por *G-Lisa kit*. Dados representativos de três experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

O LB é uma neoplasia peculiar que apesar de ser extremamente agressiva, apresenta altas taxas de cura com a utilização de regimes de quimioterapia intensivos. Dos pacientes pediátricos acometidos com LB, 80-95% são curados (PATTE *et al.*, 2007; REITER *et al.*, 1999). Entretanto, a probabilidade de sobrevida em 4 anos para pacientes com doença progressiva ou com recaída é de apenas 16%. Observa-se ainda, um pior prognóstico em pacientes que são diagnosticados no estágio IV da doença, apresentando disseminação do LB para medula óssea (MO) e/ou SNC (CAIRO *et al.*, 2007; CAIRO *et al.*, 2012; GRIFFIN *et al.*, 2009). Quando avaliamos o cenário do LB no paciente adulto, observamos um número absoluto maior de casos que o número de pacientes pediátricos, com 30% dos casos em pacientes acima de 60 anos de idade. Também no adulto, o envolvimento da MO e SNC está relacionado com prognóstico desfavorável (RIBERA *et al.*, 2013). Outra peculiaridade relacionada ao LB é o fato de que mais recentemente, pacientes adultos e pediátricos são tratados de forma semelhante, apesar das taxas de resposta ao tratamento serem diferentes. A taxa de sobrevida para pacientes adultos é de 70% e a resposta para pacientes adultos com altos níveis de LDH e que falham na primeira semana de tratamento, ainda deve ser melhorada através do estudo de novas estratégias de terapia (DIVINE *et al.*, 2005).

Desde a primeira aprovação, pela FDA, da utilização de HDACi para o tratamento de LCCT, vem crescendo o interesse na terapia epigenética, mudando paradigmas no que diz respeito ao tratamento de doenças hematológicas (CRUMP *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2010). Porém, o que se tem observado é a falha desses agentes quando utilizados como monoterapia em malignidades hematológicas, incluindo o linfoma difuso de grandes células B. Dessa forma, começaram a surgir na literatura o relato de estudos que sugerem a combinação de quimioterapia e terapia epigenética, visando reverter a resistência aos quimioterápicos (ATRA *et al.*, 2001; CAIRO *et al.*, 2003; GRIFFIN *et al.*, 2009; SIEGEL *et al.*, 2009).

Nosso grupo vem mostrando um efeito sinérgico na combinação de HDACi e quimioterápico no LB. Observamos que o HDACi Butirato de Sódio foi capaz de potencializar o efeito de quimioterápicos utilizados no protocolo de resgate de pacientes com LB que não respondem ao tratamento de primeira linha (DOS SANTOS FERREIRA *et al.*, 2012). Com base nos novos achados de Schmitz *et al.* & Sander *et al.* que a partir da compreensão da baixa atividade da via de NF- κ B no LB, apostaram na hipótese da superexpressão da via de PI3K como

explicação para o alto perfil proliferativo encontrado nesse tumor uma vez que a super expressão de c-Myc por si só não era suficiente para a linfomagênese, prosseguimos na investigação das vias que estariam envolvidas na inibição da proliferação observada com essa combinação (SANDER et al., 2012; SCHMITZ et al., 2012). Através de análises de microarranjo de DNA investigamos os processos alterados após o tratamento com HDACi e quimioterápico. Nas análises transcricionais, observamos alterações em processos relacionados com ciclo celular, reparo de DNA e fosforilação. Também demonstramos que a via de PI3K/Akt é alvo de HDACi (NaB) no LB, levando à parada do ciclo celular e reduzindo a proliferação através da inibição da fosforilação de Akt e diminuição da expressão de c-Myc. Essa é uma via importante que regula o crescimento celular, metabolismo, proliferação e apoptose. O eixo PI3K/Akt é um importante regulador de p53 e vem sendo estudado no contexto de terapias alvo (LEE, K. B. *et al.*, 2012; RASUL *et al.*, 2012). Além de estar de acordo com a hipótese proposta por Schmitz et al. & Sander et al. que demonstram uma cooperação entre essas vias (SANDER et al., 2012; SCHMITZ et al., 2012) e com Guan et al., que demonstraram a repressão do oncogene c-Myc resultante da utilização de agentes como decitabina, os HDACi apresentam propriedades demetilantes (GUAN *et al.*, 2013; MILUTINOVIC *et al.*, 2007).

Para avaliar efeito demetilante do HDACi foi analisada a o percentual de de metilação do promotor do gene *p16^{INK4a}* e as alterações mediadas pelo tratamento com a combinação NaB/VP que foi capaz de diminuir de forma sutil a metilação do promotor desse gene, mas que levou ao aumento significativo dos níveis de RNAm e proteína, mostrando que os efeitos do NaB não são limitados a hiperacetilação de histonas mas também levam a alterações na metilação do DNA. Em concordância com nossos resultados, a indução de *p16^{INK4a}* já foi observada por Schwartz et al. após o tratamento de células de câncer de cólon com NaB (SCHWARTZ; AVIVI-GREEN; POLAK-CHARCON, 1998).

A regulação da expressão de proteínas depende de diferentes vias que envolvem tanto regulação da transcrição como regulação pós transcricional. Dessa forma, investigamos a expressão de miRNAs que atuariam como reguladores da expressão de genes envolvidos na via de PI3K, antes e após o tratamento com NaB, VP e NaB/VP. Avaliamos a expressão do *cluster miR-143* e *-145* que se localizam a distância de aproximadamente 1.3 kb um do outro no cromossomo 5q33 (IIO et al., 2010). Nos tecidos humanos normais, esses miRs estão expressos, mas em tumores como câncer de cólon, gástricos, leucemias crônicas ou linfomas de células B estão reprimidos (DI LISIO et al., 2012). Nossos resultados apontam para uma possível relação

entre *miR145*, c-Myc, e a via de PI3K/AKT no LB uma vez que a combinação de NaB com VP aumentou 14 vezes a expressão de *miR-145*, aumentou a defosforilação de Akt na serina 473 e reduziu os níveis de c-Myc. Esses efeitos foram encontrados a partir da combinação de drogas que levam ao aumento de apoptose como demonstrado previamente (DOS SANTOS FERREIRA et al., 2012). Além dos *miR-143* e *-145*, estudamos também o *miR-101*, uma vez que observamos a diminuição da proteína anti-apoptótica MCL1 (DOS SANTOS FERREIRA et al., 2012) que é um dos alvos do *miR-101*. Esse miR também é considerado um supressor tumoral e está envolvido no processo de invasão e inibição do crescimento (HE, X. P. et al., 2012; SMITS et al., 2010; WANG, H. J. et al., 2010). De forma similar, observamos o aumento da expressão do *miR-101* com o tratamento com HDACi. Quando avaliamos a expressão desses miRs nas amostras tumorais de pacientes com LB ao diagnóstico, observamos uma expressão extremamente baixa, que não pôde ser correlacionada de forma significativa com a probabilidade de sobrevida dos pacientes em estudo. Apesar de observarmos diferenças entre as curvas de sobrevida dos pacientes que expressam os miRs comparado com os que não expressam, nosso tamanho amostral não teve poder estatístico para determinarmos a participação desses miRs na resposta ao tratamento do LB, sendo necessário mais estudos para o entendimento do papel do silenciamento dos *miRs-143, -145 e -101* no LB.

Nosso trabalho publicado no periódico *Annals of Hematology* com o título “*Histone deacetylase inhibitor prevents cell growth in Burkitt’s lymphoma by regulating PI3K/Akt pathways and leads to upregulation of miR-143, miR-145, and miR-101*” reforça os dados recentes da literatura ao demonstrar a estreita relação entre c-Myc e a via de PI3K e sugere a via PI3K como alvo terapêutico. Entretanto, até então, apesar de termos sido o primeiro grupo a publicar um trabalho que demonstra a potencialização do efeito de quimioterápicos mediada por HDACi no LB (DOS SANTOS FERREIRA et al., 2012), nossos dados eram baseados em estudos utilizando NaB, um HDACi, que devido a sua instabilidade, não apresenta potencial para uso clínico e por isso, este inibidor foi substituído pelo HDACi SAHA na sequência do estudo. Além disso, baseados nos resultados anteriores, incluímos no estudo o LY294002, um pan-inibidor da via PI3K/Akt/mTOR.

A utilização de dois inibidores em doses inferiores às utilizadas na literatura, também levou a diminuição do crescimento e parada do ciclo celular nas linhagens estudadas. Esses dados estão de acordo com outros estudos que demonstram efeitos dessa combinação em diferentes tumores como leucemia (BURKE et al., 2014), carcinoma endometrial (YOSHIOKA et al.,

2013), renal (YAMADA *et al.*, 2013) e de cabeça e pescoço (ERLICH *et al.*, 2012). Alguns estudos como o de Burke *et al.* também mostraram o efeito da combinação de SAHA com o agente demetilante Decitabina em pacientes com leucemia linfoblástica aguda em recaída. Os autores sugeriram que através dos padrões de metilação encontrados, esses pacientes poderão ser estratificados entre respondedores e não respondedores (BURKE *et al.*, 2014). Em relação a linfomas, um estudo de fase II avaliou a atividade e tolerabilidade da combinação SAHA e rituximabe em pacientes refratários ou em recaída com linfomas folicular, linfoma de zona marginal e linfoma de células do manto, demonstrando que a combinação é efetiva e segura (CHEN *et al.*, 2015).

Como já mencionado anteriormente, é crescente o interesse no estudo de vias que levem ao entendimento dos mecanismos de disseminação do LB para MO e SNC. Acredita-se que exista um *cross-talk* entre as vias de proliferação e migração. Diversos estudos, como o de Yang e cols, já demonstraram o envolvimento das vias de ERK e PI3K na migração celular (YANG *et al.*, 2015). Nossos resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que observamos diminuição da fosforilação de ERK1/2 frente aos tratamentos com HDACi e PI3Ki e também observamos diminuição da capacidade de migração das células do LB com os mesmos tratamentos. A utilização de um inibidor específico da isoforma delta de PI3K nos permitiu inferir que esse efeito de inibição da migração celular é independente de mTOR, como comprovado por Ridley *et al.*, em um estudo utilizando inibidores para as diversas isoformas de PI3K (CAIN; VANHAESEBROECK; RIDLEY, 2012). Observamos também alterações no formato celular representado pela observação da actina e tubulina, e investigamos as possíveis vias relacionadas com essas alterações, visto que a dinâmica de cito-esqueleto é crucial para a migração e polarização celular que é coordenada pelas proteínas da família Rho (INFANTE; RIDLEY, 2013). Entretanto, não observamos alteração nos níveis protéicos de Cdc42, uma proteína bem estudada por preservar a polaridade e necessária durante a migração transendotelial de linfócitos (MANES; POBER, 2013; RATNER; PIECHOCKI; GALY, 2003). Apesar de não termos encontrado alterações na expressão dessa proteína, a alteração na migração celular pode ser atribuída a algum efetor de Cdc42 como, por exemplo, WASP (ZHANG, H. *et al.*, 2006) ou Par6 (GERARD *et al.*, 2007), uma vez que já foi demonstrado que a depleção de Cdc42 não leva a diminuição da migração em leucemia linfoblástica aguda T (INFANTE; HEASMAN; RIDLEY, 2011).

Os HDACi são drogas que não apresentam como alvo somente as histonas. Existem substratos não histônicos muito bem caracterizados que são alvos desses inibidores. Dentre eles, está a α -tubulina que é acetilada via HDAC6, que vem sendo considerada uma reguladora da motilidade celular (CHUN, 2015) (VALENZUELA-FERNANDEZ *et al.*, 2008). Portanto, inibidores capazes de interferir na atividade de HDAC6 são passíveis de alterar o perfil de acetilação de α -tubulina. Dessa forma, observamos que o tratamento com SAHA foi capaz de aumentar os níveis de acetilação dessa proteína nas células estudadas. Recentemente, alguns estudos vêm mostrando que a regulação de acetilação de tubulina, localização de actina e migração são reguladas por HDAC6 e que a inibição dessa enzima inibe a motilidade de linhagens derivadas do LB (BIRDSEY *et al.*, 2012) (DING *et al.*, 2014). Lee et al. demonstraram que a inibição de HDAC6 potencializa o efeito do VP16, doxorubicina e SAHA somente em células transformadas, ou seja, sem apresentar toxicidade para células normais (RIVIECCIO *et al.*, 2009).

Além da HDAC6, o inibidor SAHA possui como alvo a HDAC1 que está envolvida na repressão de RhoB. A inibição de HDAC foi sugerida por Wang et al., que observaram pela primeira vez a relação entre atividade de HDAC e silenciamento de RhoB, sugerindo a HDAC1 como possível alvo terapêutico em câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC) (WANG, S. *et al.*, 2003). Como no nosso estudo foi observado o aumento da expressão de todos os membros da família Rho estudados (*RhoA*, *RhoB*, *RhoC*, *Rac1*, *Rac2*, *Rac3*, *Rnd1*, *Rnd2* e *Rnd3*) frente ao tratamento com HDACi e PI3Ki, sugerimos a hipótese de que esse aumento de expressão seja um efeito indireto, já que LY é um repressor transcricional. Dessa forma, a inibição de PI3K levaria a diminuição de fosforilação de Akt, que por sua vez ativaria um fator de transcrição capaz de levar ao aumento da expressão da família de GTPases Rho. Já está descrito na literatura, que a diminuição dos níveis de fosforilação de Akt está relacionada com o aumento de expressão do fator de transcrição FOXO (WANG, Y.; ZHOU; GRAVES, 2014). Entretanto, os estudos que mostram a relação entre FOXO e Rho ainda são raros. Em nosso primeiro trabalho publicado (DOS SANTOS FERREIRA *et al.*, 2012), mostramos que a potencialização dos efeitos de quimioterápicos mediada por HDACi estava relacionada com o aumento da expressão de Bim, um alvo transcricional de FOXO3 (HAGENBUCHNER *et al.*, 2012). Dessa forma, aventamos a hipótese de que, de alguma forma, HDACi provavelmente possa alterar a expressão de membros da família FOXO.

Apesar de termos descrito alterações na expressão gênica de Rho, não observamos correlação com os níveis protéicos dos membros estudados. Da mesma forma, não observamos correlação entre as alterações na atividade de RhoA e o perfil migratório das células do LB. Recentemente, um estudo envolvendo pacientes pediátricos com LB, demonstrou que 8.5% dos pacientes apresentam mutações em RhoA, que foram classificadas como recorrentes, e que levam a inibição da expressão ou alteração da atividade da enzima (ROHDE *et al.*, 2014). Além disso, já foi demonstrado, que a regulação da expressão de Rho pode ocorrer por miRs. Como revisado por Ridley em 2013, RhoC pode ser alvo de *miR-493* e *miR-138*, ambos relacionados com redução da migração celular. RhoA também é alvo de *miR-131* (RIDLEY, 2013) e a expressão de *miR-143* leva a inibição da migração e invasão em células de câncer pancreático (HU *et al.*, 2012). De forma interessante, a expressão de *miR-143* em amostras tumorais de pacientes com LB analisados em nosso estudo foi diminuída, contudo ainda não foi elucidado o significado da perda de expressão de *miR-143* na patogênese do LB (FERREIRA, A. C. *et al.*, 2014).

Dentre as três proteínas Rho estudadas, apenas RhoB teve sua expressão aumentada principalmente com a utilização de SAHA. A diminuição da expressão de RhoB já foi observada em diversos tipos tumorais e está relacionada com migração celular aumentada e redução na apoptose e por isso RhoB é considerada um supressor tumoral (CONNOLLY *et al.*, 2010; HUANG, M.; PRENDERGAST, 2006; LIU, M. *et al.*, 2011) que tem sua expressão reprimida via HDAC1 (WANG, S. *et al.*, 2003). Estudos envolvendo pacientes e linhagens de NSCLC demonstraram que a utilização de HDACi leva ao aumento da expressão de RhoB e que pacientes que apresentam prognóstico desfavorável, apresentam baixa expressão ou ausência de expressão de RhoB (SATO *et al.*, 2007). Além disso, a regulação da via de Akt por RhoB controla a invasão e migração (BOUSQUET *et al.*, 2009) e a perda de expressão de RhoB aumenta a iniciação e o crescimento tumoral durante o desenvolvimento do câncer de mama (KAZEROUNIAN *et al.*, 2013).

Em resumo, nossas observações apontam para a importância da análise da interface das alterações e vias envolvidas na patogênese do LB e novas drogas envolvidas nestas vias visando a exploração de novas estratégias de tratamento neste tumor.

6 CONCLUSÕES

- Os inibidores de HDACi, NaB e SAHA, combinados com VP-16 e LY, são capazes de levar à inibição da proliferação celular, parada do ciclo celular e a alterações na expressão de genes relacionados com diversas vias como a via de PI3K/Akt em células do LB.

- A combinação desses agentes é capaz de induzir o aumento na expressão de p16 e de miRNAs e inibir a expressão de c-Myc em linhagens celulares derivadas do LB. Entretanto, o papel deste efeito no LB ainda necessita ser elucidado visto que não foi relacionado com a sobrevida global dos pacientes.

- A inibição da via de PI3K combinada com a inibição de HDAC altera a proliferação, o ciclo celular e perfil migratório das células derivadas do LB devido a inibição da atividade de HDAC relacionada com acetilação de tubulina.

- A indução de alterações na expressão de genes como RhoB provavelmente está relacionada às alterações morfológicas compatíveis com o perfil de menor motilidade das células de LB sugerindo seu envolvimento na migração do LB para outros tecidos.

Levando-se em consideração que a via de PI3K/Akt está superexpressa no LB, coopera com c-Myc e pode representar um alvo importante para terapia combinada, a utilização de inibidores alvo-específicos pode alterar as vias de sinalização e levar ao aumento da sensibilidade a quimioterápicos. Além disso, drogas modificadoras epigenéticas como HDACi em combinação com outros agentes podem ser explorados em ensaios clínicos. Dessa forma, novos esquemas de terapia podem melhorar a resposta ao tratamento de pacientes com LB que não respondem a primeira linha de tratamento.

7 NOTA

Parte dos resultados descritos receberam o prêmio de melhor trabalho de Doutorado na modalidade pôster durante o V Simpósio de Oncobiologia/2013 – UFRJ (Anexo VI), melhor apresentação oral na VI Jornada de Pós-Graduação do INCA em 2014 (Anexo VII) e fazem parte dos manuscritos intitulados: “Histone deacetylase inhibitor prevents cell growth in Burkitt’s lymphoma by regulating PI3K/Akt pathways and leads to upregulation of miR-143, miR-145, and miR-101” publicado na revista *Ann Hematol* DOI 10.1007/s00277-014-2021-4 (Anexo VIII). e “Dual inhibition of histone deacetylase and PI3K: Effect on Burkitt’s lymphoma cell growth and migration” (Manuscrito em fase de submissão). Parte dos resultados que estão em fase de publicação foram obtidos durante doutorado sanduiche realizado no Kings College London sob orientação da Dr^a Anne Ridley.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAO, Y. et al. Role of anti-oncomirs miR-143 and -145 in human colorectal tumors. **Cancer Gene Ther**, v. 17, n. 6, p. 398-408, Jun 2010.
- AKAO, Y. et al. Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies. **Cancer Sci**, v. 98, n. 12, p. 1914-20, Dec 2007.
- ALBIHN, A.; JOHNSEN, J. I.; HENRIKSSON, M. A. MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. **Adv Cancer Res**, v. 107, p. 163-224 2010.
- ALEXANDROVA, A. Y. Plasticity of tumor cell migration: acquisition of new properties or return to the past? **Biochemistry (Mosc)**, v. 79, n. 9, p. 947-63, Sep 2014.
- ALLEN, K. E.; WEISS, G. J. Resistance may not be futile: microRNA biomarkers for chemoresistance and potential therapeutics. **Mol Cancer Ther**, v. 9, n. 12, p. 3126-36, Dec 2010.
- ATRA, A. et al. Outcome of relapsed or refractory childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma treated with the UKCCSG 9003/9002 protocols. **Br J Haematol**, v. 112, n. 4, p. 965-8, Mar 2001.
- BADER, A. G. et al. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 12, p. 921-9, Dec 2005.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan 23 2004.
- BATTY, N.; MALOUF, G. G.; ISSA, J. P. Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents. **Cancer Lett**, v. 280, n. 2, p. 192-200, Aug 8 2009.
- BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2 Suppl 1, p. S4-11, Dec 2005.
- BAYLIN, S. B.; OHM, J. E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 2, p. 107-16, Feb 2006.
- BEAGLE, B.; FRUMAN, D. A. A lipid kinase cousin cooperates to promote cancer. **Cancer Cell**, v. 19, n. 6, p. 693-5, Jun 14 2011.
- BENDELL, J. C. et al. Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 3, p. 282-90, Jan 20 2012.
- BERG, T. Small-molecule modulators of c-Myc/Max and Max/Max interactions. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 348, p. 139-49 2011.
- BIRCH, J. M. et al. Incidence of malignant disease by morphological type, in young persons aged 12-24 years in England, 1979-1997. **Eur J Cancer**, v. 39, n. 18, p. 2622-31, Dec 2003.

BIRDSEY, G. M. et al. The transcription factor Erg regulates expression of histone deacetylase 6 and multiple pathways involved in endothelial cell migration and angiogenesis. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 894-903,Jan 19 2012.

BOUCHARD, C.; STALLER, P.; EILERS, M. Control of cell proliferation by Myc. **Trends Cell Biol**, v. 8, n. 5, p. 202-6,May 1998.

BOUSQUET, E. et al. Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1. **Cancer Res**, v. 69, n. 15, p. 6092-9,Aug 1 2009.

BRADY, G.; MACARTHUR, G. J.; FARRELL, P. J. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. **J Clin Pathol**, v. 60, n. 12, p. 1397-402,Dec 2007.

BURKE, M. J. et al. A therapeutic trial of decitabine and vorinostat in combination with chemotherapy for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. **Am J Hematol**, v. 89, n. 9, p. 889-95,Sep 2014.

BUTLER, L. M. et al. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 18, p. 11700-5,Sep 3 2002.

CAIN, R. J.; VANHAESEBROECK, B.; RIDLEY, A. J. Different PI 3-kinase inhibitors have distinct effects on endothelial permeability and leukocyte transmigration. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 11, p. 1929-36,Nov 2012.

CAIRO, M. S. et al. Results of a randomized international study of high-risk central nervous system B non-Hodgkin lymphoma and B acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2736-43,Apr 1 2007.

CAIRO, M. S. et al. Advanced stage, increased lactate dehydrogenase, and primary site, but not adolescent age (≥ 15 years), are associated with an increased risk of treatment failure in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB LMB 96 study. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 4, p. 387-93,Feb 1 2012.

CAIRO, M. S. et al. Burkitt's and Burkitt-like lymphoma in children and adolescents: a review of the Children's Cancer Group experience. **Br J Haematol**, v. 120, n. 4, p. 660-70,Feb 2003.

CALBO, J. et al. The fate of pancreatic tumor cell lines following p16 overexpression depends on the modulation of CDK2 activity. **Cell Death Differ**, v. 11, n. 10, p. 1055-65,Oct 2004.

CARPENTER, C. L. et al. Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. **J Biol Chem**, v. 265, n. 32, p. 19704-11,Nov 15 1990.

CATALANO, M. G. et al. Valproic acid enhances tubulin acetylation and apoptotic activity of paclitaxel on anaplastic thyroid cancer cell lines. **Endocr Relat Cancer**, v. 14, n. 3, p. 839-45,Sep 2007.

- CHANG, T. C. et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. **Nat Genet**, v. 40, n. 1, p. 43-50, Jan 2008.
- CHEN, R. et al. A Phase II Study of vorinostat and rituximab for treatment of indolent non-Hodgkin lymphoma (newly diagnosed and relapsed/refractory). **Haematologica**, Jan 16 2015.
- CHIU, B. C.; WEISENBURGER, D. D. An update of the epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. **Clin Lymphoma**, v. 4, n. 3, p. 161-8, Dec 2003.
- CHO, D. C. Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Malignancy: Rationale and Clinical Outlook. **BioDrugs**, Feb 25 2014.
- CHO, H. M. et al. microRNA-101 inhibits lung cancer invasion through the regulation of enhancer of zeste homolog 2. **Exp Ther Med**, v. 2, n. 5, p. 963-967, Sep 2011.
- CHUN, P. Histone deacetylase inhibitors in hematological malignancies and solid tumors. **Arch Pharm Res**, Feb 5 2015.
- CLARKE, C. A.; GLASER, S. L. Changing incidence of non-Hodgkin lymphomas in the United States. **Cancer**, v. 94, n. 7, p. 2015-23, Apr 1 2002.
- CONNOLLY, E. C. et al. Overexpression of miR-21 promotes an in vitro metastatic phenotype by targeting the tumor suppressor RHOB. **Mol Cancer Res**, v. 8, n. 5, p. 691-700, May 2010.
- CRUMP, M. et al. Phase II trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in relapsed diffuse large-B-cell lymphoma. **Ann Oncol**, v. 19, n. 5, p. 964-9, May 2008.
- DI LISIO, L. et al. MicroRNA signatures in B-cell lymphomas. **Blood Cancer J**, v. 2, n. 2, p. e57, Feb 2012.
- DIBBLE, C. C. et al. TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. **Mol Cell**, v. 47, n. 4, p. 535-46, Aug 24 2012.
- DING, N. et al. Histone deacetylase 6 activity is critical for the metastasis of Burkitt's lymphoma cells. **Cancer Cell Int**, v. 14, n. 1, p. 139 2014.
- DIVINE, M. et al. Burkitt lymphoma in adults: a prospective study of 72 patients treated with an adapted pediatric LMB protocol. **Ann Oncol**, v. 16, n. 12, p. 1928-35, Dec 2005.
- DOMIN, J. et al. The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2beta regulates cell migration by a PtdIns3P dependent mechanism. **J Cell Physiol**, v. 205, n. 3, p. 452-62, Dec 2005.
- DOMIN, J. et al. Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. **Biochem J**, v. 326 (Pt 1), p. 139-47, Aug 15 1997.

- DOS SANTOS FERREIRA, A. C. et al. Histone deacetylase inhibitor potentiates chemotherapy-induced apoptosis through Bim upregulation in Burkitt's lymphoma cells. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 138, n. 2, p. 317-25, Feb 2012.
- DOS SANTOS FERREIRA, A. C. et al. Histone deacetylase inhibitor prevents cell growth in Burkitt's lymphoma by regulating PI3K/Akt pathways and leads to upregulation of miR-143, miR-145, and miR-101. **Ann Hematol**, Feb 28 2014.
- DOS SANTOS, M. P. et al. Sodium butyrate enhances the cytotoxic effect of antineoplastic drugs in human lymphoblastic T-cells. **Leuk Res**, v. 33, n. 2, p. 218-21, Feb 2009.
- ELLIS, L.; ATADJA, P. W.; JOHNSTONE, R. W. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. **Mol Cancer Ther**, v. 8, n. 6, p. 1409-20, Jun 2009.
- ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 8, p. 606-19, Aug 2006.
- ERLICH, R. B. et al. Preclinical evaluation of dual PI3K-mTOR inhibitors and histone deacetylase inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, v. 106, n. 1, p. 107-15, Jan 3 2012.
- ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **N Engl J Med**, v. 358, n. 11, p. 1148-59, Mar 13 2008.
- FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 1, p. 21-33, Jan 2006.
- FERRACIN, M.; VERONESE, A.; NEGRINI, M. Micromarkers: miRNAs in cancer diagnosis and prognosis. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 10, n. 3, p. 297-308, Apr 2010.
- FERREIRA, A. C. et al. Histone deacetylase inhibitor prevents cell growth in Burkitt's lymphoma by regulating PI3K/Akt pathways and leads to upregulation of miR-143, miR-145, and miR-101. **Ann Hematol**, v. 93, n. 6, p. 983-93, Jun 2014.
- FERREIRA, J. M. et al. Lymphoma subtype incidence rates in children and adolescents: first report from Brazil. **Cancer Epidemiol**, v. 36, n. 4, p. e221-6, Aug 2012.
- FRIEDL, P.; BORGMANN, S.; BROCKER, E. B. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. **J Leukoc Biol**, v. 70, n. 4, p. 491-509, Oct 2001.
- FRIEDL, P.; WOLF, K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. **J Cell Biol**, v. 188, n. 1, p. 11-9, Jan 11 2010.
- FRUMAN, D. A.; MEYERS, R. E.; CANTLEY, L. C. Phosphoinositide kinases. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 481-507 1998.
- GARCIA-MATA, R.; BOULTER, E.; BURRIDGE, K. The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHO GDI. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 8, p. 493-504, Aug 2011.

GARGALIONIS, A. N.; BASDRA, E. K. Insights in microRNAs biology. **Curr Top Med Chem**, v. 13, n. 13, p. 1493-502 2013.

GERARD, A. et al. The Par polarity complex regulates Rap1- and chemokine-induced T cell polarization. **J Cell Biol**, v. 176, n. 6, p. 863-75, Mar 12 2007.

GIL, J.; PETERS, G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 9, p. 667-77, Sep 2006.

GRIFFIN, T. C. et al. A study of rituximab and ifosfamide, carboplatin, and etoposide chemotherapy in children with recurrent/refractory B-cell (CD20+) non-Hodgkin lymphoma and mature B-cell acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. **Pediatr Blood Cancer**, v. 52, n. 2, p. 177-81, Feb 2009.

GUAN, H. et al. Decitabine represses translocated MYC oncogene in Burkitt lymphoma. **J Pathol**, v. 229, n. 5, p. 775-83, Apr 2013.

HABERLAND, M.; MONTGOMERY, R. L.; OLSON, E. N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 1, p. 32-42, Jan 2009.

HAGEMEISTER, F. B. Treatment of relapsed aggressive lymphomas: regimens with and without high-dose therapy and stem cell rescue. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 49 Suppl 1, p. S13-20, May 2002.

HAGENBUCHNER, J. et al. FOXO3-induced reactive oxygen species are regulated by BCL2L1 (Bim) and SESN3. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 5, p. 1191-203, Mar 1 2012.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

HARRIS, K. P.; TEPASS, U. Cdc42 and vesicle trafficking in polarized cells. **Traffic**, v. 11, n. 10, p. 1272-9, Oct 2010.

HE, L. et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 828-33, Jun 9 2005.

HE, X. P. et al. Downregulation of miR-101 in gastric cancer correlates with cyclooxygenase-2 overexpression and tumor growth. **FEBS J**, v. 279, n. 22, p. 4201-12, Nov 2012.

HEASMAN, S. J. et al. Coordinated RhoA signaling at the leading edge and uropod is required for T cell transendothelial migration. **J Cell Biol**, v. 190, n. 4, p. 553-63, Aug 23 2010.

HEASMAN, S. J.; RIDLEY, A. J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 9, p. 690-701, Sep 2008.

HECHT, J. L.; ASTER, J. C. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 21, p. 3707-21, Nov 1 2000.

HEEREMA, N. A. et al. State of the Art and Future Needs in Cytogenetic/Molecular Genetics/Arrays in childhood lymphoma: summary report of workshop at the First International Symposium on childhood and adolescent non-Hodgkin lymphoma, April 9, 2003, New York City, NY. **Pediatr Blood Cancer**, v. 45, n. 5, p. 616-22, Oct 15 2005.

HEIDER, U. et al. Synergistic interaction of the histone deacetylase inhibitor SAHA with the proteasome inhibitor bortezomib in cutaneous T cell lymphoma. **Eur J Haematol**, v. 82, n. 6, p. 440-9, Jun 2009.

HERMAN, J. G. et al. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. **Cancer Res**, v. 57, n. 5, p. 837-41, Mar 1 1997.

HIRSCH, E. et al. PI3K in cancer-stroma interactions: bad in seed and ugly in soil. **Oncogene**, Jul 29 2013.

HOCHBERG, J. et al. Adolescent non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin lymphoma: state of the science. **Br J Haematol**, v. 144, n. 1, p. 24-40, Jan 2009.

HU, Y. et al. miR-143 inhibits the metastasis of pancreatic cancer and an associated signaling pathway. **Tumour Biol**, v. 33, n. 6, p. 1863-70, Dec 2012.

HUANG, J.; MANNING, B. D. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. **Biochem J**, v. 412, n. 2, p. 179-90, Jun 1 2008.

HUANG, M.; PRENDERGAST, G. C. RhoB in cancer suppression. **Histol Histopathol**, v. 21, n. 2, p. 213-8, Feb 2006.

IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. Epigenetic changes in cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 4, p. 229-49 2009.

IIO, A. et al. Identification of non-coding RNAs embracing microRNA-143/145 cluster. **Mol Cancer**, v. 9, p. 136 2010.

INFANTE, E.; HEASMAN, S. J.; RIDLEY, A. J. Statins inhibit T-acute lymphoblastic leukemia cell adhesion and migration through Rap1b. **J Leukoc Biol**, v. 89, n. 4, p. 577-86, Apr 2011.

INFANTE, E.; RIDLEY, A. J. Roles of Rho GTPases in leucocyte and leukaemia cell transendothelial migration. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 368, n. 1629, p. 20130013 2013.

JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 21, p. 247-69 2005.

- JIN, H. Y. et al. MicroRNA-17~92 plays a causative role in lymphomagenesis by coordinating multiple oncogenic pathways. **EMBO J**, v. 32, n. 17, p. 2377-91, Aug 28 2013.
- KATSUDA, K. et al. Activation of caspase-3 and cleavage of Rb are associated with p16-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. **Oncogene**, v. 21, n. 13, p. 2108-13, Mar 27 2002.
- KAZEROUNIAN, S. et al. RhoB differentially controls Akt function in tumor cells and stromal endothelial cells during breast tumorigenesis. **Cancer Res**, v. 73, n. 1, p. 50-61, Jan 1 2013.
- KIUCHI, T. et al. Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers. **J Cell Biol**, v. 177, n. 3, p. 465-76, May 7 2007.
- KLANGBY, U. et al. p16/INK4a and p15/INK4b gene methylation and absence of p16/INK4a mRNA and protein expression in Burkitt's lymphoma. **Blood**, v. 91, n. 5, p. 1680-7, Mar 1 1998.
- KLAPPROTH, K.; WIRTH, T. Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. **Br J Haematol**, v. 149, n. 4, p. 484-97, May 2010.
- KLUMB, C. E. et al. DNA sequence profile of TP53 gene mutations in childhood B-cell non-Hodgkin's lymphomas: prognostic implications. **Eur J Haematol**, v. 71, n. 2, p. 81-90, Aug 2003.
- KLUMB, C. E. et al. Treatment of children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma in developing countries: the experience of a single center in Brazil. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 26, n. 7, p. 462-8, Jul 2004.
- LAMMERMANN, T.; SIXT, M. Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. **Curr Opin Cell Biol**, v. 21, n. 5, p. 636-44, Oct 2009.
- LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274-93, Apr 13 2012.
- LEE, K. B. et al. CYR61 controls p53 and NF-kappaB expression through PI3K/Akt/mTOR pathways in carboplatin-induced ovarian cancer cells. **Cancer Lett**, v. 315, n. 1, p. 86-95, Feb 1 2012.
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-54, Dec 3 1993.
- LI, J. et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science**, v. 275, n. 5308, p. 1943-7, Mar 28 1997.
- LIM, L. P. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. **Nature**, v. 433, n. 7027, p. 769-73, Feb 17 2005.
- LINDEMANN, R. K. et al. Analysis of the apoptotic and therapeutic activities of histone deacetylase inhibitors by using a mouse model of B cell lymphoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 19, p. 8071-6, May 8 2007.

- LINDSTROM, M. S.; KLANGBY, U.; WIMAN, K. G. p14ARF homozygous deletion or MDM2 overexpression in Burkitt lymphoma lines carrying wild type p53. **Oncogene**, v. 20, n. 17, p. 2171-7, Apr 19 2001.
- LINDSTROM, M. S.; WIMAN, K. G. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. **Semin Cancer Biol**, v. 12, n. 5, p. 381-7, Oct 2002.
- LIU, M. et al. miR-21 targets the tumor suppressor RhoB and regulates proliferation, invasion and apoptosis in colorectal cancer cells. **FEBS Lett**, v. 585, n. 19, p. 2998-3005, Oct 3 2011.
- LIU, T. et al. Histone deacetylase inhibitors: multifunctional anticancer agents. **Cancer Treat Rev**, v. 32, n. 3, p. 157-65, May 2006.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.
- LUND, A. H.; VAN LOHUIZEN, M. Epigenetics and cancer. **Genes Dev**, v. 18, n. 19, p. 2315-35, Oct 1 2004.
- LUSCHER, B. MAD1 and its life as a MYC antagonist: an update. **Eur J Cell Biol**, v. 91, n. 6-7, p. 506-14, Jun-Jul 2012.
- LUSCHER, B.; VERVOORTS, J. Regulation of gene transcription by the oncoprotein MYC. **Gene**, v. 494, n. 2, p. 145-60, Feb 25 2012.
- MAEHAMA, T.; DIXON, J. E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. **J Biol Chem**, v. 273, n. 22, p. 13375-8, May 29 1998.
- MAFFUCCI, T. et al. Class II phosphoinositide 3-kinase defines a novel signaling pathway in cell migration. **J Cell Biol**, v. 169, n. 5, p. 789-99, Jun 6 2005.
- MAGRATH, I. et al. Adults and children with small non-cleaved-cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 3, p. 925-34, Mar 1996.
- MAHLKNECHT, U.; HOELZER, D. Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease. **Mol Med**, v. 6, n. 8, p. 623-44, Aug 2000.
- MANES, T. D.; POBER, J. S. TCR-driven transendothelial migration of human effector memory CD4 T cells involves Vav, Rac, and myosin IIA. **J Immunol**, v. 190, n. 7, p. 3079-88, Apr 1 2013.
- MILUTINOVIC, S. et al. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 560-71, Mar 2007.

- MINAMI, R. et al. p16(INK4a) induces differentiation and apoptosis in erythroid lineage cells. **Exp Hematol**, v. 31, n. 5, p. 355-62, May 2003.
- MOLYNEUX, E. M. et al. Burkitt's lymphoma. **Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1234-44, Mar 31 2012.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.
- MURPHY, S. B. et al. Non-Hodgkin's lymphomas of childhood: an analysis of the histology, staging, and response to treatment of 338 cases at a single institution. **J Clin Oncol**, v. 7, n. 2, p. 186-93, Feb 1989.
- NOBES, C. D.; HALL, A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. **Cell**, v. 81, n. 1, p. 53-62, Apr 7 1995.
- ORTEGA, S.; MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1602, n. 1, p. 73-87, Mar 14 2002.
- OU, J. N. et al. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines. **Biochem Pharmacol**, v. 73, n. 9, p. 1297-307, May 1 2007.
- PATTE, C. et al. Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2773-80, Apr 1 2007.
- PATTE, C. et al. The Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia. **Blood**, v. 97, n. 11, p. 3370-9, Jun 1 2001.
- PINYOL, M. et al. p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. **Blood**, v. 91, n. 8, p. 2977-84, Apr 15 1998.
- POLIVKA, J., JR.; JANKU, F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. **Pharmacol Ther**, v. 142, n. 2, p. 164-175, May 2014.
- QIU, Y.; KUNG, H. J. Signaling network of the Btk family kinases. **Oncogene**, v. 19, n. 49, p. 5651-61, Nov 20 2000.
- RAMALINGAM, S. S. et al. Phase I and pharmacokinetic study of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, in combination with carboplatin and paclitaxel for advanced solid malignancies. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 12, p. 3605-10, Jun 15 2007.

RASUL, A. et al. Dracorhodin perchlorate inhibits PI3K/Akt and NF-kappaB activation, up-regulates the expression of p53, and enhances apoptosis. **Apoptosis**, v. 17, n. 10, p. 1104-19, Oct 2012.

RATNER, S.; PIECHOCKI, M. P.; GALY, A. Role of Rho-family GTPase Cdc42 in polarized expression of lymphocyte appendages. **J Leukoc Biol**, v. 73, n. 6, p. 830-40, Jun 2003.

REITER, A. et al. Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: A report of the Berlin-Frankfurt-Munster Group Trial NHL-BFM 90. **Blood**, v. 94, n. 10, p. 3294-306, Nov 15 1999.

RESSLER, S. et al. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. **Aging Cell**, v. 5, n. 5, p. 379-89, Oct 2006.

RIBERA, J. M. et al. Dose-intensive chemotherapy including rituximab in Burkitt's leukemia or lymphoma regardless of human immunodeficiency virus infection status: final results of a phase 2 study (Burkimab). **Cancer**, v. 119, n. 9, p. 1660-8, May 1 2013.

RIDLEY, A. J. RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. **J Microsc**, v. 251, n. 3, p. 242-9, Sep 2013.

RIDLEY, A. J.; HALL, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. **Cell**, v. 70, n. 3, p. 389-99, Aug 7 1992.

RIDLEY, A. J. et al. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. **Cell**, v. 70, n. 3, p. 401-10, Aug 7 1992.

RIVIECCIO, M. A. et al. HDAC6 is a target for protection and regeneration following injury in the nervous system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 46, p. 19599-604, Nov 17 2009.

ROBAINA, M. C. et al. Quantitative analysis of CDKN2A methylation, mRNA, and p16(INK4a) protein expression in children and adolescents with Burkitt lymphoma: Biological and clinical implications. **Leuk Res**, v. 39, n. 2, p. 248-56, Feb 2015.

ROBERTUS, J. L. et al. MiRNA profiling in B non-Hodgkin lymphoma: a MYC-related miRNA profile characterizes Burkitt lymphoma. **Br J Haematol**, v. 149, n. 6, p. 896-9, Jun 2010.

ROHDE, M. et al. Recurrent RHOA mutations in pediatric Burkitt lymphoma treated according to the NHL-BFM protocols. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 53, n. 11, p. 911-6, Nov 2014.

ROMAGOSA, C. et al. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. **Oncogene**, v. 30, n. 18, p. 2087-97, May 5 2011.

ROUGERIE, P.; DELON, J. Rho GTPases: masters of T lymphocyte migration and activation. **Immunol Lett**, v. 142, n. 1-2, p. 1-13, Feb 29 2012.

- ROUNTREE, M. R. et al. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. **Oncogene**, v. 20, n. 24, p. 3156-65, May 28 2001.
- ROY, C. C. et al. Short-chain fatty acids: ready for prime time? **Nutr Clin Pract**, v. 21, n. 4, p. 351-66, Aug 2006.
- SABATTINI, E. et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. **Pathologica**, v. 102, n. 3, p. 83-7, Jun 2010.
- SACHDEVA, M. et al. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 9, p. 3207-12, Mar 3 2009.
- SAMPSON, V. B. et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. **Cancer Res**, v. 67, n. 20, p. 9762-70, Oct 15 2007.
- SANCHEZ-MADRID, F.; SERRADOR, J. M. Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 5, p. 353-9, May 2009.
- SANDER, S.; BULLINGER, L.; WIRTH, T. Repressing the repressor: a new mode of MYC action in lymphomagenesis. **Cell Cycle**, v. 8, n. 4, p. 556-9, Feb 15 2009.
- SANDER, S. et al. Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. **Cancer Cell**, v. 22, n. 2, p. 167-79, Aug 14 2012.
- SANDER, S.; RAJEWSKY, K. Burkitt lymphomagenesis linked to MYC plus PI3K in germinal center B cells. **Oncotarget**, v. 3, n. 10, p. 1066-7, Oct 2012.
- SANLUND, J. T.; DOWNING, J. R.; CRIST, W. M. Non-Hodgkin's lymphoma in childhood. **N Engl J Med**, v. 334, n. 19, p. 1238-48, May 9 1996.
- SATO, N. et al. RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. **Int J Cancer**, v. 120, n. 3, p. 543-51, Feb 1 2007.
- SAYED, D.; ABDELLATIF, M. MicroRNAs in development and disease. **Physiol Rev**, v. 91, n. 3, p. 827-87, Jul 2011.
- SCHMITZ, R. et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 116-20, Oct 4 2012.
- SCHWARTZ, B.; AVIVI-GREEN, C.; POLAK-CHARCON, S. Sodium butyrate induces retinoblastoma protein dephosphorylation, p16 expression and growth arrest of colon cancer cells. **Mol Cell Biochem**, v. 188, n. 1-2, p. 21-30, Nov 1998.
- SEMAAN, A. et al. MicroRNA-101 inhibits growth of epithelial ovarian cancer by relieving chromatin-mediated transcriptional repression of p21(waf(1)/cip(1)). **Pharm Res**, v. 28, n. 12, p. 3079-90, Dec 2011.

- SERRANO, M. et al. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. **Cell**, v. 85, n. 1, p. 27-37, Apr 5 1996.
- SHARPLESS, N. E. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. **Mutat Res**, v. 576, n. 1-2, p. 22-38, Aug 25 2005.
- SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. **Genes Dev**, v. 9, n. 10, p. 1149-63, May 15 1995.
- _____. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. **Genes Dev**, v. 18, n. 22, p. 2699-711, Nov 15 2004.
- SIEGEL, D. et al. Vorinostat in solid and hematologic malignancies. **J Hematol Oncol**, v. 2, p. 31 2009.
- SMITS, M. et al. miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. **Oncotarget**, v. 1, n. 8, p. 710-20, Dec 2010.
- SONG, M. S.; SALMENA, L.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 5, p. 283-96, May 2012.
- SPENDER, L. C.; INMAN, G. J. Developments in Burkitt's lymphoma: novel cooperations in oncogenic MYC signaling. **Cancer Manag Res**, v. 6, p. 27-38 2014.
- SU, H. et al. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. **Cancer Res**, v. 69, n. 3, p. 1135-42, Feb 1 2009.
- SUBRAMANIAN, C. et al. Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 13, p. 4842-7, Mar 29 2005.
- TAN, J. et al. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. **J Hematol Oncol**, v. 3, p. 5 2010.
- TESSIER, M.; WOODGETT, J. R. Serum and glucocorticoid-regulated protein kinases: variations on a theme. **J Cell Biochem**, v. 98, n. 6, p. 1391-407, Aug 15 2006.
- TROEGER, A. et al. RhoH is critical for cell-microenvironment interactions in chronic lymphocytic leukemia in mice and humans. **Blood**, v. 119, n. 20, p. 4708-18, May 17 2012.
- TYBULEWICZ, V. L.; HENDERSON, R. B. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 9, p. 630-44, Sep 2009.
- VALENZUELA-FERNANDEZ, A. et al. HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. **Trends Cell Biol**, v. 18, n. 6, p. 291-7, Jun 2008.
- VAN ENGELAND, M. et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, n. 1, p. 1-9, Jan 1 1998.

- VANHAESEBROECK, B. et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. **Annu Rev Biochem**, v. 70, p. 535-602 2001.
- VANHAESEBROECK, B. et al. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. **Trends Biochem Sci**, v. 22, n. 7, p. 267-72, Jul 1997.
- VANHAESEBROECK, B.; WATERFIELD, M. D. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. **Exp Cell Res**, v. 253, n. 1, p. 239-54, Nov 25 1999.
- VASCONCELOS, F. C. et al. Contrasting features of MDR phenotype in leukemias by using two fluorochromes: implications for clinical practice. **Leuk Res**, v. 31, n. 4, p. 445-54, Apr 2007.
- VASILATOU, D.; . The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. **Eur J Haematol**, v. 84, n. 1, p. 1-16, Jan 1 2010.
- VASILJEVIC, N. et al. Absolute quantitation of DNA methylation of 28 candidate genes in prostate cancer using pyrosequencing. **Dis Markers**, v. 30, n. 4, p. 151-61 2011.
- VICENTE-MANZANARES, M.; SANCHEZ-MADRID, F. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 2, p. 110-22, Feb 2004.
- VILLUENDAS, R. et al. Loss of p16/INK4A protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression. **Am J Pathol**, v. 153, n. 3, p. 887-97, Sep 1998.
- VIRBASIOUS, J. V.; GUILHERME, A.; CZECH, M. P. Mouse p170 is a novel phosphatidylinositol 3-kinase containing a C2 domain. **J Biol Chem**, v. 271, n. 23, p. 13304-7, Jun 7 1996.
- WAHID, F. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. **Biochim Biophys Acta**, v. 1803, n. 11, p. 1231-43, Nov 2010.
- WALKINSHAW, D. R.; YANG, X. J. Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics. **Curr Oncol**, v. 15, n. 5, p. 237-43, Oct 2008.
- WANG, H. J. et al. MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 12, p. 2295-303, Aug 2010.
- WANG, S. et al. Histone deacetylase 1 represses the small GTPase RhoB expression in human nonsmall lung carcinoma cell line. **Oncogene**, v. 22, n. 40, p. 6204-13, Sep 18 2003.
- WANG, Y.; ZHOU, Y.; GRAVES, D. T. FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 925350 2014.
- WANG, Z. et al. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. **Nat Genet**, v. 40, n. 7, p. 897-903, Jul 2008.

WINTER, J. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 3, p. 228-34, Mar 2009.

XU, W. S.; PARMIGIANI, R. B.; MARKS, P. A. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5541-52, Aug 13 2007.

YAMADA, T. et al. A novel HDAC inhibitor OBP-801 and a PI3K inhibitor LY294002 synergistically induce apoptosis via the suppression of survivin and XIAP in renal cell carcinoma. **Int J Oncol**, v. 43, n. 4, p. 1080-6, Oct 2013.

YANG, J. et al. Thymoquinone inhibits proliferation and invasion of human nonsmall-cell lung cancer cells via ERK pathway. **Tumour Biol**, v. 36, n. 1, p. 259-69, Jan 2015.

YOSHIDA, M. et al. From discovery to the coming generation of histone deacetylase inhibitors. **Curr Med Chem**, v. 10, n. 22, p. 2351-8, Nov 2003.

YOSHIOKA, T. et al. Combination of a novel HDAC inhibitor OBP-801/YM753 and a PI3K inhibitor LY294002 synergistically induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells due to increase of Bim with accumulation of ROS. **Gynecol Oncol**, v. 129, n. 2, p. 425-32, May 2013.

ZHANG, H. et al. Impaired integrin-dependent function in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient murine and human neutrophils. **Immunity**, v. 25, n. 2, p. 285-95, Aug 2006.

ZHANG, Y. et al. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. **Genes Dev**, v. 13, n. 15, p. 1924-35, Aug 1 1999.

ZINDY, F. et al. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. **Oncogene**, v. 15, n. 2, p. 203-11, Jul 10 1997.

Anexo I

Histone deacetylase inhibitor potentiates chemotherapy-induced apoptosis through Bim upregulation in Burkitt's lymphoma cells

Ana Carolina dos Santos Ferreira, Renan Amphilophio Fernandes, Jolie Kiemlian Kwee & Claudete Esteves Klumb

**Journal of Cancer Research and
Clinical Oncology**

ISSN 0171-5216

J Cancer Res Clin Oncol
DOI 10.1007/s00432-011-1093-y



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Histone deacetylase inhibitor potentiates chemotherapy-induced apoptosis through Bim upregulation in Burkitt's lymphoma cells

Ana Carolina dos Santos Ferreira · Renan Amphiphio Fernandes · Jolie Kiemlian Kwee · Claudete Esteves Klumb

Received: 22 June 2011 / Accepted: 3 November 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract

Purpose Although polychemotherapy regimens have improved clinical outcome for Burkitt's lymphoma (BL) patients, salvage treatment of patients with refractory disease remains very poor. Combined therapies protocols have been emerging to improve treatment strategies to circumvent responseless BL patients. We evaluate the cell death effect of histone deacetylase inhibitor (HDACI) combined with etoposide (VP-16) and cisplatin (CDDP) on BL cell lines.

Methods 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay was performed to assess drug toxicity. To establish the concentrations and time of incubation for the combined treatment, a kinetic analysis was performed for each drug on BL41 and Raji BL cell lines for 24, 48 and 72 h. Apoptosis was assessed by flow cytometry using Annexin V/propidium iodide (PI) and cleaved caspase 3 labeling assays. Caspase 9 activation and levels of Bcl-2 family proteins were analyzed by Western blot.

Results The doses of NaB (1.0 mM), CDDP (1.0 and 2.5 μ M), and VP-16 (0.1 and 0.3 μ M) after 24 h of

incubation were chosen for the evaluation of combined therapy. The apoptotic effects on BL cell lines of NaB/VP-16 and NaB/CDDP were followed by upregulation of Bim protein ($P < 0.05$), activation of caspase-3 and caspase-9, followed by Mcl-1 downregulation ($P < 0.05$). However, Bim overexpression was not correlated with Bcl-2 inhibition ($P > 0.05$) and was accompanied by increase in Bax expression ($P < 0.05$). The combination effects of NaB/VP-16 and NaB/CDDP were found to be synergistic and additive, respectively, in both the cell lines.

Conclusions The study provides strong evidence for the synergistic effects of the association with HDACI and chemotherapy in BL cells.

Keywords Histone deacetylase inhibitor · Burkitt's lymphoma · Bim protein · Apoptosis · Chemotherapy

Purpose

Burkitt's lymphoma (BL) is an aggressive B-cell neoplasm, which is one of the most common lymphoma of childhood (Burkitt 1958; Magrath et al. 1982; Kelly and Rickinson 2007). It is characterized by EBV-positive and EBV-negative phenotypes, which occur in distinct epidemiological subgroups (Thorley-Lawson and Allday 2008; Bornkamm 2009). The introduction of high-intensity regimens has significantly improved the clinical outcome for BL patients, significantly changing their prognosis (Patte et al. 2007; Gerrard et al. 2008). However, patients who present primary chemoresistance or relapse usually die from the disease (Atra et al. 2001; Cairo et al. 2003). Thus, despite the development of new drugs and new polychemotherapy regimens to improve treatment strategies to circumvent responseless BL

A. C. dos Santos Ferreira · R. A. Fernandes · J. K. Kwee
Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular,
Coordenação Geral Técnico-Científica,
Instituto Nacional de Câncer-INCA,
Rio de Janeiro, Brazil

C. E. Klumb (✉)
Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular,
Coordenação Geral Técnico-Científica,
Instituto Nacional de Câncer, Praça Cruz Vermelha,
23/6th floor, Rio de Janeiro CEP 20 230-130, Brazil
e-mail: cklumb@inca.gov.br

patients, chemotherapy resistance may still occur (Griffin et al. 2009).

Very recently, the combination of the new drug Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor (HDACI), and chemotherapy in xenograft BL mice model was found to have an additive effect when compared with the chemotherapy alone (Richter-Larrea et al. 2010). Also, this effect was detected to occur through reactivation of Bim expression, a pro-apoptotic BH3-only family protein, which has attracted increasing attention as a target for tumor therapy (Richter-Larrea et al. 2010; Mérino et al. 2009). In this study, we show that combined treatment of HDACI sodium butyrate and chemotherapy has an apoptotic synergistic effect on BL cell lines. Moreover, these drug combinations triggered apoptosis through Bim, Bax, and Caspase-9 activation, and Mcl-1 downregulation in BL cell lines.

Methods

Cell lines

Human BL cancer cell line Raji was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The BL cell line BL41 was established at the International Agency for Research on Cancer (IARC) (Calender et al. 1987) and it was kindly provided by Dr. Boulanger (Greehey Children's Cancer Research Institute, The University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA). The cell lines were maintained in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C and were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 25 mM of HEPES buffer (Sigma, St. Louis, USA) and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco BRL, UK).

Antibodies and reagents

Procaspase-9, Mcl-1, Bim, Bax, and Bcl-2 antibodies were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN USA), BD Biosciences (San Jose, CA, USA), Enzo Life Sciences (Farmingdale, New York, USA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), and Dako (Glostrup, Denmark), respectively. 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was obtained from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Polyclonal phycoerythrin (PE)-conjugated anti-active caspase 3 antibody was obtained from PharMingen–Becton–Dickinson (Le Pont de Claix, France). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Annexin V (Annexin V) and propidium iodide (PI) were obtained from Genzyme Corporation (Cambridge, MA, USA).

Cell viability

To evaluate the effect of NaB, cisplatin (CDDP), and etoposide (VP-16) on cell viability, Raji and BL41 cells were seeded at 1×10^5 cells/well in 96-well plates in the culture medium plus 10% FCS. The cells were treated with NaB (1.0–10 mM), CDDP (1.0–30 μ M), and VP-16 (0.1–10 μ M). After 24 h, the viable cells were determined using the cell proliferation reagent, MTT. Four hours before the end of incubation, the MTT reagent (0.5 mg/ml) was added to each well (Mosmann 1983). After 24 h, formazan crystals were solubilized with DMSO and measured at 570 nm. Three replicate wells were used to determine each data point.

Apoptosis analysis

The apoptotic cells were detected using Annexin V and PI assay, as previously described (Silva et al. 2006). In general, 2×10^5 Raji and BL41 cells treated with 1 mM of NaB, 1.0 and 2.5 μ M of CDDP, 0.1 and 0.3 μ M of VP-16 or the combined treatment, were washed twice with PBS after 24 h and labeled using Annexin V and PI in binding buffer for apoptosis and necrosis detection, according to the manufacturer's instructions. Fluorescence signals of FITC and PI were detected by FL1 at 530 nm and FL2 at 585 nm, respectively, on a CyAn ADP flow cytometer (Beckman-Coulter, CA, USA). The data were analyzed using the Summit v.4.3 (Beckman-Coulter, CA, USA) software. For each analysis, 10,000 events were recorded.

Cleaved caspase 3 labeling

Cleaved caspase 3 labeling was determined according to a previous study (Belloc et al. 2000). Briefly, 5×10^5 cells were exposed to NaB, CDDP, and VP-16 as described earlier. After treatments, the cells were pelleted, resuspended in 10% (v/v) lise solution (BD Bioscience, CA, USA), and incubated for 10 min at room temperature. The suspension was then centrifuged and the pellet was washed with washing buffer (5% Tween-20 (LGC Biotechnology) in phosphate-buffered saline (PBS)). Labeling was performed by adding 5 μ l of PE)-conjugated anti-active caspase 3 antibody. The samples were analyzed on a CyAn ADP flow cytometer (Beckman-Coulter, CA, USA) at 575 nm.

Western blotting

The cell lysates were subjected to 15% SDS-PAGE, electrotransferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) in a buffer containing

25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% methanol at 2 mA/cm² for 2 h at 25°C, and incubated overnight with antibodies specific for each protein of interest or anti-β actin as a loading control. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used to detect specific binding of the primary antibodies and visualized with Amersham ECL Western Blotting Systems (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

Drug interaction analysis

Combination Index (CI) calculations were analyzed following the procedure developed by Fischel et al. (2005), with the equation adapted from the method developed by Chou and Talalay (1984):

$$R = \frac{\text{Survival (NaB + CDDP or VP-16)}}{\text{Survival (NaB alone)} \times \text{survival (CDDP or VP-16)}}$$

According to Fischel et al. (2005), if:

1. $R < 0.8$, then the association is considered to be synergistic;
2. $0.8 < R < 1.2$, then the association is considered to be additive;
3. $R > 1.2$, then the association is considered to be antagonistic.

Statistical analysis

The data were expressed throughout as mean ± SD, calculated from at least three different experiments. In the apoptosis assays, statistical comparison between the cells treated with NaB plus CDDP or VP-16 and NaB alone was compared with the paired *t*-test. Statistical significance was set at $P < 0.05$. The analysis was performed using the Graph Pad Prism 4.0 software.

Results

Establishing NaB, CDDP, and VP-16 concentrations for combined treatment evaluation

To establish the best concentrations and time of incubation for the combined treatment, a kinetic analysis was performed for each drug on both BL cell lines for 24, 48, and 72 h. Through cell viability assay on BL41 and Raji cells, cytotoxic dose-dependent curves were observed after 24 h of incubation with NaB and with the chemotherapy drugs, CDDP and VP-16 (Fig. 1). The final concentrations of NaB (1 mM), CDDP (1.0 and 2.5 μM), and VP-16 (0.1 and

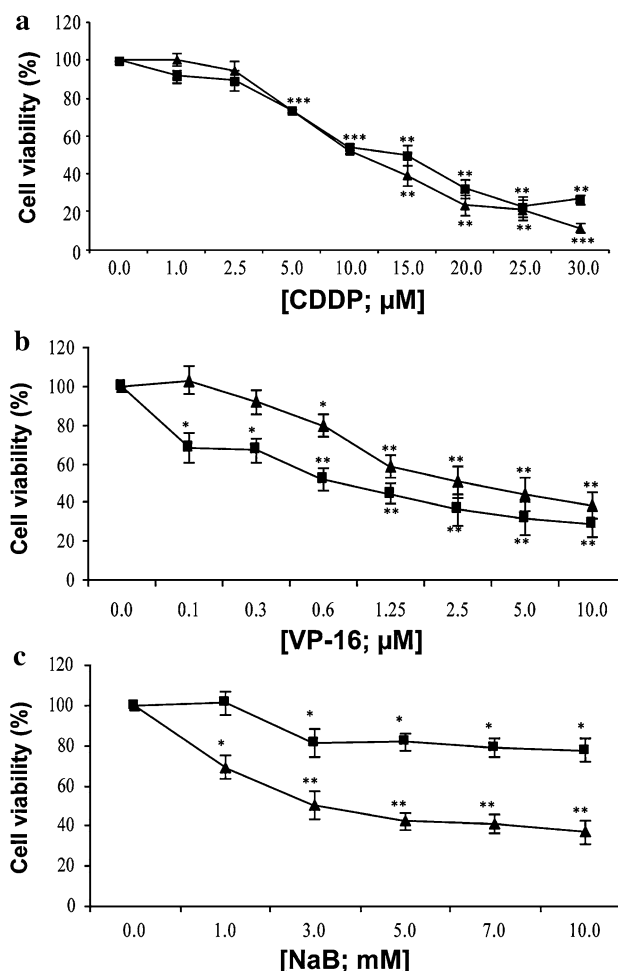


Fig. 1 Dose-effect curve of NaB, CDDP, and VP-16 on BL41 (filled triangle) and Raji (filled square) cell lines. Cell viability after 24 h with 1.0–30 μM of CDDP (a) 0.1–10 μM of VP-16 (b) and 1.0–10 mM of NaB (c) was determined by the MTT method. Data are means ± SD of three independent experiments. Significance versus untreated cells: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

0.3 μM) and the incubation time were chosen for the combined therapy evaluation (Fig. 2).

Evaluation of NaB on sensitizing BL41 and Raji cell lines to CDDP and VP-16

To evaluate the best concentrations of CDDP and VP-16 combined with 1.0 mM of NaB that could induce apoptosis on BL41 and Raji cell lines, we first applied the Annexin V/PI assay on both the cell lines (Fig. 2) with the drugs separately (Fig. 2, upper panel) and combined (Fig. 2, lower panel). Apoptosis was significantly ($P < 0.05$) enhanced by the combined treatments (NaB/CDDP and NaB/VP-16), when compared with each drug incubated independently in both the cell lines (Fig. 2). However, further increase in caspase 3 activation ($P < 0.05$) with the

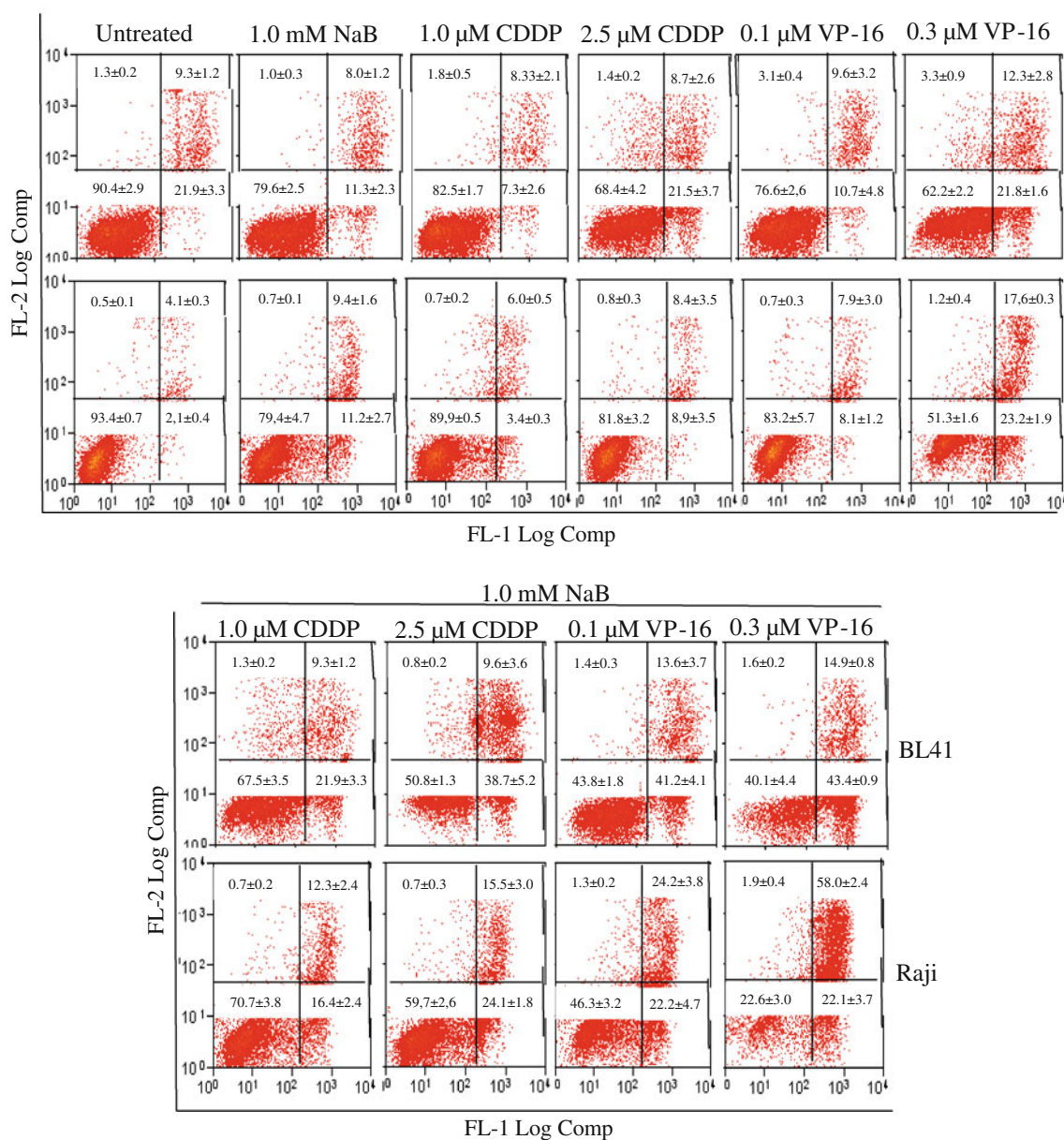


Fig. 2 Effect of NaB on VP-16- and CDDP-induced apoptosis. BL41 and Raji cell lines were treated with 1.0 mM of NaB, 0.1 and 0.3 μM of VP-16, and 1.0 and 2.5 μM of CDDP (upper panel) or the combined treatment (lower panel) during 24 h. After treatment,

apoptosis was measured as described in the Materials and methods section. The results are expressed as mean ± SD of three independent experiments. Untreated versus NaB-treated cells was significantly different $P < 0.05$

combined treatment was observed only in the BL41 cell line (Fig. 3a, b).

Drug interaction analysis

Through the combination index calculations (R) developed by Fischel et al. (2005), the combination effect of NaB/VP-16 and NaB/CDDP was found to be synergistic and additive, respectively, in both the cell lines (Table 1).

Combined treatment of NaB/CDDP and NaB/VP-16 triggered apoptosis through caspase-9 activation and Mcl-1 downregulation in both the cell lines

As our data indicated that co-treatment of BL41 and Raji cells with NaB sensitizes cells to CDDP and VP-16, we investigated whether this treatment increased the cleavage of proteins known to be involved in the apoptotic cascade. The NaB/CDDP and NaB/VP-16 combination was found to lead to Mcl-1

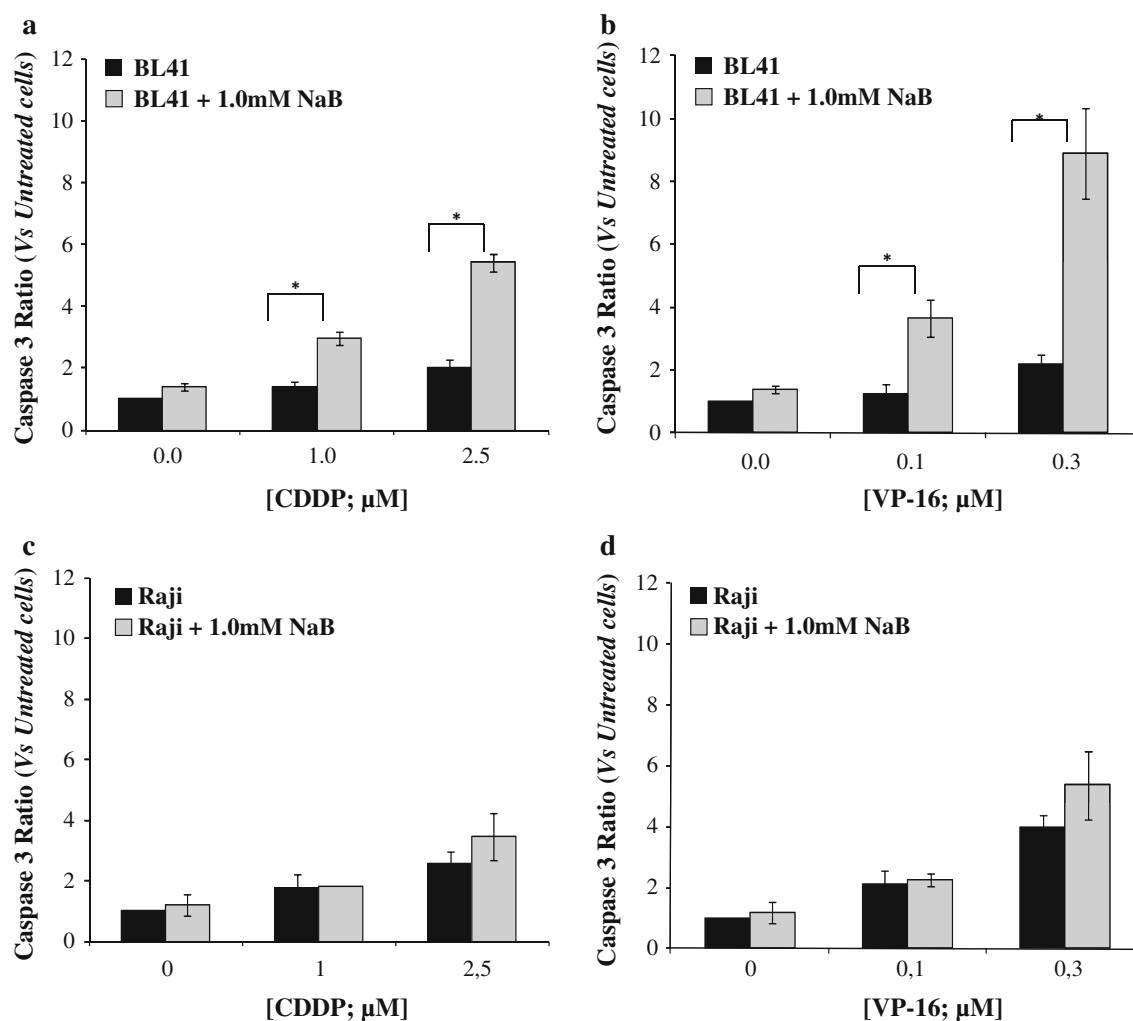


Fig. 3 Caspase-3 activation by CDDP and VP-16 alone or combined with NaB. BL41 (a and b) and Raji (c and d) cell lines were treated with 0.1 and 0.3 μM of VP-16 or 1.0 and 2.5 μM of CDDP alone or combined with 1.0 mM of NaB. After 24 h, caspase-3 activation was

assessed by flow cytometry; the activation of caspase in untreated cells was taken as 1. Data are means \pm SD of three independent experiments. Significance versus cells not exposed to NaB: * $P < 0.05$

Table 1 Combined apoptotic effect with NaB/CDDP and NaB/VP-16

Cell line	Combined treatment	R value	
BL41	1.0 mM NaB	1.0 μM CDDP	0.8 \pm 0.1
		2.5 μM CDDP	0.8 \pm 0.04
		0.1 μM VP-16	0.6 \pm 0.1
		0.3 μM VP-16	0.9 \pm 0.1
Raji	1.0 mM NaB	1.0 μM CDDP	0.9 \pm 0.1
		2.5 μM CDDP	0.8 \pm 0.06
		0.1 μM VP-16	0.5 \pm 0.09
		0.3 μM VP-16	0.4 \pm 0.1

downregulation and activate the caspase-9-mediated intrinsic cell death pathway in both the cell lines (Fig. 4a, b).

Induction of pro-apoptotic Bim correlates with apoptosis in BL cell lines

To elucidate the mechanism of NaB, CDDP, and VP-16 apoptosis induction, we examined the involvement of the HDACI in the combined treatment apoptotic effect (Fig. 2). This apoptotic effect was followed by a strong increase in Bim protein expression (Fig. 5a, b). Bim overexpression was not correlated with Bcl-2 inhibition and was accompanied by increased expression of Bax, a potent inducer of apoptosis, and Mcl-1 downregulation (Fig. 5c, d).

Discussion

The outcome for pediatric BL is excellent with current upfront chemotherapy regimens even for those with

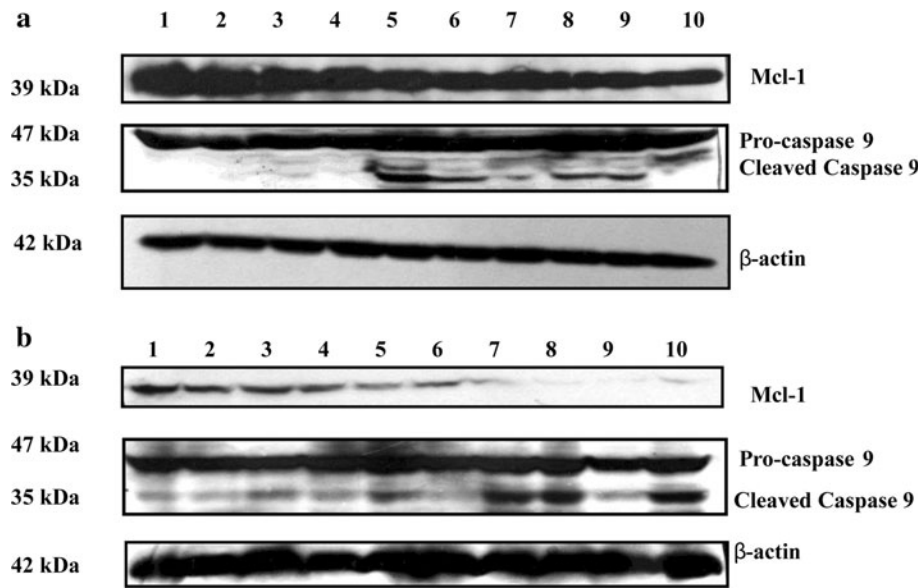


Fig. 4 Effect of NaB on Mcl-1 downregulation and pro-caspase-9 cleavage. One representative analysis, out of three, is shown. Mcl-1 downregulation and pro-caspase-9 cleavage in BL41 (a) and Raji (b) cell lines, treated during 24 h with 1.0 and 2.5 μ M of CDDP or 0.1 and 0.3 μ M of VP-16, alone or combined with 1.0 mM of NaB, was assessed using Western blotting, as described in the Materials and

Methods Section. (1) Untreated cells, (2) 1.0 μ M of CDDP, (3) 2.5 μ M of CDDP, (4) 0.1 μ M of VP-16, (5) 0.3 μ M of VP-16, (6) 1.0 mM of NaB, (7) 1.0 mM of NaB + 1.0 μ M of CDDP, (8) 1.0 mM of NaB + 2.5 μ M of CDDP, (9) 1.0 mM of NaB + 0.1 μ M of VP-16, and (10) 1.0 mM of NaB + 0.3 μ M of VP-16

advanced (Stage III or IV) disease (Patte et al. 2007; Gerrard et al. 2008). However, salvage of patients with refractory or recurrent disease remains very poor. Long-term survival is only 10–20% for refractory or recurrent BL (Atra et al. 2001; Cairo et al. 2003; Griffin et al. 2009). There is a pressing need for the development of new drugs with more potent activity, given the paucity of effective salvage therapies not only for pediatric patients with relapsed or refractory disease but particularly for adult patients. Adult patients exhibit inferior response rates and are less tolerant to treatment-associated toxicities than children. Furthermore, in patients with HIV-associated BL,

toxicity and immunosuppression pose a threat (Aldoss et al. 2008; Oriol et al. 2008).

HDACi are a novel category of anticancer pharmacological agents developed to counter the actions of HDACs, with high selectivity for cancer cells and low toxicity toward normal cells (Emanuele et al. 2008). These new drugs are able to induce an array of death cells-related events, such as cell cycle arrest, generation of reactive oxygen species, inhibition of angiogenesis, apoptosis, and autophagy (Sakajiri et al. 2005; Jazirehi 2010; Walkinshaw and Yang 2008). Several clinical trials of HDACi have been conducted in different types of malignancy diseases,

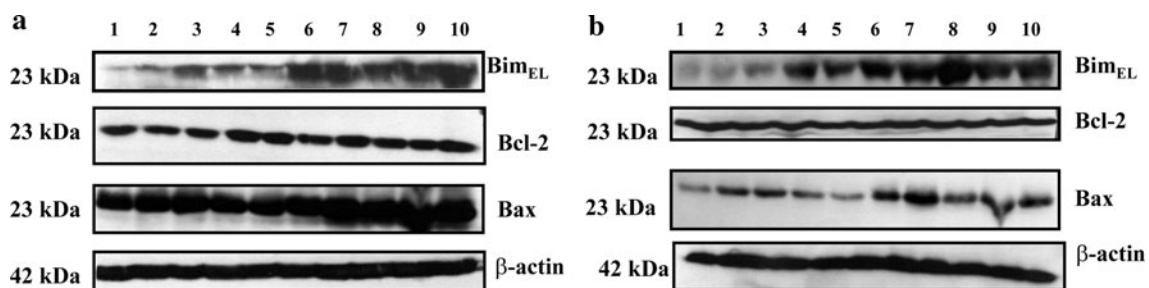


Fig. 5 Effect of NaB treatment on Bim expression. The enhancement of Bim and Bax expression in BL41 (a) and Raji (b) cell lines, treated during 24 h with 1.0 and 2.5 μ M of CDDP or 0.1 and 0.3 μ M of VP-16, alone or combined with 1.0 mM of NaB, was assessed using Western blotting as described in the Materials and Methods Section. (1) Untreated cells, (2) 1.0 μ M of CDDP, (3) 2.5 μ M of CDDP, (4)

0.1 μ M of VP-16, (5) 0.3 μ M of VP-16, (6) 1.0 mM of NaB, (7) 1.0 mM of NaB + 1.0 μ M of CDDP, (8) 1.0 mM of NaB + 2.5 μ M of CDDP, (9) 1.0 mM of NaB + 0.1 μ M of VP-16, and (10) 1.0 mM of NaB + 0.3 μ M of VP-16. One representative experiment for each cell line, out of three, is shown

and a preferential clinical efficacy of these drugs in hematologic malignancies, particularly in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL), peripheral T-cell lymphoma (PTCL), Hodgkin's lymphoma (HL), and myeloid malignancies, has been described (Cang et al. 2009). Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Vorinostat), a pan deacetylase inhibitor, showed moderate activity in a study population that included multiple types of leukemia/lymphoma (O'Connor et al. 2006). Nevertheless, further studies of combined therapies with some HDACIs, either as chemosensitizing agents in association with standard chemotherapy drugs or in combination with DNA methyltransferase inhibitors (DNMTi) to revert epigenetic alterations, are in progress (Mercurio et al. 2010; Ellis and Pili 2010). In addition, HDACIs, such as Panobinostat (LBH589), Belinostat (PXD101), and Miconostatin (MGCD0103), have demonstrated therapeutic potential not only as monotherapy, but also in combination with other antitumor drugs in hematologic malignancies (Tan et al. 2010; Siegel et al. 2009). However, clinical investigation into HDACIs in B-cell lymphomas has been extremely limited (Lemoine and Younes 2010).

With regard to BL, a recent report using a xenograft model described that combined therapy of HDACI, Vorinostat, at a low dose followed by doxorubicin and cyclophosphamide was associated with higher apoptotic rates, decreased cell growth, marked reduction in tumor volume, and longer overall survival. However, the study did not report synergistic effect of combined therapy of HDACI with VP-16 and CDDP (Richter-Larrea et al. 2010).

We evaluated the effect of combined therapy of HDACI with VP-16 and CDDP, which are drugs commonly used as salvage chemotherapy on BL patients. Our results demonstrated that the combination of NaB/VP-16 and NaB/CDDP was synergistic and additive, respectively, in both the cell lines. We observed significant loss of viability following the final concentration of 0.1 μ M of VP-16 after 24 h of incubation with NaB. These synergistic effects were followed by enhanced activation of the pro-apoptotic proteins, when compared with each drug incubated separately. Moreover, the NaB/CDDP and NaB/VP-16 combination led to upregulation of Bim protein, activation of the caspase-9-mediated intrinsic cell death pathway, and Mcl-1 downregulation in both the cell lines.

Previous studies have been reported as apoptosis-related events, such as activation of the death receptor pathway through induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors, downregulation and/or degradation of prosurvival proteins (XIAP, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-XL), production of reactive oxygen species, and upregulation of the apoptosome proteins, caspase-9 and Apaf-1, after treatment of tumor cell lines with HDACIs (Guo et al. 2004; Rosato et al. 2006; Wang et al. 2006; Xu

et al. 2007; Martínez-Iglesias et al. 2008). Furthermore, p53 has also been proposed to play a role in the anticancer activities of HDACI, and an intact p53 pathway is important for the optimal activity of a number of chemotherapeutic drugs (Mellert et al. 2011; Chen et al. 2009). Ellis et al. (2009) used the *E μ -myc* transgenic mouse model of pre-B/B-cell lymphoma to identify the molecular events required for antitumor effects of the HDACIs, Dacinostat (LAQ824), and Panobinostat (LBH589). Both the HDACIs engaged the intrinsic apoptotic cascade that did not require p53 (Ellis et al. 2009). Consistent with these findings, our results showed that combined treatment of NaB/CDDP and NaB/VP-16 triggered apoptosis through caspase-9 activation, increasing the Bim expression, and Mcl-1 downregulation in both BL cells lines. Besides, BL cells lines selected in the present study contain mutant p53 protein that exhibits no wild-type p53 function (Cherney et al. 1997). Although p53-deficient cancer cells are often less responsive to chemotherapy, they are not completely drug resistant, suggesting that other apoptotic pathways are at work. In p53-deficient breast cancer cells, p73 functionally replaces p53 following adriamycin treatment (Vayssade et al. 2005).

HDACIs have been reported to activate the intrinsic cell death pathway in many cancer models (Carew et al. 2008). The mitochondrial pathway of apoptosis is controlled by the Bcl-2 family, which is composed of both pro- and anti-apoptotic proteins. Several pro- (Bax, Bak, Bim, Bid, etc.) and anti-apoptotic (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, etc.) proteins regulate this cell death pathway (Wei et al. 2001; Youle and Strasser 2008).

Similar to other anti-apoptotic Bcl-2 proteins, Mcl-1 prevents the permeabilization of the mitochondrial outer membrane, which requires the oligomerization of either Bax or Bak (Youle and Strasser 2008). Although it has been established that the activation of Bax and Bak is mediated by certain BH3-only proteins, the exact mechanisms involved remain controversial (Mérino et al. 2009; Youle and Strasser 2008). According to the neutralization model, on receipt of an apoptotic signal, activated BH3-only proteins (Bim, Bid and probably Puma) remove Bax and Bak from the constraints of prosurvival Bcl-2 proteins (Youle and Strasser 2008). According to the alternative model, activator BH3-only proteins, including Bid, Bim, and Puma, are capable of direct activation of Bax and Bak, unless kept in check by prosurvival proteins (Kuwana et al. 2005; Czabotar et al. 2009). Mcl-1 has a high turnover rate and the shortest half-life among anti-apoptotic Bcl-2 family members (Craig 2002). This may facilitate the apoptosis process, since early elimination of Mcl-1 is required for etoposide and UV-mediated apoptosis in HeLa cells (Nijhawan et al. 2003). Although our study does not directly address these questions, it suggests that Bim and

Mcl-1 proteins are involved in HDCIs apoptosis induction in BL cells. Moreover, we have found that BL-41 and Raji cells differ in the degree of dependence of caspase 3 activation for apoptosis completion. These opposing results may reflect differences in the performance of apoptotic machinery among cells models.

In conclusion, the current study provides strong evidence for the synergistic effects of the association with HDCl and chemotherapy in BL cells and proposes the possibility that Bim and MCL-1 are involved into apoptotic events. As HDACIs can modulate a variety of pro- and anti-apoptotic proteins, combination regimens with HDACIs should be investigated using knockdown approaches. Ultimately, these studies will hopefully improve our treatment strategies for patients with relapsed and refractory BL.

Acknowledgments We thank Flavia da Cunha Vasconcelos for helping on flow cytometry analysis. This work was supported by a grant from INCT para Controle do Câncer, CNPq 573806/2008-0 e FAPERJ E26/170.026/2008.

Conflict of interest None of the authors have any financial interest related to this work.

References

- Aldoss IT, Weisenburger DD, Fu K, Chan WC, Vose JM, Bierman PJ, Bociek RG, Armitage JO (2008) Adult Burkitt lymphoma: advances in diagnosis and treatment. *Oncology* 22:1508–1517
- Atra A, Gerrard M, Hobson R, Imeson JD, Hann IM, Pinkerton CR (2001) Outcome of relapsed or refractory childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma treated with the UKCCSG 9003/9002 protocols. *Br J Haematol* 112:965–968. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.02647.x
- Belloc F, Belaud-Rotureau MA, Lavignolle V, Bascans E, Braz-Pereira E, Durrieu F, Lacombe F (2000) Flow cytometry detection of caspase 3 activation in preapoptotic leukemic cells. *Cytometry* 40:150–151. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(20000601)40:2<151:AID-CYTO9>3.0.CO;2-9
- Bornkamm GW (2009) Epstein-Barr virus and its role in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: an unresolved issue. *Semin Cancer Biol* 19:351–365. doi:10.1016/j.semcancer.2009.07.002
- Burkitt D (1958) A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* 46:218–223
- Cairo MS, Sposto R, Perkins SL, Meadows AT, Hoover-Regan ML, Anderson JR, Siegel SE, Lones MA, Tedeschi-Blok N, Kadin ME, Kjeldsberg CR, Wilson JF, Sanger W, Morris E, Krailo MD, Finlay JL (2003) Burkitt's and Burkitt-like lymphoma in children and adolescents: a review of the children's cancer group experience. *Br J Haematol* 120:660–670
- Calender A, Billaud M, Aubry JP, Banchereau J, Vuillaume M, Lenoir GM (1987) Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8060–8064
- Cang S, Ma Y, Liu D (2009) New clinical developments in histone deacetylase inhibitors for epigenetic therapy of cancer. *J Hematol Oncol* 2:22–32. doi:10.1186/1756-8722-2-22
- Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST (2008) Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett* 269:7–17. doi:10.1016/j.canlet.2008.03.037
- Chen X, Wong P, Radany E, Wong JY (2009) HDAC Inhibitor, Valproic acid, induces p53-dependent radiosensitization of colon cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm* 24:689–699. doi:10.1089/cbr.2009.0629
- Cherney BW, Bhatia KG, Sgadari C, Gutierrez MI, Mostowski H, Pike SE, Gupta G, Magrath IT, Tosato G (1997) Role of the p53 tumor suppressor gene in the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma cells. *Cancer Res* 57:2508–2515
- Chou T, Talalay P (1984) Quantitative analysis of dose-effects relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22:27–55
- Craig RW (2002) MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 16:444–454. doi:10.1038/sj/leu/2402416
- Czabotar PE, Colman PM, Huang DC (2009) Bax activation by Bim? Cell Death Differ 16:1187–1191. doi:10.1038/cdd.2009.83
- Ellis L, Pili R (2010) Histone deacetylase inhibitors: advancing therapeutic strategies in hematological and solid malignancies. *Pharmaceuticals (Basel)* 3:2411–2469. doi:10.3390/ph3082441
- Ellis L, Bots M, Lindemann RK, Bolden JE, Newbold A, Cluse LA, Scott CL, Strasser A, Atadja P, Lowe SW, Johnstone RW (2009) The histone deacetylase inhibitors LAQ824 and LBH589 do not require death receptor signaling or a functional apoptosome to mediate tumor cell death or therapeutic efficacy. *Blood* 114:380–393. doi:10.1182/blood-2008-10-182758
- Emanuele S, Lauricella M, Tesoriere G (2008) Histone deacetylase inhibitors: apoptotic effects and clinical implications *Int J Oncol* 33:637–646. doi:10.3892/ijo_00000049
- Fischel J-L, Formento P, Milano G (2005) Epidermal growth factor receptor double targeting by a tyrosine kinase inhibitor (Iressa) and a monoclonal antibody (Cetuximab). Impact on cell growth and molecular factors *Br J Cancer* 92:1063–1068. doi:10.1038/sj.bjc.6602428
- Gerrard M, Cairo MS, Weston C, Auperin A, Pinkerton R, Lambilliotte A, Sposto R, McCarthy K, Lacombe MJ, Perkins SL, Patte C (2008) FAB LMB96 International Study Committee. Excellent survival following two courses of COPAD chemotherapy in children and adolescents with resected localized B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB/LMB 96 international study. *Br J Haematol* 141:840–847. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07144.x
- Griffin TC, Weitzman S, Weinstein H, Chang M, Cairo M, Hutchison R, Shiramizu B, Wiley J, Woods D, Barnich M, Gross TG, Group Children'sOncology (2009) A study of rituximab and ifosfamide, carboplatin, and etoposide chemotherapy in children with recurrent/refractory B-cell (CD20+) non-Hodgkin lymphoma and mature B-cell acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 52:177–181. doi:10.1002/pbc.21753
- Guo F, Sigua C, Tao J, Bali P, George P, Li Y, Wittmann S, Moscinski L, Atadja P, Bhalla K (2004) Cotreatment with histone deacetylase inhibitor LAQ824 enhances Apo-2L/tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced death inducing signaling complex activity and apoptosis of human acute leukemia cells. *Cancer Res* 64:2580–2589. doi:10.1158/0008-5472
- Jazirehi AR (2010) Regulation of apoptosis-associated genes by histone deacetylase inhibitors: implications in cancer therapy. *Anticancer Drugs* 21:805–813. doi:10.1097/CAD.0b013e32833dad91
- Kelly GL, Rickinson AB (2007) Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. *Hematology* 20:277–284. <http://asheducationbook.hematologylibrary.org>

- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular Cell* 17:525–535. doi:[10.1016/j.molcel.2005.02.003](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.003)
- Lemoine M, Younes A (2010) Histone deacetylase inhibitors in the treatment of lymphoma. *Discov Med* 10:462–470
- Magrath I, Jain V, Bhatia K (1982) Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma. *Semin Cancer Biol* 3:285–295
- Martínez-Iglesias O, Ruiz-Llorente L, Sánchez-Martínez R, García L, Zambrano A, Aranda A (2008) Histone deacetylase inhibitors: mechanism of action and therapeutic use in cancer. *Clin Transl Oncol* 10:395–398
- Mellert HS, Stanek TJ, Sykes SM, Rauscher FJ, Schultz DC, McMahon SB (2011) Deacetylation of the DNA-binding domain regulates p53-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 286:4264–4270. doi:[10.1074/jbc.M110.184663](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.184663)
- Mercurio C, Minucci S, Pelicci PG (2010) Histone deacetylases and epigenetic therapies of hematological malignancies. *Pharmacol Res* 62:18–34. doi:[10.1016/j.phrs.2010.02.010](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.02.010)
- Mérino D, Giam M, Hughes PD, Siggs OM, Heger K, O'Reilly LA, Adams JM, Strasser A, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P (2009) The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J Cell Biol* 186:355–362. doi:[10.1083/jcb.200905153](https://doi.org/10.1083/jcb.200905153)
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63. doi:[10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X (2003) Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 17:1475–1486. doi:[10.1101/gad.1093903](https://doi.org/10.1101/gad.1093903)
- O'Connor OA, Heaney ML, Schwartz L, Richardson S, Willim R, MacGregor-Cortelli B, Curly T, Moskowitz C, Portlock C, Horwitz S, Zelenetz AD, Frankel S, Richon V, Marks P, Kelly WK (2006) Clinical experience with intravenous and oral formulations of the novel histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in patients with advanced hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 24:166–173. doi:[10.1200/JCO.2005.01.9679](https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.9679)
- Oriol A, Ribera JM, Bergua J, Giménez MesaE, Grande C, Esteve J, Brunet S, Moreno MJ, Escoda L, Hernandez-Rivas JM, Hoelzer D (2008) High-dose chemotherapy and immunotherapy in adult Burkitt lymphoma: comparison of results in human immunodeficiency virus-infected and noninfected patients. *Cancer* 113:117–125. doi:[10.1002/ncr.23522](https://doi.org/10.1002/ncr.23522)
- Patte C, Auperin A, Gerrard M, Michon J, Pinkerton R, Sposto R, Weston C, Raphael M, Perkins SL, McCarthy K, Cairo MS (2007) FAB/LMB96 International Study Committee. Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients. *Blood* 109:2773–2780. doi:[10.1182/blood-2006-07-036673](https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-036673)
- Richter-Larrea JA, Robles EF, Fresquet V, Beltran E, Rullan AJ, Agirre X, Calasanz MJ, Panizo C, Richter JA, Hernandez JM, Roman-Gomez J, Prosper F, Martinez-Climent JA (2010) Reversion of epigenetically mediated Bim silencing overcomes chemoresistance in Burkitt lymphoma. *Blood* 116:2531–2542. doi:[10.1182/blood-2010-02-268003](https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-268003)
- Rosato R, Maggio SC, Almenara JA, Payne SG, Atadja P, Spiegel S, Dent P, Grant S (2006) The histone deacetylase inhibitor LAQ824 induces human leukemia cell death through a process involving XIAP down-regulation, oxidative injury, and the acid sphingomyelinase-dependent generation of ceramide. *Mol Pharmacol* 69:216–225. doi:[10.1124/mol.105.017145](https://doi.org/10.1124/mol.105.017145)
- Sakajiri S, Kumagai T, Kawamata N, Saitoh T, Said JW, Koeffler HP (2005) Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines. *Exp Hematol* 33:53–61. doi:[10.1016/j.exphem.2004.09.008](https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.09.008)
- Siegel D, Hussein M, Belani C, Robert F, Galanis E, Richon VM, Garcia-Vargas J, Sanz-Rodriguez C, Rizvi S (2009) Vorinostat in solid and hematologic malignancies. *J Hematol Oncol* 2:31–41. doi:[10.1186/1756-8722-2-31](https://doi.org/10.1186/1756-8722-2-31)
- Silva KL, Vasconcelos DV, Castro EDP, Coelho AM, Linden R, Maia RC (2006) Apoptotic effect of fludarabine is independent of expression of IAPs in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Apoptosis* 11:277–285. doi:[10.1007/s10495-006-3560-5](https://doi.org/10.1007/s10495-006-3560-5)
- Tan J, Cang S, Ma Y, Petrillo RL, Liu D (2010) Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *J Hematol Oncol* 4:3–5. doi:[10.1186/1756-8722-3-5](https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-5)
- Thorley-Lawson DA, Allday MJ (2008) The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol* 6:913–924. doi:[10.1038/nrmicro2015](https://doi.org/10.1038/nrmicro2015)
- Vayssade M, Haddada H, Faridoni-Laurens L, Tourpin S, Valent A, Bénard J, Ahomadegbe JC (2005) P73 functionally replaces p53 in Adriamycin-treated, p53-deficient breast cancer cells. *Int J Cancer* 116:860–869. doi:[10.1002/ijc.21033](https://doi.org/10.1002/ijc.21033)
- Walkinshaw DR, Yang XJ (2008) Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics. *Curr Oncol* 15:237–243
- Wang S, Yan-Neale Y, Cai R, Alimov I, Cohen D (2006) Activation of mitochondrial pathway is crucial for tumor selective induction of apoptosis by LAQ824. *Cell Cycle* 5:1662–1668. doi:[10.4161/cc.5.15.3099](https://doi.org/10.4161/cc.5.15.3099)
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292:727–730. doi:[10.1126/science.1059108](https://doi.org/10.1126/science.1059108)
- Xu WS, Parmigiani R, Marks PA (2007) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26:5541–5552. doi:[10.1038/sj.onc.1210620](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210620)
- Youle J, Strasser A (2008) The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:47–59. doi:[10.1038/nrm2308](https://doi.org/10.1038/nrm2308)

Anexo II



Memo 198/09-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 14 de julho de 2009.

A(o): Dr(a) Claudete Klumb
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP n° 18/09 (Este n°. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
Título do Estudo: Implicações Prognósticas de Alterações Genéticas e Epigenéticas nos linfomas não Hodgkin da Infância

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer aprovou após re-análise o estudo intitulado: **Implicações Prognósticas de Alterações Genéticas e Epigenéticas nos linfomas não Hodgkin da Infância**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para maiores de 18 anos versão 2**, **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para menores de 18 anos e maiores de 12 anos versão 2** e **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes controle versão 2**, em 6 de julho de 2009.

Ressalto que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu protocolo que estão previstos para as seguintes datas: janeiro/2010 e julho/2010.

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

Anexo III

Gene Symbol	p value (FDR Adjusted)	FoldChange: Up-regulated in VP-16 treated cells	Gene Symbol	p value (FDR Adjusted)	FoldChange: Up-regulated in Control
GALNTL2	2.31E-04	14.57	FOS	2.21E-10	32.55
FHOD3	2.06E-06	7.98	EGR1	1.35E-06	22.97
CAPSL	7.44E-06	6.90	CD69	2.03E-11	20.76
LGALS2	1.17E-03	6.81	JUN	4.26E-06	10.23
IL7R	6.97E-04	5.23	RGS1	4.83E-14	9.72
SELL	2.39E-04	5.00	SEMA5B	5.67E-06	6.32
SPOCK1	3.36E-05	4.84	PHACTR1	2.33E-06	6.24
CXCL9	7.35E-05	4.81	X86121	2.61E-04	6.09
MRO	9.99E-04	4.56	CCL18	1.79E-07	5.71
MLLT7	6.76E-05	4.27	ATF3	1.83E-08	5.69
GPD2	1.83E-04	4.09	KLF6	6.12E-08	5.49
GIPC2	1.14E-04	3.62	PKD2L1	5.09E-07	5.46
ALKBH8	2.82E-05	3.48	PHLDA2	3.05E-04	5.29
KCTD7	1.09E-06	3.24	INHBE	5.04E-06	5.09
MCART2	3.45E-04	3.13	SULF2	3.61E-04	4.97
EFHB	5.52E-04	2.98	ATF5	1.06E-04	4.81
GSG1L	1.27E-03	2.93	CCL3	1.65E-09	4.80
CYB5A	9.60E-07	2.89	CCL3L3	1.69E-09	4.79
CDKL1	1.98E-04	2.83	CXCL11	1.02E-08	4.64
HECW2	4.22E-04	2.77	HYAL4	9.25E-07	4.49
FUT7	1.77E-04	2.72	DB340110	4.05E-08	4.40
CV323908	7.87E-04	2.70	UNQ6488	9.30E-04	4.36
P2RY10	1.45E-05	2.60	SGK	9.40E-04	4.33
RGS9BP	1.34E-04	2.59	TTC25	4.97E-05	4.32
CN430008	7.07E-04	2.41	NR4A1	1.95E-05	4.31
RGC32	5.02E-04	2.36	PPP1R15A	3.52E-08	4.30
ZNF555	7.64E-05	2.36	DDIT3	1.40E-07	4.29
HSPA1A	2.08E-04	2.30	TUBE1	1.37E-06	4.07
ARSB	9.83E-06	2.28	CTH	3.05E-06	3.76
CCRL1	1.38E-07	2.25	TRPM1	1.42E-03	3.62
SOX5	1.05E-04	2.24	LMO2	1.40E-03	3.60
TFDP2	3.40E-07	2.19	SEC63D1	1.96E-03	3.50
IL9R	1.06E-03	2.18	GUCA1B	7.07E-05	3.44
OGG1	5.18E-04	2.17	DUSP10	2.04E-04	3.37
ACACB	1.14E-03	2.17	SLC6A13	9.52E-06	3.30
PFTK1	3.43E-08	2.15	FGF18	5.84E-09	3.25
OAS1	4.50E-06	2.14	LY9	1.09E-03	3.24
NAGA	6.92E-04	2.13	TNFAIP3	3.02E-07	3.22
DNAJB4	9.56E-05	2.13	CHAC1	1.07E-05	3.19
SHRM	1.24E-03	2.12	TNFRSF8	2.93E-05	3.15

WFDC10B	1.34E-03	2.07	FFAR1	1.15E-03	3.10
ZMYM3	2.35E-04	2.06	FAM90A1	5.39E-06	3.09
WASF3	1.50E-04	2.02	LAIR1	4.23E-04	3.09
PRPF8	4.37E-04	2.02	NFKBIA	3.60E-05	3.06
RANGAP1	3.73E-04	2.02	PAQR6	1.83E-03	3.05
CLCF1	2.13E-03	2.01	DUSP1	4.25E-06	3.03
ATBF1	1.89E-05	2.00	SLC23A1	1.57E-03	3.01
GEMIN5	1.15E-04	2.00	OTOP3	1.13E-03	3.01
CHST4	1.46E-04	1.97	GPR18	1.73E-06	3.00
PSMD2	1.36E-03	1.97	CDC14C	1.90E-03	2.97
ANKRD25	4.38E-04	1.97	NUDT15	1.30E-09	2.96
ZNF526	1.03E-03	1.96	SLC30A1	2.82E-05	2.95
CCDC86	3.08E-04	1.92	AMY1C	1.94E-04	2.90
ZPBP2	7.76E-04	1.92	MMP7	8.70E-11	2.89
KCNA3	9.85E-04	1.89	IL7	7.63E-06	2.88
ATAD3B	1.16E-03	1.89	DDX59	1.27E-06	2.84
CEP70	9.56E-04	1.86	HIST1H1E	3.06E-06	2.84
CRLF1	1.54E-03	1.85	ALDOC	6.64E-06	2.83
EBI2	2.03E-03	1.85	TRIM16	1.60E-03	2.78
CRELD2	1.38E-04	1.85	HIST1H2BD	3.19E-07	2.78
DHRS1	1.82E-03	1.83	TncRNA	6.75E-04	2.75
FGFR1	1.59E-08	1.83	TRPV1	1.09E-03	2.64
NQO1	4.14E-04	1.82	DFNA5	1.31E-08	2.64
MGAT4B	1.46E-03	1.82	CTAGE4	6.63E-08	2.64
ZNF259	3.53E-05	1.81	WFDC8	2.03E-03	2.64
SYTL2	9.85E-04	1.80	OTOA	1.36E-04	2.59
IBRDC2	2.67E-04	1.80	LGALS12	1.27E-03	2.57
METTL7A	9.09E-04	1.79	FKBP14	2.88E-05	2.52
AAMP	2.79E-04	1.77	DOC2A	1.23E-04	2.50
ERBB4	1.21E-06	1.77	CD274	6.44E-05	2.49
PLB1	1.42E-03	1.75	GMEB1	1.07E-03	2.49
UTP20	1.80E-04	1.75	SNORA70	2.23E-05	2.48
GALE	1.62E-04	1.75	TMEM88	1.22E-03	2.46
U88048	1.57E-03	1.74	RG9MTD3	3.95E-04	2.46
MME	3.48E-04	1.74	BAIAP2L2	2.83E-04	2.45
ZSWIM3	1.75E-03	1.73	TSGA2	1.39E-04	2.45
PLK1	4.55E-04	1.73	ZNF548	1.47E-05	2.45
BIK	1.52E-04	1.69	TNFRSF10B	6.81E-04	2.43
CHEK2	1.42E-03	1.69	SUMF2	1.45E-03	2.43
CIZ1	1.78E-04	1.68	NKX6-3	7.83E-04	2.41
MCOLN1	2.06E-03	1.68	PFKFB4	1.86E-05	2.39
MMACHC	7.41E-06	1.66	X15675	6.63E-04	2.38
RSC1A1	1.05E-05	1.66	ZNF426	4.74E-04	2.37

FKBP4	2.63E-04	1.65	ACP5	9.63E-05	2.37
TIMM8A	1.27E-03	1.64	RSHL3	2.64E-05	2.35
NOTCH1	7.36E-04	1.64	PLEKHG1	3.60E-07	2.34
POLE2	2.52E-04	1.63	ELK4	3.97E-04	2.34
SLC43A2	2.43E-04	1.63	SLC7A11	4.70E-09	2.33
ARL6IP	7.31E-04	1.62	SBEM	5.37E-04	2.32
WDR77	1.96E-03	1.61	EIF2S3	5.98E-05	2.31
RAB6B	1.42E-03	1.61	PRO2852	2.64E-06	2.30
TMEM149	2.19E-03	1.61	HIST1H4L	1.05E-03	2.30
UBE2C	1.60E-04	1.60	ECM1	5.01E-04	2.29
ZNF573	8.90E-04	1.59	ZMYND17	1.94E-04	2.28
GLUL	6.48E-06	1.59	SLC38A2	3.28E-06	2.27
PIP5K2B	1.19E-04	1.59	LY86	5.99E-04	2.27
GAS2	1.52E-03	1.59	PIGW	2.41E-06	2.26
FBXW9	5.38E-04	1.58	NFKBIZ	2.50E-06	2.26
MRPL35	8.96E-05	1.58	TLR10	5.49E-05	2.26
HCG27	6.25E-04	1.57	SEC31L2	1.32E-03	2.25
HSPH1	8.06E-04	1.57	AGA	7.27E-06	2.25
PREB	9.84E-04	1.56	HIST1H4D	1.97E-04	2.23
DRAP1	3.17E-04	1.56	WSB1	7.96E-08	2.22
FAM98A	2.67E-04	1.55	RPGR	4.86E-04	2.21
WDFY4	1.69E-03	1.55	CHRN1	5.79E-05	2.21
PLEKHQ1	2.08E-04	1.55	KLHL15	5.27E-04	2.21
SEMA4D	9.28E-04	1.54	SLC39A9	3.07E-07	2.20
DDN	3.84E-04	1.54	CEBPG	3.14E-05	2.20
ZBTB32	2.33E-05	1.54	DNAJB9	2.73E-07	2.18
CREB5	1.41E-05	1.54	AOC3	4.20E-04	2.18
CXCL10	1.03E-04	1.54	CEBPB	5.43E-06	2.17
TUBA1	7.36E-08	1.54	RP3-398D13.1	1.07E-03	2.17
CLTC	1.20E-03	1.54	IER5	4.32E-06	2.17
NUFIP1	1.22E-03	1.53	ATP6V1E2	6.48E-04	2.17
JMJD4	9.57E-04	1.53	PAM	3.60E-05	2.17
LTBP1	4.28E-05	1.53	SYTL1	1.34E-05	2.16
NIPSNAP3A	3.02E-08	1.53	DDIT4	2.13E-04	2.15
SLC25A11	2.05E-03	1.53	MAMDC4	2.37E-04	2.15
ST6GALNAC4	8.89E-04	1.53	L06610	9.32E-04	2.14
WDR66	1.00E-03	1.52	ZBTB25	4.17E-05	2.14
KCNMB4	1.68E-04	1.52	HLA-DQA1	1.62E-03	2.14
HMMR	1.63E-03	1.52	FAS	7.22E-05	2.13
FAM27E2	5.38E-04	1.52	RP5-1022P6.2	6.22E-05	2.12
SEPHS1	1.11E-05	1.52	SKP2	4.51E-04	2.12
NKG7	2.07E-03	1.51	MDM4	3.62E-07	2.11
ARL2BP	3.88E-04	1.51	BACH1	1.10E-06	2.11

WDR46	1.56E-04	1.50	WNT10A	7.64E-05	2.10
			SPON2	4.32E-07	2.10
			SFRS12	7.82E-10	2.10
			ZNF28	3.25E-04	2.09
			CTAGE5	8.76E-09	2.09
			MTL5	3.03E-04	2.08
			TIAM2	3.50E-07	2.07
			YRDC	5.93E-06	2.06
			PLK3	2.42E-05	2.06
			SESN2	3.15E-06	2.06
			NOL3	3.07E-06	2.06
			PTK2	1.17E-03	2.05
			PLA1A	1.10E-03	2.05
			FYN	7.14E-05	2.05
			CCNL1	7.48E-07	2.04
			LRRC8C	1.76E-04	2.02
			ZNF18	1.78E-04	2.02
			HES1	5.01E-09	2.02
			GTF2IRD2	4.27E-04	2.02
			AMPD3	6.73E-04	2.02
			HIST1H4C	1.30E-04	2.01
			DNAJC14	1.88E-03	2.00
			SLC35D2	1.87E-06	2.00
			TMEM34	1.56E-05	1.99
			T15787	9.34E-04	1.99
			SCYL1BP1	2.89E-04	1.99
			CCPG1	3.37E-06	1.99
			ERN1	4.93E-05	1.97
			VEGF	3.64E-06	1.97
			GALNACT-2	9.40E-05	1.97
			HIST1H2AK	1.69E-04	1.94
			DNHD1	1.60E-03	1.94
			PNN	4.15E-06	1.94
			ZC3H6	5.39E-04	1.94
			CD104030	5.98E-04	1.94
			L04336	6.13E-04	1.94
			SLAMF1	4.93E-11	1.93
			CTAGE6	5.83E-04	1.93
			TAF11	7.47E-04	1.93
			MXI1	6.86E-06	1.92
			CTAGEP	9.52E-05	1.91
			TMEM57	2.43E-04	1.90
			DMTF1	5.84E-06	1.90

	NFIL3	8.08E-05	1.90
	BIC	2.86E-04	1.90
	GBE1	1.51E-04	1.89
	RND1	1.16E-04	1.88
	MTX3	8.87E-05	1.88
	SECISBP2	7.78E-07	1.87
	ZNF446	7.73E-04	1.87
	SLAMF7	1.00E-04	1.87
	HSPC157	3.31E-05	1.87
	COQ10B	5.79E-04	1.87
	UGDH	1.44E-04	1.87
	ZNF100	5.44E-04	1.86
	CDC14A	6.75E-04	1.85
	IER2	1.89E-03	1.85
	FAM100B	1.80E-04	1.85
	WARS	7.34E-06	1.85
	CCNB1IP1	1.04E-03	1.85
	ZNF268	1.39E-03	1.85
	FGFR3	1.81E-03	1.84
	UBXD4	1.53E-05	1.84
	COMMD2	1.42E-03	1.84
	ZFP161	5.14E-04	1.84
	BCOR	4.71E-04	1.83
	WHDC1	2.89E-05	1.83
	SLC25A4	6.73E-05	1.82
	THRAP2	2.00E-04	1.81
	IL21R	5.03E-04	1.81
	CTBP2	4.78E-05	1.81
	TMEM18	5.21E-04	1.81
	BNIP3L	2.10E-05	1.81
	CN430223	1.25E-05	1.81
	BTBD12	7.35E-04	1.80
	LYSMD2	7.39E-04	1.80
	RHEBL1	1.62E-03	1.80
	U66046	1.13E-03	1.79
	AZGP1	3.25E-04	1.78
	CHFR	3.91E-04	1.78
	BCL7A	5.67E-04	1.77
	RABGGTB	7.35E-05	1.77
	PIM1	1.40E-05	1.77
	SFRS4	2.90E-05	1.76
	LAT2	7.20E-04	1.76
	ST7L	4.46E-04	1.75

	KLHL6	3.31E-04	1.75
	FZD7	7.61E-04	1.74
	KLHL24	1.63E-06	1.74
	SC4MOL	1.59E-04	1.74
	CDKN1A	3.59E-07	1.74
	EGLN1	5.70E-06	1.74
	LRRC57	3.05E-04	1.74
	ZNF711	2.18E-04	1.73
	CD55	2.04E-06	1.73
	TARBP1	1.81E-04	1.73
	ALS2	5.72E-04	1.72
	CARS	1.39E-03	1.72
	KLK1	5.47E-06	1.71
	BTBD15	3.21E-05	1.71
	GPR160	2.20E-03	1.70
	ADAM11	7.99E-04	1.69
	USP3	1.80E-03	1.69
	UST	4.87E-04	1.69
	XPOT	1.30E-04	1.69
	TLR6	1.41E-05	1.69
	RUFY2	1.55E-03	1.69
	TMEM77	7.49E-05	1.68
	GKAP1	3.94E-05	1.68
	SUB1	1.93E-05	1.68
	ZNF267	1.40E-03	1.68
	SDK1	1.92E-03	1.68
	CEP135	1.89E-06	1.68
	RNF139	2.65E-05	1.67
	CD46	1.84E-03	1.67
	GEMIN7	1.89E-03	1.67
	RASA1	1.29E-04	1.66
	LNX2	1.76E-03	1.66
	CCDC45	5.18E-05	1.66
	PEX7	3.06E-04	1.66
	GPT2	7.46E-06	1.66
	SLC15A4	1.45E-03	1.66
	HIST3H2BB	1.80E-03	1.66
	SGSH	1.51E-03	1.66
	ERO1LB	6.74E-04	1.66
	ZNF432	1.13E-04	1.65
	SNAPC3	1.54E-04	1.65
	SLC41A2	1.28E-06	1.65
	PDE6B	1.70E-04	1.65

	SMC3	1.21E-03	1.65
	PSIP1	2.07E-04	1.65
	ZNF582	6.67E-04	1.65
	ZNF292	1.80E-03	1.65
	JMY	5.48E-04	1.65
	CMKOR1	1.16E-03	1.64
	LMBRD1	5.07E-04	1.64
	MAP2K6	1.61E-04	1.64
	RAB11FIP1	7.55E-04	1.64
	HRASLS2	2.22E-04	1.64
	MIS12	1.31E-04	1.64
	GOLGA8B	3.33E-04	1.63
	YEATS4	4.94E-04	1.63
	PRPF38B	6.91E-05	1.63
	EXOSC8	1.18E-03	1.63
	CGRRF1	1.18E-03	1.63
	RBMS2	9.48E-04	1.63
	RAB21	7.82E-05	1.63
	OTUD3	4.01E-04	1.62
	IRF8	1.04E-03	1.62
	KIF21B	1.96E-03	1.62
	DEGS1	1.25E-05	1.62
	SRA1	7.70E-04	1.62
	CXCR4	4.81E-04	1.62
	ATXN7	4.42E-04	1.62
	VLDLR	4.28E-05	1.62
	HIST1H2AE	1.88E-03	1.62
	ZNF254	1.47E-03	1.62
	CCDC52	1.50E-04	1.61
	GARS	1.59E-03	1.61
	IFNGR1	3.99E-04	1.61
	MARK3	2.20E-03	1.61
	CD641036	8.36E-05	1.61
	TNFSF9	1.40E-04	1.60
	STIL	1.04E-03	1.60
	NAT11	1.25E-03	1.60
	TMEM161B	6.17E-05	1.60
	CLOCK	9.42E-05	1.60
	JMJD1A	2.58E-06	1.60
	TOR1AIP1	6.83E-04	1.60
	CENPH	6.22E-08	1.60
	TNFSF7	1.78E-03	1.60
	PPP1R3E	1.63E-04	1.59

	OGT	1.17E-03	1.59
	FUSIP1	1.38E-04	1.59
	HBP1	5.21E-04	1.58
	WDR44	1.89E-04	1.58
	PCK2	1.28E-05	1.58
	PSAT1	1.66E-06	1.58
	ZNF614	9.77E-04	1.58
	LPIN1	3.31E-05	1.58
	PRO2266	9.23E-05	1.58
	REV3L	2.80E-04	1.58
	CCND1	1.85E-05	1.58
	FNBP1	7.88E-05	1.58
	TCERG1	7.02E-05	1.58
	IRAK1BP1	1.83E-03	1.58
	RGS3	5.54E-04	1.58
	WRN	3.30E-04	1.57
	JMJD2C	1.03E-03	1.57
	DSCR3	4.83E-04	1.57
	INSIG1	1.16E-03	1.57
	ICAM1	4.86E-05	1.57
	TTC32	7.34E-05	1.57
	LRIG2	2.26E-04	1.57
	BI523298	7.34E-05	1.57
	TBK1	1.12E-03	1.57
	ARL6IP6	1.16E-03	1.56
	TMC8	9.89E-04	1.56
	DNAJC1	1.63E-04	1.56
	CALML4	6.70E-05	1.56
	STCH	4.23E-04	1.56
	EIF1B	1.44E-03	1.56
	GNG7	7.53E-04	1.56
	ZCCHC8	1.13E-04	1.56
	ABCA6	1.33E-03	1.56
	HSUP1	1.94E-04	1.56
	RAB39B	4.71E-04	1.55
	RBBP6	1.48E-04	1.55
	PLEK	2.49E-04	1.54
	HNRPDL	1.15E-04	1.54
	ARHGAP21	1.72E-03	1.54
	IFRD1	3.56E-04	1.54
	PPP3CB	5.17E-04	1.54
	SKIP	4.87E-04	1.54
	SNORD22	3.74E-04	1.54

	USP52	1.49E-03	1.54
	SREBF2	8.30E-05	1.54
	TMEM154	1.62E-03	1.54
	JMJD1C	1.61E-03	1.53
	PCGF3	1.60E-03	1.53
	DEXI	6.84E-04	1.53
	SPRED1	3.42E-04	1.53
	ING2	4.52E-04	1.53
	NEF3	7.01E-04	1.53
	AUH	1.57E-05	1.53
	KLF15	3.51E-04	1.53
	HACE1	3.44E-04	1.52
	NDFIP2	1.66E-04	1.52
	PRKRIR	1.20E-04	1.52
	PHF21B	2.14E-06	1.52
	RFXAP	4.28E-05	1.52
	SH2B3	1.44E-04	1.52
	ZMYM5	9.08E-04	1.52
	ZNF518	2.88E-04	1.51
	RNF14	1.08E-04	1.51
	BCL2L2	1.09E-05	1.51
	MGEA5	3.93E-04	1.51
	GOLGA1	2.15E-03	1.51
	FAM122A	1.04E-04	1.51
	HNRPR	4.55E-04	1.51
	KNS2	1.34E-03	1.51
	DBNDD2	4.01E-04	1.51
	ABI1	3.39E-04	1.51
	SFT2D3	3.14E-04	1.50
	MLLT10	7.85E-04	1.50
	PJA1	8.07E-06	1.50
	CLCN6	1.86E-05	1.50

Supplementary File 1: Differentially expressed genes between VP-16 treated cells and controls. Reported genes presented at least a 1.5 fold-change between the two cell treatments (FDR corrected *p* value).

Anexo IV

Gene Symbol	p value (FDR Adjusted)	Fold-Change: Up-regulated in NaB treated cells	Gene Symbol	p-value (FDR Adjusted)	Fold-Change: Up-regulated in Controls
BHLHB3	1.04E-04	5.86	FOS	2.15E-10	36.45
CXCL9	3.03E-04	4.10	CD69	2.16E-11	18.01
SEMA3D	1.19E-03	3.30	RGS1	3.49E-14	15.27
HSPA2	3.57E-04	3.25	EGR1	2.14E-06	10.02
RPP25	1.48E-03	3.23	AMY1C	3.58E-05	5.97
KBTBD7	2.22E-03	3.11	JUN	8.38E-06	5.70
CSN2	7.54E-04	2.87	SLC2A3P1	4.92E-05	5.32
S100A10	3.56E-04	2.83	ATF3	2.84E-08	4.53
SOCS1	7.87E-05	2.77	SLC7A11	4.11E-10	4.46
RGS9BP	6.98E-05	2.75	ZNF674	1.52E-03	4.23
CYB5A	2.28E-06	2.69	CXCL11	1.29E-08	4.19
ZNF526	2.52E-05	2.64	PHACTR1	5.80E-06	3.91
NRGN	4.90E-05	2.53	ACCN3	1.07E-03	3.88
ANKRD34	1.54E-03	2.45	SLC15A2	2.84E-03	3.84
HSPA1A	1.07E-04	2.44	NR4A1	2.70E-05	3.77
SQRDL	5.53E-06	2.29	CCL18	4.46E-07	3.75
SHRM	5.00E-04	2.29	PPP1R15A	5.30E-08	3.68
SNAI3	8.01E-05	2.28	KLF6	1.64E-07	3.58
MT1G	1.09E-05	2.24	DUSP10	1.72E-04	3.58
ZC3H10	3.79E-05	2.19	HYAL4	1.73E-06	3.53
MT2A	8.31E-05	2.16	SGK	1.50E-03	3.48
BMP7	6.89E-04	2.14	FKBP14	9.67E-06	3.33
CCNF	2.56E-03	2.13	CCDC62	1.38E-03	3.24
Z18824	4.03E-04	2.12	OTOP3	9.47E-04	3.19
MT1L	2.13E-06	2.09	CEP135	3.11E-08	3.17
MT1E	6.79E-06	2.08	CCNL1	7.69E-08	3.15
NCKAP1L	1.38E-03	2.08	MMP7	6.79E-11	3.07
MT1B	6.33E-06	2.06	ARID4B	1.22E-04	3.07
ROR2	1.95E-04	2.05	GOLGA8A	3.39E-04	3.07
MT1X	1.91E-05	2.04	SLC35D2	1.88E-07	3.07
ZSWIM3	2.27E-04	2.01	PRO2964	5.48E-05	3.03
LRRC20	2.58E-04	1.99	ADAM28	5.94E-04	3.02
PARS2	3.42E-04	1.98	SFRS12	1.13E-10	3.01
NLC1-C	1.58E-03	1.97	GOLGA8B	6.84E-06	3.00
DERL3	7.35E-05	1.95	CDC14C	2.00E-03	2.92
CERK	3.04E-05	1.95	PKD2L1	2.82E-06	2.89
ZNF572	1.05E-03	1.94	CTAGEP	1.01E-05	2.84
G6PD	9.31E-04	1.94	NKTR	1.36E-09	2.83
MMACHC	5.90E-07	1.93	ROCK2	6.83E-05	2.82
RANGAP1	7.94E-04	1.90	FGF18	1.03E-08	2.81

MRPL4	1.25E-03	1.90	COL4A3BP	6.44E-04	2.81
SMPDL3B	3.84E-05	1.89	CTAGE1	1.92E-04	2.81
CD97	5.16E-05	1.89	GRM8	1.29E-03	2.79
CV323793	1.16E-04	1.89	CTAGE3	1.94E-03	2.79
MMP15	1.61E-03	1.89	CTAGE6	8.44E-05	2.78
TRAP1	3.72E-05	1.88	BACH1	2.54E-07	2.75
KIF20A	3.84E-04	1.87	ATF5	4.92E-04	2.72
DPAGT1	1.23E-03	1.86	GPR18	2.66E-06	2.71
PSRC1	2.46E-03	1.86	WASL	1.68E-05	2.70
ZNF555	1.65E-03	1.85	FAM90A1	9.62E-06	2.68
PFN4	1.29E-03	1.83	CTAGE5	2.03E-09	2.68
TMEM81	1.21E-03	1.82	REV3L	6.09E-06	2.67
CRLF1	1.97E-03	1.82	CEP290	8.45E-06	2.66
ASMTL	5.97E-08	1.82	RSHL3	1.47E-05	2.65
LAYN	2.22E-03	1.82	IL7	1.10E-05	2.64
PDXK	1.05E-06	1.81	DDIT3	7.33E-07	2.63
CALR	2.07E-03	1.81	KLRA1	1.16E-04	2.61
HIFX	8.66E-04	1.81	NFKBIZ	1.17E-06	2.60
ARSB	2.69E-04	1.80	NKX6-3	5.74E-04	2.60
PTAFR	3.51E-05	1.79	ZNF367	1.61E-03	2.59
CHST2	2.20E-07	1.79	SEMA5B	5.95E-05	2.57
HYOU1	1.10E-04	1.78	DUSP1	8.64E-06	2.56
IL10	1.94E-06	1.78	ZNF588	2.97E-04	2.55
FAM27E2	3.30E-05	1.77	CEP152	4.56E-07	2.55
TUBB6	1.03E-03	1.77	CCPG1	7.38E-07	2.54
KIF22	6.91E-04	1.76	ACTA1	3.40E-04	2.52
PYCARD	2.08E-04	1.75	CCL3L3	1.47E-08	2.51
PIP5K2B	1.99E-05	1.75	N4BP2	1.28E-03	2.51
OAS1	9.29E-05	1.75	BRCA2	1.29E-04	2.50
ANKRD25	2.16E-03	1.75	KLHL24	1.19E-07	2.48
SLC25A11	2.12E-04	1.75	CDC14A	1.22E-04	2.47
HRAS	6.25E-04	1.75	CSAD	2.40E-04	2.46
HPCAL1	1.72E-03	1.75	TMEM88	1.25E-03	2.45
HEY1	2.73E-04	1.74	CTAGE4	9.72E-08	2.45
TSPO	9.65E-06	1.74	CCL3	1.68E-08	2.44
ZNF202	5.91E-04	1.73	DFNB59	8.49E-04	2.43
SLC13A1	3.05E-03	1.73	SEC31L2	9.33E-04	2.42
CHST4	9.94E-04	1.73	LCOR	2.39E-04	2.42
DNMT1	1.60E-05	1.73	PLGLB2	2.58E-03	2.42
ZNF232	2.09E-05	1.72	JMJD1C	5.07E-05	2.41
ACOT7	2.68E-03	1.72	ST8SIA4	1.20E-03	2.40
IL1R2	1.89E-03	1.71	CCDC82	2.77E-06	2.39
WDR77	7.88E-04	1.71	CTH	1.75E-05	2.39

CD33	3.00E-03	1.71	SBEM	4.66E-04	2.38
CCDC69	2.18E-03	1.71	TNFAIP3	1.14E-06	2.38
MAT1A	5.61E-05	1.70	SLC26A11	1.84E-03	2.38
ARRB2	2.98E-03	1.70	RASGEF1B	1.63E-03	2.38
FCRL3	8.74E-06	1.70	TCF8	2.57E-04	2.36
CSRPI	2.63E-03	1.70	TRPV1	1.81E-03	2.34
ARL4D	2.94E-04	1.70	SNORA70	3.06E-05	2.34
LMAN2L	1.93E-04	1.69	SPON2	2.22E-07	2.33
SNX17	3.81E-04	1.69	RICTOR	2.55E-05	2.33
PRRT3	1.75E-04	1.69	CCNT2	1.26E-03	2.32
HEG1	1.04E-03	1.69	DEADC1	5.44E-04	2.32
RAB8A	5.38E-04	1.69	PHLDA2	2.81E-03	2.32
NKG7	3.13E-04	1.69	MAP4K3	9.74E-06	2.30
QPRT	9.54E-04	1.68	TncRNA	1.41E-03	2.30
UGT2B17	6.05E-05	1.68	RAB6B	2.20E-03	2.30
TBRG4	1.01E-04	1.68	GUCA1B	3.44E-04	2.29
DHX37	2.34E-03	1.68	BRIP1	5.07E-04	2.28
LCMT2	8.65E-06	1.68	DST	2.10E-04	2.28
DDIT4	4.27E-05	1.67	DMTF1	1.64E-06	2.27
SNX8	1.09E-03	1.67	RUFY2	2.02E-04	2.26
B4GALNT1	3.80E-04	1.66	RFX3	8.01E-06	2.26
GSR	2.06E-03	1.66	DOC2A	2.07E-04	2.25
GLUL	2.90E-06	1.65	TUBE1	1.39E-05	2.24
VPREB3	2.65E-04	1.65	TPR	7.18E-06	2.24
JMJD4	2.64E-04	1.65	ZNF354B	1.92E-04	2.23
NIT1	3.85E-04	1.64	AKAP9	5.48E-06	2.23
FZD2	6.61E-04	1.64	ZDHHC17	1.06E-04	2.23
PPAN	2.63E-04	1.64	ZNF721	5.23E-04	2.23
NQO2	2.05E-03	1.64	TTC25	4.94E-04	2.22
ENDOG	1.01E-03	1.64	CIR	2.34E-03	2.22
EARS2	4.21E-05	1.64	FAS	5.76E-05	2.21
GAMT	3.53E-04	1.63	ZNF711	3.49E-05	2.21
TIGD5	6.73E-04	1.63	TBX15	1.53E-03	2.21
PTK9L	1.60E-05	1.62	CD274	1.23E-04	2.20
MYBBP1A	1.86E-04	1.62	TROVE2	9.29E-07	2.20
PREB	5.21E-04	1.62	UACA	3.96E-07	2.19
ARF3	1.05E-03	1.62	BAZ2B	3.19E-05	2.19
NCR3	6.67E-04	1.62	CHM	3.26E-05	2.19
PTOV1	2.77E-03	1.61	LPIN1	1.79E-06	2.19
KCNN3	1.10E-03	1.61	TSGA2	2.50E-04	2.19
ARMC7	3.94E-04	1.61	ATRX	2.22E-04	2.18
PLK1	1.48E-03	1.61	CHD1	1.14E-04	2.17
NQO1	2.69E-03	1.61	ZC3H6	2.70E-04	2.16

TCTA	1.25E-04	1.61	CHFR	9.68E-05	2.16
NOP17	1.67E-03	1.61	GOLGB1	1.05E-04	2.16
EFHD2	1.07E-04	1.61	FUSIP1	9.68E-06	2.15
ZBTB32	9.99E-06	1.61	MTHFD2L	2.90E-08	2.15
PRPF31	6.69E-04	1.60	ZBTB25	4.09E-05	2.14
TUBG1	1.82E-03	1.60	FNDC3A	3.33E-07	2.14
ATOX1	2.83E-03	1.60	WSB1	1.03E-07	2.14
UROS	2.13E-03	1.60	MCMDC1	3.66E-06	2.13
PHF23	1.75E-05	1.60	NARG1L	1.85E-04	2.13
CRELD2	1.39E-03	1.60	PNN	2.11E-06	2.13
SCFD2	2.56E-03	1.60	PRPF4B	1.63E-08	2.12
KHK	5.14E-05	1.60	C1QTNF3	5.54E-04	2.11
ABCF2	2.90E-03	1.59	SUGT1L1	5.74E-04	2.10
IGHM	1.06E-03	1.59	RAD9B	2.70E-03	2.10
POLD2	1.51E-04	1.59	ZNF354A	1.77E-04	2.10
SGTA	3.08E-04	1.59	SERINC1	1.01E-03	2.10
SERPINB6	1.47E-04	1.59	RBM41	3.53E-05	2.10
ACTL8	4.88E-04	1.59	SCYL1BP1	2.10E-04	2.09
ACLY	2.59E-03	1.59	PKD2	1.66E-03	2.09
RHOV	2.99E-03	1.58	PCGF5	9.13E-07	2.08
PEX10	1.41E-03	1.58	LRCH1	2.79E-03	2.07
A4GALT	1.04E-03	1.58	TRPC1	1.15E-03	2.07
WDR46	5.95E-05	1.58	GCA	1.32E-04	2.07
LTBP1	2.51E-05	1.57	GARNL1	5.86E-04	2.06
TEX261	2.60E-03	1.57	STXBP3	1.48E-05	2.06
TLE3	3.63E-04	1.57	DNAJB9	4.12E-07	2.05
AURKB	1.06E-03	1.57	MAP9	1.43E-04	2.05
LMAN2	3.09E-05	1.56	EEA1	1.32E-05	2.04
NOTCH1	1.61E-03	1.56	PRPF39	4.12E-05	2.04
ZNF500	6.31E-04	1.56	SLC30A1	1.76E-04	2.04
BCKDK	2.97E-05	1.56	RGPD5	1.25E-03	2.04
GALE	1.11E-03	1.56	NUDT15	1.03E-08	2.04
MYLIP	1.13E-03	1.55	CCDC55	5.87E-05	2.04
CD247	1.75E-07	1.55	PDCL2	6.57E-04	2.03
PSCD3	2.18E-04	1.55	CEP110	1.21E-05	2.03
CTPS2	1.34E-03	1.55	KLHL3	8.98E-05	2.03
W72450	5.11E-04	1.54	GALNACT-2	7.52E-05	2.03
AP2A2	1.68E-04	1.54	METT5D1	4.83E-04	2.03
ADD1	1.89E-03	1.54	GALNT11	1.32E-03	2.02
ADAM33	3.01E-03	1.54	SLTM	2.32E-05	2.02
SEMA4D	9.82E-04	1.54	TSNAX	2.74E-03	2.02
ABCC1	6.67E-04	1.54	SLC6A13	9.97E-05	2.02
MSN	8.42E-05	1.54	DDX26B	2.12E-04	2.02

CTNBL1	1.89E-04	1.54	RBBP6	1.17E-05	2.01
AAMP	2.71E-03	1.54	LRMP	5.19E-05	2.01
HMGF2	1.68E-03	1.54	UNQ467	1.78E-03	2.01
MAP4	2.72E-03	1.54	PHF3	1.91E-06	2.01
SERTAD3	6.46E-04	1.54	ZNF550	1.23E-03	2.01
PRDX1	2.62E-03	1.53	THAP9	9.48E-04	2.01
GRAP	2.66E-03	1.53	PHIP	7.36E-05	2.00
BLCAP	2.29E-03	1.53	CASP8AP2	1.26E-04	2.00
RNF34	7.18E-05	1.53	TLR10	1.16E-04	2.00
TMEM86B	4.27E-04	1.53	KLK13	2.43E-03	2.00
GMPPB	4.20E-06	1.53	OFD1	3.10E-07	2.00
APEH	5.43E-04	1.52	ANKRD12	6.42E-04	2.00
BTN3A2	1.57E-05	1.52	TRIP11	1.04E-03	2.00
SLC44A4	2.03E-03	1.52	ZNF195	2.72E-04	1.99
MYC	1.30E-03	1.52	VPS13C	6.48E-04	1.99
TSC22D1	2.24E-03	1.52	ELK4	9.84E-04	1.99
GNA12	1.34E-03	1.51	WDR52	3.66E-04	1.99
COPG	4.47E-05	1.51	ING3	4.93E-04	1.99
FCGR2B	5.67E-04	1.51	OGT	1.77E-04	1.99
CSTF2	6.60E-05	1.51	FAM76B	1.78E-06	1.99
RAB7L1	6.97E-04	1.51	BDP1	1.93E-05	1.98
ACTR1A	1.96E-04	1.51	ANKRD26	9.55E-04	1.98
TNS3	4.42E-11	1.51	ZNF146	2.28E-03	1.97
RNPEPL1	2.91E-03	1.51	SCFD1	2.34E-03	1.97
DHX30	3.43E-04	1.50	CP110	3.12E-06	1.96
CHCHD6	2.05E-04	1.50	CENPC1	1.03E-05	1.96
PEX12	1.22E-03	1.50	ZNF582	1.54E-04	1.96
RBM9	3.68E-04	1.50	ZNF673	6.77E-04	1.96
SENP3	7.14E-04	1.50	ZNF121	1.32E-04	1.95
ZNF587	1.46E-03	1.50	FAM44A	8.88E-05	1.95
			COQ10B	4.26E-04	1.95
			RABGGTB	3.33E-05	1.95
			HACE1	3.00E-05	1.95
			ZNF614	1.55E-04	1.95
			PCM1	1.02E-03	1.94
			POLQ	7.94E-06	1.94
			CLOCK	1.48E-05	1.94
			RAB33B	4.31E-04	1.94
			RAD51AP1	4.13E-04	1.94
			VPS13A	2.18E-06	1.94
			SLC38A2	9.95E-06	1.93
			ZC3H8	3.96E-04	1.93
			MLF1IP	6.00E-06	1.92

SENP6	4.04E-06	1.92
MOBKL1A	2.90E-07	1.92
ERO1LB	1.90E-04	1.92
SLC25A27	2.10E-06	1.92
ZBTB1	6.21E-04	1.91
KATNAL1	3.26E-04	1.91
IRAK1BP1	3.46E-04	1.91
ANKRD20A2	2.59E-03	1.91
TMEM161B	1.13E-05	1.90
SNORA24	3.39E-04	1.90
PLK4	3.02E-04	1.90
STIM2	5.30E-04	1.90
YPEL5	2.57E-03	1.90
PLK3	4.54E-05	1.89
ZNF268	1.17E-03	1.89
NFKBIA	4.33E-04	1.89
LRRFIP1	8.31E-05	1.89
JAK2	1.30E-03	1.89
PCSK4	1.29E-03	1.89
DMXL1	1.62E-03	1.88
ERBB2IP	4.50E-04	1.88
NPHP3	5.39E-05	1.88
TFEC	4.69E-05	1.87
ZNF292	6.31E-04	1.87
MDFIC	3.08E-04	1.87
ZNF518	3.24E-05	1.87
MBD5	2.74E-03	1.86
TRPM7	7.30E-04	1.86
RND1	1.29E-04	1.86
DPY19L3	1.22E-04	1.86
CENTB2	1.72E-03	1.86
TMF1	6.01E-04	1.85
SYTL1	4.23E-05	1.85
SLC25A36	7.72E-05	1.84
FNBP4	9.93E-04	1.84
PMS1	4.79E-04	1.84
RNF6	2.25E-05	1.84
TLR6	6.09E-06	1.84
SFRS11	1.34E-03	1.83
ZNF254	4.87E-04	1.83
PLDN	2.98E-05	1.83
RPGR	1.61E-03	1.83
FAM3C	2.57E-06	1.83

PIP5K3	1.61E-03	1.82
STCH	8.82E-05	1.82
SR140	4.76E-04	1.82
PRNP	4.68E-05	1.82
IRF7	3.03E-03	1.82
ZMYM5	1.40E-04	1.82
ABCA6	3.00E-04	1.82
HISPPD1	2.38E-04	1.82
ZNF25	2.92E-03	1.82
RIF1	1.18E-03	1.82
RAB11FIP2	9.51E-04	1.81
CENPJ	1.63E-07	1.81
KNTC1	1.76E-04	1.81
ARL5B	1.43E-04	1.81
CCDC45	2.27E-05	1.81
BNIP2	4.84E-05	1.81
RECQL	6.62E-04	1.80
USP12	1.62E-03	1.80
AKAP11	3.76E-05	1.80
ALS2CR8	2.41E-03	1.80
MKLN1	2.23E-06	1.80
TTC32	1.72E-05	1.80
SRFBP1	2.22E-05	1.80
MAP3K2	5.26E-04	1.79
DNAJC10	1.79E-05	1.79
CD58	1.71E-04	1.79
RSN	3.02E-04	1.79
SMC4	4.39E-04	1.79
ZCCHC11	3.08E-07	1.78
METTL4	2.03E-03	1.78
PTBP2	4.22E-05	1.78
SLK	6.10E-06	1.78
ZNF708	1.95E-03	1.78
SETDB2	1.01E-03	1.78
PCMTD2	4.44E-06	1.78
SMCHD1	2.88E-05	1.78
PPIG	5.10E-05	1.78
BRMS1L	3.93E-05	1.78
YOD1	2.60E-05	1.77
UBXD2	7.52E-04	1.77
SYNE2	3.12E-04	1.77
CENPF	2.61E-07	1.77
LTV1	6.61E-04	1.77

CYP4V2	2.68E-05	1.77
RANBP2	4.05E-06	1.77
TBRG1	1.14E-03	1.76
MTX3	1.56E-04	1.76
TNAP	2.53E-03	1.76
ZCCHC8	3.14E-05	1.75
ZNF83	1.37E-03	1.75
WRN	1.13E-04	1.74
MIA3	7.09E-04	1.74
RASA2	8.41E-04	1.74
UFM1	1.32E-05	1.74
CEP192	1.03E-03	1.73
BBX	2.28E-07	1.73
CDC7	5.06E-05	1.73
BTAF1	2.85E-04	1.73
TMEM87A	6.68E-05	1.73
UBXD4	2.83E-05	1.72
TIAM2	1.73E-06	1.72
GOLGA2L1	1.68E-03	1.72
UBLCP1	1.61E-03	1.72
ACTR10	2.07E-04	1.72
CEBPG	2.02E-04	1.72
CARF	5.08E-07	1.72
CHD9	1.62E-03	1.71
RSF1	1.71E-05	1.71
OTUD3	2.33E-04	1.71
ACADSB	1.10E-04	1.71
AP4E1	6.60E-05	1.71
WHDC1	5.36E-05	1.71
MORC3	1.46E-06	1.71
TXK	3.62E-04	1.71
NCOA7	4.93E-04	1.71
DDX3Y	1.42E-05	1.71
SMARCAD1	2.42E-03	1.71
IER5	3.09E-05	1.71
ANKRD32	4.71E-04	1.70
ZC3H7A	4.29E-04	1.70
OSBPL8	2.60E-03	1.70
FNDC6	1.42E-03	1.70
RCBTB2	6.89E-04	1.70
TBK1	4.95E-04	1.70
ATP11B	7.08E-04	1.69
ZNF548	2.02E-04	1.69

SMC3	9.73E-04	1.69
MAP7	1.39E-04	1.69
BMI1	6.71E-05	1.69
BRCA1	1.40E-05	1.69
RNF103	1.48E-05	1.69
WBP4	3.22E-04	1.69
TTN	1.98E-03	1.68
SHOC2	1.25E-03	1.68
STRN3	4.63E-04	1.68
C1S	2.36E-03	1.68
BAIAP2L2	3.03E-03	1.68
PPP1R12A	2.74E-03	1.68
<i>ZZZ3</i>	2.22E-05	1.68
LRRC8C	7.66E-04	1.68
TARBP1	2.38E-04	1.68
RCOR3	5.70E-06	1.68
SC5DL	4.29E-05	1.68
CASD1	1.33E-03	1.68
THRAP2	4.10E-04	1.68
MAMDC4	1.47E-03	1.68
DFNA5	4.06E-07	1.67
ZNF33B	9.48E-05	1.67
SMC6	1.18E-04	1.67
MAP1D	3.67E-04	1.66
ADHFE1	1.34E-03	1.66
COG6	8.69E-04	1.66
DDX59	4.85E-05	1.66
LHFP	1.61E-03	1.66
ZNF267	1.55E-03	1.66
EID3	1.17E-03	1.66
HIAT1	1.95E-05	1.66
ATXN7	3.55E-04	1.66
MDM4	3.30E-06	1.65
ZNF718	6.00E-04	1.65
ICAIL	1.62E-03	1.65
HEMGN	1.71E-04	1.65
DNAJA5	2.60E-04	1.65
JMY	5.58E-04	1.64
SMC2	2.68E-03	1.64
CENPQ	2.27E-03	1.64
RAB3GAP2	3.64E-04	1.64
IPMK	1.79E-03	1.64
GLIPR1	5.91E-05	1.64

CCDC52	1.27E-04	1.63
YEATS4	4.89E-04	1.63
GOLGA1	9.33E-04	1.63
ASNSD1	1.56E-06	1.63
USP16	8.38E-05	1.63
ATM	1.22E-03	1.63
IFRD1	1.90E-04	1.63
TMEM30A	3.00E-04	1.63
IMMP2L	2.21E-03	1.63
VEGF	2.32E-05	1.62
SLC41A2	1.59E-06	1.62
GTF2IRD2	2.35E-03	1.62
MFN1	5.01E-06	1.62
HERC4	3.66E-05	1.62
TMEM123	2.27E-04	1.62
OTOA	2.87E-03	1.62
ZNF429	2.08E-03	1.62
NFXL1	2.11E-03	1.61
CMAH	7.38E-09	1.61
CTBP2	1.54E-04	1.61
CD55	4.62E-06	1.61
IFT74	2.09E-06	1.61
IFNGR1	4.05E-04	1.61
DBF4	1.35E-04	1.61
TMEM77	1.30E-04	1.60
ETAA16	9.27E-05	1.60
ARL6IP6	9.07E-04	1.60
AZI2	6.93E-05	1.60
BANK1	2.42E-05	1.60
MLSTD2	1.15E-04	1.60
PCGF6	4.10E-06	1.60
PAG1	1.41E-04	1.59
DEK	8.77E-05	1.59
ZNF277	1.31E-04	1.59
PRO2852	5.89E-05	1.59
SLC25A4	2.65E-04	1.59
ALS2	1.24E-03	1.59
NT5C3	5.09E-06	1.59
PFAAP5	2.27E-04	1.59
RPS6KB1	6.53E-05	1.59
PEX3	1.34E-03	1.58
PRPF38B	9.70E-05	1.58
EZH1	2.35E-03	1.58

MGEA5	2.25E-04	1.58
ZNF650	3.51E-04	1.58
TOR1AIP1	7.77E-04	1.58
SLC25A32	1.82E-06	1.58
RBBP8	1.06E-03	1.58
BRWD1	7.51E-04	1.58
ZMYM6	2.65E-03	1.58
RAB11FIP1	1.12E-03	1.58
SNORD22	2.86E-04	1.57
RRN3	8.65E-07	1.57
ALG11	2.37E-03	1.57
DDX21	7.20E-06	1.57
BCLAF1	1.69E-04	1.57
TAF9	2.50E-04	1.57
CCDC111	5.31E-04	1.57
MON2	3.31E-04	1.57
COL24A1	1.33E-03	1.57
ARHGAP21	1.43E-03	1.57
MTMR6	6.00E-04	1.57
KTN1	1.21E-04	1.57
CTBS	7.73E-05	1.56
CCDC41	3.56E-04	1.56
ZRANB2	2.08E-04	1.56
GNL3	1.83E-04	1.56
IMPA1	4.25E-05	1.56
ZNF639	6.10E-06	1.56
NAPG	2.61E-03	1.56
PRPF18	1.92E-03	1.56
WDR60	2.94E-05	1.56
CCNJ	9.82E-04	1.56
STAG2	2.67E-04	1.56
RAB3IP	2.40E-04	1.56
EPB41L5	1.98E-03	1.55
RBM39	9.43E-06	1.55
FANCL	1.95E-04	1.55
TMEM29	1.50E-05	1.55
SLAMF7	6.14E-04	1.55
GOLT1B	6.38E-06	1.55
RAB18	8.34E-05	1.55
BIRC2	1.62E-04	1.55
EFHA1	1.24E-04	1.55
RAB8B	2.82E-03	1.55
UPF3B	2.48E-05	1.55

NUPL1	3.02E-05	1.55
TRAPPC6B	2.58E-03	1.55
MATR3	7.50E-04	1.54
SRP19	1.81E-04	1.54
BNIP3L	1.16E-04	1.54
NFE2L2	5.38E-06	1.54
HIVEP1	7.25E-05	1.54
SIRT1	2.97E-03	1.54
CYLD	6.20E-05	1.54
ARMCX5	3.83E-04	1.54
CCDC98	2.21E-04	1.54
HIF1A	2.23E-06	1.54
SPRED1	3.25E-04	1.54
TTC17	2.72E-03	1.54
ASPM	4.99E-05	1.54
NPIP	1.74E-03	1.53
CSPP1	5.69E-04	1.53
ABI1	2.73E-04	1.53
PDIK1L	1.03E-04	1.53
CENPH	1.17E-07	1.53
NUCB2	2.48E-04	1.53
SMG1	8.07E-04	1.53
CASC4	2.43E-03	1.53
NOL3	5.90E-05	1.53
PHCA	1.76E-03	1.53
GKAP1	1.25E-04	1.53
ZNFN1A5	2.85E-05	1.52
FAM29A	3.43E-05	1.52
RNF139	8.29E-05	1.52
PREI3	1.68E-04	1.52
CLIC4	2.73E-04	1.52
YRDC	1.15E-04	1.52
PSIP1	5.32E-04	1.52
DENND4C	1.93E-04	1.52
GBE1	1.21E-03	1.52
PPWD1	2.70E-03	1.52
PRO2266	1.51E-04	1.52
AHI1	6.83E-05	1.52
TBC1D15	2.13E-03	1.52
RFXAP	4.31E-05	1.52
LARP7	3.73E-04	1.52
CCAR1	2.53E-04	1.52
TMEM67	1.82E-04	1.52

IDI1	3.12E-06	1.51
PJA2	2.36E-05	1.51
MCFP	1.69E-04	1.51
PRMT3	1.67E-04	1.51
DLG1	4.01E-04	1.51
RASGRP3	5.27E-06	1.51
CHPF	1.78E-03	1.51
LIPT1	1.10E-04	1.50
SAMSN1	5.41E-04	1.50
APPL	1.30E-03	1.50
LY75	2.34E-03	1.50
ATXN3	5.08E-04	1.50
IBTK	1.40E-04	1.50
NFAT5	2.43E-04	1.50

Supplementary File 2: Differentially expressed genes between NaB treated cells and controls. Reported genes presented at least a 1.5 fold-change between the two cell treatments (FDR corrected *p* value).

Anexo V

Gene Symbol	p value (FDR Adjusted)	FoldChange: Up-regulated in VP-16 NaB treated cells	Gene Symbol	p value (FDR Adjusted)	FoldChange: Up-regulated in Control
TEX13B	2.88E-06	21.10	FOS	2.26E-10	29.81
EPB41L1	5.32E-07	19.52	EGR1	1.53E-06	16.91
CCL23	2.12E-05	19.13	CD69	2.52E-11	13.58
PECAM1	2.98E-03	16.83	NUDT15	9.84E-11	11.83
SMAD1	1.90E-03	13.74	PHLDA2	1.37E-04	11.32
LGALS2	1.01E-05	12.55	NDRG3	1.13E-04	8.96
SIGLECP3	5.75E-07	9.58	RGS1	5.55E-14	8.46
VCX3A	4.90E-04	8.21	TUBE1	4.27E-07	8.13
FHOD3	2.13E-06	7.95	C1S	1.32E-05	7.97
VPREB1	2.36E-03	7.75	ATF3	1.17E-08	7.82
IL3RA	8.29E-04	7.61	PHACTR1	1.86E-06	7.41
APOB48R	6.15E-10	6.71	NFKBIZ	8.48E-08	7.29
SPOCK1	2.04E-06	6.59	PIGW	8.75E-08	7.01
PLA2G1B	1.38E-03	6.57	DHRS2	3.73E-03	6.99
CXCL9	5.49E-06	6.43	TBCCD1	1.33E-03	6.90
TIMD4	3.67E-03	6.31	UNQ6488	5.21E-04	6.39
CAPSL	2.51E-05	6.01	JUN	7.18E-06	6.32
SHRM	1.05E-07	5.06	ZNF28	1.18E-05	5.91
RPP25	3.06E-05	4.97	CCL18	1.73E-07	5.83
HSPA2	6.67E-06	4.92	TAF11	1.75E-05	5.75
IL7R	1.21E-03	4.87	PRO2964	1.29E-05	5.47
TXNL6	1.13E-04	4.84	GTF2IRD2	1.47E-05	5.37
GIPC2	8.42E-06	4.76	SBEM	4.60E-05	5.32
RASGEF1A	8.02E-04	4.70	SEMA5B	7.97E-06	5.11
ELOVL4	3.49E-04	4.65	ATF5	1.03E-04	4.88
GAL3ST3	1.21E-03	4.59	PPID	1.88E-04	4.87
CCDC37	1.15E-03	4.54	ZNF208	4.73E-04	4.86
MALL	1.95E-04	4.51	CXCL11	9.67E-09	4.76
BHLHB3	1.02E-03	4.45	SLC7A11	3.60E-10	4.74
C3AR1	6.75E-04	4.25	CYFIP1	4.72E-04	4.74
ACCN4	4.04E-03	4.09	MOAP1	1.30E-03	4.68
S100A10	1.00E-05	4.03	SLC23A1	5.78E-04	4.61
HBD	1.43E-03	4.02	THAP9	4.68E-05	4.59
KCNJ1	1.22E-05	3.94	TNAP	5.07E-05	4.55
PPP3R1	7.23E-04	3.91	SUMF2	2.44E-04	4.47
RGS9BP	1.96E-06	3.84	FGF18	2.38E-09	4.45
PLEKHN1	5.02E-04	3.83	STIL	6.90E-06	4.41
RNU12	8.32E-04	3.81	ELK4	5.09E-05	4.36
GPD2	3.77E-04	3.78	PPP1R15A	3.58E-08	4.27
PRSSL1	4.07E-03	3.75	FFAR1	5.35E-04	4.23

ChGn	8.59E-05	3.71	NCOA2	4.72E-03	4.21
TMEM100	4.14E-04	3.71	FKBP14	5.17E-06	4.18
RTDR1	5.09E-03	3.69	TMEM34	6.35E-07	4.17
REG4	1.06E-07	3.65	INHBE	7.72E-06	4.15
LPO	3.81E-03	3.61	CTH	2.41E-06	4.11
TNNI3	1.96E-03	3.53	AMY1C	7.15E-05	4.10
CYB5A	1.09E-07	3.50	RFX3	8.09E-07	4.07
DAB2IP	2.10E-05	3.47	KLF6	1.20E-07	4.01
RNASE6	1.45E-03	3.44	SFRS12	4.61E-11	3.96
SMARCD3	3.83E-05	3.43	KLK13	1.89E-04	3.94
KBTBD7	9.45E-04	3.43	CTAGE6	2.85E-05	3.91
GALK1	6.31E-04	3.40	ZNF595	2.10E-03	3.91
VMD2L1	6.08E-04	3.22	SLC6A9	1.73E-04	3.88
NCR3	5.80E-08	3.19	DUSP1	2.00E-06	3.85
APOC1	2.93E-03	3.15	DDIT3	1.94E-07	3.78
SV2C	1.06E-05	3.13	BTNL2	4.14E-03	3.74
SQRDL	1.31E-07	3.11	ZNF711	4.05E-06	3.73
ANKRD25	2.00E-06	3.04	ZNF676	8.12E-04	3.70
ADAMTS16	5.26E-03	3.04	FAM90A1	3.07E-06	3.69
CAMK2B	3.36E-03	3.04	TRPM1	1.39E-03	3.66
SMPDL3B	7.99E-08	3.01	SLC14A1	4.32E-03	3.61
LRRC20	1.57E-06	3.00	CTAGEP	4.62E-06	3.56
F10881	2.87E-03	3.00	SLC2A3P1	1.16E-04	3.56
CD33	2.37E-06	2.99	ZNF43	1.94E-03	3.52
CLCA2	1.11E-03	2.98	OTOP3	7.50E-04	3.48
NEUROG3	1.70E-03	2.97	XPOT	2.20E-06	3.48
HSPA6	1.45E-04	2.95	SULF2	7.69E-04	3.46
B3GNT5	7.89E-05	2.95	HYAL4	1.88E-06	3.44
LPA	5.19E-04	2.94	TLR10	9.52E-06	3.42
ZNF572	7.60E-06	2.91	SMA4	2.37E-03	3.40
ZNF521	3.30E-03	2.90	THRAP2	7.89E-06	3.38
QPRT	6.01E-07	2.90	SC4MOL	4.15E-06	3.36
TP53INP1	1.73E-04	2.90	PRO2852	5.02E-07	3.35
ICAM3	4.14E-03	2.88	SLC38A2	5.90E-07	3.33
NKG7	2.12E-07	2.84	TNKS1BP1	6.24E-04	3.32
NRGN	1.38E-05	2.83	SNAPC3	2.40E-06	3.31
HEY1	3.87E-07	2.81	PKD2L1	1.71E-06	3.31
SNAI3	6.82E-06	2.80	TRIM16	9.46E-04	3.31
BMP7	3.26E-05	2.78	ORM2	2.46E-04	3.29
HRC	2.06E-06	2.78	ZNF367	7.37E-04	3.29
TCL1A	1.81E-04	2.76	TncRNA	3.77E-04	3.28
JSRP1	6.02E-04	2.76	ZFP2	2.44E-03	3.27
AURKA	5.27E-04	2.72	UBXD4	6.44E-07	3.27

CCRN4L	9.92E-06	2.72	CCNT2	3.55E-04	3.27
CHEK2	2.37E-06	2.71	LAYN	5.60E-03	3.24
JARID1B	4.40E-03	2.70	GOLGA8B	5.42E-06	3.21
TNFAIP8L2	2.25E-03	2.69	EIF2S3	1.47E-05	3.20
SAG	1.09E-04	2.68	GUCA1B	8.92E-05	3.19
SLC17A4	5.54E-04	2.66	CD46	5.32E-05	3.17
ZNF555	1.90E-05	2.65	ST8SIA4	4.42E-04	3.14
NKD1	3.47E-03	2.64	CCNL1	7.78E-08	3.14
ZBTB32	4.49E-09	2.64	MAP4K3	2.44E-06	3.13
SERPINB6	7.45E-08	2.62	SEC63D1	2.62E-03	3.13
CHST4	3.64E-06	2.62	STAG1	1.56E-04	3.12
ASB2	2.71E-03	2.62	GALNACT 2	9.36E-06	3.08
CA11	9.94E-05	2.61	SLC15A2	4.83E-03	3.06
SNTA1	9.56E-04	2.60	CTAGE1	1.43E-04	3.05
GALE	5.67E-07	2.60	ZNF678	1.40E-03	3.05
ANKRD34	8.61E-04	2.59	SNAP23	3.29E-04	3.03
GTPBP5	5.03E-03	2.59	DOC2A	5.82E-05	3.01
WNT11	1.37E-04	2.59	CDC14A	5.42E-05	3.00
GPR92	1.70E-03	2.58	ZNF141	7.84E-04	2.99
CRIL	6.22E-04	2.56	RNF32	5.16E-03	2.99
CD59	3.51E-03	2.55	ZNF66	6.31E-04	2.97
CRLF1	2.71E-05	2.55	TMEM30A	6.23E-06	2.96
NCKAP1L	1.29E-04	2.54	SGK	2.34E-03	2.96
CAST1	3.37E-05	2.53	CLOCK	1.44E-06	2.95
GBA	4.58E-04	2.53	ATF1	3.33E-04	2.95
ZBED2	4.46E-05	2.53	ZNF91	4.49E-04	2.94
ZNF526	4.44E-05	2.52	ZNF10	2.07E-03	2.93
SPBC24	2.98E-04	2.51	ZNF709	2.85E-03	2.89
MT1G	2.58E-06	2.50	ORM1	5.27E-03	2.88
TNFSF12	1.36E-04	2.49	SLC1A7	3.87E-04	2.87
DHRS1	3.75E-05	2.49	ZNF85	1.05E-03	2.87
OAS1	5.83E-07	2.48	TAS2R43	2.63E-03	2.86
UBD	1.09E-03	2.47	ZNF596	2.54E-03	2.86
GGTLA4	2.30E-03	2.46	MMP7	9.03E-11	2.86
DSCR1L2	2.01E-03	2.46	CENPH	7.94E-10	2.85
GSDMDC1	7.95E-04	2.45	SNORA70	1.22E-05	2.85
CYHR1	1.97E-03	2.44	DNAJB9	6.68E-08	2.84
ITGB5	8.93E-04	2.44	COQ10B	6.09E-05	2.83
DOK4	1.32E-04	2.44	RAXL1	4.93E-03	2.83
MLYCD	1.10E-04	2.43	CROT	3.92E-03	2.80
DTX3	2.95E-04	2.43	GOLGA8A	4.67E-04	2.79
RGC32	3.64E-04	2.43	ZNF675	8.44E-05	2.79
WWC1	6.73E-05	2.42	KCTD18	2.22E-04	2.79

DBNL	1.10E-03	2.42	ZNF714	7.23E-04	2.78
ABHD1	4.38E-03	2.41	UGDH	1.48E-05	2.77
MPP5	2.95E-06	2.41	SERPINA3	3.06E-03	2.77
IDH2	5.16E-05	2.39	ZNF117	1.67E-03	2.76
ARMC7	1.07E-06	2.38	RSHL3	1.24E-05	2.75
IL1R2	2.14E-05	2.38	ZNF493	3.66E-04	2.73
TMEPAI	3.02E-03	2.37	ADAM9	5.78E-04	2.72
SERHL2	3.03E-03	2.37	NEK7	2.82E-03	2.70
CCND3	2.84E-04	2.36	TBX15	6.47E-04	2.69
CTSL	1.63E-03	2.36	RAG1AP1	8.61E-04	2.69
OR10H1	3.11E-03	2.35	FAS	2.19E-05	2.68
AAK1	1.87E-03	2.34	TNFAIP3	6.34E-07	2.67
ANG	2.58E-07	2.34	CTAGE5	2.05E-09	2.67
PROKR2	1.79E-03	2.34	VEGF	5.88E-07	2.67
ENAH	1.35E-04	2.34	BCL7A	4.79E-05	2.67
MT1E	1.35E-06	2.33	ZNF267	7.81E-05	2.66
CCDC24	1.34E-03	2.33	ZNF674	4.89E-03	2.66
CDKL3	1.46E-03	2.32	CDC14C	2.74E-03	2.65
SOCS1	5.74E-04	2.32	CCL3L3	1.13E-08	2.65
MT1B	1.15E-06	2.32	METTL4	2.16E-04	2.65
LSM11	4.03E-03	2.32	EDD1	3.23E-05	2.64
BFSP2	2.99E-04	2.31	ALS2CR8	2.85E-04	2.64
WASF2	3.65E-04	2.30	CEBPG	1.21E-05	2.64
RHOV	1.39E-05	2.30	NFKBIA	6.54E-05	2.63
ACOX3	3.81E-03	2.29	KLRA1	1.13E-04	2.63
APOBEC3B	3.35E-04	2.29	TSGA2	1.01E-04	2.63
TMEM63A	4.56E-04	2.28	CD55	1.08E-07	2.61
TMEM149	1.36E-05	2.28	PNN	6.67E-07	2.60
NLE1	1.46E-04	2.28	AOC3	1.79E-04	2.59
TUBB6	3.30E-05	2.27	RAB6B	1.36E-03	2.59
PEX6	1.02E-04	2.26	DMTF1	8.21E-07	2.58
GNB3	1.89E-03	2.26	LMTK2	4.17E-03	2.57
IQCD	3.15E-03	2.26	ZNF426	3.30E-04	2.57
WDR66	2.14E-06	2.25	UBXD2	7.73E-05	2.57
MT2A	5.43E-05	2.23	SYTL1	5.23E-06	2.56
PAQR8	1.67E-03	2.23	PHC3	2.14E-03	2.56
ASL	1.87E-04	2.23	NKX63	6.11E-04	2.56
TUBD1	9.63E-04	2.22	PLK4	5.38E-05	2.55
CYBASC3	3.96E-03	2.22	UBE2Q2	8.43E-06	2.55
SLC2A4	1.34E-03	2.22	WASL	2.20E-05	2.54
UNC45A	6.28E-05	2.22	AFG3L1	3.45E-05	2.54
SP140	1.96E-03	2.21	DDX59	2.13E-06	2.54
RPS6KA1	7.93E-04	2.21	ZNF430	7.08E-04	2.53

FRAT2	3.04E-06	2.21	RAP2C	9.41E-06	2.52
LCE3A	2.08E-03	2.21	BTBD12	9.41E-05	2.52
HN1	3.05E-05	2.20	ZNF429	1.04E-04	2.52
AICDA	8.12E-05	2.20	CHD1	5.33E-05	2.51
CKB	3.53E-03	2.20	LRRFIP1	1.43E-05	2.50
CCRL1	1.90E-07	2.20	TOR1AIP1	2.69E-05	2.49
PMFBP1	8.58E-04	2.19	MINPP1	2.98E-03	2.49
TRAPPC4	1.49E-03	2.19	CHAC1	2.96E-05	2.49
TMEM121	5.73E-06	2.18	CSAD	2.30E-04	2.48
PRG1	1.96E-06	2.18	C1QTNF3	2.41E-04	2.48
PINK1	1.85E-04	2.18	NR4A1	1.19E-04	2.48
FBXO16	4.34E-04	2.18	ZNF680	8.78E-04	2.48
OBFC2A	2.58E-03	2.18	GALNT11	4.65E-04	2.48
MT1L	1.25E-06	2.17	UBLCP1	1.70E-04	2.45
EIF2B4	2.02E-03	2.17	HIST1H2B D	5.82E-07	2.45
HLXB9	3.70E-05	2.17	WARS	1.08E-06	2.45
SLC6A10P	1.29E-03	2.17	ZNF539	3.83E-04	2.45
ATOX1	3.66E-05	2.16	CCDC78	3.80E-04	2.44
ALDH4A1	4.04E-03	2.16	DBR1	1.33E-03	2.44
PSMD2	4.37E-04	2.16	CCPG1	9.09E-07	2.44
SLC44A1	1.04E-03	2.16	OPTC	2.54E-03	2.44
PYCARD	9.65E-06	2.16	CCL3	1.72E-08	2.43
SNN	1.32E-04	2.16	KDEL1C1	6.75E-04	2.41
ZBP2	1.76E-04	2.15	PLEKHG1	3.06E-07	2.41
FGFRL1	1.04E-03	2.15	SNORD22	9.85E-06	2.41
ABHD8	1.26E-03	2.14	IL7	1.72E-05	2.41
ACAD9	1.44E-03	2.13	LEPR	2.26E-03	2.41
PARS2	1.33E-04	2.13	CCNE2	4.16E-04	2.41
ID3	2.15E-03	2.13	ZNF548	1.64E-05	2.39
ACOT7	1.50E-04	2.12	CTAGE4	1.10E-07	2.39
FAM45A	1.34E-04	2.12	IRF8	6.46E-05	2.38
AMBP	5.18E-04	2.12	MAPK8	9.68E-04	2.38
HSD11B1L	1.76E-03	2.12	SRFBP1	3.03E-06	2.37
ZNF543	6.42E-05	2.12	ZNF681	6.71E-04	2.37
RASSF4	3.78E-03	2.11	KCNRG	4.82E-04	2.36
HPCAL1	1.33E-04	2.11	ZNF578	1.77E-03	2.36
RTP4	4.43E-04	2.10	SS18	4.36E-04	2.36
NSDHL	1.16E-03	2.09	ACCN3	4.76E-03	2.35
GAMT	7.62E-06	2.09	BTA1F1	3.28E-05	2.35
TFDP2	6.94E-07	2.08	CHRN1	4.11E-05	2.35
PIP5K2B	1.29E-06	2.08	LRRC8C	7.41E-05	2.34
TST	8.99E-05	2.08	CCDC82	3.17E-06	2.34
MGMT	4.83E-05	2.08	CRABP2	5.56E-03	2.33

ALAS1	4.68E-03	2.08	SAMSN1	1.32E-05	2.31
TDRD9	3.13E-03	2.07	DW443340	5.05E-03	2.30
TACC3	1.87E-04	2.07	ZNF708	3.86E-04	2.30
CMTM4	7.40E-04	2.07	SLC6A13	4.41E-05	2.30
POLA2	6.81E-04	2.07	SLC30A1	8.80E-05	2.29
CSRPI	1.74E-04	2.07	ZNF140	6.19E-04	2.29
TK1	2.59E-03	2.06	LCOR	3.16E-04	2.29
EGLN2	1.22E-03	2.06	DFNA5	2.91E-08	2.28
SPINK2	7.34E-05	2.06	PRKRIR	3.23E-06	2.28
PJCG6	1.91E-03	2.06	DMPK	3.30E-04	2.27
IAPP	1.69E-03	2.06	THOC1	2.10E-03	2.27
MT1X	1.76E-05	2.06	CLK1	6.12E-04	2.26
MCOLN1	1.13E-04	2.06	NEDD1	3.28E-04	2.26
PLEKHQ1	1.73E-06	2.05	ZNF451	1.46E-03	2.26
SLC22A7	4.58E-03	2.05	GPR18	6.75E-06	2.26
Ells1	1.84E-03	2.05	ZNF529	2.19E-03	2.26
TXNIP	4.65E-03	2.05	LGALS12	2.23E-03	2.25
MFI2	1.09E-05	2.04	SLC12A8	3.86E-03	2.25
TRIM32	1.20E-03	2.04	ARHGAP2 1	8.51E-05	2.25
CLTB	3.16E-03	2.04	ZNF195	1.32E-04	2.24
W74523	2.01E-03	2.04	RAD9B	1.95E-03	2.24
BLR1	4.54E-03	2.03	DNAJB14	5.09E-03	2.24
TSPO	7.75E-07	2.03	CCDC100	5.40E-04	2.24
ELA2A	1.26E-03	2.03	HIAT1	1.62E-06	2.23
PFTK1	8.45E-08	2.03	RAPGEF6	6.64E-05	2.23
RARRES3	6.40E-06	2.03	TCERG1	3.45E-06	2.23
FSD1	2.05E-03	2.02	SLC39A9	2.88E-07	2.22
NUBP2	5.17E-06	2.02	USP12	4.22E-04	2.22
HSPA1A	1.03E-03	2.02	ZNF354A	1.28E-04	2.21
FER	6.54E-05	2.02	SGPP1	5.03E-04	2.20
DOCK6	4.55E-03	2.02	RBM3	4.61E-06	2.20
CCNK	2.43E-03	2.02	SYNJ1	2.41E-03	2.20
PLG	6.08E-05	2.02	TRPV1	2.46E-03	2.19
PRKCH	8.29E-04	2.02	MTHFD2L	2.60E-08	2.19
OGG1	1.31E-03	2.01	DUSP10	1.12E-03	2.18
BIVM	2.75E-04	2.01	MOBKL2A	2.44E-03	2.18
KHK	9.84E-07	2.01	RAD51AP1	2.02E-04	2.17
KCNH2	1.84E-03	2.01	ZNF100	1.96E-04	2.17
CYP4X1	1.16E-03	2.01	SACMIL	5.96E-04	2.16
BPGM	5.33E-03	2.01	PRMT3	5.94E-06	2.16
GPR109B	8.91E-04	2.01	ENDOGL1	2.62E-05	2.16
DEF6	2.52E-03	2.00	MIA3	1.54E-04	2.15
FETUB	3.34E-03	2.00	KLKB1	4.48E-03	2.15

ZNF467	1.72E-03	2.00	LTK	3.92E-03	2.15
SP110	2.93E-06	2.00	RFXAP	1.53E-06	2.14
APOL2	1.22E-05	2.00	NKTR	6.50E-09	2.13
TUBB2C	3.92E-04	2.00	SHOC2	2.22E-04	2.13
PRIC285	5.12E-03	2.00	SLC35D2	1.22E-06	2.12
STRA13	3.18E-03	1.99	PLEK	1.42E-05	2.11
TMEM141	1.27E-03	1.99	ZNF582	9.53E-05	2.11
SOX5	4.87E-04	1.99	SLC35E4	1.24E-03	2.11
MVP	4.85E-03	1.98	CDYL	1.29E-04	2.10
MRPS12	1.71E-03	1.98	ZMYND17	3.25E-04	2.09
PELI3	3.53E-03	1.98	CEBPB	7.17E-06	2.08
CSTA	1.20E-03	1.98	MBD5	1.37E-03	2.08
BLCAP	3.96E-05	1.98	SFRS4	7.58E-06	2.08
MAST2	7.09E-04	1.98	TXK	7.84E-05	2.08
CARD12	4.20E-03	1.97	ZNF83	4.07E-04	2.08
APTX	5.07E-06	1.97	DPY19L3	5.39E-05	2.07
F11R	1.53E-03	1.97	ZNF700	6.06E-04	2.07
MYD88	2.41E-03	1.96	CDK8	1.72E-03	2.06
NUP214	1.17E-03	1.96	POLN	1.90E-03	2.06
PRCP	1.58E-03	1.96	YRDC	5.90E-06	2.06
AP1S1	1.42E-03	1.96	NEIL1	5.36E-03	2.06
GPR114	5.41E-04	1.96	UNQ467	1.55E-03	2.06
ADORA2B	5.90E-07	1.96	VLDLR	4.77E-06	2.06
FCGR2A	3.24E-03	1.95	TARBP1	4.46E-05	2.06
GOSR2	3.16E-03	1.95	RYK	2.10E-04	2.05
SLC2A4RG	3.22E-04	1.95	PNRC2	2.55E-06	2.05
PHF13	1.52E-03	1.95	CEPT1	2.41E-05	2.05
PLCXD2	1.46E-03	1.95	ALS2	1.49E-04	2.05
ZSWIM3	3.48E-04	1.95	MTX3	4.78E-05	2.04
CIB2	5.47E-04	1.95	NFXL1	3.31E-04	2.04
SNX17	4.42E-05	1.95	LRRC23	1.99E-03	2.04
HGF	5.38E-03	1.94	MCMD1	4.95E-06	2.04
UBE2E1	2.32E-05	1.94	SCYL1BP1	2.47E-04	2.04
ZDHHC24	1.57E-03	1.94	WDFY1	1.50E-04	2.03
SYTL2	3.63E-04	1.94	ZBTB25	6.00E-05	2.02
TBC1D2	1.28E-03	1.94	STS1	4.20E-03	2.02
PLEKHF1	7.06E-04	1.94	ZNF25	1.49E-03	2.02
MOV10	4.28E-05	1.94	UFM1	3.60E-06	2.02
MGAT4B	6.32E-04	1.94	TBK1	1.24E-04	2.02
LMAN2L	2.34E-05	1.93	TAPBP	1.01E-03	2.01
HOXA5	2.75E-03	1.93	CHFR	1.54E-04	2.01
GLA	8.46E-04	1.93	MDM4	5.25E-07	2.01
CYP3A7	7.62E-04	1.93	TBRG1	4.49E-04	2.00

MRPL40	1.90E-03	1.93	EFNA1	4.22E-03	2.00
UBTD1	3.48E-03	1.93	YIPF4	2.58E-05	2.00
CRIP1	6.40E-04	1.92	ZNF639	4.82E-07	2.00
UBE2C	7.28E-06	1.92	CD274	2.29E-04	2.00
SURB7	1.44E-04	1.92	UST	1.29E-04	1.99
SLC35A4	4.92E-03	1.92	MATR3	7.28E-05	1.99
DNAJB5	6.40E-05	1.92	HNRPF	1.08E-03	1.99
PREB	3.67E-05	1.91	FAM19A2	8.05E-04	1.99
PARD6A	1.44E-03	1.91	NEDD9	1.01E-03	1.98
DIP2A	3.84E-03	1.91	HIST1H1E	2.24E-05	1.98
AKR7A3	1.71E-05	1.91	RHOT1	1.12E-04	1.98
EVI2A	3.91E-03	1.91	SP4	2.54E-03	1.98
CHST2	7.79E-08	1.90	REV3L	3.43E-05	1.98
ATG4B	3.89E-03	1.90	FUSIP1	1.76E-05	1.98
PLAU	3.20E-03	1.90	TNFRSF8	2.84E-04	1.98
FJX1	1.85E-03	1.90	ATXN7	7.78E-05	1.97
KIF3C	2.34E-03	1.90	SESN2	4.30E-06	1.97
HTF9C	3.12E-03	1.90	EIF2AK3	1.27E-03	1.97
AGPAT6	4.05E-03	1.90	RBM39	8.06E-07	1.97
UBE2L6	2.11E-03	1.89	CCNG1	3.93E-05	1.97
TTL11	9.93E-04	1.89	PBEF1	5.52E-04	1.97
JMJD4	2.94E-05	1.89	CHM	6.70E-05	1.97
H2-ALPHA	9.46E-04	1.89	TMEM87B	1.23E-04	1.96
GSH1	1.43E-03	1.89	SEC31L2	2.77E-03	1.96
RANGAP1	9.17E-04	1.88	GABPA	4.64E-03	1.95
URG4	1.03E-03	1.88	RASA1	3.13E-05	1.95
FOXRED2	3.22E-03	1.88	OGT	2.02E-04	1.95
ATAD3B	1.28E-03	1.87	NEF3	6.81E-05	1.95
FAM26B	2.27E-03	1.87	EBF	1.61E-06	1.95
GLT25D1	4.71E-03	1.87	BACH1	2.01E-06	1.95
ZNF668	2.88E-03	1.87	OTOA	6.54E-04	1.94
HKR2	1.32E-03	1.87	T15787	1.09E-03	1.94
GFOD2	3.35E-04	1.86	RPGR	1.05E-03	1.94
OAS2	1.61E-03	1.86	ACTA1	1.38E-03	1.94
PRDX1	1.18E-04	1.86	PSAT1	1.98E-07	1.94
LY96	2.96E-05	1.86	WSB1	2.14E-07	1.94
YPEL1	8.00E-04	1.86	IFRD1	3.82E-05	1.94
OLFML2A	2.63E-03	1.86	JMJD1C	1.92E-04	1.94
ALDH16A1	1.58E-03	1.86	POLQ	8.19E-06	1.94
HKR3	2.16E-03	1.85	DDX5	5.69E-05	1.94
TRPV2	8.23E-07	1.85	FAM3C	1.56E-06	1.94
HTR7P	8.24E-05	1.84	MAP7	4.24E-05	1.93
CABP1	5.14E-04	1.84	RAB28	1.67E-05	1.93

PSEN2	8.36E-04	1.84	CEP135	4.79E-07	1.93
ATP6V1E1	4.28E-04	1.84	ERO1LB	1.85E-04	1.93
DDR1	2.38E-03	1.84	DNHD1	1.70E-03	1.92
SLC25A11	9.93E-05	1.84	SLTM	3.48E-05	1.92
VWA1	5.99E-04	1.83	FZD7	3.64E-04	1.91
MORC2	2.47E-03	1.83	SFRS11	9.83E-04	1.91
CORO7	1.09E-03	1.83	TFAP4	5.33E-03	1.91
DYNC2H1	2.72E-03	1.83	LONRF1	7.84E-05	1.91
DDX56	2.50E-03	1.83	MFN1	9.40E-07	1.91
NID1	2.34E-06	1.83	AUH	1.38E-06	1.91
CARD11	2.53E-04	1.83	FEM1C	3.29E-05	1.90
LMLN	3.71E-03	1.83	LRP11	1.44E-03	1.90
HEATR3	4.22E-05	1.83	RUFY2	6.01E-04	1.90
AMDHD2	5.28E-03	1.83	SNORA24	3.43E-04	1.90
ATP5G1	1.38E-03	1.83	TMEM67	1.74E-05	1.90
ZYX	3.07E-03	1.83	PJA2	1.99E-06	1.90
PRKCB1	1.95E-03	1.83	BIRC6	4.19E-03	1.89
PIGM	4.74E-03	1.82	PTPRC	1.98E-03	1.89
TIMM8A	2.50E-04	1.82	RBMS2	2.58E-04	1.89
AP1M1	3.63E-03	1.82	GUCY1A3	3.56E-03	1.89
SOX9	2.29E-04	1.82	EID3	3.88E-04	1.89
KCTD1	3.99E-05	1.82	RASGEF1B	5.35E-03	1.89
CD2BP2	2.89E-03	1.82	TMEFF1	1.06E-03	1.89
ZNF423	8.71E-07	1.82	TUBGCP3	3.52E-03	1.89
KCTD21	5.47E-04	1.82	TMED2	4.76E-03	1.89
TUFM	5.06E-03	1.82	MYT2	5.50E-03	1.89
UROD	1.73E-03	1.82	RCOR3	1.85E-06	1.88
FXC1	3.21E-04	1.81	KCTD3	4.64E-03	1.88
SLC5A12	3.95E-03	1.81	PIM1	7.87E-06	1.88
SERTAD2	2.78E-03	1.81	ZCCHC8	1.64E-05	1.88
METTL7A	7.65E-04	1.81	ZNF254	3.92E-04	1.88
MARVELD3	4.96E-03	1.81	RNF6	1.89E-05	1.88
NME3	9.01E-05	1.81	BAGE	8.83E-04	1.87
PTK9L	2.35E-06	1.81	ADAM11	3.51E-04	1.87
NHP2L1	6.26E-04	1.80	FTS	1.07E-03	1.87
ECHS1	3.22E-05	1.80	CHRAC1	8.26E-05	1.87
PARVG	7.58E-04	1.80	BBS5	2.81E-03	1.87
CLUAP1	1.11E-03	1.80	CCDC55	1.13E-04	1.87
NADK	5.14E-03	1.80	KLHL15	1.50E-03	1.86
ZNF695	5.50E-03	1.80	ZDHHC17	3.49E-04	1.86
BIRC5	1.34E-03	1.80	GNPTAB	3.59E-04	1.86
CTSC	3.99E-04	1.80	HIVEP1	9.93E-06	1.86
DGCR6	6.54E-06	1.80	ADAM28	5.50E-03	1.85

DAGLBETA	1.09E-03	1.79	SENP6	5.49E-06	1.85
ZCCHC17	6.54E-04	1.79	ELF1	2.62E-03	1.85
QARS	1.53E-03	1.79	RBM16	9.19E-04	1.85
MAPKAPK3	3.05E-03	1.79	PIP5K3	1.45E-03	1.85
EPPB9	2.04E-03	1.79	TMPO	5.94E-04	1.85
PRRT3	7.02E-05	1.79	LRRC57	1.80E-04	1.85
MYBBP1A	3.62E-05	1.79	MIS12	4.18E-05	1.84
CYP2U1	2.55E-05	1.79	MTL5	7.27E-04	1.84
SNX8	3.96E-04	1.78	AGA	3.18E-05	1.83
TMBIM1	1.72E-03	1.78	ARL16	1.11E-04	1.83
GMFG	7.10E-04	1.78	ARTS1	2.67E-03	1.83
SIN3B	5.56E-03	1.78	MAMDC4	7.08E-04	1.83
PLP2	4.13E-03	1.78	DDX21	1.37E-06	1.83
RBM18	6.88E-05	1.77	RRM2	4.83E-06	1.83
CCS	1.70E-03	1.77	SEC24B	7.53E-05	1.82
DZIP3	2.99E-03	1.77	ASAHI	1.78E-04	1.82
CCNB2	4.12E-03	1.77	ZNF33B	4.07E-05	1.82
PML	5.23E-06	1.77	CCDC94	1.05E-04	1.81
HDGF2	1.60E-04	1.77	BCL2L11	4.12E-04	1.81
BDH2	5.15E-03	1.77	TATDN3	2.57E-03	1.81
ATPBD1B	3.10E-05	1.77	NBPF3	3.01E-04	1.81
BOP1	4.27E-03	1.77	PICALM	2.56E-03	1.81
ARHGEF19	5.15E-04	1.77	ORC6L	1.31E-03	1.81
RAB11FIP4	2.06E-06	1.77	MTIF2	5.55E-06	1.80
ACTA2	7.79E-05	1.77	TARS	8.28E-07	1.80
GGTL4	2.93E-03	1.77	DDEF1	2.08E-03	1.80
CNTNAP4	3.94E-03	1.76	BRMS1L	3.59E-05	1.79
PECI	3.62E-05	1.76	NPHP3	8.08E-05	1.79
POP1	5.73E-04	1.76	FBXL5	8.62E-05	1.79
SEPX1	2.23E-04	1.76	FBXO8	5.56E-04	1.78
OTUD7A	1.12E-03	1.76	CARS	1.04E-03	1.78
HLA-DPB2	6.41E-05	1.76	TIAM2	1.25E-06	1.78
PAK1	1.08E-03	1.75	LRIG2	6.13E-05	1.77
TIGD5	2.02E-04	1.75	ICA1L	8.98E-04	1.77
WDR39	4.77E-04	1.75	NHEJ1	3.87E-03	1.77
GCN1L1	1.19E-03	1.75	SLAMF1	1.18E-10	1.76
TUBGCP2	1.23E-03	1.75	GOLGA2L1	1.38E-03	1.76
CDKL5	2.00E-05	1.75	BCOR	6.43E-04	1.76
TTC12	2.59E-04	1.75	ABTB2	2.65E-03	1.76
PYCRL	2.11E-03	1.75	P4HA1	2.77E-03	1.76
B4GALNT1	1.65E-04	1.75	TMEM66	7.94E-04	1.76
HEXA	1.59E-04	1.75	STS	5.10E-03	1.75
TEP1	3.61E-03	1.75	SLK	7.04E-06	1.75

ZFP95	1.75E-03	1.74	GNA13	2.64E-03	1.75
GBAP	4.83E-04	1.74	YEATS4	2.49E-04	1.75
ADPRHL2	1.49E-03	1.74	ZNF614	3.65E-04	1.75
KIF22	7.94E-04	1.74	NUPL2	3.26E-04	1.75
TMEM23	3.51E-04	1.74	TMED7	7.28E-04	1.75
NQO2	8.05E-04	1.74	NCOA6IP	1.88E-04	1.75
HTR3C	2.22E-03	1.74	JMJD2C	3.70E-04	1.74
WASF3	1.29E-03	1.74	NFE2L2	1.23E-06	1.74
NADSYN1	2.08E-03	1.74	PRPF38B	3.43E-05	1.74
GGT2	9.61E-04	1.73	COMMD2	2.12E-03	1.74
LEPROTL1	8.79E-05	1.73	SRP46	2.17E-04	1.74
ZCD1	7.69E-04	1.73	MTM1	1.48E-03	1.74
ATP6V1A	2.43E-07	1.73	IRF7	4.20E-03	1.74
MGST3	2.43E-03	1.73	CASD1	9.71E-04	1.74
SLC27A5	6.08E-04	1.73	RG9MTD3	3.12E-03	1.74
CA13	2.04E-04	1.72	JMJD1A	9.95E-07	1.74
WDR25	8.69E-04	1.72	ZNF268	2.22E-03	1.74
HADHA	1.07E-03	1.72	SLC38A1	1.84E-04	1.74
RBM19	2.35E-03	1.72	ZFP161	8.14E-04	1.74
BID	2.11E-03	1.72	STC2	3.22E-03	1.74
LRRC45	5.56E-04	1.72	DEK	3.45E-05	1.73
FBXW9	1.22E-04	1.72	HSPA5	3.55E-06	1.73
DYNC1H1	4.08E-03	1.72	POLE3	4.28E-03	1.73
DUS2L	3.53E-04	1.72	L2HGDH	1.20E-04	1.73
ZFP106	4.27E-03	1.71	SCFD1	5.54E-03	1.73
EDG6	1.60E-04	1.71	CYP4V2	3.26E-05	1.73
TUBA1	8.02E-09	1.71	EML2	5.26E-03	1.73
HIG2	3.07E-03	1.71	IER5	2.69E-05	1.73
PRKD2	1.34E-04	1.71	ERBB2IP	8.97E-04	1.73
ACTL8	1.35E-04	1.71	ABCD3	1.41E-03	1.73
UROS	7.58E-04	1.71	SUPV3L1	1.49E-04	1.73
SF3B5	4.36E-03	1.71	CTBP2	7.45E-05	1.73
NOSIP	4.85E-03	1.71	ZBTB2	2.25E-04	1.73
TRAP1	1.82E-04	1.71	FGFR3	3.00E-03	1.72
POP5	7.20E-04	1.71	BAIAP2L2	2.50E-03	1.72
GNA12	1.67E-04	1.71	DNAJC10	2.62E-05	1.72
NEK6	5.89E-04	1.70	CROP	4.56E-03	1.72
MFNG	8.31E-04	1.70	PDE8A	3.35E-03	1.72
ZNF232	2.44E-05	1.70	ZBTB1	1.43E-03	1.72
POLR1C	1.26E-03	1.70	ABI1	7.62E-05	1.71
PALLD	4.64E-06	1.70	SLC25A4	1.19E-04	1.71
NDUFB1	4.62E-05	1.70	GUSBL1	4.93E-03	1.71
CDT1	5.80E-06	1.70	SIRT1	1.07E-03	1.71

RNASSET2	2.39E-03	1.70	WDR51B	1.52E-05	1.71
MMACHC	5.30E-06	1.69	BIRC2	5.37E-05	1.71
SMYD3	3.81E-05	1.69	SEC24D	9.58E-05	1.71
ARMC9	6.22E-04	1.69	YTHDC1	7.87E-05	1.71
MEF2B	4.50E-04	1.69	SLC39A6	3.63E-03	1.71
FGFR1	6.55E-08	1.69	TMEM123	1.28E-04	1.71
BAK1	5.19E-03	1.69	SMC2	1.91E-03	1.71
EFTUD2	1.02E-04	1.69	SLC30A9	3.02E-04	1.71
HYAL2	4.92E-03	1.69	SMC6	9.39E-05	1.70
GINS4	2.25E-03	1.69	SYVN1	3.99E-04	1.70
FOXA2	1.08E-03	1.69	USP6	3.00E-04	1.70
MRPS14	2.37E-03	1.69	GCA	5.94E-04	1.70
HOXA4	8.50E-04	1.69	IKBKB	3.00E-04	1.70
ANXA4	2.11E-07	1.69	PIK3CA	3.23E-03	1.70
PPP2R5D	3.40E-03	1.69	GOLT1B	2.15E-06	1.70
KCTD10	4.63E-04	1.69	TTC8	6.06E-04	1.69
APOL3	6.35E-05	1.68	WDR35	4.95E-03	1.69
MAD2L1BP	9.72E-05	1.68	TMF1	1.28E-03	1.69
PEF1	2.04E-03	1.68	LMBRD1	3.82E-04	1.69
MED28	1.23E-03	1.68	WDR19	3.50E-03	1.69
CCM2	2.69E-03	1.68	PGRMC1	4.36E-04	1.69
TMEM104	4.29E-03	1.68	CNBP	3.57E-05	1.69
GRPEL1	3.86E-03	1.68	ZNF588	3.61E-03	1.68
MRPS17	2.24E-03	1.68	TTK	4.05E-05	1.68
GRAP	5.91E-04	1.68	TRAPPC6B	1.14E-03	1.68
MVD	1.17E-03	1.68	PCGF6	2.22E-06	1.68
ACSS1	9.48E-04	1.68	CALML4	2.86E-05	1.68
EMG1	1.27E-03	1.68	HNRPR	1.33E-04	1.68
PNKP	4.25E-03	1.68	NBPF1	4.93E-03	1.68
NEO1	1.55E-03	1.68	CKAP2L	2.96E-03	1.68
RAD51	1.01E-04	1.67	FBXO4	2.32E-03	1.68
KCNMB4	2.70E-05	1.67	CDC73	3.90E-05	1.67
B3GNT1	2.05E-03	1.67	NFKB1	9.93E-04	1.67
RDH13	1.24E-04	1.67	ZCCHC11	6.11E-07	1.67
FIBP	6.88E-04	1.67	KIF24	3.33E-04	1.67
PTOV1	1.64E-03	1.67	PPP4R2	4.37E-03	1.67
ACTR1A	2.81E-05	1.67	PMS1	1.12E-03	1.67
IGLV6-57	2.63E-03	1.67	KLHL24	2.64E-06	1.67
GRHPR	3.15E-03	1.66	ZNF432	1.06E-04	1.66
PRMT2	5.10E-04	1.66	GTPBP2	1.25E-04	1.66
XTP3TPA	5.66E-04	1.66	DYNC1LI1	8.82E-07	1.66
WDR33	2.67E-03	1.66	PRPF39	2.35E-04	1.66
KPTN	7.64E-04	1.66	ATXN2L	1.46E-04	1.66

DECR1	2.85E-04	1.66	RABGGTB	1.41E-04	1.66
RABL4	6.13E-04	1.66	ZBTB3	4.43E-03	1.66
ASMTL	3.25E-07	1.66	EID3	2.11E-03	1.66
A4GALT	4.46E-04	1.66	TMEM161 B	4.21E-05	1.66
NEU1	1.11E-03	1.66	RNF44	2.97E-03	1.66
CENTD2	3.04E-03	1.65	REV1L	6.14E-05	1.65
RUSC1	4.24E-03	1.65	PI4K2B	3.65E-03	1.65
CDC34	8.12E-06	1.65	MXI1	2.92E-05	1.65
MGAT1	1.23E-03	1.65	GPT2	8.13E-06	1.65
ZNF93	1.75E-04	1.65	POLS	6.48E-06	1.65
KCNN3	7.66E-04	1.65	CYLD	2.72E-05	1.65
DGCR6L	5.15E-04	1.65	PTBP2	9.15E-05	1.65
THOC5	2.11E-03	1.65	KLF15	1.44E-04	1.65
SLC35E3	8.77E-06	1.65	TATDN1	1.68E-05	1.65
THRAP3	2.68E-05	1.65	ZNF518	1.08E-04	1.64
GNGT2	1.44E-03	1.65	COPB1	2.57E-03	1.64
FAM120B	5.53E-03	1.65	THAP5	8.08E-04	1.64
SF3A3	5.42E-06	1.64	RAB21	6.97E-05	1.64
CDK5RAP1	1.46E-03	1.64	GARNL1	3.16E-03	1.64
NDUFV3	3.43E-03	1.64	FAM18B	2.24E-04	1.64
TUSC2	1.85E-03	1.64	CCDC111	3.29E-04	1.64
ARSA	5.47E-03	1.64	STCH	2.43E-04	1.64
ACAA1	2.22E-03	1.64	TTC21B	1.57E-05	1.64
LRRIQ2	1.99E-03	1.64	THRAP6	5.65E-04	1.64
ARSB	1.18E-03	1.64	TMEM1	4.38E-04	1.64
DGAT1	2.25E-03	1.64	BIC	1.02E-03	1.64
TICAM1	4.64E-03	1.64	STIM2	1.83E-03	1.64
VNN2	6.80E-04	1.64	DUSP12	6.80E-05	1.64
UBE2W	9.95E-04	1.64	ZZZ3	3.05E-05	1.63
ATBF1	4.28E-04	1.64	USP25	1.60E-05	1.63
REXO4	4.34E-03	1.64	TTC25	4.18E-03	1.63
BIK	2.62E-04	1.64	OTUD3	3.86E-04	1.63
COX17	2.20E-03	1.64	TMC8	6.27E-04	1.63
LRRN6A	4.87E-03	1.63	ZFP1	4.58E-04	1.63
FCGR2B	1.30E-04	1.63	FAM18B2	6.16E-04	1.63
PQLC1	8.98E-04	1.63	SC5DL	6.20E-05	1.62
PRDX6	9.39E-04	1.63	ARMC1	3.90E-05	1.62
PEX10	8.00E-04	1.63	SH2B3	6.24E-05	1.62
POLD2	9.74E-05	1.63	AGPAT5	7.74E-04	1.62
CDC25A	2.83E-03	1.63	INSIG1	8.57E-04	1.62
RNF8	1.06E-04	1.63	ERO1L	5.13E-05	1.62
NOL9	1.08E-05	1.63	RSL1D1	1.59E-05	1.62
BCKDK	1.21E-05	1.63	SPRED1	1.85E-04	1.61

KMO	2.38E-03	1.63	LHFP	2.13E-03	1.61
SLC25A14	7.14E-05	1.63	NARG2	2.65E-04	1.61
IBRDC2	1.35E-03	1.63	HK2	5.36E-04	1.61
NIT1	4.63E-04	1.63	ZF	7.99E-05	1.61
ACOT9	7.17E-05	1.62	MCTP2	1.75E-04	1.61
CCBL1	4.61E-04	1.62	ZCCHC4	1.02E-04	1.61
UNQ501	4.35E-03	1.62	FNDC3A	4.59E-06	1.61
PREX1	3.64E-05	1.62	PRPF4B	2.26E-07	1.61
DAP	4.10E-03	1.62	CASP8AP2	8.35E-04	1.61
HRBL	1.60E-05	1.62	PAM	4.31E-04	1.60
ALKBH6	4.58E-03	1.62	UBE2D3	3.79E-03	1.60
MED9	2.55E-05	1.62	CRKRS	3.10E-03	1.60
ERGIC1	1.27E-03	1.62	RBL2	1.95E-03	1.60
POR	4.23E-03	1.62	SLC35B3	1.30E-03	1.60
LCMT1	5.23E-04	1.62	PHF3	1.76E-05	1.60
TCEB3	2.21E-04	1.61	PLK3	2.32E-04	1.60
MAGED2	1.94E-05	1.61	SLC7A1	1.86E-03	1.59
DLEU2	2.51E-04	1.61	CENPL	8.14E-04	1.59
MKKS	2.93E-03	1.61	ZNF23	1.16E-03	1.59
AAMP	1.23E-03	1.61	RANBP9	4.40E-06	1.59
ZNF573	6.98E-04	1.61	ZNF292	2.50E-03	1.59
ZNF630	6.97E-05	1.61	BAZ2B	4.52E-04	1.59
SIX1	7.13E-05	1.61	WHDC1	1.19E-04	1.59
NIPSNAP1	1.13E-03	1.61	TES	5.55E-03	1.59
TRIM59	1.16E-03	1.61	DDX26B	1.57E-03	1.59
GSS	1.00E-03	1.61	WDR52	2.39E-03	1.58
PLK1	1.49E-03	1.61	INPP5E	7.74E-05	1.58
FAM27E2	1.83E-04	1.61	ETAA16	1.06E-04	1.58
COX6B1	5.56E-03	1.61	TNFSF9	1.65E-04	1.58
ABCA1	6.79E-04	1.61	ATP11B	1.39E-03	1.58
GABARAPL2	1.14E-04	1.61	ABCA6	1.12E-03	1.58
TIMM50	3.35E-05	1.60	TRPM7	2.98E-03	1.58
CHID1	2.53E-03	1.60	RECQL	2.20E-03	1.58
USMG5	1.13E-03	1.60	AMPD3	4.55E-03	1.58
ECD	1.95E-03	1.60	TIA1	3.22E-03	1.58
CBFB	1.65E-06	1.60	FNBP4	3.76E-03	1.58
HMMR	6.54E-04	1.60	ZNF121	9.05E-04	1.58
LMAN2	1.95E-05	1.60	HMGB2	1.84E-03	1.57
CCDC86	4.37E-03	1.60	CRTC2	2.54E-03	1.57
PLCG2	2.76E-05	1.60	CDKN1A	1.16E-06	1.57
UBE2L3	7.62E-04	1.60	SECISBP2	5.08E-06	1.57
PMS2CL	6.21E-04	1.60	SPON2	6.97E-06	1.57
COPS4	1.32E-04	1.60	NUP153	7.33E-04	1.57

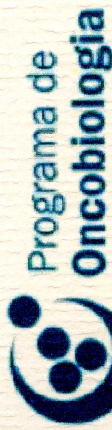
TUBG1	1.98E-03	1.59	RSN	1.03E-03	1.57
TBC1D10A	2.26E-03	1.59	ANKRD11	1.54E-04	1.57
MFAP1	4.13E-04	1.59	KLHL6	9.70E-04	1.57
IMP3	7.54E-04	1.59	PTP4A1	1.46E-03	1.57
PSAP	1.64E-03	1.59	ATG4C	4.88E-04	1.57
NSF	1.44E-04	1.59	ARHGAP1 1A	5.75E-04	1.57
NT5C3L	1.87E-03	1.59	ARFGAP3	7.18E-04	1.56
MORG1	9.37E-05	1.59	ETNK1	3.91E-03	1.56
VAV1	5.59E-04	1.58	JMJD1B	2.92E-03	1.56
SIRT3	1.60E-03	1.58	HSPC157	2.09E-04	1.56
SLC38A5	5.73E-04	1.58	TLR6	3.65E-05	1.56
SCARB1	1.95E-04	1.58	RBM6	9.69E-04	1.56
CDCA3	2.69E-03	1.58	DENND4A	1.29E-03	1.56
RFX1	5.44E-03	1.58	MTMR6	6.47E-04	1.56
PDK3	2.17E-04	1.58	CEP290	4.44E-04	1.55
STX12	2.71E-04	1.58	DBF4	2.03E-04	1.55
EIF2B1	7.29E-05	1.58	MGEA5	2.83E-04	1.55
NDUFS5	1.46E-03	1.58	PPP2CA	3.13E-04	1.55
APEH	2.76E-04	1.58	RNF103	4.05E-05	1.55
HMOX2	4.08E-04	1.58	COG3	1.50E-04	1.55
ARL4D	9.57E-04	1.58	ZNF138	4.93E-04	1.55
GSPT2	6.43E-04	1.58	GOLGA2	6.99E-04	1.55
ISOC2	8.46E-04	1.58	SLC16A6	1.35E-05	1.54
GMDS	1.53E-03	1.58	IRAK1BP1	2.27E-03	1.54
RECQL5	2.01E-03	1.57	RBM26	4.23E-03	1.54
C1GALT1C1	5.53E-04	1.57	SLC41A2	3.04E-06	1.54
PRKCZ	7.71E-04	1.57	PPM1A	1.53E-04	1.54
ASB1	2.00E-04	1.57	SKP2	5.28E-03	1.54
ANKS6	1.95E-03	1.57	CLEC2D	2.54E-05	1.54
NR1H3	1.52E-03	1.57	CEP110	1.70E-04	1.54
SAT2	1.46E-04	1.57	SREBF2	8.23E-05	1.54
MPST	1.79E-04	1.57	SMC4	1.88E-03	1.54
SGTB	1.75E-03	1.57	NOL3	5.36E-05	1.54
NUMB	4.66E-05	1.57	WDR44	2.73E-04	1.54
FAM50A	5.43E-03	1.57	XRCC1	6.36E-05	1.54
FUZ	2.62E-03	1.57	MTRR	4.08E-03	1.53
PIP5K2A	1.28E-05	1.57	PLDN	1.96E-04	1.53
CNOT4	5.42E-05	1.57	TRAM1	2.31E-04	1.53
POLR2L	4.74E-03	1.57	AZI2	1.19E-04	1.53
DUS1L	3.22E-03	1.57	EDEM1	2.45E-03	1.53
MRM1	2.07E-03	1.56	GABPB2	7.77E-05	1.53
PHOSPHO2	1.90E-03	1.56	TUBGCP5	5.92E-04	1.53
ATG7	2.79E-04	1.56	GARS	2.74E-03	1.53

GEMIN5	4.37E-03	1.56	TTC13	1.19E-04	1.53
FAM53B	2.26E-03	1.56	RWDD3	3.80E-03	1.53
TRIP12	4.19E-03	1.56	DPY19L1	4.33E-04	1.53
LRPAP1	1.24E-05	1.56	ZNF501	2.46E-03	1.53
MRPS16	3.29E-04	1.56	PTPN2	2.58E-03	1.53
COX7B	5.63E-05	1.56	METTL9	1.93E-03	1.52
NME4	5.34E-05	1.56	HACE1	3.36E-04	1.52
SYMPK	5.18E-03	1.56	SFRS9	4.47E-03	1.52
ABHD6	5.31E-04	1.55	EIF5	1.59E-05	1.52
OR7E47P	2.77E-03	1.55	KIF21B	3.77E-03	1.52
MRPL30	4.96E-04	1.55	NSUN5	2.90E-03	1.52
TP53BP1	4.97E-04	1.55	HNRPDL	1.41E-04	1.52
HSDL2	3.19E-04	1.55	SDHAL2	2.22E-03	1.52
UBPH	1.10E-04	1.55	CCND1	3.10E-05	1.52
POLDIP2	6.30E-04	1.55	CCDC45	1.56E-04	1.52
VCP	2.78E-03	1.55	CDCA4	1.94E-03	1.52
CD97	1.35E-03	1.55	GLUD1	3.24E-03	1.52
FLAD1	4.18E-05	1.55	CSNK1G3	3.97E-04	1.52
CHRNA10	1.53E-03	1.55	ZNF18	2.26E-03	1.51
DNAJC4	1.77E-03	1.55	PRO2266	1.58E-04	1.51
SLC43A2	6.24E-04	1.55	IFT74	4.76E-06	1.51
WDR46	8.94E-05	1.54	NARS2	1.19E-04	1.51
FAM121B	3.71E-04	1.54	USP1	4.08E-04	1.51
TIMM8B	1.05E-03	1.54	HBP1	9.00E-04	1.51
HDAC1	1.15E-04	1.54	SLC15A4	3.76E-03	1.51
ITGB7	2.22E-04	1.54	PNRC1	1.66E-03	1.51
UMPS	5.20E-04	1.54	IREB2	3.98E-03	1.51
HK1	2.11E-04	1.54	ARL5B	9.27E-04	1.51
USP37	2.11E-03	1.54	NSMAF	1.00E-03	1.51
CPEB4	2.31E-05	1.54	ST7L	2.04E-03	1.51
PPP2R2B	2.22E-03	1.54	USP52	1.87E-03	1.51
FAM98A	3.24E-04	1.54	JUNB	1.49E-03	1.51
HTRA2	4.43E-04	1.54	TMEM43	1.04E-03	1.51
XPNPEP1	1.68E-03	1.54	IFT88	1.77E-03	1.51
HABP4	2.24E-04	1.54	CCDC52	3.50E-04	1.50
CTNBL1	1.93E-04	1.54	LEREPO4	1.07E-04	1.50
ARG2	1.18E-03	1.54	BDP1	3.15E-04	1.50
BAG1	2.67E-03	1.53	WRN	5.95E-04	1.50
UBN1	3.36E-03	1.53	ZMYM5	1.04E-03	1.50
CDKN2A	9.51E-04	1.53	SFRS10	6.08E-04	1.50
RANBP10	1.88E-04	1.53	TMEM77	2.99E-04	1.50
UBADC1	8.40E-04	1.53	GLUD2	5.54E-03	1.50
AP2A2	1.87E-04	1.53	CREG1	4.34E-04	1.50

RAE1	3.43E-04	1.53	MTHFD2	9.93E-05	1.50
PSMD13	1.82E-03	1.53			
SAMM50	6.47E-04	1.53			
COMMD9	9.89E-04	1.53			
CETN2	4.97E-03	1.53			
ARHGAP10	3.36E-05	1.53			
BRRN1	1.44E-04	1.53			
RAGE	1.86E-03	1.53			
SLC39A1	5.13E-03	1.53			
CIAPIN1	5.75E-04	1.52			
MTCH2	2.19E-03	1.52			
SLC35A2	1.10E-04	1.52			
DCTN2	1.86E-04	1.52			
FH	3.04E-03	1.52			
TOB2	1.14E-03	1.52			
PHF23	5.01E-05	1.52			
WDR77	5.05E-03	1.52			
TRIM14	3.35E-04	1.52			
FAM118B	5.03E-03	1.52			
AHCY	4.73E-04	1.52			
DHX30	2.92E-04	1.52			
ZBTB8	4.93E-03	1.52			
AP4M1	2.13E-03	1.52			
PET112L	1.85E-05	1.51			
TTC9C	4.87E-05	1.51			
CXXC5	2.32E-04	1.51			
LCMT2	6.58E-05	1.51			
ATG9A	4.09E-03	1.51			
LZIC	9.89E-05	1.51			
PRKCE	4.63E-03	1.51			
ARFRP1	4.23E-03	1.51			
AYP1	2.98E-03	1.51			
COPZ1	2.05E-04	1.51			
WDR51A	3.81E-05	1.51			
LARP5	3.15E-04	1.50			
MRPL22	5.52E-03	1.50			
FAHD2A	8.33E-04	1.50			
NMU	1.61E-03	1.50			
UBR1	2.96E-03	1.50			
VPS26B	2.03E-04	1.50			
NP	1.66E-03	1.50			
NPEPPS	2.69E-03	1.50			

Supplementary File 3: Differentially expressed genes between VP16/NaB treated cells and controls. Reported genes presented at least a 1.5 fold-change between the two cell treatments (FDR corrected p value).

Anexo VI



Programa de
Oncobiologia



FUNDAÇÃO
DO
CÂNCER
Com vida. Pela vida.



IBqM

Instituto de Biotecnologia Médica UFRJ

VII Simpósio de Oncobiologia

Menção Honrosa

Conferimos a Ana Carolina dos Santos Ferreira este certificado de Menção Honrosa pelo trabalho intitulado “**INIBIDOR DE HISTONA DEACETILASE INIBE O CRESCIMENTO DE CÉLULAS DERIVADAS DO LINFOMA DE BURKITT ATRAVÉS DA REGULAÇÃO DA VIA DE PI3K/AKT E AUMENTO DE EXPRESSÃO DOS microRNAS-143, -145, E -101**” no VII Simpósio de Oncobiologia, realizado entre os dias 25 e 27 de setembro de 2013, no Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Robson de Queiroz Monteiro

Coordenador do Núcleo de Simpósios do Programa de
Oncobiologia

Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek

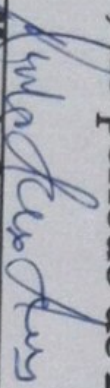
Coordenadora do Núcleo de Ensino do Programa de
Oncobiologia

Anexo VII

XI Jornada de Iniciação Científica & VI Jornada de Pós-Graduação

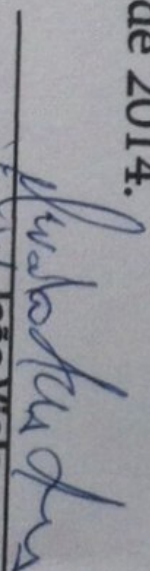
CERTIFICADO

Conferimos a Ana Carolina dos Santos Ferreira, Marcela Cristina da Silva Robaina, Lúdia Maria Magalhães de Rezende, Patricia Severino, Anne Ridley, Claudete Esteves Klumb, na categoria de Doutorado, o presente certificado de Melhor apresentação Oral pelo trabalho intitulado: *“Efeito de HDACi combinado com quimioterápico e PI3Ki na proliferação e migração de células derivadas do linfoma de Burkitt”, no período de 22 a 24 de outubro de 2014.*



Marcelo Soares Alves

Coordenador de Pós-Graduação Stricto Sensu
em Oncologia



João Viola

Coordenador do Programa de Bolsas de Formação
em Pesquisa Oncológica

Anexo VIII

Histone deacetylase inhibitor prevents cell growth in Burkitt's lymphoma by regulating PI3K/Akt pathways and leads to upregulation of miR-143, miR-145, and miR-101

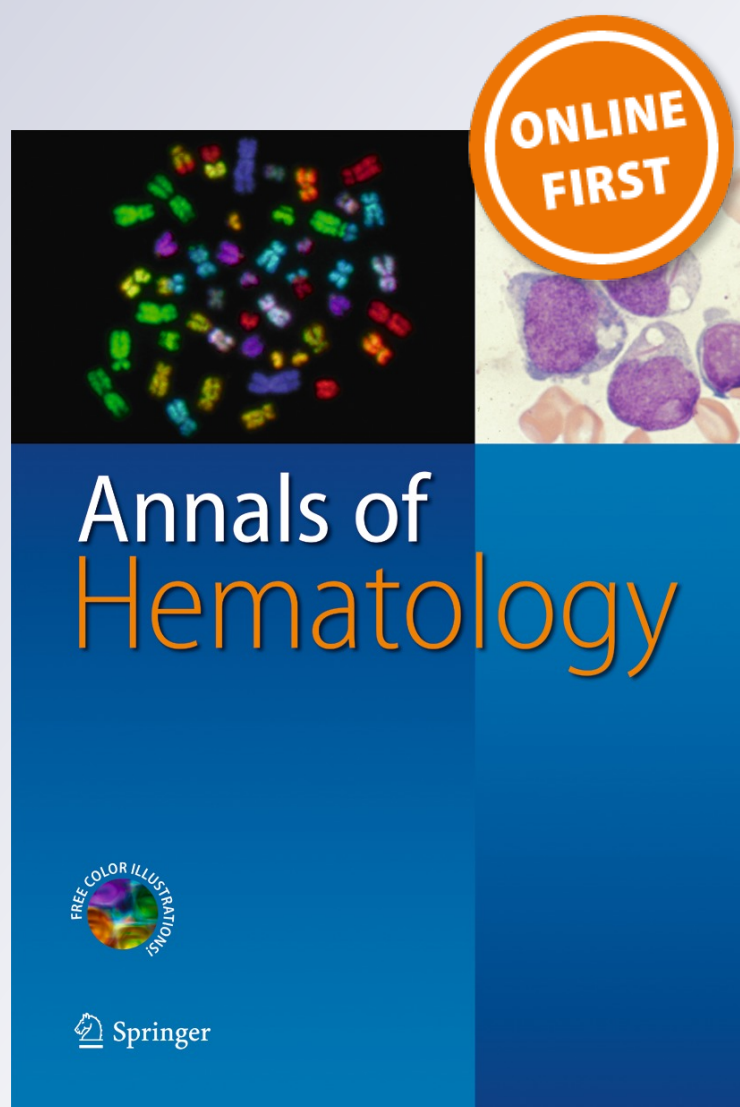
**Ana Carolina dos Santos Ferreira,
Marcela Cristina Robaina, Lídia
Maria Magalhães de Rezende, Patricia
Severino, et al.**

Annals of Hematology

ISSN 0939-5555

Ann Hematol

DOI 10.1007/s00277-014-2021-4



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Histone deacetylase inhibitor prevents cell growth in Burkitt's lymphoma by regulating PI3K/Akt pathways and leads to upregulation of miR-143, miR-145, and miR-101

Ana Carolina dos Santos Ferreira · Marcela Cristina Robaina ·
Lídia Maria Magalhães de Rezende · Patricia Severino ·
Claudete Esteves Klumb

Received: 3 October 2013 / Accepted: 22 January 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Burkitt lymphoma (BL) is an aggressive B-cell lymphoma more common in children comprising one third of pediatric non-Hodgkin lymphoma cases. The recent discovery in BL pathogenesis highlighted the activation of PI3K pathway in cooperation with Myc in the development of BL. In this study, we demonstrated that PI3K/Akt pathway is a target to histone deacetylase inhibitor (HDACi) in BL cells. The combination of HDACi (sodium butyrate, NaB) and chemotherapy (VP-16) inhibited 51 % of the proliferation and enhanced the blockage of the cell cycle progression at G2/M with a concurrent decrease in the S phase. Microarray profiling showed a synergistic action of NaB/VP-16 combination through the differential regulation of 1,413 genes.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00277-014-2021-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. C. dos Santos Ferreira · M. C. Robaina · C. E. Klumb
Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular,
Coordenação Geral Técnico-Científica, Instituto Nacional de
Câncer-INCA, Rio de Janeiro, Brazil

L. M. M. de Rezende
Divisão de Patologia, Instituto Nacional de Câncer-INCA, Rio de
Janeiro, Brazil

P. Severino
Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Hospital
Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil

C. E. Klumb (✉)
Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular; Programa de
Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular; CGTC, Instituto
Nacional de Câncer, Praça Cruz Vermelha, 23/6th floor, CEP: 20
230-130 Rio de Janeiro, Brazil
e-mail: cklumb@inca.gov.br

Comparing VP-16 treatment with the NaB/VP-16 combination, 318 genes were deregulated: 250 genes were downregulated, and 68 were upregulated when compared with untreated cells. Among these genes, six (CDKN1A, CCND1, FAS, CHEK2, MDM4, and SESN2) belong to the p53-signaling pathway. The activation of this signaling pathway is usually induced by stress signals and ultimately leads to cell cycle arrest. Besides, the inhibition of the cell growth was related to reduced Akt phosphorylation, and decrease of c-Myc protein expression by about 60 % ($p \leq 0.005$). Moreover, HDACi enhanced miR-101, miR-143, and miR-145 levels in BL cell line, which were inversely associated with the levels of miR-101, miR-143, and miR-145 found to be extremely downregulated in the sample of BL patients. We highlight the fact that effective combinations of HDACis with other target drugs could improve BL therapy in the future.

Keywords Burkitt's lymphoma · HDACi · Cell growth · PI3K · miRNA

Introduction

Burkitt lymphoma (BL) is an aggressive B-cell lymphoma more common in children comprising one third of pediatric non-Hodgkin lymphoma cases [1]. The hallmark genetic alteration in BL is a chromosomal translocation that places the *MYC* oncogene, located at 8q24, under control of one of the immunoglobulin gene enhancers, resulting in deregulated expression of the Myc protein, which elicits aberrant cell proliferation, metabolic reprogramming, and genomic instability [2, 3]. Despite its growth-promoting effects, Myc also stimulates

both TP53-dependent and TP53-independent apoptotic pathways [4]. Thus, the shift of the balance away from the apoptosis induced by Myc towards proliferation is achieved by inactivation of the p53-dependent apoptosis pathway through p53 mutations or via the downregulation of *BIM* gene [5–8].

A remarkable addition to the understanding of BL pathogenesis came with the recent discovery implicating the activation of PI3K/AKT pathway in the development of BL in cooperation with MYC [9, 10]. Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt constitutes an important pathway that regulates cell growth, metabolism, proliferation, and apoptosis [11]. PI3K/Akt is also an important player in the regulation of p53, a process recently studied in the context of targeted therapies [12, 13]. This new insight into BL pathogenesis, described by two independent groups, suggested a reevaluation of drugs targeting the alterations associated with BL progression and drug combinations aiming to reduce BL treatment morbidity. Still in the context of cell cycle proliferation and apoptosis, the methylation of *p16^{INK4a}*, a cyclin-dependent kinase inhibitor, has been correlated to BL development. The silencing of this tumor suppressor would lead to cell cycle disruption [14].

Furthermore, there is increasing experimental evidence supporting the role of microRNAs (miRNA; mir)—small noncoding RNA that negatively regulates gene expression—in a large range of processes implicated in cancer [15]. In this context, miR-101, miR-143, and miR-145 have been reported to be downregulated in most types of cancers and BL [16].

We recently demonstrated that the treatment of BL cells with histone deacetylase inhibitor (HDACi) and chemotherapy induces apoptosis involving the proapoptotic BCL-2-related family member Bim protein [17]. To evaluate additional mechanisms underlying this effect, here, we analyzed gene expression profiles in a well-characterized BL cell line upon treatment with HDACi combined with chemotherapy. The impact on gene expression regulation was broader when HDACi was combined with chemotherapy and, then, when either therapy was used alone. We demonstrated that PI3K/Akt pathway is a target to HDACi in BL cells, arresting cell cycle and reducing proliferation through inhibition of Akt phosphorylation and downregulation of c-Myc expression. As a complementary approach, we investigated if HDACi combined with chemotherapy treatment would enhance mir-101, mir-143, and mir-145 levels in BL cell line. This hypothesis was confirmed, and we also observed that levels of mir-101, mir-143, and mir-145 were extremely downregulated in the sample of BL patients.

In this study, we demonstrate mechanisms involved in cell cycle arrest upon cell treatment using a combination of HDACi and chemotherapy. We highlight the fact that effective combinations of HDACis with other target drugs could improve BL therapy in the future.

Methods

Cell lineage and drug treatments

Burkitt's lymphoma cell line Raji was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The lineage was EBV-positive and mycoplasma-negative and was used within 6 months from source. The cell line was maintained in a humidified atmosphere of 95 % air and 5 % CO₂ at 37 °C and was grown in RPMI 1640 medium supplemented with 25 mM of HEPES buffer (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco BRL, UK). Twenty-four hours before each assay, Raji cell line was incubated with 1.0 mM of NaB (sodium butyrate), a pan-HDACi, and/or 0.1 μM of VP-16 (VePesid®; VP-16), a chemotherapy commonly used in BL treatment.

Cellular viability by trypan blue exclusion assay

In viability assay, at 24, 48, and 72 h after combined or isolated treatments [17], Raji cells were collected through centrifugation. An aliquot of collected cells was combined with trypan blue dye at a concentration of 0.04 % (w/v) and analyzed microscopically on a Neubauer counting chamber. Blue cells were counted as nonviable, and cells excluding the dye were counted as viable. Cell viability was expressed as percentage of viable cells.

Cell cycle analyses

After Raji cell treatment with NaB isolated or combined with VP-16 during 24, 48, and 72 h, cells were harvested, washed in PBS, and incubated with 500 μl of propidium iodide (PI) staining solution (PI 50 μg/ml diluted in citrate buffer 4 mM and 0.3 % Triton X-100) and RNase (ribonuclease A 100 μg/ml diluted in citrate buffer 40 mM) for 15 min at room temperature. DNA content was determined by collecting 10,000 events for cell cycle analysis using a CyAn ADP analyzer flow cytometry and Summit v4.3 software (Dako, USA).

Gene expression profile

DNA microarrays were used to access global gene expression modulation upon treatment of Raji BL cell line with VP-16 or NaB and a combination of NaB and VP-16 for 24 h. Total RNA was extracted using Trizol®. Gene expression of treated cells was compared with those of untreated cells (controls). Microarray analysis was performed using Agilent Whole Human Genome Microarray 4×44K arrays and labeled using the One Color Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies). Two biological replicates were included for each experimental condition. Hybridization and washing

followed protocols described by the manufacturer (Agilent Technologies). The one-color arrays were scanned using GenePix 4000B Scanner (Axon) and analyzed using the Agilent Feature extraction software (version 9.5). The gProcessedSignal from each array was loaded into Partek Genomics Suite (v6.6) and normalized between arrays using quantile normalization. For subsequent statistical analysis, we used the ANOVA implementation of Partek. Differentially expressed genes were defined as genes presenting at least a 1.5-fold change and FDR adjusted $p < 0.05$ (false discovery rate multiple testing correction). For biological function analysis, we used gene ontology (GO) term enrichment analysis and KEGG pathway mapping through DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). Raw data files can be accessed through Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE48399.

Western blot analysis

The cell lysates were subjected to 15 % SDS-PAGE; electrotransferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) in a buffer containing 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20 % methanol at 2 mA/cm² for 2 h at 25 °C and incubated overnight with primary antibodies anti-Akt, anti-Phospho-Akt (Ser473) (Cell Signalling Technology), anti-P16 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-c-Myc (Epitomics, CA, USA) or anti- β -actin and HSC70 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) as a loading control. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used to detect specific binding of the primary antibodies and visualized with Amersham ECL Western Blotting Systems (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

c-Myc expression analysis

Changes of c-Myc protein were assessed using intracellular immunostaining by flow cytometry. Briefly, 5×10^5 cells were exposed to NaB 1 mM, VP-16 0.1 μ M, or the combination NaB/VP during 24 h. After treatments, the cells were pelleted, resuspended in 10 % (v/v) lysing solution (BD Bioscience, CA, USA), and incubated for 10 min at room temperature. The suspension was then centrifuged, and the pellet was washed with washing buffer (5 % Tween-20 (LGC Biotechnology) in phosphate-buffered saline (PBS)). Labeling was performed by adding anti-c-Myc 1:10 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 60 min. Cells were washed with washing buffer, incubated with an Alexa Fluor[®]488-labeled antirabbit IgG (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) and analyzed using flow cytometry. The data were analyzed using the Summit v.4.3 (Beckman-Coulter, CA, USA) software. For each analysis, 10,000 events were recorded. The results were confirmed by Western blotting.

Pyrosequencing assay

Raji cell line was treated with NaB 1 mM, VP-16 0.1 μ M, or the combination NaB/VP for 24 h. Cell line DNA was extracted from 6×10^6 cells using the Qiaamp DNA Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The DNA was quantified on a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Bisulfite conversion of 500 ng of DNA was performed using the Epitect Bisulfite Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Promoter methylation was quantified using pyrosequencing (Pyromark Q24; Qiagen). Bisulfite-converted DNA was amplified with one biotin-labeled primer using Pyromark PCR Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The primer was previously described by Vasiljevic and colleagues [18]. The sequence to analyze was localized in the first exon in the P16 gene and contained 7 CpG sites (Reference sequence: NM_000077.4). The amplified DNA was confirmed by 2 % agarose gel electrophoresis. A total volume of 20 μ l of biotinylated PCR products were immobilized on streptavidin-coated Sepharose beads (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Next, the amplicons were denatured and washed using the vacuum prep workstation. The sequencing primer was added a final concentration of 0.3 μ M and incubated at 80 °C for 2 min. Then, pyrosequencing was performed using PyroGold Pyromark Q24 reagents (Qiagen) in the Pyromark Q24 (Qiagen). The percentage of each CpG site was generated automatically using the PyroMark Q24 software. Genomic DNA extracted from mononuclear blood cells from a healthy donor and a universally methylated DNA sample (Qiagen) were used as negative and positive controls, respectively, for methylation assays. Control bisulfite treatment was included in each test to check the conversion and avoid false-positive results.

Reverse-transcription quantitative PCR

The small fraction of RNA from cell lineage was extracted using the mirVana miRNA Isolation kit (Ambion, Life Technologies) and quantitated using the NanoDrop 1,000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and cDNA was generated using the TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time reverse-transcription PCR was performed using primer-specific TaqMan[®] Kit (Applied Biosystems) for miR-101 reverse transcription (Part 4427975, Assay ID 002253), miR-143 (Part 4427975, Assay ID 002249), and miR-145 (Part 4427975, Assay ID 002278), followed by qPCR with TaqMan[®] Universal PCR Master Mix. The miRNA levels were normalized to the expression level of mature miRNA control RNU6B (Part 4427975, Assay ID 1093). The reactions were performed in triplicate on an Applied Biosystems StepOne[™], and the results were the mean of two experiments from separate reverse-transcript reaction normalized to

expression levels from untreated cells. For the assessment of *p16^{INK4a}* mRNA, cDNA was generated with the Ready-To-Go Kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Real-time quantitative PCR was performed with Applied Biosystems StepOne™ using primer-specific TaqMan® Kit (Applied Biosystems). The expression was normalized to GAPDH and expressed relative to *p16^{INK4a}* transcript levels from untreated cells.

miRNA quantification in patient tissues

After approval by institutional review board, 46 cases of pediatric BL were obtained from the archives of Pathology Division of National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil. The pathologic diagnosis of the samples was verified before analysis. Quantitative real-time reverse-transcription PCR (qRT-PCR) was performed on miRNA isolated from FFPE tissue specimens using RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Ambion®). Five reactive lymph node FFPE tissue specimens were used as control samples. qRT-PCR was performed using primer-specific TaqMan® Kit (Applied Biosystems) for miR-101, miR-143, and miR-145. The miRNA levels were normalized to the expression level of mature miRNA control RNU6B and expressed relative to miR-101, miR-143, and miR-145 transcript levels from the reactive lymph node.

Statistical analysis

The data were expressed as mean±SD. Statistical comparison between cells treated with NaB plus VP-16 and NaB alone was carried out using paired *t* test. Statistical significance was set at *p*<0.05. The analysis was performed using the Graph Pad Prism 5.0 software.

Results

NaB/VP-16 combination enhances cell growth inhibition and cell cycle arrest of BL cell lineage

To determine the influence of NaB/VP-16 combination on proliferation, we counted the total number of the cells after 24, 48, and 72 h of NaB/VP treatment. As we expected, 1.0 mM of NaB did not affect the proliferation; 0.1 μM of VP-16 inhibited 37 % of the proliferation, whereas the combined treatment inhibited 51 % after 24 h of treatment. After 48 and 72 h, the combined treatment leads to a strong inhibition of the proliferation in about 84 and 88 %, respectively. However, the VP-16 alone was capable to inhibit 84 % of the proliferation after 72 h (Fig. 1). As demonstrated previously [17], HDACi potentiated chemotherapy-induced apoptosis in BL cells. To confirm these data, we accessed the cell cycle using propidium iodide staining. NaB treatment alone

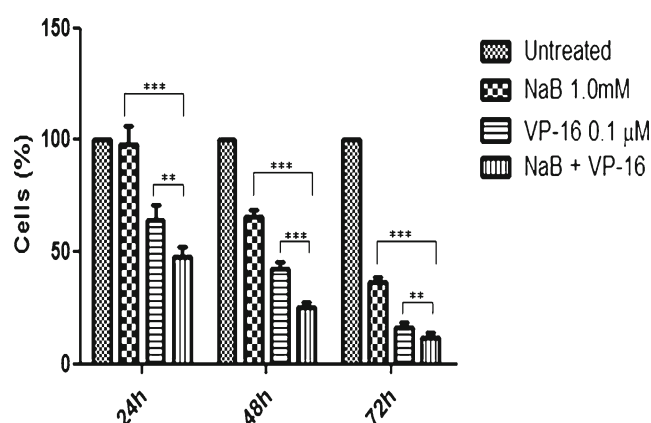


Fig. 1 Effect of NaB and VP-16 isolated or combined in Raji cells: BL cells were exposed to NaB 1.0 mM only or in combination with VP-16 0.1 μM for 24, 48, and 72 h. The total number of the cells was determined. Results are expressed as % of viable cells related to untreated cells. Data are means±SD of three independent experiments. ***p*<0.01; ****p*<0.001

decreases the percentage of the cells in the S phase; VP-16, a well-known topoisomerase inhibitor, leads to a strong cell cycle arrest, arresting about 70 % of the cells at G2/M. The NaB/VP-16 combined treatment enhances the blockage of the cell cycle progression at G2/M with a concurrent decrease in the S phase in Raji cells at 24. Although we could observe the same profile after 48 h of treatment, after 72 h of VP-16 isolated treatment or combined with NaB we observed G2/M blockage with a concurrent apoptotic processes affecting cells in G1 (Fig. 2).

Cell growth inhibition following NaB/VP-16 treatment is related to the blockage of PI3K/Akt signaling

To uncover the mechanism of proliferation inhibition upon NaB/VP-16 treatment, we performed global gene expression profiling by means of DNA microarrays. Microarray profiling showed the differential regulation of 500 genes upon treatment with VP-16, 728 genes upon treatment with NaB, and 1,413 genes upon VP-16/NaB treatment, indicating a possible synergistic action of the combination NaB/VP-16 (Supplementary Files 1, 2 and 3, respectively). The VP-16 treatment resulted in the upregulation of 127 genes and downregulation of 373 genes. With NaB treatment, we noticed that 200 genes were upregulated and 528 genes were downregulated. Moreover, NaB/VP-16 combination showed upregulation of 727 genes and downregulation of 686 genes (Fig. 3a, b). Among these genes, six (CDKN1A, CCND1, FAS, CHEK2, MDM4, and SESN2) belong to the p53-signaling pathway (hsa04115). The activation of this signaling pathway is usually induced by stress signals and ultimately leads to cell cycle arrest. In agreement, we identified several differentially regulated genes associated with the regulation of cell death and cell cycle, as shown in Table 1. When considering the

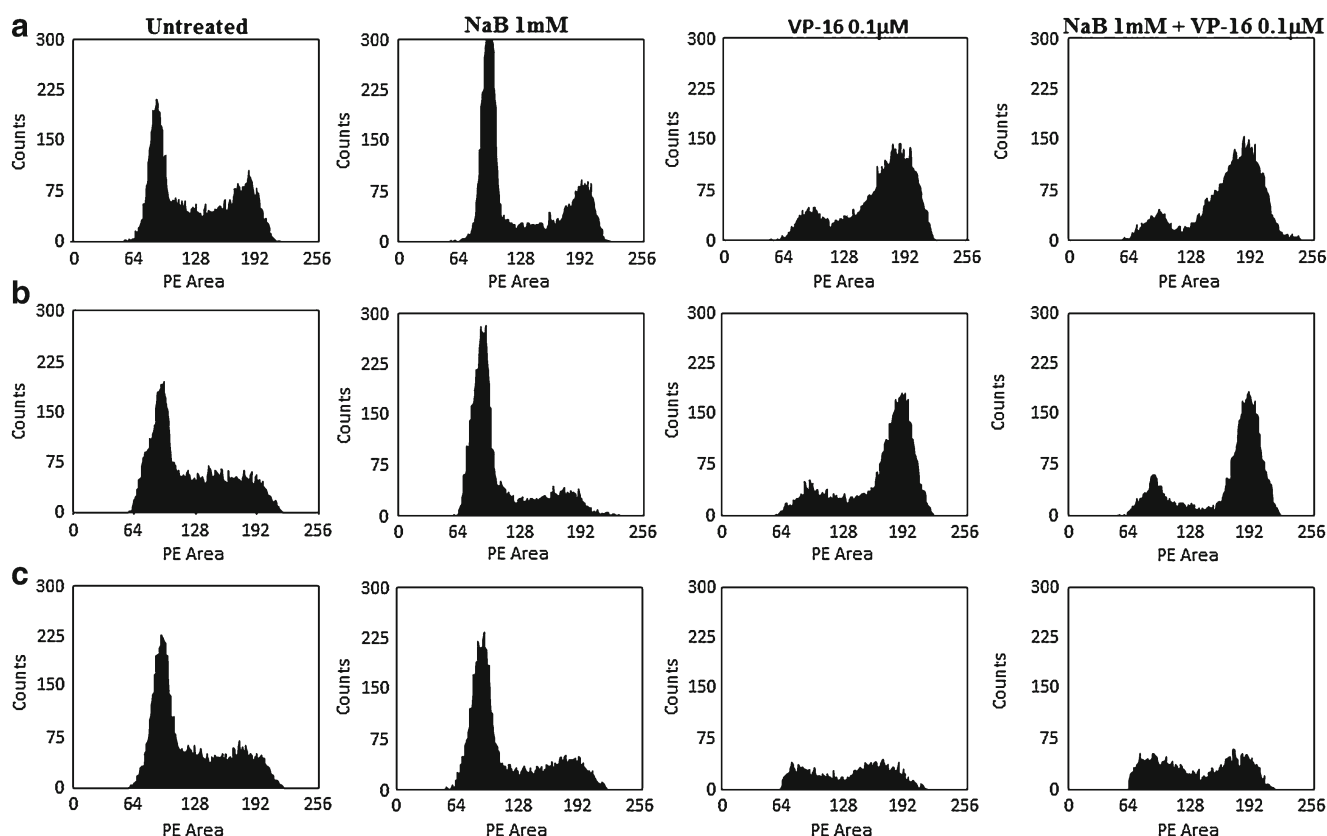


Fig. 2 Cell cycle arrest induced by HDACi plus chemotherapy in BL Raji cells were treated with NaB 1.0 mM, VP-16 0.1 μ M and the combination NaB/VP-16. After 24, 48, and 72 h of treatment, Raji cells were stained with propidium iodide, and the DNA content was analyzed using flow cytometry

synergistic effect of NaB/VP-16, we were able to identify, in addition to the above processes, the deregulation of DNA replication and repair and a broad deregulation of genes involved in phosphorylation (Table 2). The later biological process includes PI3KCA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha), which is responsible for the phosphorylation of phosphatidylinositol, generating PIP3, and is thus involved in cell proliferation and survival through the activation of Akt [19]. Immunoblotting analyses showed that NaB/VP-16 combined treatment reduced Akt phosphorylation, confirming the involvement of PI3K/Akt pathway on the cell growth inhibition and cell cycle arrest observed in this study (Fig. 4).

HDACi and chemotherapy reduces c-Myc expression in BL cells

As reported recently, the proliferative profile of BL cells is related to translocated *c-myc* oncogene, which cooperates with the PI3K/AKT pathway. Thus, we decide to evaluate if NaB/VP-16 treatment leads to downregulation of c-Myc protein expression in Raji cells. After 24 h of treatment, c-Myc protein expression decreased by about 60 % ($p \leq 0.005$) compared with untreated cells, correlating to the effects of NaB/VP-16 on cell growth (Fig. 5). In agreement, the expression of cell

proliferation marker MIB-1 (Ki-67), a surrogate marker of BL decreased 1.6-fold upon combined treatment (GSE48399).

Sodium butyrate induces *p16^{INK4a}* mRNA expression in BL cells

p16^{INK4a} is a tumor suppressor gene critical in the cell cycle regulation. As shown in Fig. 6a, b, an enhancement in *p16^{INK4a}* mRNA and protein levels was observed after NaB/VP-16 treatment. It has been demonstrated that increase of histone acetylation by HDACi is associated with a significant decrease in global methylation [20]. To investigate this effect in our study we evaluated the percentage of methylation on *p16^{INK4a}* gene promoter, (Fig. 6c). Raji cell line presented 96 % of *p16^{INK4a}* gene promoter methylation and upon NaB/VP-16 treatment a slight reduction on methylation percentage level after 24 h was observed (Fig. 6c).

HDACi treatment enhances miR-101, miR-143, and miR-145 levels in Raji cells

To examine the effect of NaB and VP-16 isolated or combined treatment on expression levels of miR-101, miR-143, and miR-145, we analyzed the miRNA expression levels 24 h after the treatment (Fig. 7). NaB/VP-16 treatment enhanced

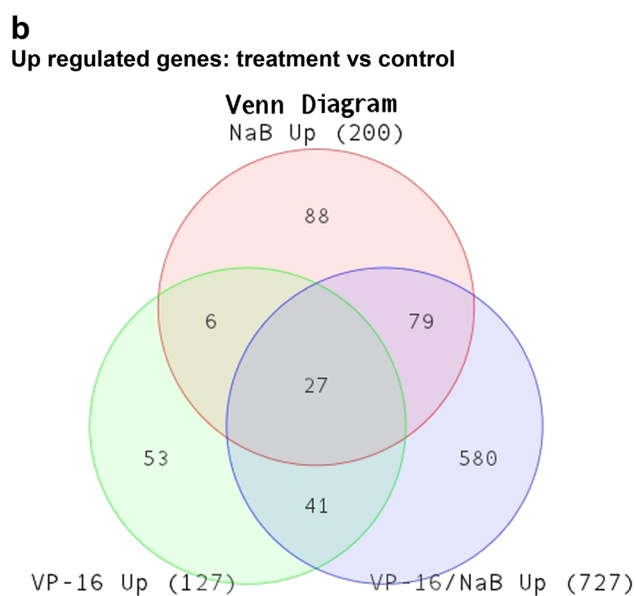
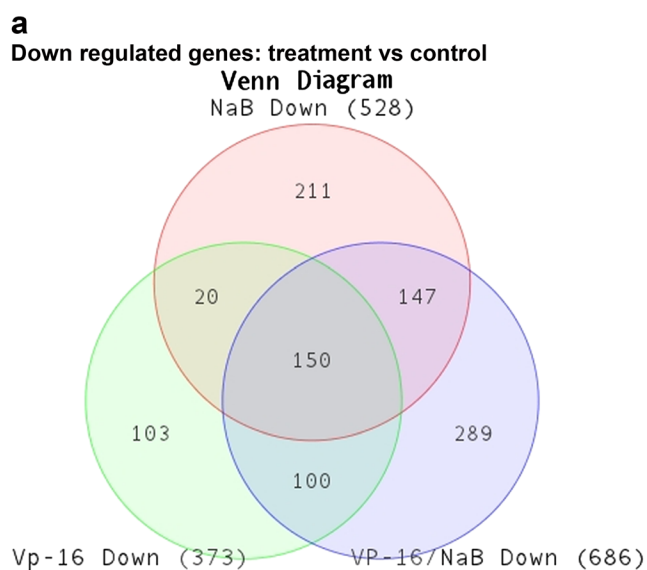


Fig. 3 Venn diagram illustrating the commonly and exclusively expressed genes between cells treated with NaB, VP-16 and NaB/VP-16. Downregulated genes in NaB, VP-16 and NaB/VP-16 treated cells compared with controls (a); upregulated genes in NaB, VP-16 and NaB/VP-16 treated cells compared with controls (b)

all of the miRNAs tested. However, a strong enhancement of miR-145 could be observed. The combination of NaB and VP-16 enhanced 14-fold miR-145 levels compared with untreated cells.

Expression levels of miR-101, miR-143, and miR-145 were significantly decreased in BL samples

We examine the expression of miR-101, miR-143, and miR-145 in the 46 samples of BL patients. Eighty-seven percent of BL samples showed an extremely low expression of miR-143 and miR-145, and 95 % showed low expression of miR-101 compared with reactive lymph node tissues ($n=5$) (Fig. 8).

Discussion

Epigenetic therapy represents a novel approach for treating hematologic malignancies, which is changing the current treatment paradigms for these diseases because two HDACi, vorinostat and romidespin, were approved by the US FDA for treating patients with progressive, persistent, or recurrent cutaneous T-cell lymphoma after one or more lines of chemotherapy [21, 22]. However, these agents have not been shown to be active as a single agent in hematologic malignancies, including B-cell lymphoma, such as diffuse large B-cell lymphoma suggesting that HDACi combination with other compounds, including chemotherapy agents, should be evaluated [23–26]. Particularly, this is important in BL, where recovery of patients with refractory or recurrent disease remains very poor. Long-term survival is only 10–20 % for refractory or relapse disease BL [27–29]. To achieve some therapeutic advancement, a better understanding of BL pathogenesis and additional therapeutic target discovery is mandatory. In this context, with the comprehension of low activity of NF- κ B in human BL as basis, Schmitz et al. and Sander et al. recently showed that PI3K/Akt pathway cooperates with c-Myc to provide the increased survival signal in BL development. In addition to PI3K/Akt activation, cyclin D3 mutations and $p16^{INK4a}$ promoter methylation counteract c-Myc-associated apoptotic effect. These results have directly actionable

Table 1 Geno Ontology (GO) and KEGG (hsa) terms significantly represented considering genes differentially expressed in VP-16 and NaB/VP-16 treatments vs untreated cells

Term	Genes	<i>p</i> value
hsa04115: p53 signaling pathway	CDKN1A, CCND1, FAS, CHEK2, MDM4, SESN2	5.84E–03
GO:0007049: cell cycle	YEATS4, CCPG1, CDC14A, CEP135, PIM1, SKP2, CHEK2, UBE2C, SESN2, DDIT3, MIS12, CCND1, CDKN1A, PLK3, DUSP1, DMTF1, PLK1, TFD2, PSMD2, TUBE1, HBPI, MDM4, CHFR, PPP1R15A	4.14E–03
GO:0010941: regulation of cell death	CEBPB, NOL3, SLC25A4, IL7, CEBPG, PIM1, LGALS12, SKP2, NFKBIA, TNFRSF8, NR4A1, HSPA1A, WRN, CHEK2, DDIT3, ATF5, CDKN1A, DUSP1, TIAM2, JUN, BIK, FAS, TNFAIP3, RASA1	7.40E–03

Table 2 Geno ontology (GO) terms significantly represented considering genes differentially expressed only in NaB/VP-16 treatment compared with untreated cells

Term	Genes	p value
GO:0006259 DNA metabolic process	KIF22, HMGB2, RAG1AP1, DBF4, MGMT, PML, CDC34, POLA2, XRCC1, OBFC2A, TK1, CDT1, CCNE2, CDKN2A, SLK, POLE3, ORC6L, POLN, FBXO4, PMS2CL, POLQ, PMS1, WDR33, RECQL5, RAD51AP1, USP1, TP53BP1, GINS4, NEIL1, RAD9B, APTX, SMC6, SIRT1, CDC25A, RAD51, TNKS1BP1, RNF8, PNKP, RECQL, CCDC111, VCP, RRM2, POLD2, TBRG1, TEP1, AICDA, NHEJ1	1.70E-03
GO:0006260 DNA replication	HMGB2, DBF4, GINS4, RAD9B, CDC34, POLA2, SIRT1, CDC25A, TK1, RAD51, CDT1, TNKS1BP1, CCNE2, PNKP, CCDC111, POLE3, RRM2, POLD2, ORC6L, TBRG1, POLN, POLQ	3.50E-03
GO:0006281 DNA repair	KIF22, HMGB2, MGMT, PML, OBFC2A, XRCC1, SLK, POLN, PMS2CL, POLQ, PMS1, WDR33, RAD51AP1, RECQL5, USP1, TP53BP1, NEIL1, APTX, SMC6, RAD9B, SIRT1, RAD51, RNF8, PNKP, RECQL, VCP, POLD2, NHEJ1	8.25E-03
GO:0006796 phosphate metabolic process	BCKDK, PRPF4B, EFNA1, SYNJ1, PINK1, TTK, AURKA, TIMM50, CLK1, FER, DMPK, NDUFS5, SLK, AAK1, PLA2G1B, PIK3CA, PAK1, ADAM9, MINPP1, DBNL, TRPM7, CDK8, PRKCH, PRKCE, CDKL3, CDKL5, SACM1L, MAP4K3, DDR1, ATP6V1A, PNKP, PRKD2, MAST2, MAPK8, TXK, RAGE, CSNK1G3, EIF2AK3, NEK6, NEK7, PRKCZ, MVD, ADORA2B, PPM1A, HK2, MAPKAPK3, PML, DUSP12, ATP5G1, NDUFB1, GALK1, MTM1, GNPTAB, PPP2CA, LMTK2, CAMK2B, MTMR6, PTPRC, LTK, PTPN2, RYK, PDK3, NADK, HGF, CDC25A, NDUFV3, PLK4, RPS6KA1, GMFG, SLC17A4, PTP4A1, ATP6V1E1, IKBKB, BMP7	1.43E-02

therapeutic implications [30]. Our recent data suggest that sodium butyrate potentiates apoptosis induced by cisplatin and VP-16 in BL cell lines [17]. In the present study, we evaluated whether the combination of HDACi and chemotherapy could prevent cell growth in BL by regulating PI3K/Akt. PI3K is activated by growth factors, which converts the plasma lipid PIP2 to the second messenger PIP3. This activation of PIP3 triggers Akt to phosphorylate downstream proteins affecting cell proliferation and survival [31].

We observed that the combination of NaB/VP-16 decreased cell proliferation and led to a strong G2/M arrest. As shown by our study and other research, HDACi not only induces growth inhibition, cell cycle arrest, and apoptosis of cancer cells but also increases the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic drugs [17, 32]. In our transcriptional analysis, cell growth inhibition was correlated to mRNA level alterations in a process involved in cell cycle arrest, such as p53-related genes, DNA repair, and phosphorylation, the latter

including the deregulation of PI3K. In evaluating protein levels, we found Akt dephosphorylation, which implies the involvement of PI3K/Akt pathway in this response. According to the hypothesis by Schmitz et al. and Sander

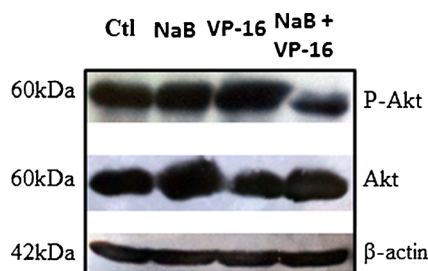


Fig. 4 Effect of the combined treatment on the Akt expression levels of Raji cells. The cells were treated with NaB 1.0 mM only or in combination with VP-16 0.1 μM. After 24 h, the levels of Akt phosphorylation was accessed using Western blotting. One representative experiment is shown

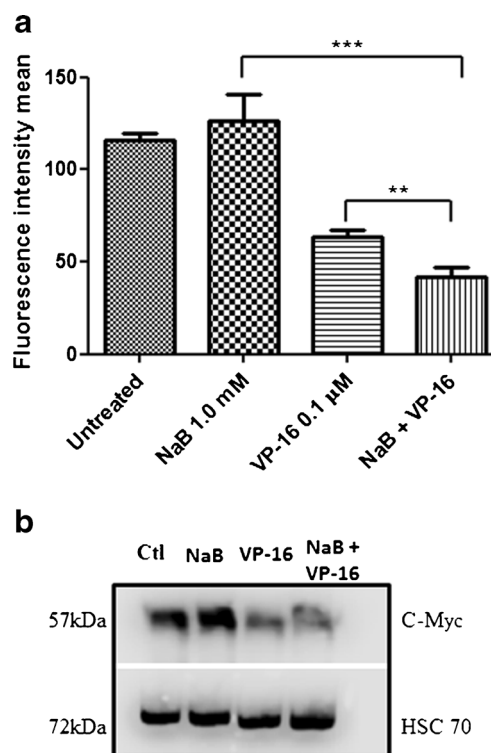
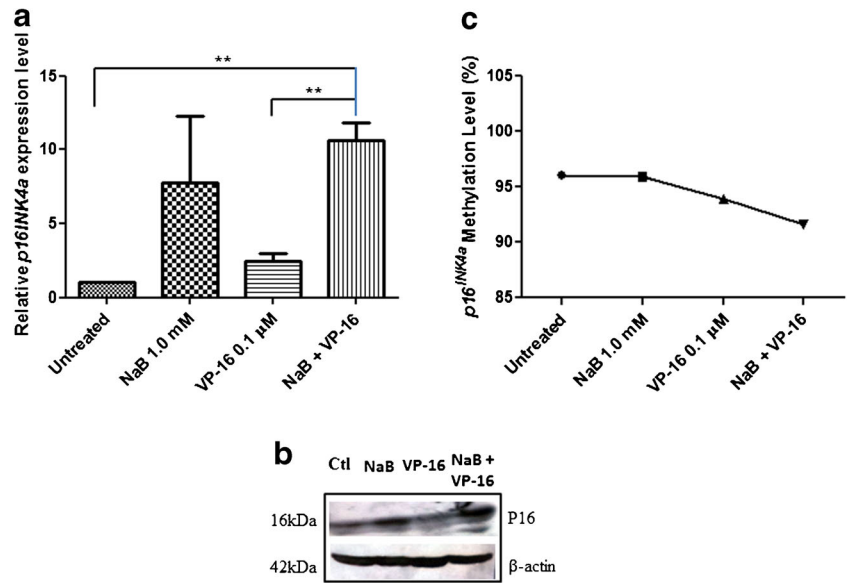


Fig. 5 c-Myc downregulation mediated by HDACi. The BL cell line Raji was treated with NaB 1.0 mM only or in combination with VP-16 0.1 μM. After 24 h, the c-Myc expression was accessed using flow cytometry (a) and confirmed by Western blotting (b). Significance versus single treatment: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

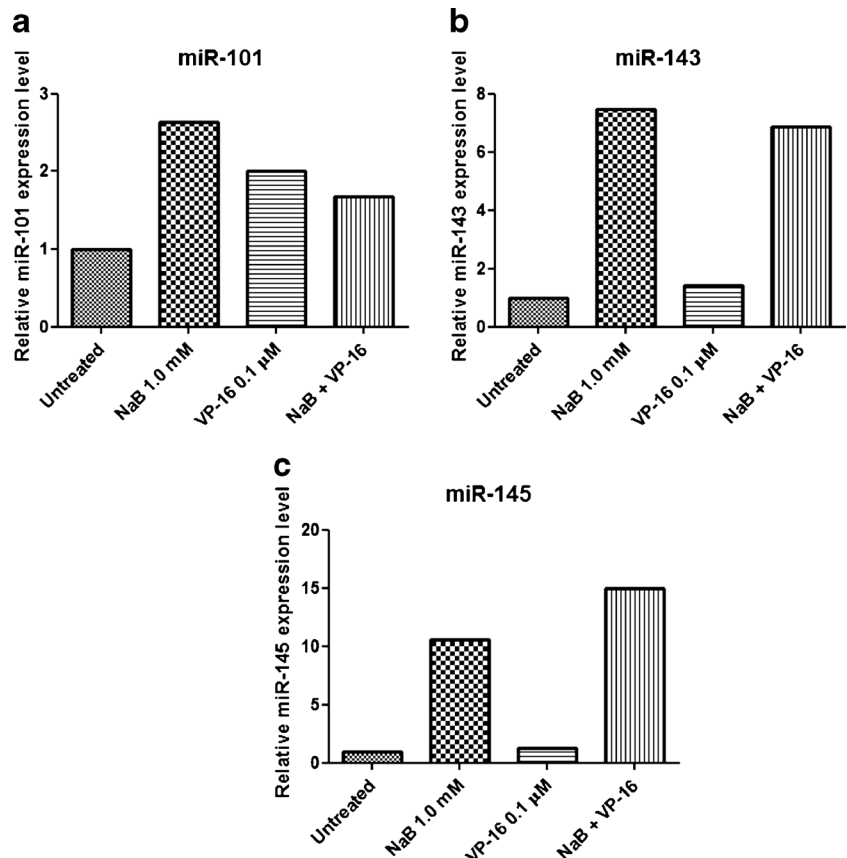
Fig. 6 Effect of the combined treatment on the *p16^{INK4a}* expression levels in Raji cells. Raji cells were treated with HDACi, NaB, and chemotherapy. *p16^{INK4a}* expression levels after the treatment were analyzed using qPCR (a) and protein levels using Western blotting (b). Methylation profile was accessed using pyrosequencing assay (c). Significance versus single treatment: ***p*<0.01



et al. [9, 10], c-Myc and PI3K/Akt pathway activation cooperates in BL tumorigenesis. We found a reduction of c-Myc protein expression mediated by NaB/VP-16 treatment in BL cells. Similar results were found by Guan et al., with demethylating agent decitabine, which represses translocated c-Myc oncogene in BL [33]. As reported previously, HDACi

has demethylating properties [34]. Here, we evaluated the percentage of methylation on *p16^{INK4a}* gene promoter and its alteration after treatment with HDACi. NaB/VP treatment could slightly decrease the percentage of *p16^{INK4a}* gene promoter methylation. However, an enhancement of *p16^{INK4a}* mRNA and protein levels was observed suggesting that the

Fig. 7 Effect of HDACi and VP-16 on miRNA expression. After 24 h of treatment, total miRNA was extracted, and miR-101 (a), miR-143 (b), and miR-145 (c) were amplified and analyzed using Taqman qPCR. Average of 2 independent experiments



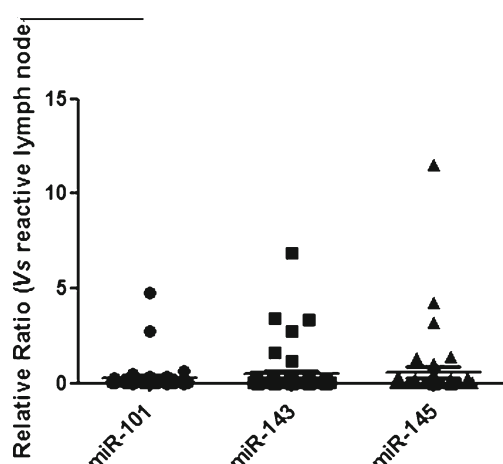


Fig. 8 miR-101, miR-143, and miR-145 expression profile of BL patients. miRNA of 46 cases of pediatric BL were isolated from FFPE tissue specimens. Expression of miR-101, miR-143, and miR-145 were evaluated using qPCR

effects of HDAC inhibitors are not limited to changes in histone acetylation but that they also cause a change in the state of DNA methylation.

According to Schwartz et al., NaB treatment induces $p16^{INK4a}$ expression and growth arrest of colon cancer cells [35]. Recent results of our group (data not shown) demonstrated a high occurrence of $p16^{INK4a}$ promoter methylation, comprising ~70 % of BL samples analyzed and reinforcing the role of $p16^{INK4a}$ inactivation in BL pathogenesis as previously reported by other studies [36].

Based on the premise that cellular growth inhibition depends on different cellular pathways involving both transcriptional and posttranscriptional regulation, we hypothesized that the combined treatment (NaB/VP-16) could also prevent cell growth through miRNAs that target genes involved in the PI3K/Akt pathway.

Micro RNA 145 (miR-145) belongs to a putative suppressor class of miRNAs because of its frequent underexpression in many types of tumors. Both miR-143 and miR-145 are located approximately 1.3 kb from each other at chromosome 5q33 [37]. In human normal tissues, miR-143 and miR-145 were found to be expressed but downregulated in colon cancers, gastric cancers, chronic lymphocytic leukemias, B-cell lymphomas, and several human cell lines [38–40].

More specifically, downregulation of miR-143 and miR-145 was demonstrated in B-cell malignancies, and miR-143 and miR-145 expression levels were consistently low in BL cell lines. In addition, transfection of the BL Raji cell line with precursor of mature miR-143 or miR-145 resulted in growth inhibition [40].

The most remarkable finding regarding miR-145 originated from the study by Sachdeva et al., who defined the role of miR-145 in the posttranscriptional regulation of c-Myc. miR-145 directly targeted the oncogene *c-Myc*, an event that can be dependent or independent of p53, if sufficient miR145 is present in the cell [41]. Furthermore, the study showed that

miR-145 is expressed in response to stress through the PI3K/Akt and p53 pathways. Therefore, our results reinforced the relation among miR145, c-Myc, and PI3K/AKT pathway in BL where the combination of NaB and VP-16 increased 14-fold miR-145 levels while enhancing the dephosphorylation of Akt protein at serine 473 and conversely reducing c-Myc expression levels. Remarkably, these effects were potentiated by the combination of HDACi and chemotherapy, a treatment strategy, which was also demonstrated previously to be linked to apoptosis induction [17].

Recent reports are suggesting miR-101 as a tumor suppressor involved in the invasion and growth inhibition [42–44]. miR-101 is also related to apoptosis induced by cisplatin in hepatocellular carcinoma cells [42]. Besides, miR-101 is downregulated in the lung [45], gastric [43], and BL tumors [46].

The present study observed an upregulation of miR-101 after HDACi treatment of BL cells corroborating with our previous data, which show the downregulation of MCL-1, which is predicted to be a miR-101 target, after the combined treatment [17]. In opposition, an extremely low expression of this miRNA in BL samples was observed, which is similar to a previously reported study [47].

Myc expression has been reported to be a dominant factor in the regulation of many mRNAs [46]. Among known Myc-regulated miRNAs in BL, miR-101 and miR-143 were downregulated six- and four-fold, respectively [47]. Those findings are consistent with our data, although it is unclear how the miR-101, miR-143, and miR-145 contribute to tumorigenesis in BL. Recent evidences in hematological malignancies as well as in various types of cancers show miRNA silencing mediated by aberrant promoter methylation [48, 49]. Based on the effect of HDACi observed in our study where HDACi treatment decreased $p16^{INK4a}$ methylation in Raji cell line, we suggested that miR-101, miR-143, and miR145 could be downregulated in BL due to promoter hypermethylation and HDACi acts indirectly through demethylation of these miRNAs, however further studies are necessary to confirm this hypothesis.

In conclusion, taking into account that PI3K/Akt signaling networks are upregulated in BL in cooperation with c-Myc and may represent potential target for combined therapy, the addition of targeted inhibitors can inhibit the rewiring of signaling networks and enhance chemosensitivity. On the other hand, epigenetic drugs including HDAC inhibitors in combination with other agents should be explored within clinical trials. Thus, novel approaches should emerge to improve treatment strategies to circumvent unresponsive BL patients.

Acknowledgments This work was supported by grants from INCT para Controle do Câncer: CNPq 573806/2008-0/FAPERJ E26/170.026/2008 and FAPERJ E-26/111330/2011.

Conflict of interest The authors have no financial gains to disclose.

References

- Gross TG, Temuhlen AM (2007) Pediatric non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Oncol Rep* 9(6):459–465
- Dang CV (2012) MYC on the path to cancer. *Cell* 149(1):22–35. doi:10.1016/j.cell.2012.03.003
- Klaproth K, Wirth T (2010) Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br J Haematol* 149(4):484–497. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08159.x
- Meyer N, Kim SS, Penn LZ (2006) The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol* 16(4):275–287. doi:10.1016/j.semcancer.2006.07.011
- Hecht JL, Aster JC (2000) Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 18(21):3707–3721
- Klumb CE, Furtado DR, de Resende LM, Carrico MK, Coelho AM, de Meis E, Maia RC, Rumjanek FD (2003) DNA sequence profile of TP53 gene mutations in childhood B-cell non-Hodgkin's lymphomas: prognostic implications. *Eur J Haematol* 71(2):81–90
- Paschos K, Parker GA, Watanatanasup E, White RE, Allday MJ (2012) BIM promoter directly targeted by EBNA3C in polycomb-mediated repression by EBV. *Nucleic Acids Res* 40(15):7233–7246. doi:10.1093/nar/gks391
- Paschos K, Smith P, Anderton E, Middeldorp JM, White RE, Allday MJ (2009) Epstein-Barr virus latency in B cells leads to epigenetic repression and CpG methylation of the tumour suppressor gene *Bim*. *PLoS Pathog* 5(6):e1000492. doi:10.1371/journal.ppat.1000492
- Sander S, Calado DP, Srinivasan L, Kochert K, Zhang B, Rosolowski M, Rodig SJ, Holzmann K, Stilgenbauer S, Siebert R, Bullinger L, Rajewsky K (2012) Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. *Cancer Cell* 22(2):167–179. doi:10.1016/j.ccr.2012.06.012
- Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, Jhavar S, Xiao W, Zhang M, Wright G, Shaffer AL, Hodson DJ, Buras E, Liu X, Powell J, Yang Y, Xu W, Zhao H, Kohlhammer H, Rosenwald A, Kluijn P, Muller-Hermelink HK, Ott G, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Olgwang MD, Reynolds SJ, Fisher RI, Brazier RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Pittaluga S, Wilson W, Waldmann TA, Rowe M, Mbulaiteye SM, Rickinson AB, Staudt LM (2012) Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 490(7418):116–120. doi:10.1038/nature11378
- Carnero A (2010) The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des* 16(1):34–44
- Rasul A, Ding C, Li X, Khan M, Yi F, Ali M, Ma T (2012) Dracorhodin perchlorate inhibits PI3K/Akt and NF-kappaB activation, up-regulates the expression of p53, and enhances apoptosis. *Apoptosis: Int J Programmed Cell Death* 17(10):1104–1119. doi:10.1007/s10495-012-0742-1
- Lee KB, Byun HJ, Park SH, Park CY, Lee SH, Rho SB (2012) CYR61 controls p53 and NF-kappaB expression through PI3K/Akt/mTOR pathways in carboplatin-induced ovarian cancer cells. *Cancer Lett* 315(1):86–95. doi:10.1016/j.canlet.2011.10.016
- Klangby U, Okan I, Magnusson KP, Wendland M, Lind P, Wiman KG (1998) p16/INK4a and p15/INK4b gene methylation and absence of p16/INK4a mRNA and protein expression in Burkitt's lymphoma. *Blood* 91(5):1680–1687
- de Yebenes VG, Bartolome-Izquierdo N, Ramiro AR (2013) Regulation of B-cell development and function by microRNAs. *Immunol Rev* 253(1):25–39. doi:10.1111/immr.12046
- Jansson MD, Lund AH (2012) MicroRNA and cancer. *Mol Oncol* 6(6):590–610. doi:10.1016/j.molonc.2012.09.006
- Dos Santos Ferreira AC, Fernandes RA, Kwee JK, Klumb CE (2012) Histone deacetylase inhibitor potentiates chemotherapy-induced apoptosis through *Bim* upregulation in Burkitt's lymphoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 138(2):317–325. doi:10.1007/s00432-011-1093-y
- Vasiljevic N, Wu K, Brentnall AR, Kim DC, Thorat MA, Kudahetti SC, Mao X, Xue L, Yu Y, Shaw GL, Beltran L, Lu YJ, Berney DM, Cuzick J, Lorincz AT (2011) Absolute quantitation of DNA methylation of 28 candidate genes in prostate cancer using pyrosequencing. *Dis Markers* 30(4):151–161. doi:10.3233/DMA-2011-0790
- Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK (2005) Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 5(12):921–929. doi:10.1038/nrc1753
- Ou JN, Torrisani J, Unterberger A, Provencal N, Shikimi K, Karimi M, Ekstrom TJ, Szyf M (2007) Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 73(9):1297–1307. doi:10.1016/j.bcp.2006.12.032
- Crump M, Coiffier B, Jacobsen ED, Sun L, Ricker JL, Xie H, Frankel SR, Randolph SS, Cheson BD (2008) Phase II trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in relapsed diffuse large-B-cell lymphoma. *Ann Oncol: Off J Eur Soc Med Oncol/ESMO* 19(5):964–969. doi:10.1093/annonc/mdn031
- Tan J, Cang S, Ma Y, Petrillo RL, Liu D (2010) Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *J Hematol Oncol* 3:5. doi:10.1186/1756-8722-3-5
- Siegel D, Hussein M, Belani C, Robert F, Galanis E, Richon VM, Garcia-Vargas J, Sanz-Rodriguez C, Rizvi S (2009) Vorinostat in solid and hematologic malignancies. *J Hematol Oncol* 2:31. doi:10.1186/1756-8722-2-31
- Atra A, Gerrard M, Hobson R, Imeson JD, Hann IM, Pinkerton CR (2001) Outcome of relapsed or refractory childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma treated with the UKCCSG 9003/9002 protocols. *Br J Haematol* 112(4):965–968
- Cairo MS, Spoto R, Perkins SL, Meadows AT, Hoover-Regan ML, Anderson JR, Siegel SE, Lones MA, Tedeschi-Blok N, Kadin ME, Kjeldsberg CR, Wilson JF, Sanger W, Morris E, Krailo MD, Finlay JL (2003) Burkitt's and Burkitt-like lymphoma in children and adolescents: a review of the Children's Cancer Group experience. *Br J Haematol* 120(4):660–670
- Griffin TC, Weitzman S, Weinstein H, Chang M, Cairo M, Hutchison R, Shiramizu B, Wiley J, Woods D, Barnich M, Gross TG (2009) A study of rituximab and ifosfamide, carboplatin, and etoposide chemotherapy in children with recurrent/refractory B-cell (CD20+) non-Hodgkin lymphoma and mature B-cell acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 52(2):177–181. doi:10.1002/pbc.21753
- Lambert MP, Herceg Z (2008) Epigenetics and cancer, 2nd IARC meeting, Lyon, France, 6 and 7 December 2007. *Mol Oncol* 2(1):33–40. doi:10.1016/j.molonc.2008.03.005
- Shao W, Growney JD, Feng Y, O'Connor G, Pu M, Zhu W, Yao YM, Kwon P, Fawell S, Atadja P (2010) Activity of deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in cutaneous T-cell lymphoma models: defining molecular mechanisms of resistance. *Int J Cancer J Int Du Cancer* 127(9):2199–2208. doi:10.1002/ijc.25218
- Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Sanchez-Gonzalez B, Yang H, Rosner G, Verstovsek S, Rytting M, Wierda WG, Ravandi F, Koller C, Xiao L, Faderl S, Estrov Z, Cortes J, O'Brien S, Estey E, Bueso-Ramos C, Fiorentino J, Jabbour E, Issa JP (2006) Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood* 108(10):3271–3279. doi:10.1182/blood-2006-03-009142
- Dominguez-Sola D, Dalla-Favera R (2012) Burkitt lymphoma: much more than MYC. *Cancer Cell* 22(2):141–142. doi:10.1016/j.ccr.2012.07.018
- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296(5573):1655–1657. doi:10.1126/science.296.5573.1655

32. Jasek E, Lis GJ, Jasinska M, Jurkowska H, Litwin JA (2012) Effect of histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid on etoposide-induced apoptosis in leukemia cells. *Anticancer Res* 32(7):2791–2799
33. Guan H, Xie L, Klapproth K, Weitzer CD, Wirth T, Ushmorov A (2013) Decitabine represses translocated MYC oncogene in Burkitt lymphoma. *J Pathol* 229(5):775–783. doi:10.1002/path.4164
34. Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, Szyf M (2007) Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis* 28(3):560–571. doi:10.1093/carcin/bgl167
35. Schwartz B, Avivi-Green C, Polak-Charcon S (1998) Sodium butyrate induces retinoblastoma protein dephosphorylation, p16 expression and growth arrest of colon cancer cells. *Mol Cell Biochem* 188(1–2):21–30
36. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA (2003) Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 101(4):1220–1235. doi:10.1182/blood-2002-07-2009
37. Iio A, Nakagawa Y, Hirata I, Naoe T, Akao Y (2010) Identification of non-coding RNAs embracing microRNA-143/145 cluster. *Mol Cancer* 9:136. doi:10.1186/1476-4598-9-136
38. Di Lisio L, Sanchez-Beato M, Gomez-Lopez G, Rodriguez ME, Montes-Moreno S, Mollejo M, Menarguez J, Martinez MA, Alves FJ, Pisano DG, Piris MA, Martinez N (2012) MicroRNA signatures in B-cell lymphomas. *Blood Cancer J* 2(2):e57. doi:10.1038/bcj.2012.1
39. Akao Y, Nakagawa Y, Hirata I, Iio A, Itoh T, Kojima K, Nakashima R, Kitade Y, Naoe T (2010) Role of anti-oncomirs miR-143 and -145 in human colorectal tumors. *Cancer Gene Ther* 17(6):398–408. doi:10.1038/cgt.2009.88
40. Akao Y, Nakagawa Y, Kitade Y, Kinoshita T, Naoe T (2007) Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies. *Cancer Sci* 98(12):1914–1920. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00618.x
41. Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V, Kumar S, Elble R, Watabe K, Mo YY (2009) p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9):3207–3212. doi:10.1073/pnas.0808042106
42. He XP, Shao Y, Li XL, Xu W, Chen GS, Sun HH, Xu HC, Xu X, Tang D, Zheng XF, Xue YP, Huang GC, Sun WH (2012) Downregulation of miR-101 in gastric cancer correlates with cyclooxygenase-2 overexpression and tumor growth. *FEBS J* 279(22):4201–4212. doi:10.1111/febs.12013
43. Wang HJ, Ruan HJ, He XJ, Ma YY, Jiang XT, Xia YJ, Ye ZY, Tao HQ (2010) MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. *Eur J Cancer* 46(12):2295–2303. doi:10.1016/j.ejca.2010.05.012
44. Smits M, Nilsson J, Mir SE, van der Stoop PM, Hulleman E, Niers JM, de Witt Hamer PC, Marquez VE, Cloos J, Krichevsky AM, Noske DP, Tannous BA, Wurdinger T (2010) miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. *Oncotarget* 1(8):710–720
45. Cho HM, Jeon HS, Lee SY, Jeong KJ, Park SY, Lee HY, Lee JU, Kim JH, Kwon SJ, Choi E, Na MJ, Kang J, Son JW (2011) microRNA-101 inhibits lung cancer invasion through the regulation of enhancer of zeste homolog 2. *Exp Ther Med* 2(5):963–967. doi:10.3892/etm.2011.284
46. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT (2008) Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 40(1):43–50. doi:10.1038/ng.2007.30
47. Robertus JL, Kluiver J, Weggemans C, Harms G, Reijmers RM, Swart Y, Kok K, Rosati S, Schuurin E, van Imhoff G, Pals ST, Kluin P, van den Berg A (2010) MiRNA profiling in B non-Hodgkin lymphoma: a MYC-related miRNA profile characterizes Burkitt lymphoma. *Br J Haematol* 149(6):896–899. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08111.x
48. Chim CS, Wong KY, Qi Y, Loong F, Lam WL, Wong LG, Jin DY, Costello JF, Liang R (2010) Epigenetic inactivation of the miR-34a in hematological malignancies. *Carcinogenesis* 31(4):745–750. doi:10.1093/carcin/bgq033
49. Bueno MJ, Perez de Castro I, Gomez de Cedron M, Santos J, Calin GA, Cigudosa JC, Croce CM, Fernandez-Piqueras J, Malumbres M (2008) Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* 13(6):496–506. doi:10.1016/j.ccr.2008.04.018