

MAÍRA DE AZEVEDO FEITOSA ARAUJO

Caracterização e análise de expressão do gene *SMYD5* em câncer de mama e tecidos normais

BRASÍLIA, 2013

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MAÍRA DE AZEVEDO FEITOSA ARAUJO

Caracterização e análise de expressão do gene *SMYD5* em câncer de mama e tecidos normais

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pittella Silva

Brasília
2013

MAÍRA DE AZEVEDO FEITOSA ARAUJO

Caracterização e análise de expressão do gene *SMYD5* em câncer de mama e tecidos normais

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 18/01/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Pittela Silva - (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Otávio de Toledo Nóbrega
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Rosangela Vieira de Andrade
Universidade Católica de Brasília

Profa. Dra. Marie Togashi
Universidade de Brasília

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é
alguém que acredite que ele possa ser realizado.”

Roberto Shinyashiki

AGRADECIMENTOS

Não foram poucos os obstáculos que existiram ao longo da incrível jornada que foi este mestrado. Este trabalho não apenas é feito de conhecimento científico, mas de amizade e do apoio de pessoas maravilhosas que conheci ao longo desta caminhada. Sem elas, essa vitória não existiria.

Agradeço primeiramente a Deus, que me concedeu paciência e manteve minha serenidade ao longo desta longa jornada.

Ao professor Fábio, por ter confiado este sonho a mim e por ter insistido em mim quando as coisas ficaram difíceis.

Às professoras Andréa e Marie, pelas lições, conselhos, experiência, discussões, risadas, chocolates e skittles.

Às professoras Angélica e Adriana, pelos desabafos e pelo carinho.

À minha mãe, pelo perpétuo incentivo. Pelo apoio incondicional, por ter creditado e acreditado em mim.

Aos meus irmãos Tailine, Thamiris e Matheus, pela paciência nos momentos difíceis e pelo entendimento da ausência necessária.

Ao Paulo, porque sem ele talvez eu não tivesse começado e certamente não teria chegado ao final desta grande vitória. Pelos momentos de carinho, conforto, apoio incondicional e pela experiência do *Academy way of life*.

À Carolina Amaro, por ter sido minha companheira de guerra nesta difícil campanha.

À Dora, por toda a paciência e por todos os sorrisos.

Ao João Nunes, por toda a experiência e conspiração compartilhada.

À todos os PMC FRIENDS, atuais ou não! Luana, Raul, Luciana, Rubens, Martha, Brenno, Igor, Clara... Essa tese é a primeira de muitos do nosso grupo.

À Laurinha e ao Alisson, por terem me apoiado nestes dois anos mesmo quando não pude me fazer presente.

À todos os amigos do FARMOL, em especial ao Alexandre e à Carol Lourenço, à Beatriz, à Mariella, à Flora, à Cíntia, à Olívia, ao Pedro, à Carine e à Michella.

À Thalita e ao Danilo, do VIROMOL, pelos ônibus perdidos e a amizade ganha.

À Luciene Lobão, chefe, amiga e cúmplice.

RESUMO

O câncer é descrito como uma doença que é desencadeada por fatores genéticos e epigenéticos. Dentre as manifestações epigenéticas ligadas à carcinogênese a desregulação nas modificações pós-traducionais que ocorrem nas caudas das histonas tem um papel de grande importância. Vários são os tipos de modificações que podem ocorrer e vários são os sítios a serem modificados, entre eles a metilação em resíduos de lisina. As metiltransferases de lisina são um grupo de enzimas que contem um domínio SET, o qual catalisa a adição de grupos metila em resíduos de lisina. Inicialmente, as metiltransferases de lisina foram identificadas como específicas para substratos de histonas, mas estudos posteriores mostraram que estas enzimas também metilam outras proteínas que não-histonas. A família SMYD de metiltransferases consiste no agrupamento de cinco proteínas que apresentam em sua estrutura ambos os domínios SET e MYND. Ainda que os membros desta família (SMYD1 a SMYD5) ainda não tenham sido completamente caracterizados, já foi descrito que expressões aberrantes de algumas destas proteínas estão ligadas à progressão tumoral de diversos tecidos como colorretal, fígado e mama. O SMYD5 foi recentemente descrito como fator importante na atividade inflamatória de macrófagos, mas seu papel na tumorigênese não foi investigado. Seguindo o perfil de outros membros da família SMYD, no presente trabalho investigamos uma possível relação do SMYD5 como o câncer de mama. Foi constatado que o *SMYD5* está *downregulado* em todas as linhagens de células de câncer de mama estudadas. Ainda, observamos que ele se encontra frequentemente hipoexpresso em amostras de câncer de mama. Entretanto, experimentos de knockdown ou superexpressão do *SMYD5* não mostraram efeito significativo na proliferação celular *in vitro*. Revelamos que o SMYD5 está localizado em ambos núcleo e citoplasma e apresenta-se progressivamente menos presente em tecidos tumorais, quando comparado com tecido normal de mama. Os resultados sugerem uma forte ligação entre a baixa expressão do *SMYD5* e o estado maligno da mama e o apontam como um potencial supressor tumoral no contexto mamário. Estudos posteriores ajudarão na compreensão dos mecanismos envolvidos na relação do SMYD5 com o câncer de mama.

Palavras-chave: Metiltransferase de lisina, SMYD5, câncer de mama.

ABSTRACT

Cancer is described as a disease triggered by genetic and epigenetic factors. Within epigenetic manifestations linked to carcinogenesis there are the post translational modifications that occur at histone tails. Several modification types may occur and several sites can be modified, amongst them there is the methylation at lysine residues. Lysine methyltransferases are a group of enzymes containing a SET domain, responsible for catalysing the addition of methyl groups at lysine residues. Early on, lysine methyltransferases were thought to be histone substrate specific, but further studies have shown these enzymes to be capable of methylating other non-histone proteins. The SMYD family of methyltransferases consists in five proteins that present both the SET and MYND domains within their structure. Even if members of this family (SMYD 1-5) are yet to be completely characterized, it has been described that aberrant expressions of some of these family members are linked to tumor progression in various tissues, such as colorectal, liver and breast. SMYD 5 has recently been described as an important factor in inflammatory activity mediated by macrophages, but its part in tumorigenesis had not been investigated thus far. Following the profile for other members of the SMYD family, in the present study a possible relation between SMYD5 and breast cancer has been sought. It was found that *SMYD5* is downregulated in all breast cancer cell lines studied. In addition, it is also frequently hypoexpressed in clinical breast cancer samples. However, its knockdown or super expression has had no effect on *in vitro* cellular proliferation. We showed that SMYD5 is located in both the nucleus and cytoplasm and it is also progressively less present in carcinogenic tissues, if compared to regular breast tissue. The results suggest a strong link between *SMYD5* low expression states and malignant breast and points it towards to a potential tumor suppressor role in breast context. Further studies will help in understanding the mechanisms involved in the relationship between SMYD5 and breast cancer.

Keywords: Lysine methyltransferase, SMYD5, breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Os seis *Hallmarks* do câncer
- Figura 2 – Estrutura do nucleossomo
- Figura 3 – Representação esquemática do gene e da proteína SMYD5
- Figura 4 – Alinhamento dos domínios MYND dos cinco membros da família SMYD
- Figura 5 – Resumo esquemático da ação do SMYD5 em promotores de genes-alvo de TRL4 em macrófagos
- Figura 6 – Construções utilizadas
- Figura 7 – Resumo esquemático do método de transfecção por Lipofectamina™ 2000
- Figura 8 – Resumo esquemático do método de seleção clonal
- Figura 9 – Esquema mostrando a captação dos fragmentos de amostras clínicas
- Figura 10 – Resumo esquemático do processamento de amostras clínicas para análise de expressão de *SMYD5* por qPCR
- Figura 11 – Etapas da clonagem do plasmídeo pCMV-SMYD5-Entry
- Figura 12 – Padronização da concentração de antibiótico a ser usado para seleção de células transfectadas – HEK-293 com G418
- Figura 13 – Padronização da concentração de antibiótico a ser usado para seleção de células transfectadas – MDA-MB-231 com puomicina
- Figura 14 – PCR semi-quantitativo de RNA extraído de células HEK-293 e de clones estáveis expressando plasmídeos pCMV6-Entry, vazio (MOCK) e com o inserto codificador do SMYD5.
- Figura 15 – Leitura das células HEK-293 transfectadas em FACS (FL-1)
- Figura 16 – Ensaio de MTT mostrando os efeitos da superexpressão do *SMYD5* na linhagem celular não-cancerígena, HEK-293
- Figura 17 – Avaliação do efeito da superexpressão do gene SMYD5 através da transfecção do plasmídeo pCMV6-AC-SMYD5-GFP em linhagem celular não-cancerígena, HEK-293.
- Figura 18 – Leitura das células MDA-MB-231 transfectadas em FACS (FL-1)
- Figura 19 – Ensaio de MTT mostrando os efeitos do *knockdown* do *SMYD5* na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231

Figura 20 – Avaliação do efeito da inibição de expressão do gene *SMYD5* através da transfecção do plasmídeo shRNApGFP-V-RS na linhagem celular de câncer de mama, MDA-MB-231.

Figura 21 – PCR semi-quantitativo de RNA extraído de células MDA-MB-231 e de clones estáveis expressando plasmídeos shRNApGFP-V-RS

Figura 22 – Sublocalização celular do *SMYD5* em células HeLa

Figura 23 – Expressão relativa do *SMYD5* em tecidos humanos normais

Figura 24 – Expressão relativa do *SMYD5* em linhagens de celulares de câncer de mama

Figura 25 – Expressão relativa do *SMYD5* em linhagens de celulares de câncer de mama.

Figura 26 – Expressão relativa do *SMYD5* em amostras clínicas de câncer de mama

Figura 27 – Expressão relativa do *SMYD5* em amostras clínicas de câncer de mama confrontados em teste-T para amostras independentes

Figura 28 – Distribuição tecidual do *SMYD5*

Figura 29 – Dados da expressão gênica de 56 tumores de mama do banco de dados Oncomine foram analisados

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modificações pós-traducionais que ocorrem nas caudas das histonas

Tabela 2 – Metiltransferases e seus sítios de ação catalítica

Tabela 3 – Mudanças globais na metilação de histonas em vários tipos de câncer

Tabela 4 – Alguns exemplos de metiltransferases que apresentam como substratos alternativos proteínas não-histonas

Tabela 5 – Seqüências inibidoras do *SMYD5* nos seis plasmídeos adquiridos para ensaio de inibição de expressão do *SMYD5*

Tabela 6 – Plasmídeos usados com suas respectivas marcas de seleção

Tabela 7 – Características clínicas e histopatológicas de amostras de câncer de mama obtidos em hospitais da região central de Brasília

Tabela 8 – Características das linhagens celulares de câncer de mama

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementar
Cerb-B2	Receptor do crescimento epidérmico HER2/neu
CM	Câncer de mama
CO ₂	Dióxido de carbono
C _T	<i>Cycle threshold</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FACS	<i>Fluorescence Activated CellSorter</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H3K27	Lisina 27 da histona 3
H3K36	Lisina 36 da histona 3
H3K4	Lisina 4 da histona 3
H3K79	Lisina 79 da histona 3
H3K9	Lisina 9 da histona 3
H4K20	Lisina 20 da histona 4
H4K20me3	Trimetilação da lisina 20 da histona 4
H4K5	Lisina 5 da histona 4
HBDF	Hospital de Base do Distrito Federal
Hme1	Monometilação de histidina
HMTase	Metiltransferase de histona
HUB	Hospital Universitário de Brasília
I.D.	Intestino delgado
Kme1	Monometilação de lisina
Kme2	Dimetilação de lisina
Kme3	Trimetilação de lisina
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeos
MPT	Modificações pós-traducionais
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PRMT	Família de metiltransferases de arginina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo (em tempo real)
RE	Receptor de estrógeno
Rme1	Monometilação de arginina
Rme2a	Dimetilação assimétrica de arginina
Rme2s	Dimetilação simétrica de arginina
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de progesterona
RQ	Quantificação relativa
SFB	Soro fetal bovino
shRNA	RNA <i>short hairpin</i>
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
UnB	Universidade de Brasília
ΔC_T	Média do C_T do gene alvo normalizado com a média do C_T de um gene endógeno
$\Delta\Delta C_T$	ΔC_T da amostra de interesse calibrado com o ΔC_T de uma amostra controle

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Câncer e epigenética	15
1.2 Epigenética e modificações pós traducionais em histonas	19
1.3 Metiltransferases de histona	22
1.4 A família SMYD	25
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. MÉTODOS	32
3.1 Linhagens celulares	32
3.2 Construções utilizadas.....	32
3.2.1 Construções adquiridas junto a empresa Origene ®.....	32
3.2.2 Subclonagem do SMYD5 no vetor pCMV6-Entry	34
3.2.3 Obtenção do vetor pCMV6-Entry sem insertos	36
3.3 Transfecção de linhagens celulares.....	36
3.4 Seleção das células transfectadas.....	37
3.4.1 Seleção de células estáveis	37
3.4.2 FACS.....	38
3.4.3 Seleção clonal	38
3.5 Ensaio de MTT	39
3.6 Ensaio de Giemsa.....	40
3.7 Ensaio de localização subcelular.....	41
3.8 Template de tecidos normais humanos para qPCR.....	42
3.9 Implicações éticas.....	42
3.10 Obtenção de amostras clínicas de mama normal e tumoral	43
3.11 Extração de RNA	43
3.12 Síntese de cDNA e qualificação da extração	44
3.13 PCR quantitativo (Qpcr).....	44
3.14 Análise dos dados de qPCR.....	45
3.15 Ensaio de imunohistoquímica	46
4. RESULTADOS	47

4.1 Obtenção de clones plasmidiais	47
4.1.1 Digestão dos plasmídeos para clonagem em novo vetor	47
4.1.2 Confirmação de clonagem	47
4.2 Definição de concentração de antibiótico a ser usado para seleção celular pós transfecção plasmidial	48
4.3 Avaliação dos efeitos de superexpressão e inibição de expressão de SMYD5 in vitro	50
4.3.1 Efeitos da superexpressão do <i>SMYD5</i> em HEK-293	50
4.3.2 Efeitos do knockdown do <i>SMYD5</i> na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231	53
4.4 Sublocalização do SMYD5 no contexto celular	56
4.5 Perfil de expressão do <i>SMYD5</i> nos diversos tecidos humanos	57
4.6 Perfil de expressão do <i>SMYD5</i> em linhagens de célula de câncer de mama	58
4.7 Perfil de expressão de <i>SMYD5</i> em amostras clínicas de câncer de mama	60
4.8 Imunohistoquímica de SMYD5 em tecido de câncer de mama	63
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8. ANEXOS.....	80
8.1 ANEXO I – CEP 025/09.....	80
8.2 ANEXO II – TCLE.....	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de mama

O câncer da mama (CM) é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres. Em todo mundo, aproximadamente 1,3 milhões de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama e 458 mil chegam a óbito todo ano, o que representa 13,7% das causas de morte provocadas por câncer, excluindo-se tumores de pele não-melanoma (1). Em 2012, esperam-se, para o Brasil, 52.680 casos novos de câncer da mama, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres; para o Distrito Federal, espera-se 880 novos casos. Sem considerar os tumores da pele não melanoma, esse tipo de câncer é o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste (69/100 mil), Sul (65/100 mil), Centro-Oeste (48/100 mil) e Nordeste (32/100 mil). Na região Norte é o segundo tumor mais incidente (19/100 mil) (2).

A carcinogênese emerge através do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas; estas permitem às células libertarem-se da intrincada rede de controles que regulam o equilíbrio homeostático entre proliferação e morte celular (3, 4).

Depois de um quarto de século de rápidos avanços, a pesquisa em câncer gerou um rico e complexo corpo de conhecimento (5-12). Em uma tentativa de simplificar uma literatura demasiadamente complicada, Hanahan e Weinberg propuseram em 2000 os *hallmarks* do câncer. Estas características compreendem seis capacidades biológicas adquiridas durante as várias etapas do desenvolvimento de tumores humanos. Os *hallmarks* constituem um princípio organizador para racionalizar as complexidades da doença neoplásica. Elas incluem: a 1) manutenção da sinalização proliferativa, levando a proliferação crônica de células, sendo a proliferação desenfreada a mais fundamental das características de células cancerígenas; a 2) inibição de supressores de crescimento; a 3) resistência à morte celular, permitindo a 4) imortalidade replicativa; a 5) indução da angiogênese, sem a qual o tumor não teria como se nutrir, evitando assim sua progressão, e a 6) ativação de invasão e metástase, que ocorre em tumores malignos (4) (figura 1).

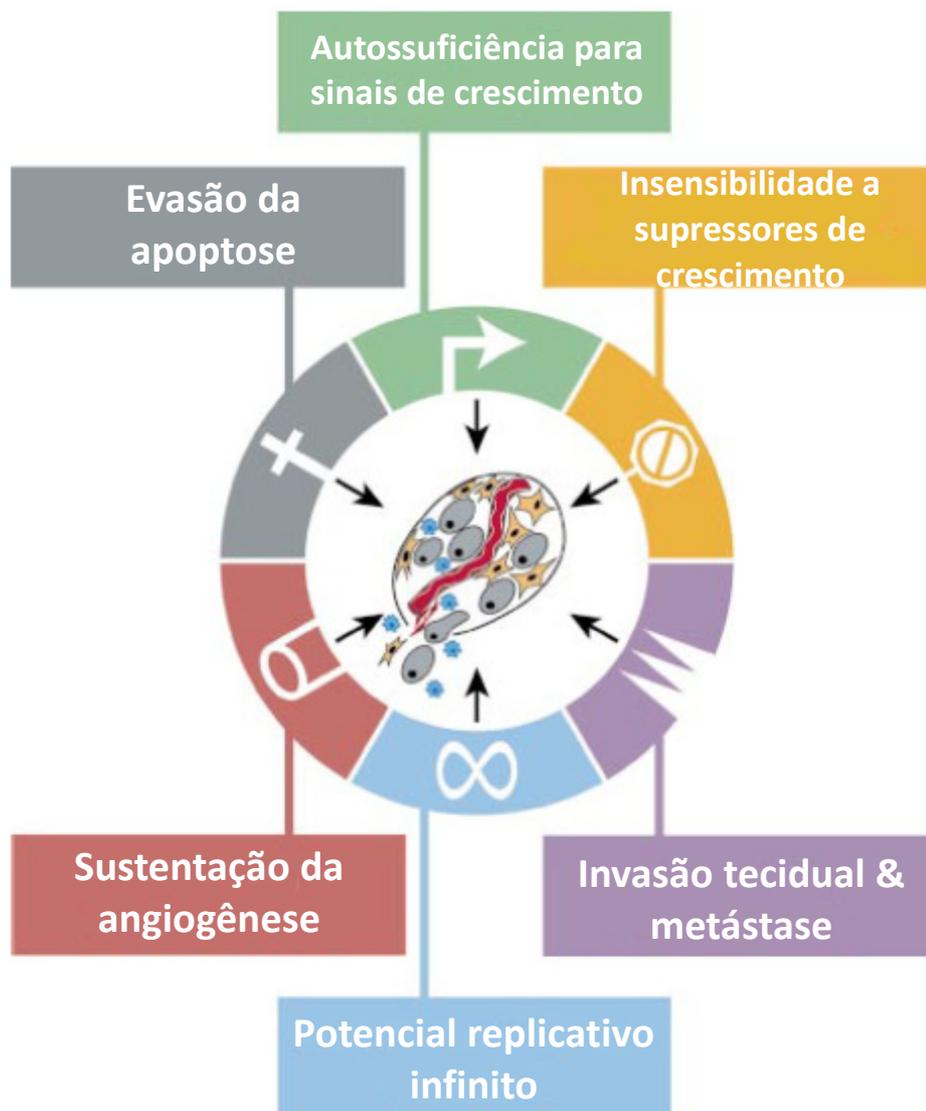


Figura 1 - As seis características adquiridas do câncer, propostas por Hanahan e Weinberg em 2000. Foi sugerido que a maioria – se não todos – dos cânceres tem adquirido o mesmo conjunto de capacidades funcionais durante seu desenvolvimento, embora que através de várias estratégias diferentes. Adaptado de (4).

Os tumores (ou neoplasias) podem ser tanto benignos (localizados, não-invasivos) como malignos (invasivos, metastáticos) (13). O termo *câncer* é usado para a designação de tumores/neoplasias de característica maligna. As metástases semeadas pelos tumores malignos são as maiores falhas no tratamento do câncer e são responsáveis por quase todos os óbitos causados por esta malignidade (14,15). O progresso conceitual da última década adicionou ainda duas características emergentes de generalidade potencial para a lista de caracterização do câncer

proposta em 2000: reprogramação do metabolismo energético e escape do sistema imunológico (16).

O câncer, de um modo geral, é uma das principais causas de morte no mundo e foi responsável por 7,6 milhões dos óbitos (cerca de 13% de todas as mortes) ocorridos em 2008. Os principais tipos de câncer que causam maior mortalidade são: 1) pulmão (1,37 milhão de mortes), 2) estômago (736 000 mortes), 3) fígado (695 000 mortes), 4) colorretal (608 000 mortes), 5) mama (458 000 mortes) e 6) câncer cervical (275 000 mortes). Os óbitos causados pelo câncer em todo o mundo têm a tendência de continuar a aumentar e estima-se que esse número será maior que 13 milhões em 2030 (15).

A explicação para o crescente aumento na incidência está na maior exposição dos indivíduos a fatores de risco para câncer. A redefinição dos padrões de vida, a partir da uniformização das condições de trabalho, nutrição e consumo, desencadeada pelo processo global de industrialização, tem reflexos importantes no perfil epidemiológico das populações. As alterações demográficas, com redução das taxas de mortalidade de natalidade, indicam o prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional, levando ao aumento da incidência de doenças crônico-degenerativas, especialmente cardiovasculares e o câncer. O câncer constitui, assim, problema de saúde pública mundial (17).

O câncer de mama vem sendo amplamente estudado e, a despeito da grande quantidade de pesquisas já conduzidas sobre a patologia, sua etiologia ainda não está totalmente esclarecida, sendo a mesma atribuída a uma interação de fatores que, de certa forma, são considerados determinantes no desenvolvimento da doença (18-20). Juntamente com idade, história de câncer de mama familiar é provavelmente o fator de risco mais conhecido e cientificamente comprovado.

A história familiar de CM está associada a um aumento de risco de duas vezes ou mais para o desenvolvimento desta neoplasia, se o afetado é um parente de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) cujo CM desenvolveu-se antes dos 50 anos; quanto mais cedo o parente desenvolveu CM, maior o risco. Apesar de importante, CM familiar corresponde a apenas 5-10% do total de casos de CM. Genes identificados como de grande importância no contexto de CM são o BRCA1 e BRCA2, p53 e PTEN (2, 21).

Como para muitas doenças, idade é um fator de risco bem documentado para o CM (2, 21). Observa-se que as taxas de incidência de CM aumentam com a idade,

dobrando a cada 10 anos até a menopausa, quando a taxa de incidência diminui drasticamente. Fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher também já estão bem estabelecidos, como menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, idade da primeira gestação acima dos 30 anos (aumentando ainda mais quando esta gestação é acima dos 35 anos), uso de contraceptivos orais e uso terapia de reposição hormonal. Além desses, também já estão bem definidos como fatores de risco no desenvolvimento desta neoplasia a exposição à radiação ionizante (particularmente quando na formação rápida da mama), doença de mama benigna prévia, e fatores relacionados com estilo de vida, como dieta (existe correlação entre a incidência de câncer de mama e dieta rica em gordura), peso (obesidade está associado com aumento de CM pós-menopausa), ingestão de álcool (2, 20) e sedentarismo (21).

Apesar de ser considerado um câncer dotado de relativo bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados (2).

Estudos têm evidenciado que o diagnóstico e o tratamento precoce do câncer de mama podem reduzir mortalidade específica. Em uma revisão sistemática, atrasos de três a seis meses entre o sintoma inicial e o tratamento adjuvante foram claramente associados com a diminuição da taxa de sobrevivência destes pacientes (22). A sobrevida média após cinco anos na população de países desenvolvidos tem apresentado um discreto aumento, cerca de 85%. Entretanto, nos países em desenvolvimento, a sobrevida fica em torno de 60%. (2). O CM é, portanto, um problema de saúde pública mundial.

A identificação de novos marcadores que possam ser utilizados não só no diagnóstico do CM, assim como novos alvos moleculares para abordagens terapêuticas se faz importante, uma vez que podem levar a diagnósticos mais precisos e precoces, bem como a um tratamento menos invasivo e mais eficiente.

O crescente número de trabalhos recentes relatando falhas tanto nos processos de metilação do DNA quanto de modificações de histona em diversos tipos tumorais enfatiza fortemente a importância dos processos epigenéticos no desenvolvimento do câncer. Sendo o câncer uma doença genética e epigenética, alterações epigenéticas têm sido descritas em praticamente todos os tipos tumorais, entre eles,

câncer de colón, endométrio, hepáticos, do sistema nervoso, de mama, esôfago, bexiga, de pele, leucemias, entre outras (23).

1.2. Epigenética e modificações pós-traducionais em histonas

Alterações genéticas e epigenéticas são os acontecimentos chave do câncer e desencadeiam funções aberrantes da expressão genética e da estabilidade genômica. (3, 24). A epigenética é definida como alterações da expressão gênica, provocadas por mecanismos independentes de modificações na sequência primária do DNA, que são herdadas durante a divisão celular (25, 26).

Os mecanismos epigenéticos são observados como os parâmetros flexíveis do genoma capazes de serem alterados em face de diversos estímulos (27). O conjunto das modificações epigenéticas, tratado como “epigenoma”, é característico a cada tipo celular e fornece mecanismos à diversidade e diferenciação, por meio da regulação da acessibilidade da informação genética para a maquinaria celular. (28, 29). A herança epigenética inclui a metilação do DNA, modificações pós traducionais em histonas e silenciamento mediado por RNA, e juntos representam mecanismos essenciais que permitem a propagação estável de estados de atividade gênica a partir de uma geração de células para outra (24).

Em contraste com lesões genéticas, mudanças epigenéticas na cromatina são, em sua maioria, bioquimicamente reversíveis e envolvem alterações na estrutura e função através de modificações pós-traducionais (MPT) de proteínas histonas (24, 30-32). Esta característica reversível justifica o interesse em decifrar os caminhos regulatórios envolvidos na estabilização e manutenção de estruturas da cromatina em células cancerígenas e em suas contrapartes normais, pois sendo reversíveis, são passíveis de mudança para o estado fisiológico através de tratamento alvo-molecular.

Sabe-se que nos núcleos de todos os organismos eucarióticos, o material genômico apresenta-se altamente compactado por proteínas histonas e não-histonas, num polímero dinâmico chamado de cromatina. O correto processo de desenvolvimento de qualquer organismo requer a estabilização e a manutenção de padrões da expressão gênica; esta atividade genômica é dependente da viabilidade do repertório de fatores de transcrição e do nível de empacotamento do DNA dentro da cromatina. Regiões altamente condensadas da cromatina, as heterocromatinas,

são ditas como regiões inertes à transcrição; regiões apenas razoavelmente condensadas e, portanto, transcricionalmente ativas, são chamadas de eucromatina. Proteínas envolvidas na regulação da estrutura da cromatina atuam, portanto, como importantes determinantes no processo de desenvolvimento (33-35).

Os distintos níveis de organização da cromatina são dependentes da organização das unidades fundamentais da cromatina, os nucleossomos. Um nucleossomo consiste em 147 pares de base de DNA que envolvem por aproximadamente duas vezes um núcleo proteico constituído das proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4), organizadas em um octâmero (um tetrâmero de H3-H4 e dois dímeros de H2A-H2B) (33, 36). As histonas são proteínas de caráter básico, constituídas de um domínio globular e um N-terminal mais flexível e carregado (cauda da histona), que se projeta para fora do nucleossomo. É no domínio N-terminal das histonas formadoras de cada octâmero que as diversas modificações químicas acontecem (figura 2) (34, 37).

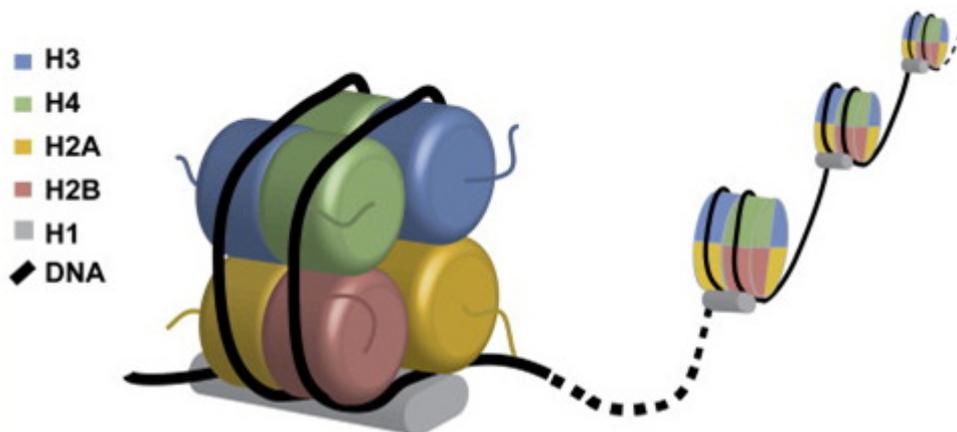


Figura 2 - Estrutura do nucleossomo. Cento e quarenta e sete pares de bases de DNA estão envolvidas num octâmero formado pelas histonas H2A, H2B, H3 e H4. A histona H1 sela o octâmero separando cada unidade de um nucleossomo de outro. As extremidade N-terminal de cada histona formadora dos núcleos ficam expostas e estão sujeitas a modificações pós-traducionais. Adaptado de HAMON; CORSART, 2008 (39).

Desde os estudos pioneiros de Allfrey e colaboradores na década de 1960 (39), sabe-se que histonas podem ser modificadas pós-traducionalmente. Um *insight* de como essas modificações poderiam afetar a estrutura da cromatina surgiu no trabalho de Luger e colegas (1997) através da resolução da estrutura da cromatina por raios-X de alta resolução (40). Hoje se sabe que ações enzimáticas pós-

transcricionais nas caudas das histonas resultam em modificações altamente complexas, alterando as interações não-covalentes dentro e entre os nucleossomos. Estas modificações afetam a estrutura da cromatina e têm o potencial tanto para ativar quanto para reprimir a transcrição de determinado segmento genômico, através da "abertura" ou do "fechamento" dos locais de ancoragem da maquinaria de transcrição ou da modificação da "identificação" destes locais pela mesma maquinaria. Esta regulação epigenética depende do tipo de modificação química, do nível desta modificação e do sítio a ser modificado na histona. A esta regulação, dá-se o nome de o "Código das Histonas" (34, 35, 37, 41, 42). Várias são classes e os níveis de modificações de histona descritas (45, 46), estando explicitadas na tabela 1.

Tabela 1 – Modificações pós-traducionais que ocorrem nas caudas das histonas

Tipo de Modificação	Nomenclatura
Acetilação	K-ac
Metilação (lisina)	K-me1, K-me2, K-me3
Metilação (arginina)	R-me1, R-me2s, R-me2a
Fosforilação (serina e treonina)	S-ph, T-ph
Fosforilação (tirosina)	Y-ph
Ubiquitinação	K-ub
Sumoilação	K-su
Ribosilação ADP	E-ar
Deiminação	R → Cit
Isomeração de prolina	P-cis ↔ P-trans
Crotonilação	K-cr
Propionilação	K-pr
Buirilação	K-bu
Formilação	K-fo
Hidroxilação	Y-oh
O-GlcAcilação	S-GlcNAc; T-GlcNAc

Legenda: me1, monometilação; me2, dimetilação; me3, trimetilação; me2s, dimetilação simétrica; me2a, dimetilação assimétrica; e Cit, citrulina. Adaptado de Dawson; Kouzirades, 2012 (44).

A informação transmitida por meio das modificações epigenéticas desempenha um papel crítico na regulação de todos os processos baseados no DNA, como transcrição, reparo no DNA e replicação. Conseqüentemente, padrões de expressão anormais ou alterações genômicas em reguladores da cromatina podem ter resultados profundos e pode levar à indução e manutenção de vários cânceres (29, 31, 47-51).

1.3. Metiltransferases de histonas

A metilação na cauda das histonas pode ocorrer em todos os resíduos básicos de aminoácidos: lisinas (L), argininas (R) e histidinas (H). As lisinas podem ser monometiladas (Kme1), dimetiladas (Kme2) ou trimetiladas (Kme3). Argininas podem ser monometiladas (Rme1) e dimetiladas simetricamente (Rme2s) ou assimetricamente (Rme2a). As histidinas foram reportadas estando monometiladas (Hme1), apesar de esta metilação ser um evento aparentemente raro e ainda não estar totalmente caracterizada (52). As complexidades nos tipos e níveis de metilação fornecem à esta MPT um potencial regulatório de grande importância uma vez que cada evento tem um efeito específico na estrutura da cromatina e na interação de proteínas regulatórias com a cromatina (53).

A ação enzimática de adição de grupos metila a resíduos de histonas é catalisada pelas chamadas Metiltransferases de Histonas (do inglês, *Histone Methyltransferase* - HMTase) e essa reação catalítica é feita através da transferência de grupos metil (CH₃) dos doadores s-adenosilmetionina (SAM) (54, 55). As HMTase podem ser separadas em 3 grandes grupos: (A) proteínas contendo o domínio SET e (B) proteínas DOT1-*like*, que metilam resíduos de lisina, e (C) a família de metiltransferases de arginina (do inglês, *protein arginine N-methyltransferase* - PRMT) , que foi descrita como responsável pela metilação prioritária de argininas (55). Os principais sítios de metilação, juntamente com seu nível de modificação e enzima responsável pela atividade catalítica estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Metiltransferases e seus sítios de ação catalítica.

Sítio de metilação	me3	me2	me1
H3R2	*	CARM1	CARM1
		PRMT6	PRMT6
		PRMT5	PRMT5
		PRMT7	PRMT7
H3K4	SETD1A	SETD1A	SETD1A
	SETD1B	SETD1B	SETD1B
	ASH1L	MLL	ASH1L
	MLL	MLL2	MLL
	MLL2	MLL3	MLL2
	MLL3	MLL4	MLL3
	MLL4	SMYD3	MLL4
	SMYD3		SETD7
	PRMD9		
H3R8	*	PRMT5	PRMT5
H3K9	SUV39H1	SUV39H1	SETDB1
	SUV39H2	SUV39H2	G9a
	SETDB1	SETDB1	EHMT1
	PRMD2	G9a	PRDM2
		EHMT1	
		PRDM2	
H3R17	*	CARM1	CARM1
H3R26	*	CARM1	CARM1
H3K27	EZH2	EZH2	*
	EZH1	EZH1	
H3K36	SETD2	NSD3	SETD2
		NSD2	NSD3
		NSD1	NSD2
		SMYD2	NSD1
		SETD2	
H3K79	DOT1L	DOT1L	DOT1L
H4R3	*	PRMT1	PRMT1
		PRMT6	PRMT6
		PRMT5	PRMT5
		PRMT7	PRMT7
H4K20	SUV420H1	SUV420H1	SETD8
	SUV420H2	SUV420H2	
	SMYD5		

Legenda: As metiltransferases de histona para vários resíduos de lisina (K) e arginina (R) estão indicadas nas colunas pelo nível de metilação (trimetilação – me3, dimetilação – me2 e monometilação – me1). Algumas metiltransferases estabelecem preferencialmente dimetilação assimétrica (me2a) ou simétrica (me2s). Adaptado de Greer, 2012 (45).

Em geral, a metilação na lisina 4 da histona 3 (H3K4), H3K36, e H3K79 está relacionada à ativação gênica, enquanto a di- e trimetilação em H3K9, H3K27 e H4K20 estão relacionadas ao silenciamento gênico. A metilação de lisina também foi descrita estando modulando outros processos relacionados à cromatina, como replicação, recombinação e reparo de DNA (42, 56, 57-62).

Muitas linhas de evidência sugerem que metilação aberrante de histonas pode ter papel na carcinogênese (24, 47, 63, 64). Estudos iniciais (45) mostraram que mudanças globais nos níveis de metilação de histona estão relacionadas ao aumento da recorrência de câncer e baixa sobrevida dos pacientes (tabela 3).

Tabela 3 – Mudanças globais na metilação de histonas em vários tipos de câncer

Tipo de Câncer	Alteração da MPT	Consequência
Câncer de próstata	↓ H3K4me2	Aumento de recorrência
	↓ H4K2me2	Aumento de recorrência
Câncer de pulmão	↓ H3K4me2	Piora na sobrevida
Câncer de Rim	↓ H3K4me2	Piora na sobrevida
Câncer de mama	↓ H3K4me2	Piora na sobrevida
	↓H3K27me3	Piora na sobrevida
	↓H4R3me2	Piores resultados clínicos
	↓H4K20me3	Piores resultados clínicos
Câncer pancreático	↓ H3K4me2	Piora na sobrevida
	↓ H3K9me2	Piora na sobrevida
	↓H3K27me3	Piora na sobrevida
Adenocarcinoma gástrico	↑H3K9me3	Piora na sobrevida
Câncer ovariano	↓H3K27me3	Piora na sobrevida
Linfomas	↓H4K20me3	Associado com
Adenocarcinoma de cólon	↓H4K20me3	Associado com

Legenda: Estudos correlacionados reportam padrões de metilação de histona alterados em tipos específicos de câncer. As setas indicam se a mudança na metilação encontra-se aumentada (↑) ou diminuída (↓) em cada estado patológico. Em alguns casos são encontradas múltiplas marcas de metilação. Adaptado de Greer, 2012 (45).

Além de sua função como metiltransferases de histona, foi demonstrado que algumas proteínas que contém o domínio SET também podem modificar proteínas não-histonas. Exemplos desta atividade são a metilação de p53 e de TAF-10 (*TATA-binding protein associated factor*) pela SET7/9 (65, 66). Alguns outros exemplos

estão listados na tabela 4. A diversidade de substratos associados à cromatina e não associados à mesma constitui um desafio importante para a nossa compreensão dos mecanismos pelos quais estas enzimas executam as suas funções biológicas (45).

Tabela 4 – Alguns exemplos de metiltransferases que apresentam como substratos alternativos proteínas não-histonas

Metiltransferase	Substrato	
	Histona	Não-histona
G9a/EHMT2	H3K9me2	p53, G9a, C/EBPb, Reptin, RARa, DNMT1,
NSD1	H3K36me2	NFkB
SMYD2	H3K36me2	p53, RB
SMYD3	H3K4me2/me3 H4K20me3 H4K5	VEGFR
SET8	H4K20me1	p53
SET7/9	H3K4me1	p53, TAF7, TAF10, ERa, AR, DNMT1, NFkB, PCAF, RB, E2F1, STAT3, Tat

Adaptado de Zhang, 2012 (56).

A literatura atual fornece cada vez mais evidências que sugerem que os eventos de metilação de histonas desempenham um papel causal na tumorigênese, transformando-os, portanto, em potenciais biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico ou alvo molecular de drogas (45, 47-52, 58, 62-64).

1.4. A família SMYD

O interesse na família SMYD de metiltransferases aumentou significativamente depois que recentes publicações apontaram membros desta família como importantes fatores ligados à carcinogênese em diversos tecidos (47).

A família SMYD consiste de 5 proteínas (SMYD 1-5) que ainda não foram completamente caracterizadas. O agrupamento dessas proteínas nessa família é baseado na presença de um domínio SET e um domínio MYND. O domínio MYND é um *zinc finger motif* que está envolvido em interações proteína-proteína e é definida

por sete resíduos de cisteína conservados e um único resíduo de histidina que são arranjados em um consenso C4-C2HC. Foi assim nomeado porque *myeloid*, *nervy* e *DEAF-1* são as mais bem caracterizadas proteínas que contem o domínio MYND. Já o domínio SET é uma sequência evolucionariamente conservada, cuja função é a adição de grupos metila. Seu nome é derivado das três proteínas nas quais foi inicialmente caracterizado: *Suv* (var) 3-9, *Enhancer-of-zeste* e *Trithorax*. (67).

O primeiro gene da família SMYD a ser descrito foi o gene *SMYD1*. Em 2002, Gottlieb e Colegas demonstrou que o *knockdown* seletivo do gene *SMYD1* provocou maturação cardiomiocítica prejudicada, morfogênese cardíaca com falhas e mortalidade embriônica em camundongos. Funcionalmente, o *SMYD1* regula a expressão gênica promovendo a metilação da H3K4 e por meio de sua associação com a atividade de deacetilase em histonas (68).

O gene *SMYD3* foi o segundo membro da família SMYD a ser descrito, o que ocorreu somente no ano de 2004. O *SMYD3* foi o primeiro gene codificador de metiltransferase de lisina a ser comprovadamente ligado à carcinogênese (69). O gene *SMYD3* codifica uma metiltransferase de histona (HMTase) e primeiramente foi descrito como atuando especificamente na lisina 4 da histona 3 (H3K4). Ele está frequentemente superexpresso nos cânceres colorretal, de fígado e de mama, influenciando diretamente na hiperproliferação destas linhagens celulares (69, 70). O *SMYD3* promove a di- e tri-metilação deste sítio e sua atividade é aumentada significativamente quando associado à proteína *heatshock 90α* (HSP90α). Além disso, em 2008, Pittella Silva *et. al.* descreveram que a clivagem dos 34 primeiros aminoácidos da região amino-terminal da proteína *SMYD3* ocorre em células cancerígenas e contribui sobremaneira para o aumento de sua atividade enzimática (71). Análises da região *upstream* do gene *SMYD3* possibilitaram a identificação de elementos ligadores de E2F1 na região promotora do *SMYD3*, e foi constatado que sua expressão foi reforçada pelo aumento de E2F1, que frequentemente está ativado no câncer humano (72).

Interessantemente, investigações subsequentes sobre o *SMYD3* evidenciaram que esta metiltransferase possui outros alvos de metilação em histonas além do primeiro identificado por Hamamoto e colaboradores (2004). Foreman e colaboradores (2011) fizeram um estudo dos perfis funcional e estrutural do *SMYD3* e descreveu a atuação do *SMYD3* na trimetilação da lisina 20 da histona

H4 (73). Ainda, recentemente foi descrito por Van Aller e colegas (2012) que o SMYD3 também atua na metilação em H4K5 (74).

Além de seus sítios em histona, foi relatado que, assim como já descrito para outras proteínas que contém o domínio SET, o SMYD3 também metila proteínas não-histona. Foi descrito por Kunizaki *et. al.* (2007) que a metilação de VEGFR1 na lisina 831, catalisada pelo SMYD3, aumentou sua atividade de cinase, modulando sua função (75).

O primeiro trabalho descrevendo a metiltransferase SMD2 foi descrito apenas no ano de 2006 (76). O SMYD2 regula a atividade da p53 através da metilação da lys-370, o que reprime a regulação transcricional mediada pela p53. (77). Outras proteínas não-histona que são alvo do SMYD2 são o supressor de tumor RB, que é metilado na lisina 380 (78), e a proteína citoplasmática Hsp90, que, em humanos, é metilada na lisina 615 (79). Com relação à atividade de metiltransferase nos resíduos de histona, Brown e colaboradores (2006) mostraram que diferentemente do primeiro sítio de catálise descrito para SMYD1 e -3, o SMYD2 metila a lisina 36 da histona H3, e que sua expressão exógena inibiu a proliferação celular da linhagem NIH3T3 (76).

O *SMYD4* foi descrito no ano de 2009 como um potencial supressor de tumor no desenvolvimento de câncer de mama. Foi sugerido que uma translocação que resulta na falha em um dos alelos do gene *SMYD4*, situado no cromossomo 17, leva a tumorigênese. Revelou-se ainda que o *platelet-derived growth factor receptor α* (Pdgfr- α), molécula altamente expressa em células tumorais, tinha expressão reduzida na presença de *SMYD4* (80).

Estes dados abrem precedência para a importância da ação das enzimas da família *SMYD*, não apenas como reguladoras da transcrição, operando na orquestra do envelhecimento da cromatina, como também para potenciais reguladores de sinais celulares por meio da metilação proteica.

O SMYD5 é o quinto membro da família SMYD de metiltransferases. Pouco se sabe a respeito desta proteína que apenas recentemente teve publicada a sua primeira caracterização, em contexto de atividade inflamatória. Sobre esta metiltransferase, o produto proteico de SMYD5 é evolucionariamente conservado de drosófilas a humanos (81). Sabe-se que o gene desta metiltransferase está localizado em 2p13.2, possui uma sequência genômica de aproximadamente 13 kb,

com 13 éxons e 12 íntrons. O mRNA do SMYD5 possui 2585 pares de bases, originando uma proteína de 418 aminoácidos (figura 3) (81).

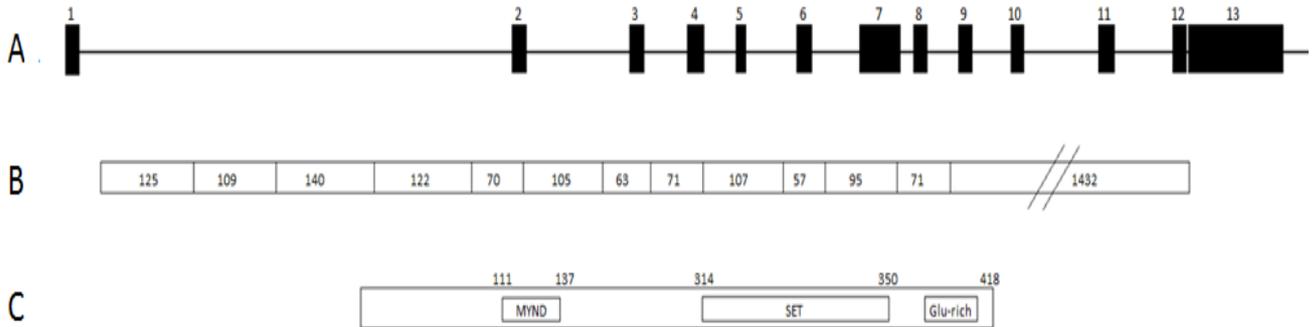


Figura 3 - Representação esquemática do gene e da proteína do SMYD5. (A) Transcrito: Os boxes negros denotam os éxons do gene; o número acima de cada éxons os classificam.; (B) mRNA maduro: os números dentro de cada éxon indicam o tamanho de cada um em nucleotídeos.; (C) Proteína: a posição de cada domínio está indicada dentro de cada boxe. A figura foi construída seguindo a descrição obtida nos bancos de dados NCBI [81] e UniProt [82].

Foi realizada uma busca de identificação entre o SMYD5 e os outros membros de sua família; constatou-se que o este tem maior identidade com SMYD4. Fazendo a comparação por domínios, o domínio SET teve 41% de identidade com SMYD2, sendo seguido por SMYD3 (35%), SMYD1 (30%) e SMYD4 (26% - SMYD4 obteve o menor score) (82). Já o domínio MYND não apresentou grande identidade com o restante da família SMYD (82). Não havendo identidade relevante entre o domínio MYND do SMYD5 com os demais membros de sua família, e utilizando-se do mecanismo oferecido pelo UniProt, buscou-se a sequência de todos os domínios MYND e foi feita uma comparação manual, que é evidenciada na figura abaixo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
SMYD1	C	H	T	C	F	K	R	Q	E	K	L	H	R	C	G	Q	C	K	F	A	H	Y	C	D	R	T	C	Q	K	D	A	W	L	N	H	K	N	E	C	
SMYD2	C	E	Y	C	F	T	R	K	E	G	L	S	K	C	G	R	C	K	Q	A	F	Y	C	N	V	E	C	Q	K	E	D	W	P	M	H	K	L	E	C	
SMYD3	C	D	R	C	L	L	G	K	E	K	L	M	R	C	S	Q	C	R	V	A	K	Y	C	S	A	K	C	Q	K	K	A	W	P	D	H	K	R	E	C	
SMYD4	C	H	R	C	L	K	H	T	L	A	T	V	P	C	D	G	C	S	Y	A	K	Y	C	S	Q	E	C	L	Q	Q	A	W	E	L	Y	H	R	T	E	C
SMYD5	P	E	L	C	T	V	R	K	D	L	H	Q	N	C	P	H	C	Q	V	M	Y	C	S	A	E	C	R	L	A	A	T	E	Q	Y	H	Q	V	L	C	

Figura 4 - Alinhamento dos domínios MYND dos cinco membros da família SMYD. Observa-se que o domínio MYND do SMYD5 difere do domínio dos outros membros desta família, com a falta da primeira cisteína no domínio.

O domínio MYND é definido por sete resíduos de cisteína conservados e um único resíduo de histidina que são arrançados em um consenso C4-C2HC. O

domínio MYND do SMYD5 difere desta definição clássica, apresentando em seu segmento, C3-C2-HC. Outra característica interessante do SMYD5 é que a sequência da proteína codificadora apresenta um domínio rico em ácido glutâmico (figura 3), o que dá um caráter ácido à proteína.

Recentemente, Stender e colegas (2012) descreveram o *loco* de atividade catalítica do SMYD5. Segundo seu estudo, o SMYD5 é o responsável pela trimetilação de H4K20 e que através de sua associação com complexo correpessor NCoR mantém a repressão da transcrição gênica em promotores de genes-alvo de *toll-like receptor 4* (TLR4) em macrófagos (figura 5) (83). Apesar deste recente relato sobre a atividade do SMYD5, não há informações sobre o comportamento deste gene em estados malignos de células.

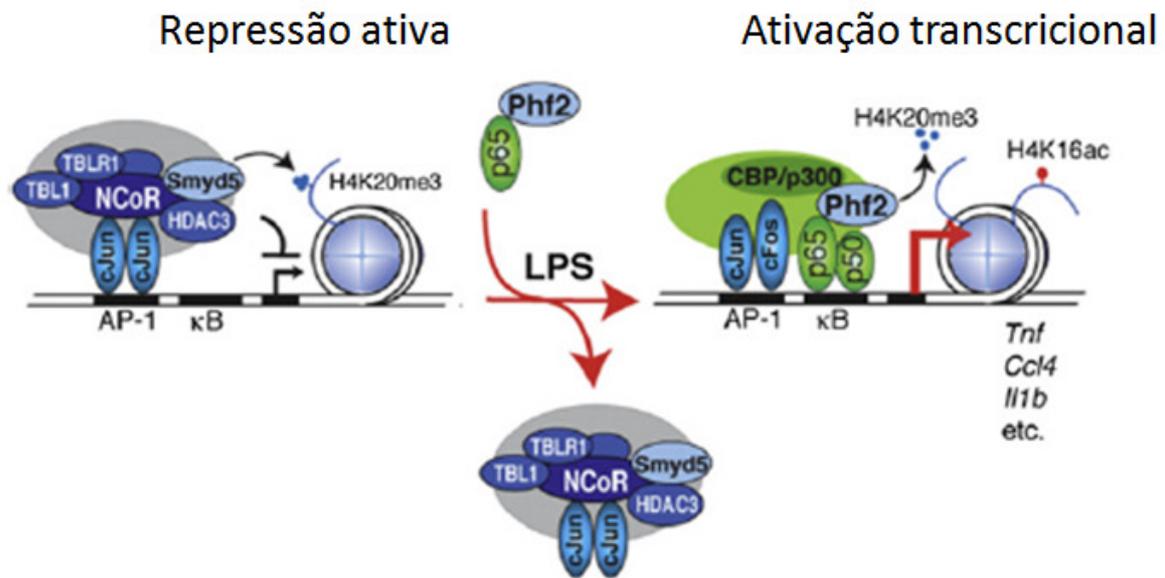


Figura 5 - Resumo esquemático da ação do SMYD5 descrita por Stender e colegas em 2012 (83). O SMYD5, junto ao complexo correpessor NCoR, tem a função de manter a repressão transcricional através da trimetilação da lisina 20 da histona 4 em promotores de genes-alvo de TLR4. Na presença de LPS, há o estímulo para o desacoplamento do complexo correpessor dos sítios promotores. Como consequência, dentre outros, há a perda da trimetilação de H4K20, levando à transcrição gênica.

A investigação do perfil de expressão do *SMYD5* em carcinomas de mama se faz importante devido às expressões desreguladas neste carcinoma

anteriormente descrita para outros genes da superfamília de metiltransferase (84-88) e da família SMYD (70-72, 77, 78, 80, 88).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Os objetivos deste projeto consistem na caracterização da expressão gênica e da funcionalidade do *SMYD5*, bem como na elucidação de possível relação deste com o câncer de mama.

2.2. Objetivos específicos

- Obter linhagens estáveis superexpressando *SMYD5* e expressando shRNAs para o *knockdown* de *SMYD5*;
- Estudar o perfil de proliferação das linhagens transformadas;
- Caracterizar a localização subcelular da proteína *SMYD5* através da transfecção deste gene em fusão com o gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP);
- Avaliar o nível de mRNA que codifica *SMYD5* nos diversos tecidos humanos por meio de PCR em Tempo Real;
- Comparar o perfil transcricional do gene *SMYD5* entre linhagens de células de câncer de mama e tecido mamário normal por meio de PCR em Tempo Real;
- Extrair mRNA de amostras clínicas de câncer de mama, bem como de suas contrapartes normais, e sintetizar o cDNA de cada amostra;
- Comparar o perfil transcricional do gene *SMYD5* entre amostras clínicas de câncer de mama e tecido mamário normal por meio de PCR em Tempo Real;

3. MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares

As seguintes linhagens celulares foram usadas neste trabalho: HCC-1954, CAMA-1, SKBR3, MDA-MB-231 e MDA-MB-436 e MDA-MB-458 gentilmente cedidas pela Dra. Ana Maria Camargo Aranha (Instituto Ludwig para pesquisa de Câncer – São Paulo); e HCC-1954, MCF-7 e MDA-231, obtidos pelo *American Type Culture Collection* (ATCC). Também foram usadas as linhagens celulares de HeLa, doadas pela Dra. Marie Togashi (Laboratório de Farmacologia Molecular, UnB) e de HEK-293, providenciadas pela Dra. Galina Pinzul, Instituto de Biologia, UnB. As células foram cultivadas em *Dulbecco's modified Eagle's medium* (Gibco; Life Technologies - Carlsbad, CA, USA) suplementado com 5mM de bicarbonato de sódio, 100 unidades/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina (Life Technologies) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cripion Biotecnologia Ltda.) (DMEM completo) à 37°C, na estufa úmida com 5% CO₂. Para transfecção usando Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen - Carlsbad, CA, USA), as células eram cultivadas em DMEM sem a adição alguma de antibióticos; para a seleção de células transfectadas, DMEM completo foi suplementado através da adição de puomicina na concentração de 0,5 µg/µL ou Geneticina (G418 - Gibco; Life Technologies - Carlsbad, CA, USA) na concentração de 700 µg/µL, de acordo com a marca de seleção do plasmídeo transfectado.

3.2. Construções utilizadas

3.2.1. Construções adquiridas junto a empresa Origene®

A construção contendo a sequência codificadora do SMYD5 (número de acesso: NM_006062.2) clonada no vetor *Precision Shuttle* pCMV6-AC-GFP foi obtida da empresa Origene®. Adicionalmente, outras ORFs de genes humanos de interesse para nosso grupo, clonadas no vetor pCMV6-Entry, também foram adquiridas na mesma empresa. O plasmídeo pCMV6-AC-GFP, possui a seqüência codificadora da proteína verde fluorescente (do inglês, *green fluorescent protein* -

GFP) fusionada a cauda carboxi-terminal da seqüência codificadora do SMYD5 (Figura 6 A). Já nas construções pCMV6-Entry-Vector há epítomos de MYC e DDK na porção C-terminal à seqüência da proteína de interesse (Figura 6 B). Ambos os plasmídeos citados acima apresentam o promotor e *enhancer* do gene 1 precoce imediato do citomegalovírus humano (HCMV). Além disso, ambos possuem similaridade nas seqüência no sítio múltiplo de clonagem, característica esta que possibilita a transferência das seqüência clonadas entre os vetores.

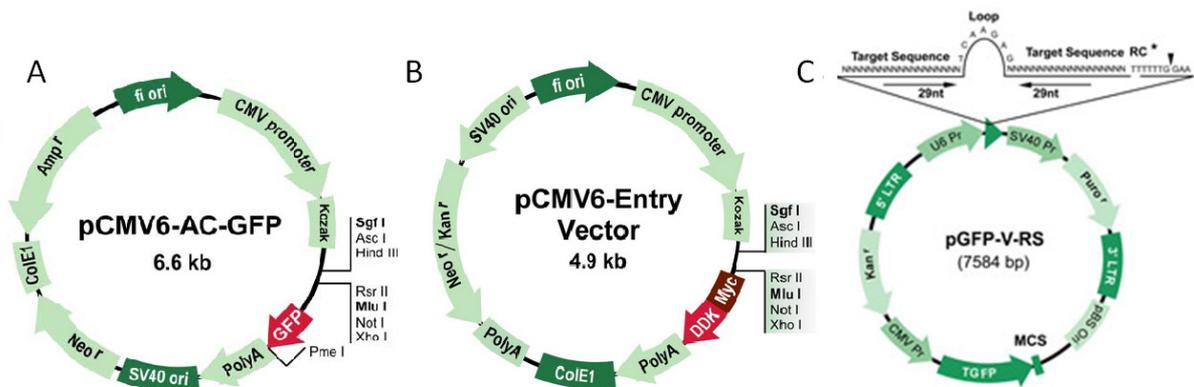


Figura 6 - Construções utilizadas. A) pCMV6-AC-GFP foi adquirido com o inserto do SMYD5 fusionado ao GFP em sua porção N-terminal; B) Construção obtida pelo grupo com o inserto codificador da proteína SMYD4; C) Plasmídeos shRNApGFP-V-RS, usados para silenciamento do gene SMYD5. C).

Em adição, 6 construções para o estabelecimento de células estáveis apresentando reduzida expressão de SMYD5 também foram obtidos da Origene® (Figura 6 C). Dentre eles: quatro plasmídeos shRNApGFP-V-RS (30001-4) possuindo distintas seqüências de 29 nucleotídeos similares a seqüência de SMYD5, bem como, o vetor *scrambled* contendo uma seqüência inespecífica (30013), e um vetor vazio (ausência de seqüência codificadora - 30007). Estas construções apresentam a expressão do RNA *short-hairpin* sob o controle do promotor U6. Além disso, apresentam expressão de GFP sob controle do promotor constitutivo (HCMV). No quadro abaixo estão dispostas as seqüências “inibidoras” de cada plasmídeo:

Tabela 5 - Sequências inibidoras do *SMYD5* nos seis plasmídeos adquiridos para ensaio de inibição de expressão do *SMYD5*

Plasmídeos	Sequências
30007	Controle negativo não efetivo – vetor vazio
30013	Controle negativo não efetivo <i>scrambled</i> do cacete shRNA do plasmídeo GFP-V-RS
30001	ACCTGAGACTGCAAGCATCATGTTGATGG
30002	ACTGGAACCTTCTGCGGAGACTCTTCACAG
30003	GAATGTCCGTTGGCAGCCACTGAGCAATA
30004	AGTCAGCCAGTGGTTCCTCCAGCTGGAT

3.2.2. Subclonagem do *SMYD5* no vetor pCMV6-Entry

A estratégia de transferências das sequências do vetor de entrada pCMV6-AC-GFP para outros vetores como pCMV6-Entry mantém o inserto na mesma orientação e na mesma janela de leitura. As mesmas enzimas de restrição são usadas na transferência entre os vetores: XhoI (Promega - Fitchburg, WI, USA) na extremidade 5' e BamHI (Promega - Fitchburg, WI, USA) na extremidade 3'. Adicionalmente, há distinção na marca de seleção bacteriana entre os vetores. pCMV6-AC-GFP utiliza ampicilina, ao passo que, pCMV6-Entry, o antibiótico kanamicina.

A reação de restrição enzimática foi realizada com o DNA plasmidial pCMV6-AC-SMYD5-GFP, seguindo a seguinte reação: para 1µg de DNA, foram adicionados 1µL de XhoI (Promega - Fitchburg, WI, USA) e BamHI (Promega - Fitchburg, WI, USA), 2µL BSA 10X e 2µL de Tampão 10x, acrescidos de 15µL de H₂O milli-Q, para um volume final de 20 µL. Esta reação foi incubada por 3h a 37°C. Os produtos da dupla digestão foram avaliados através da eletroforese em gel de agarose 0,8 % em tampão TAE 1X, contendo 0,1 µg/mL de brometo de etídeo e o tamanho do fragmento gerado foi analisado por comparação com o padrão de peso molecular de 1 Kb (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen - Carlsbad, CA, USA). A banda correspondente a sequência codificadora do SMYD5 (inserto) foi eluída do gel de agarose usando o kit GenElute™ Gel extraction (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA) seguindo as orientações do fabricante. O resultado da eluição foi quantificado

utilizando-se o espectrofotômetro de alta performance NanoVuePlus™ (GE Healthcare).

Paralelamente, um segundo vetor pCMV6-Entry contendo a sequência codificadora do *SMYD4* clonada foi submetido a digestão nas mesmas condições especificadas anteriormente. Ao término da reação, a mesma foi submetida a uma reação de desfosforilação segundo o seguinte protocolo: 1 µg de DNA, 2 µl de tampão 10x, 1 µL de enzima fosfatase SAP e 20 µl de H₂O milli-Q, sendo então incubada a 37°C por 3h. A separação eletroforética da reação em gel de agarose 0,8 % possibilitou a visualização e purificação da banda de 4,9 Kb correspondente ao vetor digerido.

Vetor e fragmento foram quantificados no espectrofotômetro NanoVuePlus™ (GE Healthcare) e resolvidos em gel de agarose 0,8%. A reação de ligação foi realizada em um volume final de 5 µL, empregando-se 0,5 µL de T4 DNA ligase (Promega - Fitchburg, WI, USA), 0,5 µL de tampão 10X da ligase, 1 µg do plasmídeo pCMV6-Entry, 0,5 µg do inserto purificado e água para completar o volume. A reação foi incubada à 37°C durante 4 horas.

Em ambiente estéril, a reação de ligação foi usada para transformação de bactérias eletrocompetentes (DH5α), as quais foram submetidas a uma descarga elétrica de 2300 volts por 5,2 milissegundos no eletroporador (Electroporator 2510, Eppendorf). Para a recuperação das células, foram adicionados 1 ml de meio Luria Bertani (LB) (1% bacto-triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl) e a cultura mantida à 37°C sob agitação no período de 1 hora. Em seguida, 200 µl da cultura foram plaqueadas em meio LB sólido contendo kanamicina (50 µg/mL). As placas foram incubadas à 37°C por aproximadamente de 16 horas.

Para a análise dos transformantes, foram selecionadas algumas colônias crescidas na placa e estas foram submetidas ao protocolo de mini-prep utilizando-se do kit GenElute™ Five-Minute Plasmids Miniprep (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA). Com DNA plasmidial purificado, foi feita a confirmação por PCR convencional, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene *SMYD5*. As colônias que apresentaram a amplificação do produto foram aliqüotadas em glicerol 25% e armazenadas a -80°C.

Para aquisição de quantidade suficiente de DNA plasmidial para os experimentos foi feito o protocolo de maxiprep por lise alcalina, seguido de purificação com fenol/clorofórmio descritos em (89).

3.2.3. Obtenção do vetor pCMV6-Entry sem insertos.

De posse da construção contendo SMYD5 clonado em pCMV6-ENTRY, fez-se necessário obter o vetor controle pCMV6-ENTRY vazio para a expressão somente dos epítomos MYC e DDK. A digestão com as enzimas de restrição citadas no item anterior gerou a linearização do vetor e a presença de extremidades 5' e 3' protuberantes. O resultado foi resolvido em gel de agarose 1% e a banda no tamanho esperado (4,9 Kb) foi então eluída com o kit GenElute™ Five-Minute Plasmids Miniprep (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA), seguindo as orientações do fabricante. O material foi então tratado com Klenow (New England) para que fosse realizada a ligação entre duas extremidades não coesivas através da reação: 0,2 µg do vetor, 1 µL de Klenow (Promega - Fitchburg, WI, USA), 1 µL de *buffer* e 1 µL de H₂O, gerando um total de 5 µL. Esta foi dializada utilizando uma membrana (Millipore) e foi realizada eletroporação em DH5α competentes.

A reação da T4 DNA ligase teve como substrato 150 ng de DNA plasmidial e seguiram-se as exigências da empresa (Promega - Fitchburg, WI, USA). O procedimento de transformação bacteriana foi conduzido como citado no item 3.2.2 Os DNAs plasmidiais das colônias selecionadas foram confirmados por restrição enzimática e PCR para a comprovação da ausência de insertos.

3.3. Transfecção de linhagens celulares

No dia anterior à transfecção, as células a serem transfectadas foram plaqueadas na confluência 40-60% (aproximadamente 5 milhões de células) em placas de culturas de células de 6 poços (Corning - Corning, NY, USA) com meio DMEM ausente de antibiótico. Para transfecção, por poço, foram incubados concomitantemente em tubo de 1,5 mL (Eppendorf - Alemanha) independentes 250 µL de Opti-MEM (Gibco; Life Technologies - Carlsbad, CA, USA) com 4µg de DNA plasmidial e 250 µL de Opti-MEM (Gibco; Life Technologies - Carlsbad, CA, USA) com 10 µL de Lipofectamina™ (Invitrogen - Carlsbad, CA, USA) por cinco minutos à temperatura ambiente (T.A.). As soluções foram então combinadas, homogeneizadas e deixadas em repouso por mais vinte minutos, à TA. Após esse período, a solução foi pipetada para o poço contendo as células e a placa foi

incubada à estufa a 37°C, 5% de saturação de CO₂ por 4 horas. Depois desse período, houve troca de meio de cultura por DMEM completo (Figura 7).

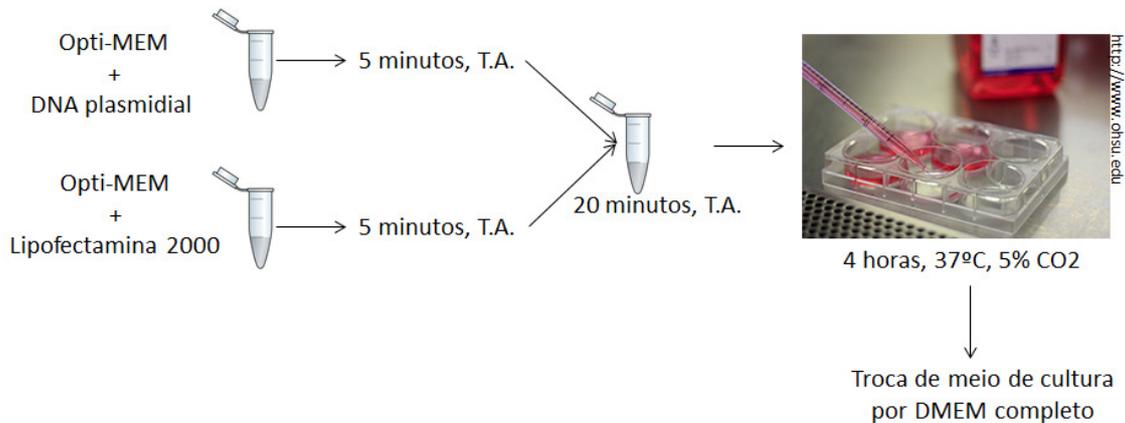


Figura 7 - Resumo esquemático do método de transfecção adotado no trabalho, utilizando-se do reagente LipofectaminaTM2000 (Invitrogen - Carlsbad, CA, USA).

3.4. Seleção das células transfectadas

3.4.1. Seleção de células estáveis

Com a finalidade de obter células com reduzida expressão de SMYD5, os plasmídeos shRNApGFP-V-RS foram utilizados para a transfecção de células MDA-MB 231. Já as construções pCMV6-SMYD5-ENTRY e pCMV-AC-SMYD5-GFP foram usadas na transfecção de células HEK-293 para geração de clones superexpressando SMYD5.

Previamente à transfecção das células, foi necessário determinar a concentração mínima requerida do agente seletivo que leva a morte das células não transfectadas. As células MDA-MB 231 foram plaqueadas na densidade de 2×10^4 em placas de 24 poços. Após 24 horas, foi adicionado ao meio de cultura o antibiótico puomicina, de modo que a concentração final em cada triplicada correspondesse a 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A cada 24 horas o meio foi renovado (assim como o antibiótico na concentração correspondente a cada poço) e a morte celular foi avaliada através da realização de ensaio de MTT. O ensaio foi feito nos dias 1, 2, 3 e 4 após o início da seleção.

Já com as células HEK-293, o experimento foi desenhado tendo plaqueamento na densidade de 7×10^4 em placas de 12 poços. Foram utilizadas as concentrações finais de 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; 1,2 mg/mL de G418 (Gibco; Life Technologies - Carlsbad, CA, USA). A cada 48 horas o meio também foi renovado e mais uma vez a morte celular foi evidenciada via ensaio de MTT. O ensaio de MTT foi feito nos dias 2, 4, 6 e 8, 10 e 12 após o início da pressão seletiva. Determinada a concentração da droga procedeu-se com a transfecção dos plasmídeos usando LipofectaminaTM 2000 (Invitrogen - Carlsbad, CA, USA) como no item 3.4.

3.4.2. FACS

A eficiência da transfecção, bem como da seleção de células estáveis, com os plasmídeos pCMV-AC-SMYD5-GFP e pGFP-V-RS foi avaliada através da análise da fluorescência das células em citometria de fluxo. Logo antes da análise, as células foram tripsinizadas, lavadas 3 vezes em PBS 1X e deixadas em suspensão no mesmo tampão, em gelo, até a leitura. A leitura foi realizada no citômetro BD FACSCalibur e o nível de fluorescência das células foi detectado pelo filtro FL-1 e análise foi feita utilizando-se do software CellQuest Pro®.

3.4.3. Seleção clonal

A seleção clonal se deu por meio de diluição seriada em placa de 96 poços. Após o período de seleção com antibiótico, 2×10^4 células foram plaqueadas no poço 1A de uma placa de 96 poços. As células foram diluídas na proporção de 1:2 no sentido A → H na placa. Após essa primeira diluição, uma segunda diluição foi feita com o auxílio de uma pipeta multi-canal; as células da coluna 1 foram diluídas na proporção de 1:2 no sentido 1 → 12 (figura 8). As células, neste momento de seleção clonal, não foram mantidas em meio de cultura seletivo. Os poços que apresentavam apenas uma única célula após a diluição foram identificados e seguiu-se com o acompanhamento do crescimento dos clones. Quando os clones cresceram a uma confluência $\geq 60\%$ do poço, as células foram transferidas para uma placa de 24 poços; quando a confluência de 60% foi atingida novamente, as

células foram novamente transferidas para uma placa cujo diâmetro de cultura era maior (neste caso, placa de 6 poços). Apenas quando as células atingiram a placa de 6 poços, o meio seletivo voltou a ser usado, sendo as células, a partir deste momento, sempre mantidas em meio DMEM completo suplementado pelo antibiótico correspondente à marca de seleção presente no plasmídeo transfectado. O tempo médio que os clones levaram para atingir a confluência de 60% no poço da placa de 96 poços foi de duas semanas.

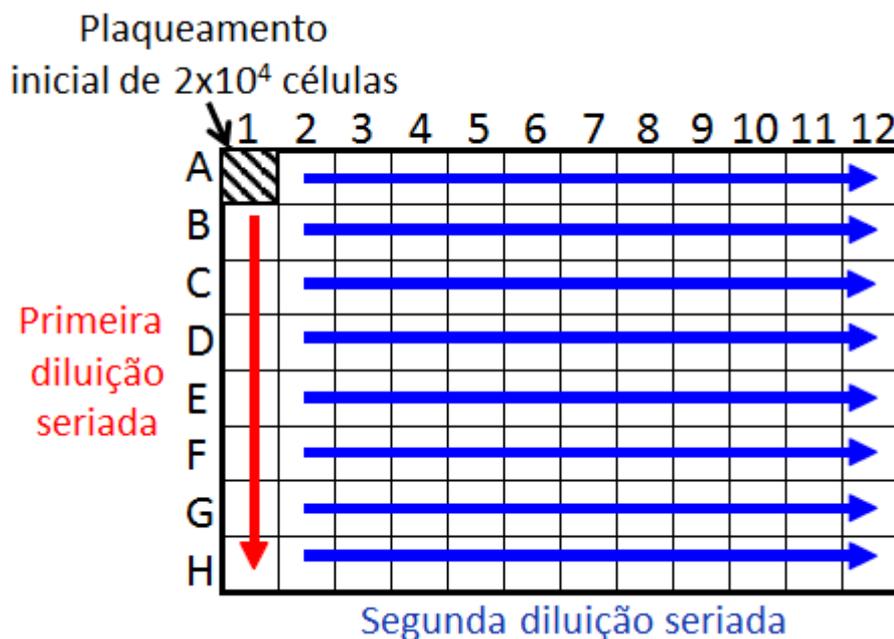


Figura 8 - Resumo esquemático do método de seleção clonal baseado na diluição seriada.

3.5. Ensaio de MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste com o reagente MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina], o qual se constitui um método colorimétrico sensível e quantitativo, desenvolvido para avaliar a sobrevivência e de proliferação de células de mamíferos. Este ensaio detecta apenas células vivas e o sinal gerado é dependente do grau de ativação metabólica das células. Aqui, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal, pelas enzimas desidrogenases mitocondriais resulta na formação de cristais de formazan com coloração azul que se acumulam nas células. (90). Quanto maior o número de células, mais forte o sinal.

O ensaio de MTT foi realizado para avaliar a morte celular tanto na otimização dos antibióticos a serem utilizados na seleção de células transfectadas estáveis quanto nos experimentos para avaliação do efeito da superexpressão e knockdown do *SMYD5* na proliferação celular de células estáveis transformadas.

Para a determinação da concentração de antibiótico para formação de células estáveis, o experimento se deu como descrito no item 3.4.1.

Para avaliação de alteração na proliferação celular em células transformadas com pCMV-SMYD5-Entry e pCMV-AC-SMYD5-GFP, superexpressando o SMYD5, as células foram plaqueadas HEK-293 em 5 placas de 12 poços, na densidade de $2,5 \times 10^4$. Foram feitos cinco plaqueamentos pois as leituras foram realizadas nos dias 1, 3, 6, 9 e 12 após o plaqueamento.

Para avaliação de alteração na proliferação celular em células transformadas com pGFP-V-RS, as células plaqueadas MDA-MB-231 em cinco placas de 12 poços, na densidade de $1,5 \times 10^4$. Como no ensaio para avaliação do efeito da superexpressão do SMYD5 na proliferação celular, as leituras da absorbância foram realizados nos dias 1, 3, 6, 9 e 12 após o plaqueamento. Nos dois ensaios, cada tipo celular, transfectado ou não (controle), foram plaqueados em triplicata. Ainda, durante o ensaio, as células foram mantidas em meio DMEM completo, sem a suplementação adicional de antibióticos.

Duas horas antes da leitura, o meio de cultura da placa a ser submetida ao ensaio foi trocado por meio DMEM sem SBF com 10% de MTT (Solução estoque: 5mg/mL em PBS 1X) e a mesma era novamente condicionada em estufa úmida a 37°C, 5% saturação de CO². Decorridas as duas horas, o meio foi cuidadosamente removido e isopropanol acidificado (0,04 M de ácido clorídrico) foi adicionado à placa para solubilização dos cristais de formazan. A solução foi homogeneizada e 200 µl de cada poço foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. Seguiu-se com a leitura a 570nm no leitor de placas DTX 800 Multimode detector (Beckman Coulter).

3.6. Ensaio de Giemsa

No mesmo dia do plaqueamento para o ensaio de MTT para avaliação do efeito da supressão ou superexpressão do SMYD5, também foram plaqueadas células para o ensaio de Giemsa. As células foram plaqueadas na mesma densidade que o

item anterior, convertendo o número de células para o poço de uma placa de 6 poços (que tem o dobro da área de uma placa de 12 poços), para mimetizar o que está acontecendo no ensaio de MTT. Portanto, para o ensaio do efeito de superexpressão, foram plaqueadas 5×10^4 HEK-293, enquanto que para o ensaio do efeito do knockdown, 3×10^4 MDA-MB-231 foram plaqueadas. O ensaio de Giemsa consiste em um ensaio visual, onde as células são fixadas com metanol absoluto (JT Baker) por 15 minutos, sob agitação, a T.A. Depois, o metanol é removido e, quando seco, adiciona-se 1mL de Giemsa (1:10 em água destilada) (Fluka analytical) ao poço. A placa é encubada em T.A., sob agitação, por 1 hora. O Giemsa é então descartado, lavam-se todos os poços com água destilada até que todo o excesso de Giemsa seja completamente removido e as placas são deixadas para secar a T.A. e registradas. Foram plaqueadas 3 placas de 6 poços a cada dois tipos de células, pois as leituras foram feitas nos dias 5, 10 e 15 após o plaqueamento.

3.7. Ensaio de localização subcelular

Células HeLa foram plaqueadas em lâminas de culturas (BD Falcon) na densidade de 100 mil células por poço, com DMEM isento de SFB. 24 horas após o plaqueamento, deu-se transfecção com protocolo já descrito no item 3.3, utilizando-se do plasmídeo pCMV6-SMYD5-AC-GFP. Aproximadamente 30 horas após a transfecção, o meio foi removido do poço e o mesmo foi lavado duas vezes com PBS 1X. Ao poço foi adicionado 1mL de paraformaldeído 4% e o mesmo foi encubado a T.A. por 30 minutos. Após o tempo, o poço foi lavado três vezes com PBS 1X por 2 minutos. As paredes das lâminas de cultura foram removidas e sobre as lâminas foi pingada uma gota de meio de montagem para fluorescência com DAPI (Vector Laboratories). As imagens de fluorescência da proteína SMYD5 fusionada ao GFP foram obtidas com o microscópio confocal TCS-SP2 (Leica).

3.8. *Template* de tecidos Normais Humanos para qPCR

Para avaliação da expressão do *SMYD5* em tecidos humanos, foi usado um painel comercial de RNA total de 12 tecidos de diferentes órgãos obtidos da Origene® Technologies, Rockville, USA. Os órgãos são: pulmão, intestino delgado (I.D.), cérebro, músculo esquelético, fígado, baço, coração, testículo, estômago e placenta.

3.9. Implicações éticas

Este projeto foi aprovado sob o número 025/09 pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB) (ANEXO I). A aprovação foi baseada na resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde, Ministério da Saúde.

3.10. Obtenção de amostras clínicas de mama normal e tumoral

Pacientes diagnosticadas com câncer de mama com indicação de mastectomia radical, atendidas no Hospital Universitário de Brasília (HUB) e no Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF), foram convidadas a participar deste estudo. A assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO II) foi obtida de todas as participantes. No momento da cirurgia, fragmentos tumorais (e, quando possível, fragmentos não-tumorais) foram coletados por especialista em oncologia. Cada fragmento foi norteado por uma marcação com tinta de caneta nanquim e dividido em dois: uma parte foi imediatamente condicionada em um criotubo e congelada em nitrogênio líquido ($N_{(l)}$), enquanto a outra parte foi condicionada em uma solução de formaldeído e encaminhada para análise patológica no HUB. Somente amostras tumorais que apresentaram pelo menos 70% de malignidade na amostra foram usadas neste trabalho. A análise patológica para determinação da porcentagem de malignidade nas amostras coletadas foi realizada por microscopia ótica em cortes representativos da amostra (figura 9).

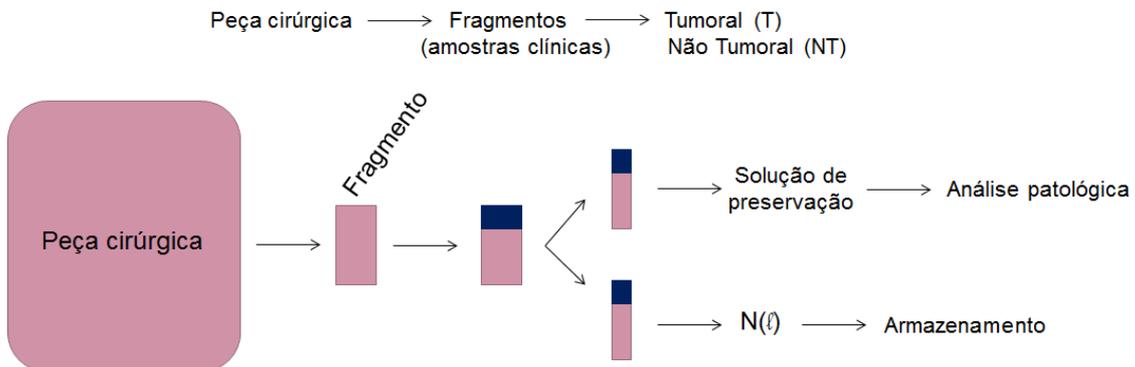


Figura 9 - Esquema mostrando a captura dos fragmentos de amostras clínicas. Os fragmentos eram coletados no momento da cirurgia, imediatamente após a mastectomia propriamente dita. Em azul, representação da marcação com tinta nanquim, a fim de nortear o fragmento. Quando possível, também era coletado da mesma peça cirúrgica, fragmento de tecido normal.

3.11. Extração de RNA

A extração de RNA das amostras clínicas e das linhagens celulares foram feitas usando o reagente TRIzol® (Invitrogen - Carlsbad, CA, USA, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as indicações do fabricante. Em resumo, efetuou-se a lise das células com o reagente TRIzol®, seguida da separação da fase aquosa com clorofórmio (Sigma-Aldrich), precipitação com isopropanol absoluto (JT Baker), lavagem do pellet com álcool (JT Baker) 75% gelado e ressuspensão em água Milli-Q. Todos os procedimentos foram feitos no gelo e/ou sob baixa temperatura (4°C). A integridade do RNA foi observada através visualização das bandas do RNA ribossomal 28S e 18S resolvidas através da eletroforese do RNA extraído em gel de agarose em 0,8%. Somente amostras de RNA que evidenciaram suas bandas foram selecionadas para a síntese de cDNA. Os RNAs extraídos foram armazenados a -80°C.

3.12. Síntese de cDNA e qualificação da extração

Após a análise de integridade, alíquotas de RNA total (2µg) foram tratadas com o kit de DNase I (Sigma-Aldrich), sob as orientações do fabricante. A reação de transcrição reversa, tanto para as linhagem celulares quanto para as amostras clínicas e para o painel de tecidos, foi realizada com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Depois da síntese de cDNA, um controle de qualidade de extração e síntese foi feito através de PCR convencional com primers de β-actina (*Foward*: GGACTTCGAGCAAGAGATGG; *Reverse*: AGCACTGTGTTGGCGTACAG) (figura 10). Apenas amostras capazes de amplificar a β-actina foram usadas para o PCR em tempo real. Depois da validação, 8 amostras normais de mama e 12 amostras de câncer de mama foram selecionadas para o prosseguimento dos estudos.

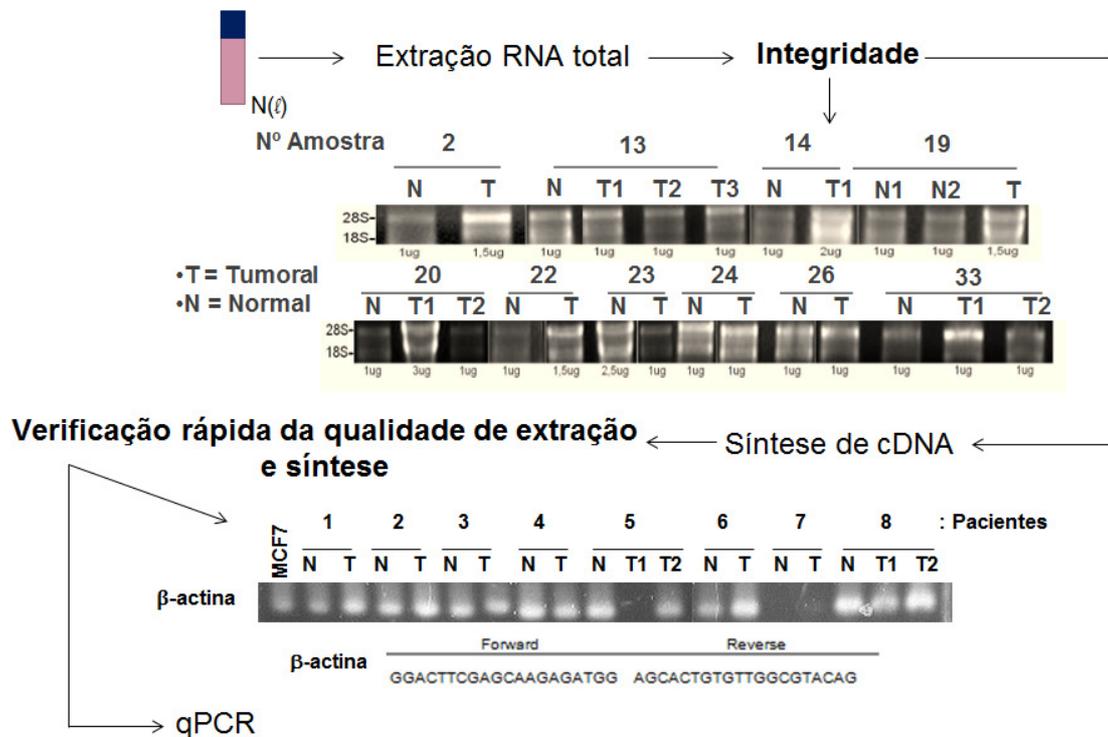


Figura 10 - Resumo esquemático do processamento de amostras clínicas para análise de expressão de SMYD5 por qPCR.

3.13. PCR quantitativo (qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas com o sistema *Step One Plus™ Real-Time PCR* (Applied Biosystems) usando *TaqMan Universal PCR Master Mix* e *Ensaio de expressão gênica TaqMan*, de acordo com as instruções do fabricante. A identidade do ensaio (ID Assay) do SMYD5 foi Hs00300181_m1 e a *ID Assay* gene endógeno usado como normalizador, β actina, foi Hs99999903_m1 (Applied Biosystems). A saber, 2 μ L do cDNA de cada amostra foram adicionados à um volume final de reação de 10 μ L por poço. As condições de amplificação foram: 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C no *holding stage*, e então 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

Os valores de expressão gênica são expressos como razões entre o gene de interesse e o gene usado como controle endógeno, que fornece o fator de normalização para a quantidade de RNA isolado a partir de uma amostra e, subsequentemente, calibrada com o valor dos controles (nível de expressão relativa). Cada ensaio foi realizado em triplicata.

3.14. Análise dos dados de qPCR

Para determinar a quantificação relativa (do inglês, *Relative Quantification* - RQ) da expressão gênica de SMYD5, os dados foram analisados usando o método C_T comparativo de quantificação relativa ($\Delta\Delta C_T$) (Applied Biosystems). Brevemente, a média dos valores de C_T (*cycle threshold*) das amostras replicadas do gene de interesse foram calculadas e normalizadas pela subtração de seu valor com a média do valor de C_T do gene endógeno usado como controle, que foi amplificado na mesma placa da amostra, gerando assim um ΔC_T . O ΔC_T de uma amostra calibradora (usado nas análises de expressão de SMYD5 em células de câncer de mama e nas amostras clínicas como a média dos ΔC_T das amostras clínicas normais de mama) foi subtraído do ΔC_T das outras amostras-alvo para produzir um valor $\Delta\Delta C_T$. A quantidade do gene alvo, normalizados para uma referência endógena e em relação a um calibrador foi convertido em quantificação relativa pela fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Para as linhagens de células, tecidos normais, e amostras clínicas utilizadas, a

expressão do gene do SMYD5 foi normalizado utilizando como um controle endógeno a expressão β -actina.

Para checar a significância estatística dos resultados de RQ foi utilizado o teste T de Student. Para as 7 amostras pareadas (amostras normal e tumoral da mesma paciente) foi utilizado o teste-T para amostras pareadas, para a comparação da média entre os membros do mesmo par. Para análise dos *pools* de amostras normais (n=8) e tumorais (n=12), foi feito o teste-T para amostras independentes, comparando-se a média entre os dois grupos. Os testes estatísticos foram considerados significantes quando valor de $P \leq 0,05$ (IC: 95%). Os cálculos foram realizados usando o software SPSS versão 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3.15. Ensaio de imunohistoquímica

Seções histológicas de amostras clínicas de câncer de mama humano foram preparadas segundo o método do Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC). Resumidamente, a atividade de peroxidase endógena de xileno-desparafinizadas e desidratada foi inibida pelo tratamento com 0,3% de H_2O_2 /metanol. A ligação não específica foi bloqueada através da incubação das secções com soro de cabra normal a 10% numa câmara húmida durante 30 minutos à temperatura ambiente, seguido por incubação durante *overnight* a 4^o C com uma diluição de 1:25 do anticorpo de coelho anti-SMYD5 policlonal (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO). As secções foram lavadas duas vezes com PBS, incubadas com 5 μ g/ μ L anticorpo IgG de cabra anti-coelhobiotinilado em PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (do inglês, Bovine serum albumin – BSA) durante 30 minutos à temperatura ambiente, e depois incubadas com o reagente ABC durante 30 minutos. A imunomarcção específica foi visualizada por 3,3'-diaminobenzidina. As lâminas foram desidratadas através do álcool graduado à lavagem sylene e montado sobre lamínulas. Hematoxilina foi utilizado para contra-coloração nuclear.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de clones plasmidiais

4.1.1. Digestão dos plasmídeos para clonagem e inserto em novo vetor

Para avaliação do efeito da superexpressão de SMYD5 na proliferação de células não-cancerígenas foi necessária a clonagem do inserto da sequência codificadora do SMYD5, presente no plasmídeo pCMV-AC-SMYD5-GFP (Origene), para o vetor pCMV6-Entry (Origene), obtido pelo grupo de Patologia Molecular do Câncer (PMC-FS-UnB), com o inserto codificador da proteína SMYD4. Para tal, foi realizada a digestão de ambos os plasmídeos com as mesmas enzimas de restrição, conforme o item 3.2.2 da metodologia. A figura 11 (A) mostra a digestão dos dois plasmídeos resolvidos em gel de agarose 0,8%.

4.1.2. Confirmação de clonagem

Os fragmentos referentes ao vetor pCMV-Entry vazio e ao fragmento codificador do SMYD5 foram eluídos do gel, purificados e ligados. O resultado da ligação foi usado na transformação de células DH5 α e estas foram submetidas ao protocolo de mini-prep utilizando-se de kit comercial. O DNA plasmidial purificado foi submetido a uma nova digestão para confirmação do tamanho dos fragmentos do vetor pCMV-Entry e do inserto referente ao SMYD5 (figura 11 B), bem como usado como *template* para PCR convencional, para amplificação do gene SMYD5 (figura 11 C).

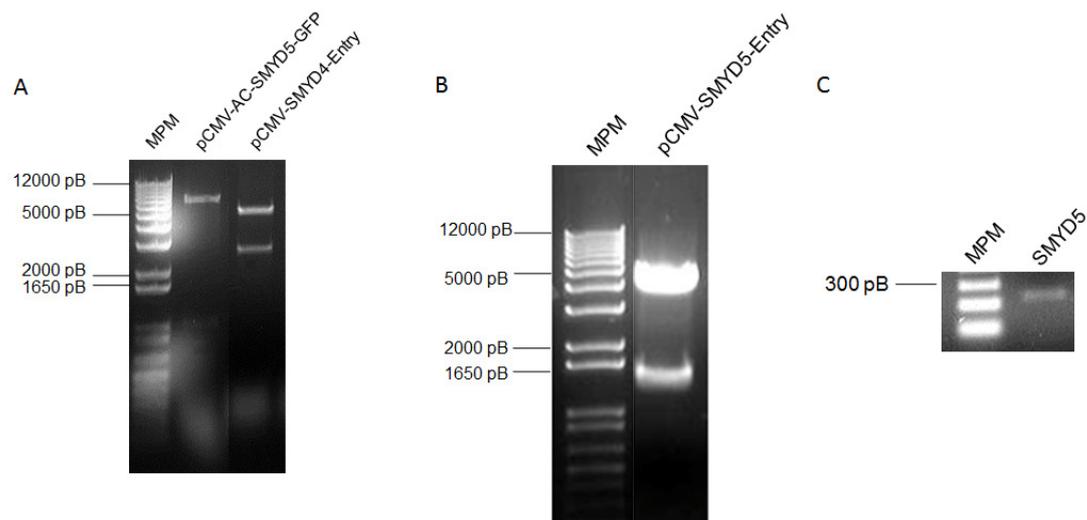


Figura 11 - Etapas da clonagem do plasmídeo pCMV-SMYD5-Entry. (A) Digestão dos plasmídeos pCMV-SMYD4-Entry e pCMV-AC-SMYD5-GFP. Os fragmentos de interesse foram eluídos, purificados e ligados. O resultado da clonagem foi usado na transformação de células DH5 α . Essas células foram submetidas a uma mini-prep e o DNA plasmidial obtido foi novamente digerido (B) para verificação dos tamanhos dos fragmentos de vetor e inserto e usado em PCR convencional (C), semi-quantitativo, para verificação do amplicon referente ao SMYD5.

4.2. Definição de concentração de antibiótico a ser usado para seleção celular pós-transfecção plasmidial

As marcas de seleção de cada plasmídeo estão evidenciadas no quadro abaixo, conforme mapa fornecido pela empresa Origene® (tabela 6).

Tabela 6 - Plasmídeos usados com suas respectivas marcas de seleção.

Plasmídeo	Marca de seleção
pCMV-AC-GFP	G418
pGFP-V-RS	Puomicina
pCMV6-Entry	G418

Legenda: A resistência ao G418 é conferido pelo gene de resistência à Neomicina (Neo^r) (91).

Para obtenção de células não-cancerígenas estáveis superexpressando o *SMYD5*, células HEK-293 foram inicialmente transfectadas com o plasmídeo pCMV6-Entry. Posteriormente, o ensaio foi realizado substituindo o pCMV6-Entry com o plasmídeo pCMV-AC-GFP. Para a seleção das células estáveis, a quantidade de antibiótico a ser usado deveria primeiro ser definida. Para tanto, foi desenhado um

experimento para avaliar a quantidade mínima de antibiótico a ser usado para matar 100% das células em duas semanas, tempo necessário para a seleção com G418. Foram plaqueadas seis placas de 24 poços na densidade de $2,5 \times 10^6$. Foram avaliadas as concentrações finais de 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; 1,3 mg/mL de G418. 24 horas após o plaqueamento, a pressão seletiva começou a ser aplicada. A cada 48 horas o meio de cultura foi renovado e a morte celular foi evidenciada via ensaio de MTT. O ensaio de MTT foi feito nos dias 2, 4, 6 e 8, 10, e 12 após o início da pressão seletiva. O resultado é evidenciado na figura 12.

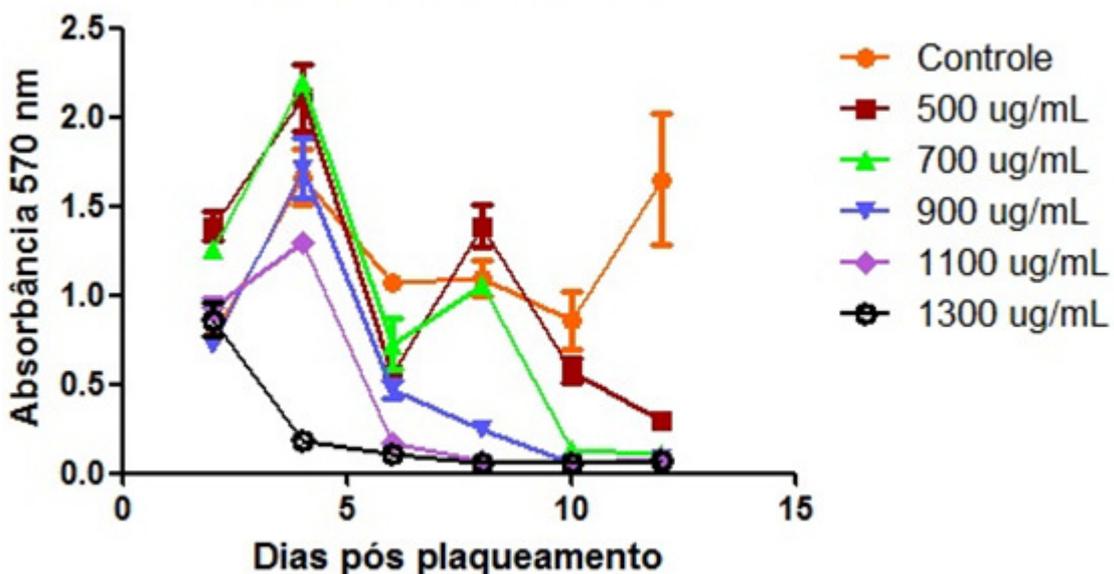


Figura 12 - Padronização da concentração de antibiótico a ser usado para seleção de células transfetadas – HEK-293 com G418. Gráfico expresso em taxa de absorbância em 570 nm (comprimento de onda onde o formazan é identificado) por dias de tratamento. Em laranja, células HEK-293 sem adição de antibiótico.

A concentração escolhida para a seleção de células estáveis pós-transfecção dos plasmídeos pCMV-SMYD5-Entry e pCMV-AC-GFP em células HEK-293 foi de 700 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Para obtenção de células cancerígenas estáveis sofrendo *knockdown* do *SMYD5*, células MDA-MB-231 foram transfetadas com os plasmídeos pGFP-V-RS (figura 6 B). O desenho para determinação da quantidade mínima de antibiótico a ser usada para seleção destas células foi o seguinte: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 μg de puomicina por mL de meio de cultura usado nas células. A seleção para este tipo de antibiótico é de uma semana, sendo as leituras do MTT feitas nos dias 1, 2, 3 e 4 após o início da seleção (figura 13).

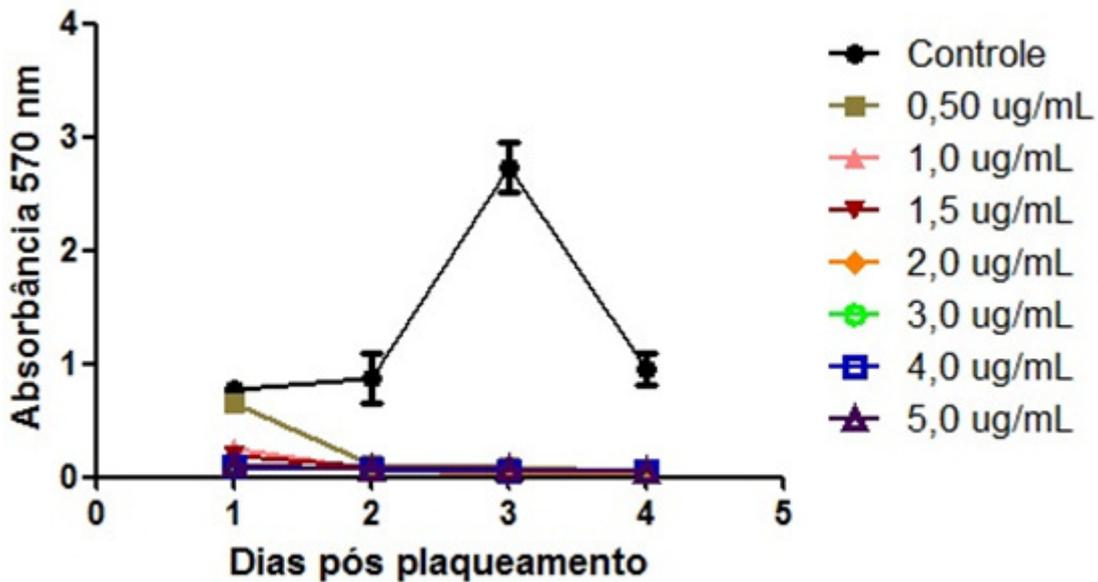


Figura 13 - Padronização da concentração de antibiótico a ser usado para seleção de células transfectadas – MDA-MB-231 com puromicina. Gráfico expresso em taxa de absorbância em 570 nm (comprimento de onda onde o formazan é identificado) por dias de tratamento. Em laranja, células HEK-293 sem adição de antibiótico.

A concentração de antibiótico mais adequada para a seleção de células MDA-MB-231 estáveis expressando os plasmídeos pGFP-V-RS foi 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de meio de cultura. Observa-se que as células controle, sem o tratamento, dão um salto na absorbância no dia 3, para depois cair drasticamente no dia 4. Isso se deve ao fato de as células estarem muito confluentes no dia 3. A queda representada no dia 4 é explicada pela morte celular em decorrência da grande quantidade de células no poço.

4.3. Avaliação dos efeitos de superexpressão e inibição de expressão de *SMYD5* *in vitro*

4.3.1. Efeitos da superexpressão de *SMYD5* em HEK-293

A transfecção das células ocorreu conforme o item 3.3 da metodologia, inicialmente usando-se dos plasmídeo clonados pCMV6-SMYD5-Entry e pCMV6-Entry vazio, sem insertos (MOCK). No dia seguinte à transfecção, foi dado início à

seleção de clones estáveis com meio DMEM suplementado com G418 (Gibco) na concentração final de 0,7 mg/mL. Duas semanas após o início da seleção, as células foram submetidas à seleção clonal conforme o item 3.5.3 da metodologia. Ao final, cinco clones contendo o pCMV6-SMYD5-Entry clonado sobreviveram (figura 14).

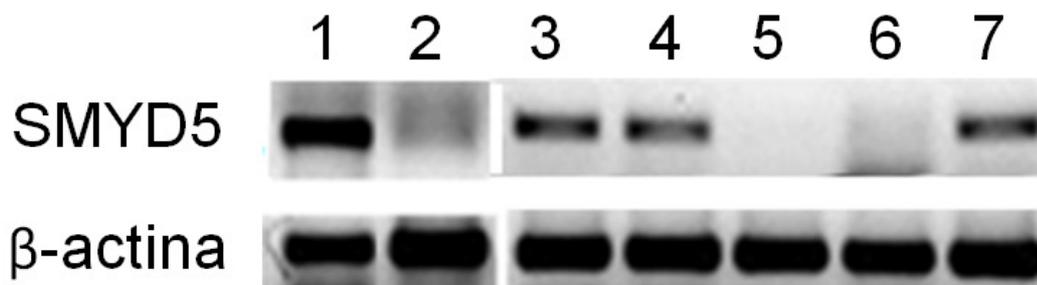


Figura 14 - PCR semi-quantitativo de RNA extraído de células HEK-293 e de clones estáveis expressando plasmídeos pCMV6-Entry, vazio (MOCK) e com o inserto codificador do SMYD5. São eles: (1) HEK-293 não transfectado, usado como controle; (2) HEK-293 MOCK E7; (3) HEK-293 SMYD5 MYC B9; (4) HEK-293 SMYD5 MYC B10; (5) HEK-293 SMYD5 MYC E9; (6) HEK-293 SMYD5 MYC F7; (7) HEK-293 SMYD5 MYC F10.

O PCR semi-quantitativo mostra um desvio no que seria esperado para células transfectadas com o plasmídeo vazio (MOCK) e com o plasmídeo clonado com o inserto do gene SMYD5. Observa-se que não houve amplificação do SMYD5 no clone 2, transfectado com o pCMV6-Entry (MOCK) clonado, representando o clone MOCK E7, e que os demais clones 3, 4, 5, 6 e 7 representando clones transfectados pCMV6-SMYD5-Entry que, em teoria, estariam superexpressando o *SMYD5*, apresentam bandas fracas ou inexistentes. A incongruência dos resultados motivou uma nova tentativa de clonagem dos plasmídeos. Até o fechamento desta dissertação não havia clones viáveis, motivo pelo qual se optou pela utilização do plasmídeo pCMV6-AC-GFP, com inserto do SMYD5 obtido comercialmente junto a empresa Origene®, para dar continuidade ao ensaio de superexpressão. Até o conclusão deste trabalho, não foi possível a seleção clonal de células HEK-293 expressando o pCMV6-AC-GFP, bem como não foi possível a confecção do plasmídeo pCMV6-AC-GFP sem inserto. O ensaio foi feito com células transfectadas e impostas à pressão seletiva com meio DMEM suplementado com G418 na concentração de 0,7mg/mL; como controle foram usadas células HEK-293 *wild-type*.

A eficiência da transfecção/seleção é evidenciada na figura 15 e o resultado do ensaio de MTT é mostrado na figura 16.

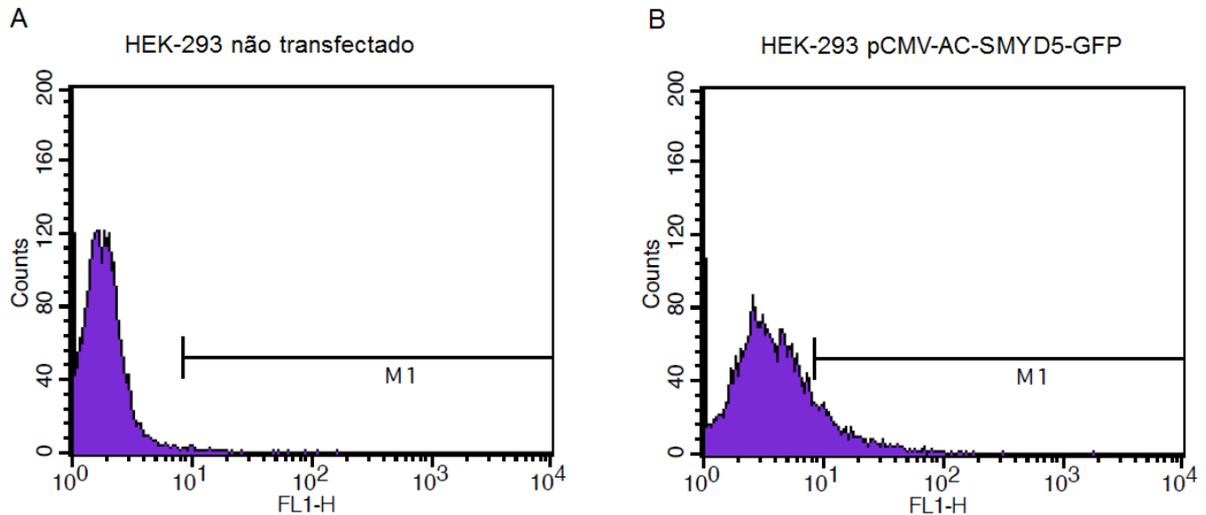


Figura 15 - Leitura das células em FACS para avaliação da transfecção e da seleção de células estáveis por pressão seletiva com antibiótico. Em A observa-se a fluorescência inata das células HEK-293. Em B observa-se a fluorescência adquirida pelas células depois da transfecção com o plasmídeo pCM-AV-SMYD5-GFP. A análise com o programa CellQuest Pro mostra que 18% das células estão emitindo fluorescência verde.

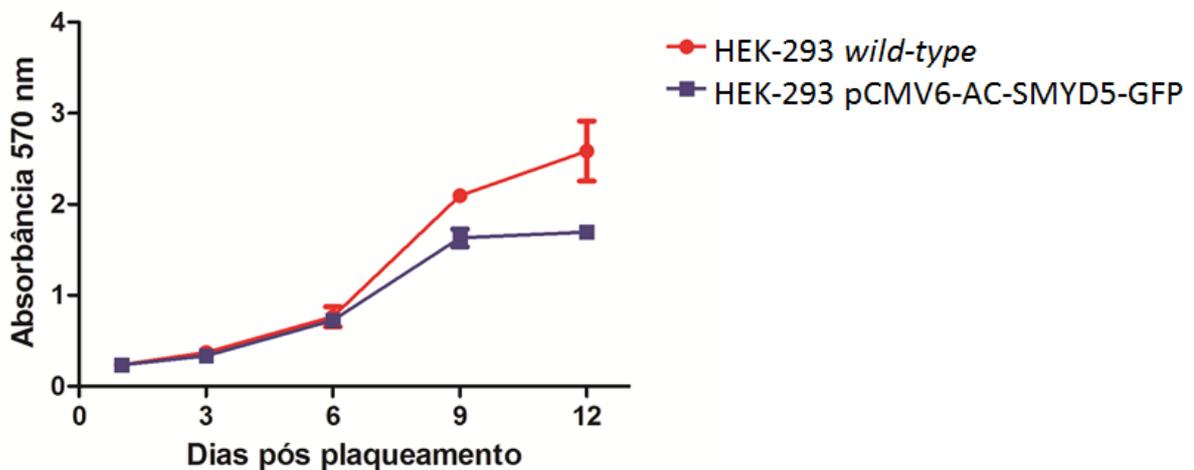


Figura 16 - Ensaio de MTT mostrando os efeitos da superexpressão do SMYD5 na linhagem celular não-cancerígena, HEK-293. Em vermelho, células HEK-293 não transfectadas; Em lilás, células HEK-293 transfectadas com o plasmídeo pCMV6-AC-GFP contendo o inserto da região codante do SMYD5.

O gráfico mostra uma discreta queda na taxa de crescimento de células transfectadas com pCMV6-AC-SMYD5-GFP.

Concomitante ao ensaio de MTT, para avaliação do efeito da superexpressão do SMYD5 na proliferação celular, também foi realizado um ensaio de Giemsa (figura 17).

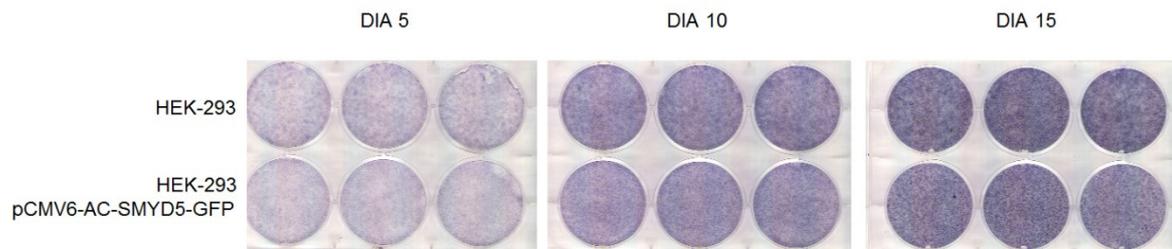


Figura 17 - Avaliação do efeito da superexpressão do gene SMYD5 através da transfecção do plasmídeo pCMV6-AC-SMYD5-GFP em linhagem celular não-cancerígena, HEK-293.

Pela figura 17 observa-se que a discreta queda na proliferação celular observada pelo grupo transfectado com o SMYD5 não foi observado no ensaio de Giemsa.

4.3.2. Efeito do knockdown do SMYD5 na linhagem de câncer de mama, MDA-MB-231

Assim como no ensaio de superexpressão, a transfecção das células ocorreu conforme o item 3.3 da metodologia. Para transfecção, foram usados os plasmídeos shRNA pGFP-V-RS. 24 horas após a transfecção, foi dado início à seleção de clones estáveis com meio DMEM suplementado com puomicina na concentração final de 0,5 µg/mL. As células transfectadas com shRNA pGFP-V-RS 30001 e shRNA pGFP-V-RS 30002 e shRNA pGFP-V-RS 30003 não sobreviveram à seleção; optou-se por usar apenas um controle negativo, o shRNA pGFP-V-RS 30007. A eficiência da transfecção/seleção é evidenciada na figura 18. O resultado do ensaio de MTT é mostrado na figura 19.

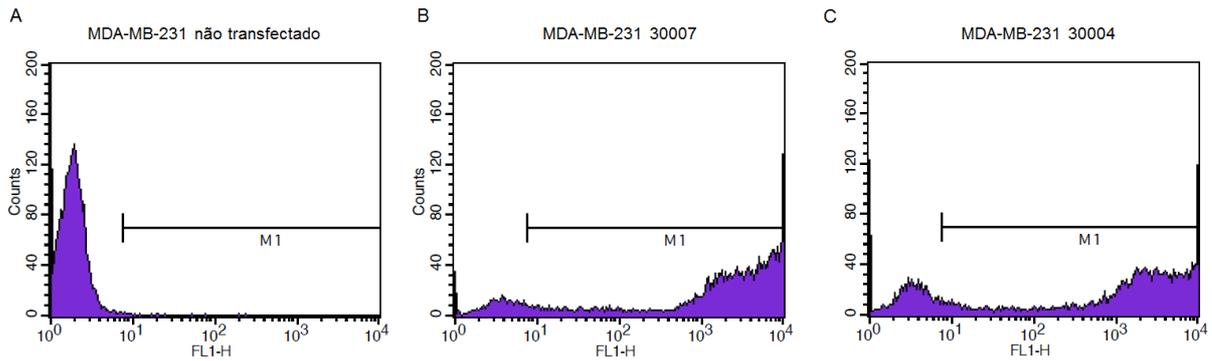


Figura 18 - Leitura das células em FACS para avaliação da transfecção e da seleção de células estáveis por pressão seletiva com antibiótico. Em A observa-se a fluorescência inata das células MDA-MB-231. Em B e C observa-se a fluorescência adquirida pelas células depois da transfecção com o plasmídeo pGFP-V-RS. A análise com o programa CellQuest Pro® mostra que 89% das células transfectadas com pGFP-V-RS 30007 estão emitindo fluorescência verde, enquanto que 80% das células transfectadas com pGFP-V-RS 30004 estão esta fluorescência.

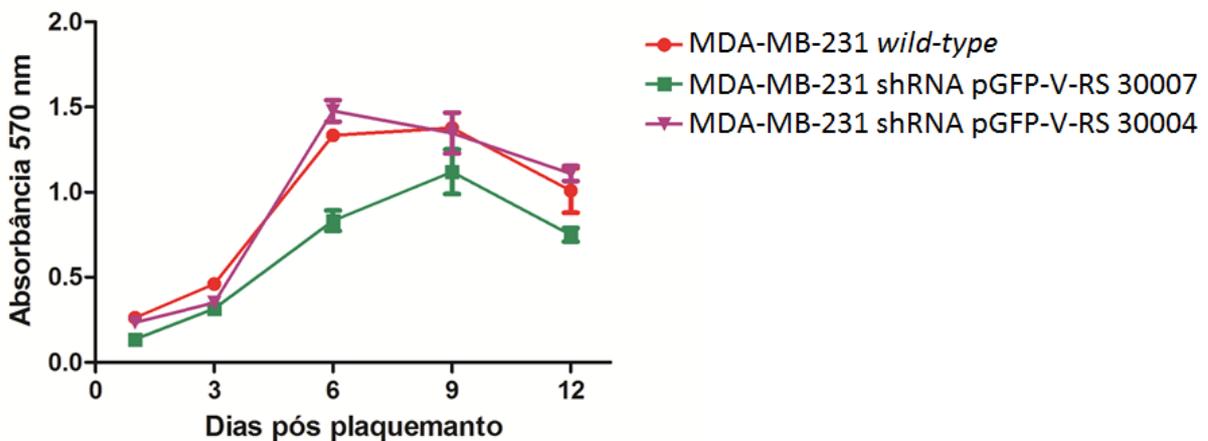


Figura 19 - Ensaio de MTT mostrando os efeitos do *knockdown* do SMYD5 na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231. Em vermelho, células MDA-MB-231 não transfectadas; Em verde, células transfectadas com o controle negativo sh RNA pGFP-V-RS 30007. Em lilás, células MDA-MB-231 transfectadas com o plasmídeo sh RNA pGFP-V-RS 30004, com atividade de silenciamento.

Não foi observada diferença no perfil proliferativo das três linhagens celulares no ensaio de MTT. Concomitante ao ensaio de MTT, para avaliação do efeito da inibição de expressão do SMYD5 na proliferação celular, também foi realizado um ensaio de Giemsa (figura 20). Observa-se que, assim como no ensaio de superexpressão, a inibição de expressão do SMYD5 não aparenta alterar a proliferação celular *in vitro*.

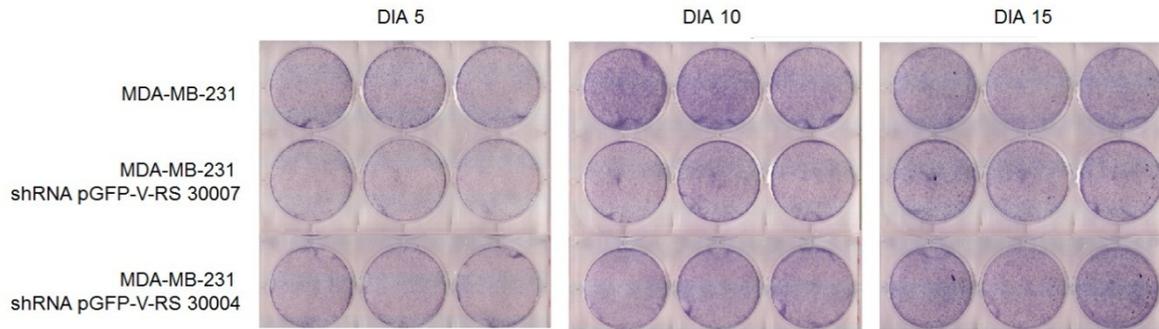


Figura 20 - Avaliação do efeito da inibição de expressão do gene SMYD5 através da transfecção do plasmídeo sh RNA pGFP-V-RS na linhagem celular de câncer de mama, MDA-MB-231.

Para avaliar o efeito do knockdown de SMYD5 em clones expressando os plasmídeos, realizou-se nova transfecção com todos os plasmídeos. As células passaram pela pressão seletiva descrita no item 3.5.1 e, na sequência, foram submetidas à diluição seriada em placas de 96 poços a fim da separação singular de células, conforme item 3.2.3.

Ao final, um clone contendo um dos plasmídeos de controle negativo, o 30013 (MDA-MB-231-psh-13-C7) sobreviveu. Também sobreviveram sete clones contendo os plasmídeos de silenciamento: três contendo o plasmídeo 30001 (MDA-MB-231-psh-1-D10, MDA-MB-231-psh-1-F7 e MDA-MB-231-psh-1-D9), três contendo o plasmídeo 30002 (MDA-MB-231-psh-2-E10, MDA-MB-231-psh-2-E11 e MDA-MB-231-psh-2-F11) e um clone contendo o plasmídeo 30004 (MDA-MB-231-psh-4-B11) (figura 21).

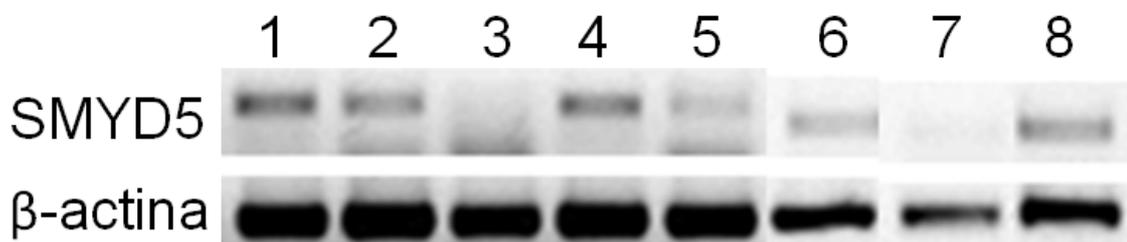


Figura 21 - PCR semi-quantitativo de RNA extraído de células MDA-MB-231 e de clones estáveis expressando plasmídeos shRNApGFP-V-RS. São eles: (1) MDA-MB-231-psh-1-D10; (2) MDA-MB-231-psh-1-F7; (3) MDA-MB-231-psh-1-D9; (4) MDA-MB-231-psh-2-E10; (5) MDA-MB-231-psh-2-E11; (6) MDA-MB-231-psh-2-F11; (7) MDA-MB-231-psh-4-B11 e (8) MDA-MB-231-psh-13-C7.

Fazendo a comparação de intensidade das bandas com a amostra 8, referente ao clone transfectado com o plasmídeo controle 30013, observa-se um *knockdown* importante das amostras 3 (clone com expressão do sh RNA pGFP-V-RS 30001) e 7 (sh RNA pGFP-V-RS 30004).

Até o fechamento desta dissertação não foi possível efetuar a análise do efeito do knockdown do *SMYD5* nestes clones celulares; há previsão deste ensaio em trabalhos futuros.

4.4. Sublocalização do SMYD5 no contexto celular

Para verificar a sublocalização celular do SMYD5, células HeLa foram plaqueadas em baixa densidade em placas de cultura com meio DMEM isento de antibiótico. No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram transfectadas com pCMV6-AC-SMYD5-GFP. Aproximadamente 30 horas após a transfecção, as HeLa foram fixadas e preparadas para leitura em microscópio confocal conforme o item 3.15 da metodologia. A análise da microscopia mostrou que a proteína do SMYD5 fusionada ao GFP estava presente em ambos núcleo e citoplasma (figura 22), estando difusa no último.

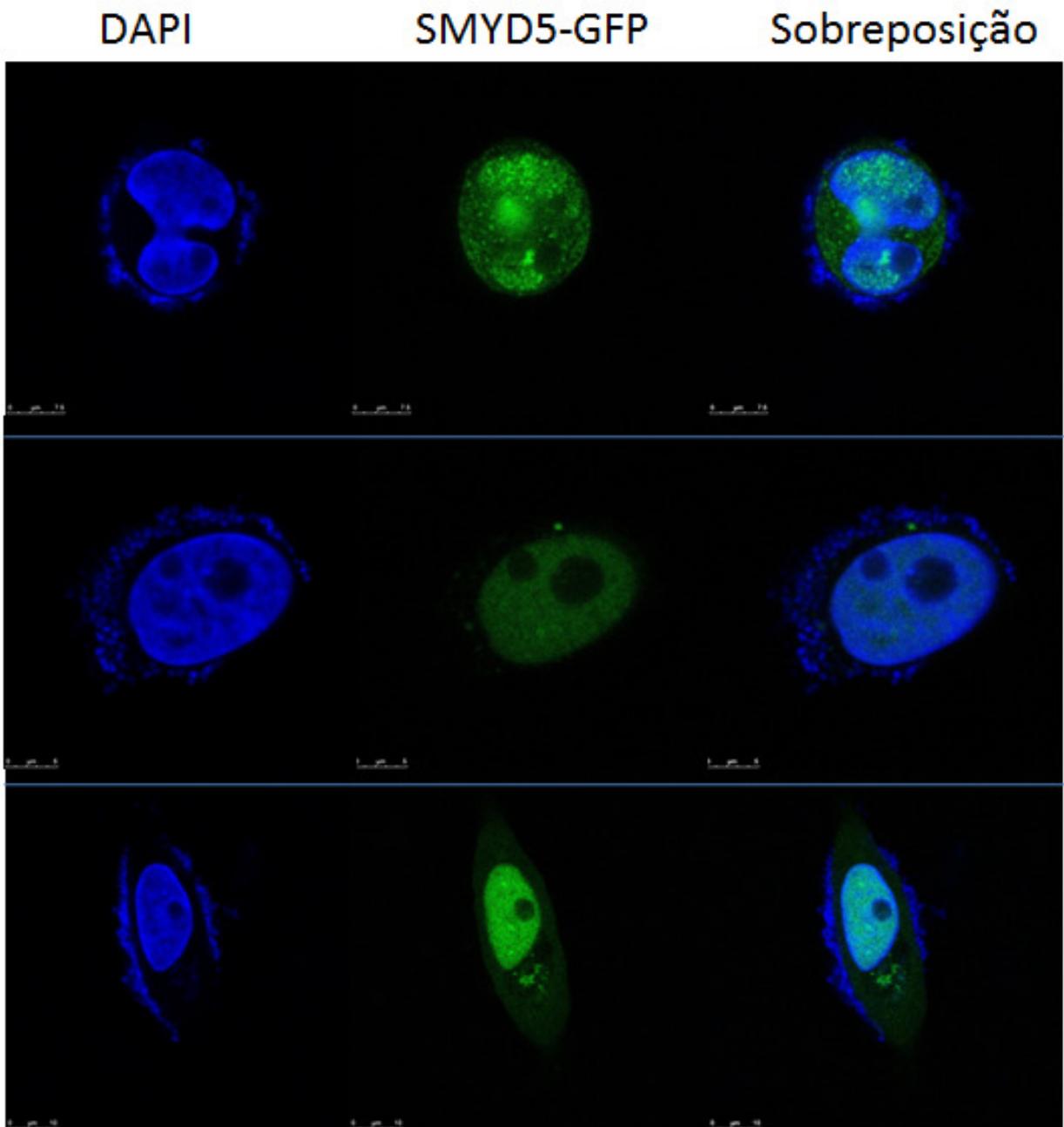


Figura 22 - Células HeLa foram transfectadas com pCMV6-AC-SMYD5-GFP. 30 horas após a transfecção, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com DAPI.

4.5. Perfil de expressão do *SMYD5* nos diversos tecidos humanos

Para determinar o perfil de expressão de *SMYD5* em tecidos normais, foi realizado PCR quantitativo (qPCR) usando como *template* cDNA obtido através da transcrição-reversa (RT-PCR) de um painel de RNA total comercial de tecidos

normais, obtidos junto a Origene®. A análise da expressão relativa (do inglês, *Relative Quantitation* - RQ) de *SMYD5* foi feita pela comparação de cada um dos tecidos com um conjunto das amostras clínicas de tecido mamário (figura 23).

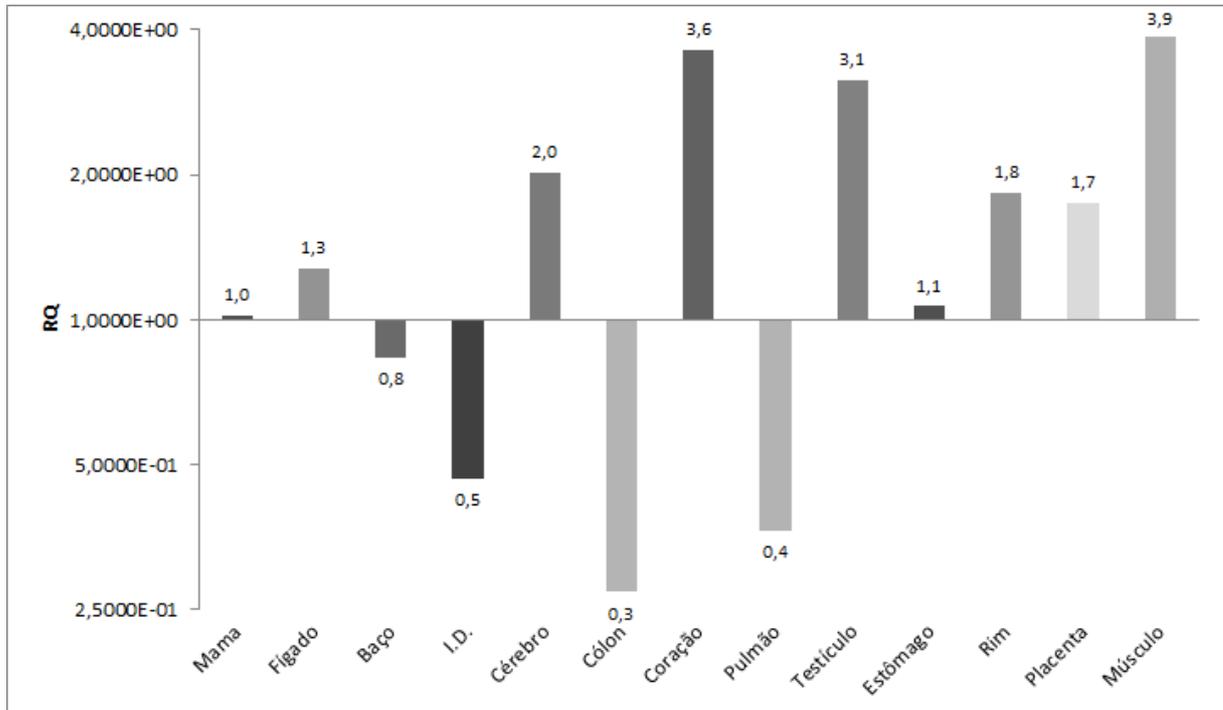


Figura 23 - Expressão relativa de *SMYD5* em tecidos humanos normais. PCR quantitativo foi realizado para identificar o perfil de expressão de *SMYD5* em tecidos normais. Os dados são apresentados como quantificação relativa (RQ), onde o calibrador usado para obtenção do $\Delta\Delta C_T$ foi a média do ΔC_T das amostras clínicas de mama normais. β -actina foi usada como controle endógeno.

A análise revelou que o *SMYD5* tem alta expressão nos tecidos cardíaco, testicular e de músculo esquelético, enquanto apresenta expressão reduzida em cólon, intestino delgado (I.D.) e pulmão.

4.6. Perfil de expressão do *SMYD5* em linhagens de célula de câncer de mama

A análise de quantificação relativa de *SMYD5* também foi feita em sete linhagens de câncer de mama (HCC1954, MCF7, CAMA1, SKBR3, MDA-MB-231, MDA-MB-436 e MDA-MB-468) (figura 22). Nesta análise, observa-se que todas as linhagens de câncer de mama apresentam uma expressão fortemente reduzida de *SMYD5*,

quando o objeto de comparação (calibrador) é o conjunto das amostras clínicas de tecido mamário normal ($p < 0,001$) (figuras 24 e 25).

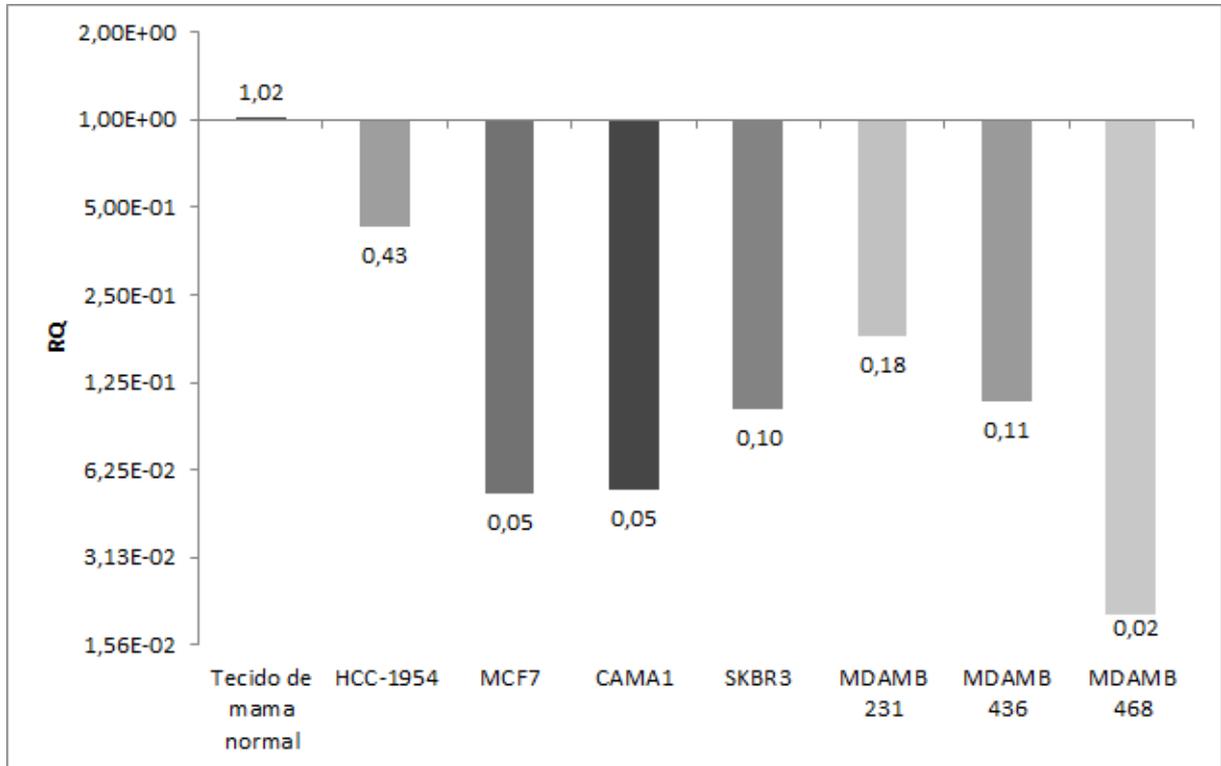


Figura 24 - Expressão relativa de *SMYD5* em linhagens de celulares de câncer de mama. *SMYD5* mostrou-se fortemente suprimido em todas as células testadas. Os dados são apresentados como quantificação relativa (RQ), onde o calibrador usado para obtenção do $\Delta\Delta C_T$ foi a média do ΔC_T das amostras clínicas de tecido mamário normal. β -actina foi usada como controle endógeno.

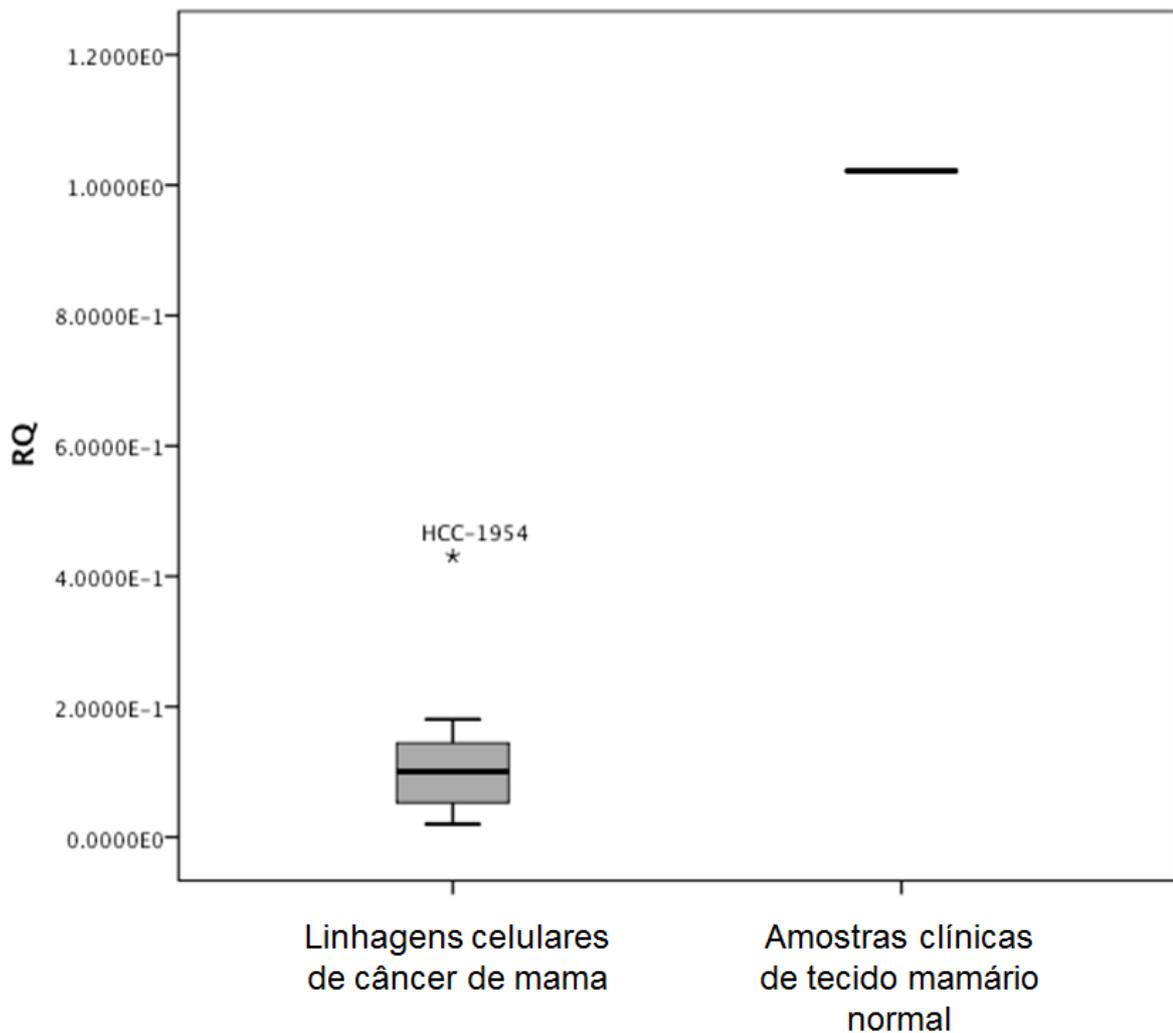


Figura 25 - Expressão relativa de *SMYD5* em linhagens de celulares de câncer de mama. A expressão de *SMYD5* mostrou-se fortemente suprimida em todas as células testadas. O RQ de todas as linhagens de câncer de mama e das amostras clínicas de tecido de mama normal (valor de teste: 1) foram confrontadas em um T-Test de uma amostra. As barras grossas nas caixas são os níveis de expressão da média, e as caixas representam 95% das amostras. A diferença da expressão de *SMYD5* entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (CI: 95%).

4.7. Perfil de expressão de *SMYD5* em amostras clínicas de câncer de mama

Foi feita a análise comparativa da expressão de *SMYD5* em 12 amostras clínicas de câncer de mama e 8 amostras normais deste tecido. Com exceção de um caso de carcinoma lobular invasivo, todas as pacientes apresentavam carcinoma ductal invasivo (tabela 7). Observou-se uma expressão reduzida de *SMYD5* em 80% das amostras de câncer de mama, comparando-se com a expressão encontrada no conjunto das amostras clínicas de tecido mamário normal (figura 26). Ainda, os dados de expressão relativa das amostras normais e tumorais foram confrontados

em teste-T de amostras independentes e a diferença de expressão entre os dois grupos foi estatisticamente significativa (figura 27).

Tabela 7 - Características Clínicas e Histopatológicas de amostras de câncer de mama obtidas em hospitais da região central de Brasília

ID	Malignidade da amostra	Mama de origem do tumor	Idade	Grau histológico	Estadiamento	Quimioterapia Neoadjuvante	Cer-b2	RE	RP
1	100%	Direita	61	Alto	T2N0M0	NÃO	-	+	+
2	100%	Direita	32	Baixo	T2N0M0	SIM	+	+	-
3	100%	Esquerda	58	Alto	T3N2aM0	SIM	-	-	-
4	80%	Direita	60	Baixo	T2N1M0	NÃO	-	+	+
5	80%	Esquerda	54	Intermediário	T4dN3M0	SIM	-	+	+
6	80%	Esquerda	64	Intermediário	YPT4PN1M0	SIM	-	-	-
7	100%	Direita	43	Alto	T2N1M0	NÃO			
8	80%	Esquerda	56	Alto	T2N1aM0	SIM	-	-	-
9	70%	Esquerda	30	*	T1SN0M0	NÃO	+	-	-
10	80%	Direita	36	*	T1cN3aM0	SIM			
11	100%	Esquerda	58	Baixo	T2N0M0	NÃO	-	-	-
12	70%	Direita	60	Alto	T2N3M0	SIM	-	+	-

Legendas: Cerb-B2: HER2/neu Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico; ER: Receptor de Estrógeno; PR: Receptor de Progesterona. * Dados indisponíveis.

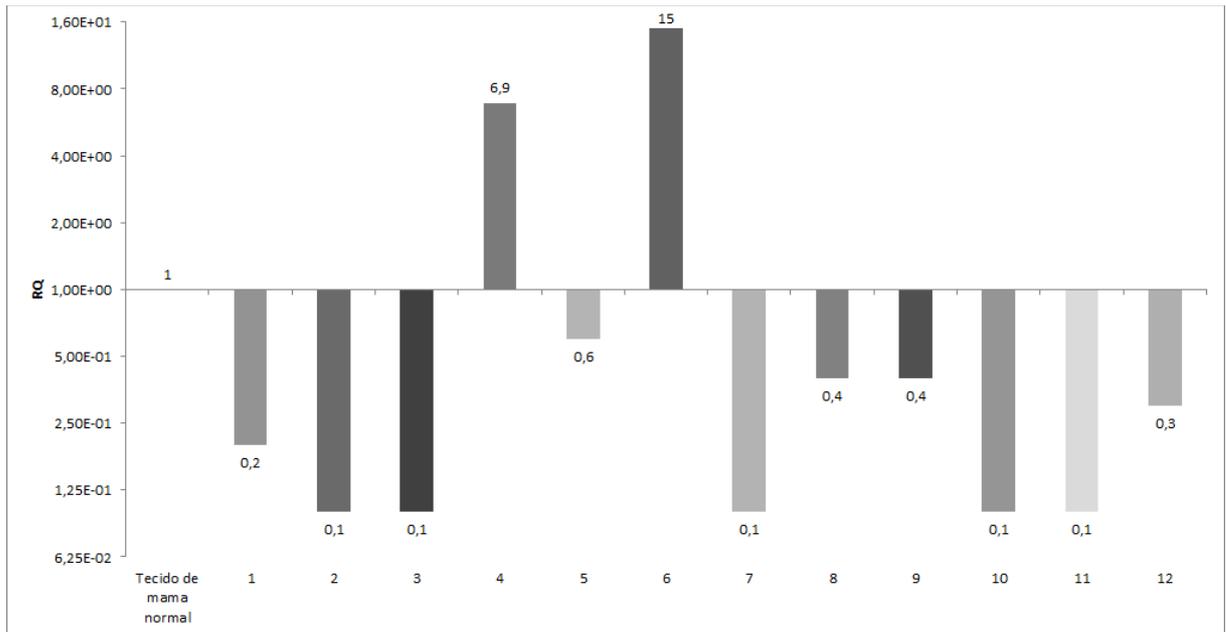


Figura 26 - Expressão relativa do SMYD5 em amostras clínicas de câncer de mama. SMYD5 se mostrou frequentemente *downregulado* nestas amostras. Os dados são apresentados como quantificação relativa (RQ), onde o calibrador usado para obtenção do $\Delta\Delta C_T$ foi a média do ΔC_T das amostras clínicas de tecido mamário hígido. β -actina foi usada como controle endógeno.

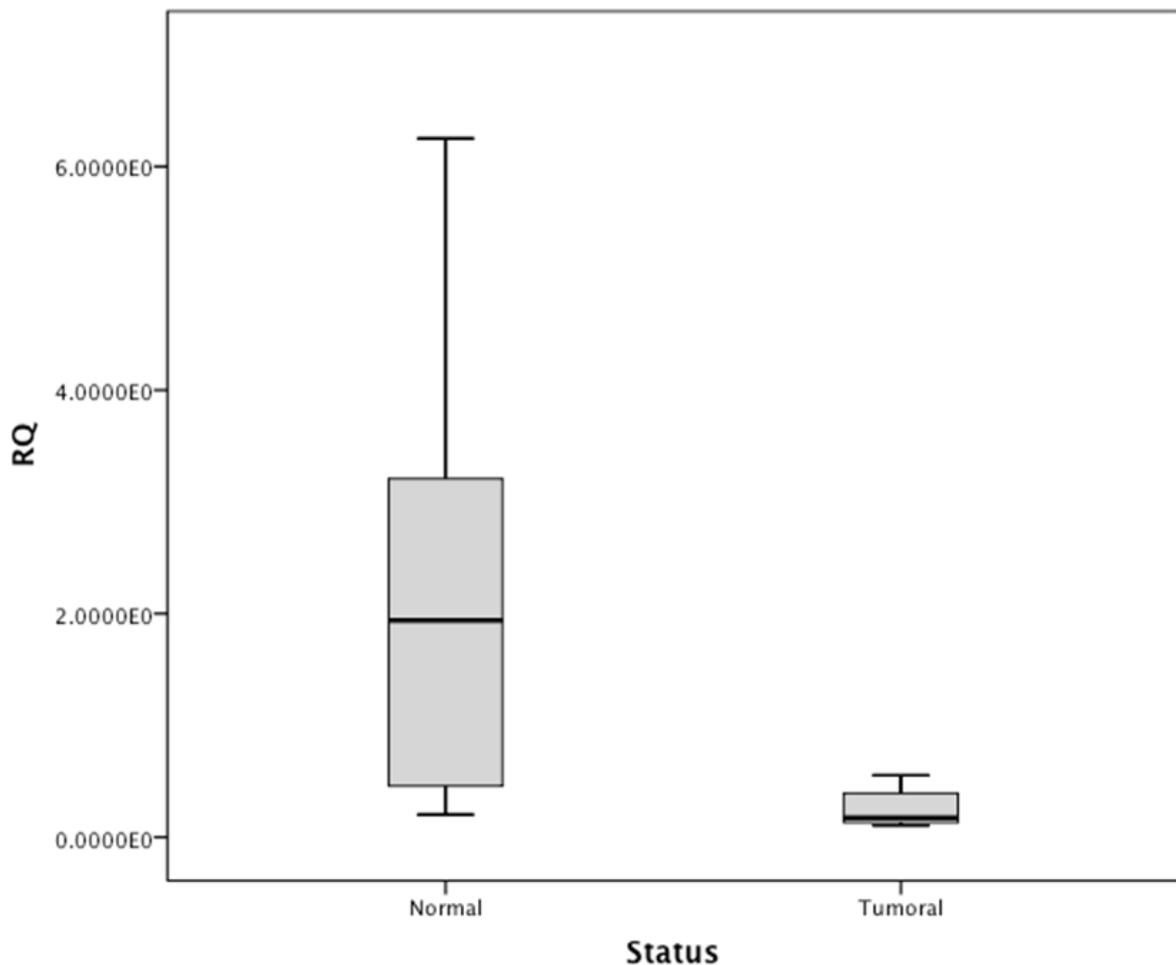


Figura 27 - *SMYD5* apresenta-se *downregulado* nas amostras tumorais. Os dados das amostras normais e tumorais foram confrontados em teste T de amostras independentes e a diferença na expressão relativa entre os grupos se mostrou estatisticamente significativa ($p = 0,012$). Para este teste foram excluídas as amostras tumorais *outliers* (4 e 6). As barras grossas nas caixas representam os níveis de expressão média e as caixas são representações de 95% das amostras. As barras de erro estão sobre e sob as caixas e o intervalo de níveis de expressão estão limitados por dois pontos.

4.8. Imunohistoquímica de *SMYD5* em tecido de câncer de mama

Para examinar a distribuição tecidual do *SMYD5* em amostra de câncer de mama, foi realizada uma análise imunohistoquímica de exemplares de câncer de mama e de tecido mamário normal em FFPF (figura 28). Foi observado que o *SMYD5* é encontrado em todas as células normais, tendo uma coloração gradativamente mais fraca marcando o tecido tumoral.

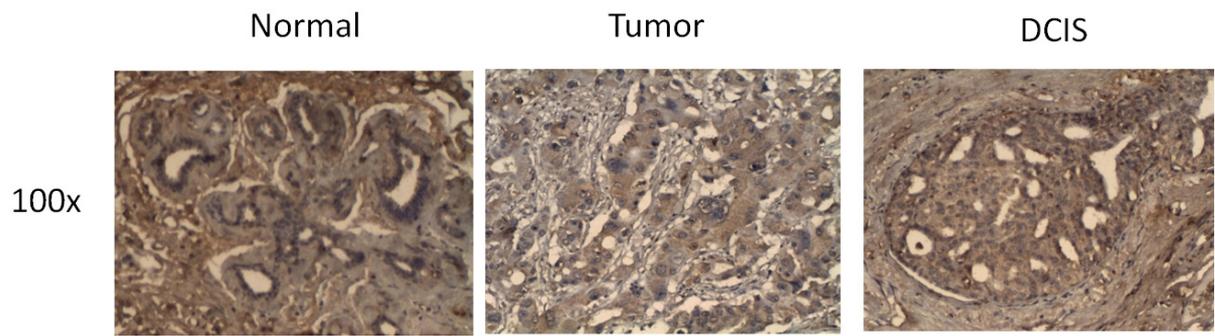


Figura 28 - Distribuição tecidual do SMYD5. Imagem representativa da marcação do SMYD5 por Imunohistoquímica em tecido de câncer de mama e glândula mamária não acometida. DCIS: carcinoma ductal *in situ* (do inglês, *Ductal Carcinoma in situ*).

5. DISCUSSÃO

O SMYD5 é uma metiltransferase de lisina responsável pela trimetilação da lisina 20 da histona 4 (H4K20me3). Esta marca pós-traducional foi descrita como um supressor transcricional de genes alvo de TLR4 em macrófagos. Esta regulação epigenética, a primeira descrição funcional do SMYD5 na literatura, foi relacionada a atividade inflamatória (83).

Nos últimos anos a literatura foi contemplada com vários artigos relacionando metiltransferases membros da família SMYD como fatores envolvidos na carcinogênese de vários tecidos (70-72, 77, 78, 80, 88). Neste trabalho foi proposta a caracterização funcional do SMYD5 e investigação da relação desta metiltransferase com o câncer de mama.

A sublocalização celular de SMYD5 foi feita em células HeLa transfectadas com pCMV-AC-SMYD5-GFP (Origene®). A transfecção foi feita com Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. A análise das células por microscopia confocal mostrou que o SMYD5 fusionado ao GFP estava em ambos núcleo e citoplasma (figura 22). Isso sugere que além da sua atividade já descrita de metiltransferase de histona, o SMYD5 pode ter outros substratos localizados no citoplasma, em concordância com o que já foi descrito para outros membros da sua família, SMYD2 (77-79) e SMYD3 (75). Ademais, SMYD1, -2 e -3 também estão co-localizados em ambos núcleo e citoplasma. O SMYD1 se move do núcleo para o citoplasma durante a diferenciação miogênica. SMYD2 pode modificar H3K36 no núcleo e regular as atividades de p53 ou RB1 no citoplasma através da metilação de lisina (77, 78). O SMYD3 tem atividade de metiltransferase de histonas em três sítios: H3K4 (69), H4K20 (73) e H4K5 (74). Além dos sítios catalíticos em histonas, o SMYD3 também foi descrito exercendo a sua atividade de metiltransferase na chaperona Hsp90 e no receptor VEGF quando localizado no citosol (69, 75). Portanto, assim como estas metiltransferases, há a possibilidade do SMYD5 atuar na metilação de diferentes alvos que não estão no compartimento nuclear. Investigações futuras são necessárias para elucidar a importância da localização do SMYD5 em ambos os compartimentos celulares, assim como a identificação de eventuais outros substratos.

Fez-se então a investigação para avaliar se a superexpressão do *SMYD5* em células não cancerígenas (HEK-293) ou a inibição de expressão em linhagem celular

de câncer de mama (MDA-MB-231) tem efeito na proliferação celular. Foi constatado que a superexpressão e/ou a inibição exógena deste gene não surtem efeitos significativos no perfil proliferativo destas células *in vitro* (figuras 16, 17, 19 e 20). Com relação ao potencial de modificador proliferativo de outros membros da família SMYD, foi descrito que a superexpressão do *SMYD3* em linhagem celular NIH3T3 resultou em um aumento significativo da proliferação celular e que o *knockdown* deste gene reduziu drasticamente a capacidade proliferativa de linhagens celulares de câncer hepático e colo retal (69). Indo na contramão do que foi descrito para o primeiro membro caracterizado da família SMYD, *SMYD2* e *-4* mostraram que apresentam um potencial papel de supressor de tumoral, uma vez que a superexpressão do *SMYD2* inibiu o crescimento de células NIH3T3 (76), e que a inibição da expressão de *SMYD4* em células MCF10 conferiu a estas células a capacidade de crescimento independente de ancoragem (80).

Para se determinar o padrão de expressão do *SMYD5* em tecidos humanos, qPCR foi feito usando um painel comercial de RNA total de doze tecidos, obtidos junto a Origene ®. A análise da expressão relativa (RQ) do *SMYD5* foi feita comparando cada tecido com a média do conjunto das amostras clínicas de tecido mamário normal. A análise revelou que o *SMYD5* exibe uma maior expressão nos tecidos cardíaco, testicular e músculo esquelético, enquanto apresenta uma expressão reduzida em cólon, intestino delgado e pulmão (figura 23). Expressões elevadas de outros membros da família SMYD já foram reportadas em coração (76, 92) e em músculo esquelético (92). Já foi descrito que o *SMYD1* é expresso especificamente nos precursores de músculos cardíaco e esquelético antes da diferenciação destas linhagens. *SMYD1* foi demonstrado como ser essencial para cardiomiogênese e funciona com um conjunto de proteínas cardíacas regulatórias (92). Apesar de o *SMYD5* se mostrar altamente expresso em células de músculo cardíaco e esquelético, ainda não se sabe se ele desempenha algum papel na cardiomiogênese. Esta observação abre possibilidades de se explorar em estudos futuros, a relação do *SMYD5* com a cardiomiogênese. Já o gene *SMYD2* apresenta altas expressões em coração e cérebro, apesar de já estar claro que esta metiltransferase não é tão essencial quanto o *SMYD1* no desenvolvimento cardíaco (76, 93). O *SMYD3* também apresenta uma alta expressão em testículo e músculo esquelético, mas não no tecido cardíaco (69). Embora seja interessante notar que os genes da família SMYD compartilham um padrão de expressão semelhante em

tecidos humanos normais, eles podem e desempenham diferentes papéis no contexto biológico.

A análise de quantificação relativa por qPCR também foi feita para avaliar a expressão de SMYD5 em linhagens de câncer de mama. Sete linhagens foram testadas (HCC1954, MCF7, CAMA1, SKBR3, MDA-MB-231, MDA-MB-436 e MDA-MB-468) e em todas elas o SMYD5 estava fortemente hipoexpresso com relação à média do conjunto das amostras de tecido mamário normal, que foi usada como calibrador da análise (figura 24). Ainda, essa diferença de expressão foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (figura 25). Uma diferença de expressão pode ser notada na linhagem celular HCC 1954, se comparada com as outras linhagens celulares de câncer de mama testadas (figura 25). Apesar de mais elevada, esta expressão ainda representa menos que 50% da expressão de SMYD5 observada em tecidos normais. É interessante notar que a linhagem HCC 1954 tem uma origem diferente das outras linhagens aqui testadas; enquanto a HCC 1954 foi coletada de um carcinoma ductal invasivo primário, as outras células de câncer de mama usadas neste projeto tem como origem a coleção em derrames pleurais de adenocarcinomas metastáticos (tabela 8). Esses dados podem sugerir que o nível de expressão do SMYD5 pode sofrer uma queda com a progressão da doença.

Tabela 8 - Características patológicas das linhagens celulares de câncer de mama

Linhagem celular	Origem	Tipo de tumor	Age	c-erbB2	RE	RP
HCC-1954	Câncer de mama primário	Carcinoma ductal	61	+	-	-
MCF-7	Derrame pleural	Carcinoma ductal invasivo	69	-	+	+
CAMA-1	Derrame pleural	Adenocarcinoma	51	-	+	-
SKBR3	Derrame pleural	Adenocarcinoma	43	+	-	-
MDA-MB-231	Derrame pleural	Adenocarcinoma	51	-	-	-
MDA-MB-436	Derrame pleural	Carcinoma ductal invasivo	43	*	-	-
MDA-MB-468	Derrame pleural	Adenocarcinoma	51	*	-	-

Legendas: RE: Receptor de Estrógeno; RP: Receptor de Progesterona; c-erbB2: Fator de crescimento epidermal HER-2/neu. * Dados não disponíveis. Adaptado de Neve (2006) em (94).

Vale ressaltar que no único artigo sobre SMYD5 publicado até o momento (83), esta metiltransferase foi descrita como responsável pela trimetilação da lisina 20 da histona 4 (H4K20me3). A metilação de H4K20 é complexa e é catalisada por várias metiltransferases, incluindo PRSET7, PRDM6 e NSD1. A trimetilação de H4K20 foi reportada como estando significativamente alterada em linhagens de câncer de mama, comparando-se com células epiteliais de mama não-tumorigênicas (95). No estudo em que há essa descrição, ainda há relato de que o grau da alteração da H4K20me3 estava correlacionado com o potencial carcinogênico das células e estava mais pronunciado na linhagem estudada que é associada ao pior prognóstico, MDA—MB-231 (95).

A perda da trimetilação da lisina 20 da histona 4 também já foi observada em modelos animais de carcinogênese, incluindo carcinogênese mamária em ratos induzidos por estradiol (96). Além disso, já foi descrito que o H4K20me3 é detectado em baixos níveis em câncer de mama e está associado com tumores de pior prognóstico (95).

A capacidade do SMYD5 de trimetilar H4K20, a conexão entre H4K20me3 e câncer de mama, e os resultados obtidos ao longo deste trabalho apontam para um potencial papel de supressor de tumor do SMYD5 na carcinogênese de mama. Todavia, investigações mais elaboradas para a confirmação desta hipótese devem ser executadas para consolidação deste potencial papel para o SMYD5.

Para fazer a avaliação do nível de SMYD5, desta vez em amostras clínicas de câncer de mama, realizou-se novamente análise de quantificação relativa por qPCR. Muitas amostras foram coletadas, mas nem todas foram utilizadas, seja pela baixa percentagem de malignidade do fragmento coletado (item 3.10), pela integridade do RNA (item 3.11) ou pela qualidade do cDNA sintetizado (3.12). Ao todo, 12 amostras tumorais foram analisadas utilizando-se a expressão de β -actina como normalizador e a média das amostras clínicas de tecido mamário normal como calibrador da análise.

Ao todo, 12 amostras tumorigênicas foram analisadas. Foi observado que o SMYD5 apresentava expressão reduzida em 80% das amostras de CM (Figura 26). No estudo feito por Elsheikh *et. al.* (2009) verificou-se que a perda de H4K20me3 aparenta estar relacionada com formas mais agressivas de câncer de mama (97), porém o pequeno número de casos do nosso estudo não permitiu fortes associações

entre o nível de expressão de *SMYD5* e as características patológicas das pacientes (TABELA 7), limitando a aplicação de análises estatísticas robustas. Fazendo teste T para amostras independentes (excluindo-se as amostras *outliers* – 4 e 6), tem-se que a diferença de expressão do *SMYD5* entre as amostras clínicas normais e as amostras tumorais é estatisticamente significativa ($p = 0,012$) (figura 27).

Por outro lado, no banco de dados Oncomine, há um estudo por *microarray* de expressão gênica de 56 casos de carcinoma ductal invasivo de mama e 6 tecidos normais de mama (98). Os dados deste corroboram nossas descobertas que mostram que o *SMYD5* é hipoexpresso no câncer de mama, se comparado com tecido mamário normal (figura 29).

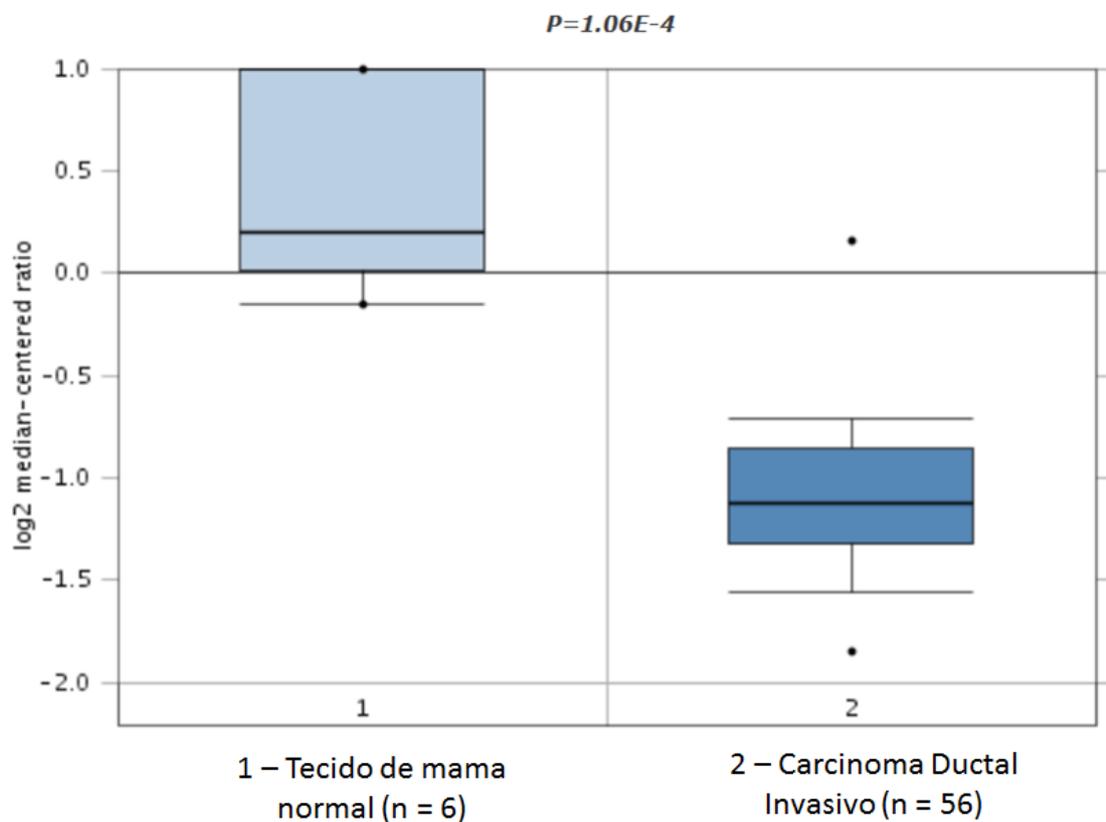


Figura 29 - *SMYD5* está *downregulado* em CM. Dados da expressão gênica de 56 tumores de mama do banco de dados Oncomine foram analisados (98). As barras grossas nas caixas representam os níveis de expressão média e as caixas são representações de 95% das amostras. As barras de erro estão sobre e sob as caixas e o intervalo de níveis de expressão estão limitados por dois pontos.

Por fim, para analisar a distribuição tecidual do *SMYD5* em tecidos mamários, tumorais e normais, foi feita análise imunohistoquímica de amostras de tecidos parafinizados. Observou-se que *SMYD5* é encontrado em todas as células normais da mama e que apresenta uma coloração gradualmente mais fraca no tecido tumoral

(Figura 28). Este dado corrobora os dados já encontrados em qPCR descritos acima, que evidenciam uma expressão basal de SMYD5 em tecidos mamários normais e uma hipoexpressão desta mesma metiltransferase em tecidos malignos, quando comparado aos tecidos normais.

Juntos, os dados deste trabalho e a literatura existente até o momento mostram que o SMYD5, responsável pela H4K20me3, está fortemente *downregulado* em linhagens de câncer de mama e que a perda da marca epigenética catalisada pela enzima não apenas está associada ao câncer de mama, como a um possível pior prognóstico da doença, levando a hipótese de esta metiltransferase ser um potencial supressor tumoral. Estudos futuros poderão esclarecer o mecanismo que leva a progressiva supressão do SMYD5 em carcinomas mamários.

6. CONCLUSÕES

- A superexpressão e inibição de expressão do *SMYD5 in vitro* não afetou significativamente o perfil proliferativo de linhagens celulares;
- O *SMYD5* está co-localizado em ambos núcleo e citoplasma;
- A expressão do *SMYD5* é mais elevada nos tecidos cardíaco, testicular e de músculo esquelético. A expressão mais baixa deste gene é encontrada em cólon, intestino delgado e pulmão;
- O *SMYD5* está significativamente hipoexpresso em linhagens de câncer de mama, quando comparadas ao tecido mamário normal;
- O *SMYD5* apresenta-se frequentemente suprimido em amostras clínicas de câncer de mama, se comparadas com tecido de mama normal;
- O *SMYD5* está gradativamente menos presente em tumores malignos de mama, quando comparados ao tecido normal;
- Existe uma correlação entre a perda de H4K20me3 e o câncer de mama, assim como há uma relação entre a baixa expressão do *SMYD5* e o CM.
- O *SMYD5* é um potencial supressor tumoral no contexto mamário.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. International Agency for Research on Cancer (2008) Cancer fact sheet: breast cancer. <<http://globocan.iarc.fr/>>, 15/11/2012.
2. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (MS. INCA). Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro : Inca, 2011
3. Peltomäki P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Exp Cell Res.* 2012;318(4):299-310.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer. *Cell.* , Vol. 2000; 100: 57–70.
5. Moolgavkar SH, Knudson AG Jr. Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 1981;66(6):1037-52.
6. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(9):2941-53.
7. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol.* 1998;153(2):333-9.
8. Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.* 1991;51(18 Suppl):5023s-5044s.
9. Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1997;18(5):869-82.
10. Minamoto T, Mai M, Ronai Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1999;20(4):519-27.
11. Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 1989;49(14):3713-21.
12. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991;51(12):3075-9.
13. Weinberg RA. *A biologia do câncer.* Porto Alegre: Artmed, 2008.
14. Guimarães JLM, Rosa DD. *Rotinas em oncologia.* Porto Alegre: Artmed, 2008.
15. WHO – World Health Organization.
<<http://www.who.int/cancer/en/index.html>>, acessado em 31/10/2012.
16. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011; 144: 646-674.

17. Lopes A et al. *Prevenção do Câncer*. Barueri: Manole, 2010
18. Adami HO, Persson I, Ekblom A, Wolk A, Pontén J, Trichopoulos D. The aetiology and pathogenesis of human breast cancer. *Mutat Res*. 1995;333(1-2):29-35.
19. Skegg DC. Risk assessment issues in breast cancer. *Mutat Res*. 1995;333(1-2):51-8.
20. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000 Sep 9;321(7261):624-8.
21. Kluttig A, Schmidt-Pokrzywniak A. Established and Suspected Risk Factors in Breast Cancer Aetiology. *Breast Care (Basel)*. 2009; 4(2): 82–87.
22. Trufelli DA, Miranda VC, Dos Santos MBB, Fraile NMP, Pecoroni PG, Gonzaga SFR, Riechelmann R, Kaliks R, Del Giglio A. Análise do atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de mama em um hospital público. *Rev Assoc Med Bras*. 2008; 54(1): 72-6
23. Rodríguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med*. 2011; 17(3):330-9
24. Varier RA, Timmers HT. Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1815(1):75-89
25. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):143-53.
26. Wolffe AP, Guschin D. Chromatin structural features and targets that regulate transcription. *Journal of Structural Biology, Amsterdam*. 2000; 129: 102–122.
27. Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr*. 2009; (2):243-51.
28. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004; 429 (6990): 457-463.
29. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in Cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31(1): 27-36.
30. Szyf M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49:243-63.
31. Lopez J, Percharde M, Coley HM, Webb A, Crook T. The context and potential of epigenetics in oncology. *Br J Cancer*. 2009;100(4):571-7.

32. Egger, G.; Liang, G.; Aparicio, A.; Jones, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, London, v. 429, n. 6990, p. 457-463, 2004.
33. Luger K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev*. 2003;13(2):127-35.
34. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001; 293(5532): 1074-80.
35. Thompson EC, Travers AA. *Drosophila* Smyd4 homologue is a muscle-specific transcriptional modulator involved in development. *PLoS One*. 2008; 3(8) :e3008.
36. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41-5.
37. Kondo Y. Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Med J*. 2009; 50(4): 455-63.
38. Hamon MA, Cossart P. Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. *Cell Host Microbe*. 2008; 14;4(2):100-9.
39. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of rna synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1964; 51: 786-94.
40. Luger K, Maeder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997; 389: 251-259
41. Spannhoff A, Hauser AT, Heinke R, Sippl W, Jung M. The Emerging Therapeutic Potential of Histone Methyltransferase and Demethylase Inhibitors. *Chem Med Chem*. 2009; (4): 1568-1582.
42. Lennartsson A, Ekwall K. Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790(9):863-8.
43. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007; 128(4): 693-705.
44. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012; 150(1):12-27.
45. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet*. 2012;13(5):343-57.

46. Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(11):838-49.
47. Albert M, Helin K. Histone methyltransferases in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, n. 21, p. 209–220, 2010.
48. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1057-68.
49. Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(6):376-92.
50. Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(6):1409-20.
51. Fog CK, Jensen KT, Lund AH. Chromatin-modifying proteins in cancer. *APMIS.* 2007; 115(10):1060-1089
52. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet.* 2012;13(5):343-57.
53. Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(11):838-49.
54. Jenuwein T. The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J.* 2006;273(14):3121-35.
55. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011 Mar;21(3):381-95.
56. Zhang X, Wen H, Shi X. Lysine methylation: beyond histones. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2012;44(1):14-27.
57. Munshi A, Shafi G, Aliya N, Jyothy A. Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics.* 2009;36(2):75-88.
58. Herceg Z. Epigenetic information in chromatin and cancer. *Eur J Cancer.* 2009;45 Suppl 1:442-4.
59. Escargueil AE, Soares DG, Salvador M, Larsen AK, Henriques JA. What histone code for DNA repair? *Mutat Res.* 2008;658(3):259-70.
60. Altaf M, Saksouk N, Côté J. Histone modifications in response to DNA damage. *Mutat Res.* 2007;618(1-2):81-90.
61. Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet.* 2002;12(2):142-8.
62. Füllgrabe, J, Kavanagh E, Joseph B: Histone onco-modifications. *Oncogene* 2011,30(31):3391-403.

63. Kooistra SM, Helin K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(5):297-311.
64. Cross NC. Histone modification defects in developmental disorders and cancer. *Oncotarget.* 2012;3(1):3-4.
65. Chuikov, S, Kurash, JK, Wilson, JR, Xiao, B, Justin, N, Ivanov, GS, Mckinney, K, Tempst, P, Prives, C, Gamblin, SJ, Barlev, NA, Reinberg, D: Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature.* 2004, 432:353–360.
66. Kouskouti A, Scheer E, Staub A, Tora L, Talianidis I: Gene-specific modulation of TAF10 function by SET9-mediated methylation. *Mol Cell.* 2004, 14(2):175-82.
67. Abu-Farha M, Lambert JP, Al-Madhoun AS, Elisma F, Skerjanc IS, Figeys D. The tale of two domains: proteomics and genomics analysis of SMYD2, a new histone methyltransferase. *Mol Cell Proteomics.* 2008; 7(3):560-72.
68. Gottlieb PD, Pierce SA, Sims RJ, Yamagishi H, Weihe EK, Harriss JV, Maika SD, Kuziel WA, King HL, Olson EN, Nakagawa O, Srivastava D. Bop encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis. *Nat Genet.* 2002;31(1):25-32.
69. Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Imura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R, Nakamura Y. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol.* 2004;6(8):731-40.
70. Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, Nishidate T, Katagiri T, Nakamura Y, Furukawa Y. Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2006;97(2):113-8.
71. Silva FP, Hamamoto R, Kunizaki M, Tsuge M, Nakamura Y, Furukawa Y. Enhanced methyltransferase activity of SMYD3 by the cleavage of its N-terminal region in human cancer cells. *Oncogene.* 2008;27(19):2686-92.
72. Tsuge M, Hamamoto R, Silva FP, Ohnishi Y, Chayama K, Kamatani N, Furukawa Y, Nakamura Y. A variable number of tandem repeats polymorphism in an E2F-1 binding element in the 5' flanking region of SMYD3 is a risk factor for human cancers. *Nat Genet.* 2005; 37(10): 1104-7.
73. Foreman KW, Brown M, Park F, Emtage S, Harriss J, Das C, Zhu L, Crew A, Arnold L, Shaaban S, Tucker P. Structural and functional profiling of the human histone methyltransferase SMYD3. *PLoS One.* 2011;6(7):e22290.

74. Van Aller GS, Reynoird N, Barbash O, Huddleston M, Liu S, Zmoos AF, McDevitt P, Sinnamon R, Le B, Mas G, Annan R, Sage J, Garcia BA, Tummino PJ, Gozani O, Kruger RG. Smyd3 regulates cancer cell phenotypes and catalyzes histone H4 lysine 5 methylation. *Epigenetics*. 2012;7(4):340-3.
75. Kunizaki M, Hamamoto R, Silva FP, Yamaguchi K, Nagayasu T, Shibuya M, Nakamura Y, Furukawa Y. The lysine 831 of vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel target of methylation by SMYD3. *Cancer Res*. 2007;67(22):10759-65.
76. Brown MA, Sims RJ 3rd, Gottlieb PD, Tucker PW. Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Mol Cancer*. 2006;5:26.
77. Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ, Sengupta R, Richter M, Dorsey JA, Kubicek S, Opravil S, Jenuwein T, Berger SL. Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature*. 2006;444(7119):629-32.
78. Saddic LA, West LE, Aslanian A, Yates JR 3rd, Rubin SM, Gozani O, Sage J. Methylation of the retinoblastoma tumor suppressor by SMYD2. *J Biol Chem*. 2010;285(48):37733-40.
79. Abu-Farha M, Lanouette S, Elisma F, Tremblay V, Butson J, Figeys D, Couture JF. Proteomic analyses of the SMYD family interactomes identify HSP90 as a novel target for SMYD2. *J Mol Cell Biol*. 2011; 3(5):301-8.
80. Hu L, Zhu YT, Qi C, Zhu YJ. Identification of Smyd4 as a potential tumor suppressor gene involved in breast cancer development. *Cancer Res*. 2009;69(9):4067-72.
81. US National Library of Medicine. National Institutes of Health. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>, acessado em 13/12/2012.
82. UniProt. <<http://www.uniprot.org/>>, acessado em 13/12/2012.
83. Stender JD, Pascual G, Liu W, Kaikkonen MU, Do K, Spann NJ, Boutros M, Perrimon N, Rosenfeld MG, Glass CK. Control of proinflammatory gene programs by regulated trimethylation and demethylation of histone H4K20. *Mol Cell*. 2012;48(1):28-38.
84. Dong C, Wu Y, Wang Y, Wang C, Kang T, Rychahou PG, Chi YI, Evers BM, Zhou BP: Interaction with Suv39H1 is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in breast cancer. *Oncogene* 2012, 169.

85. Newbold RF, Mokbel K: Evidence for a tumour suppressor function of SETD2 in human breast cancer: a new hypothesis. *Anticancer Res* 2010, 30(9):3309-3311.
86. Zhou Z, Thomsen R, Kahns S, Nielsen AL: The NSD3L histone methyltransferase regulates cell cycle and cell invasion in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010,398(3):565-570.
87. Newbold RF, Mokbel K: Evidence for a tumour suppressor function of SETD2 in human breast cancer: a new hypothesis. *Anticancer Res.* 2010; 30(9):3309-3311.
88. Ren TN, Wang JS, He YM, Xu CL, Wang SZ, Xi T. Effects of SMYD3 over-expression on cell cycle acceleration and cell proliferation in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Med Oncol.* 2011;28 Suppl 1:S91-8.
89. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Plainview, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989.
90. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
91. InvivoGen. < <http://www.invivogen.com/g418>>, acessado em 13/12/2012.
92. Tan X, Rotllant J, Li H, De Deyne P, Du SJ. SmyD1, a histone methyltransferase, is required for myofibril organization and muscle contraction in zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(8):2713-8.
93. Diehl F, Brown MA, van Amerongen MJ, Novoyatleva T, Wietelmann A, Harriss J, Ferrazzi F, Böttger T, Harvey RP, Tucker PW, Engel FB: Cardiac deletion of Smyd2 is dispensable for mouse heart development. *PLoS One* 2010, 5(3):e9748.
94. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 2006; 10(6):515-27
95. Tryndyak VP, Kovalchuk O, Pogribny IP. Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with

- aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(1):65-70.
96. Kovalchuk O, Tryndyak VP, Montgomery B, Boyko A, Kutanzi K, Zemp F, Warbritton AR, Latendresse JR, Kovalchuk I, Beland FA, Pogribny IP. Estrogen-induced rat breast carcinogenesis is characterized by alterations in DNA methylation, histone modifications and aberrant microRNA expression. *Cell Cycle.* 2007;6(16):2010-8.
97. Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, Soria D, Garibaldi JM, Paish CE, Ammar AA, Grainge MJ, Ball GR, Abdelghany MK, Martinez-Pomares L, Heery DM, Ellis IO. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res.* 2009;69(9):3802-9.
98. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallett M, Park M. ONCOMINE: Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med.* 2008;14(5):518-27.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO I – CEP 025/09



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **025/09**

Título do Projeto: “Análise genômica e funcional de genes codificadores de metiltransferases protéicas em Linhagens de Carcinoma Ductal de Mama e Normal Linfoide Humana”.

Pesquisadora Responsável: Fábio Pitella Silva

Data de Entrada: 23/04/2009

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR emenda** ao projeto **025/09** com o título: “Análise genômica e funcional de genes codificadores de metiltransferases protéicas em Linhagens de Carcinoma Ductal de Mama e Normal Linfoide Humana”, analisado na 5ª Reunião Ordinária, realizada no dia 08 de Junho de 2010, com as seguintes especificações:

- Emenda ao Protocolo, versão 02 de abril de 2010, item 4.1 metodologia, com as modificações sublinhadas;
- Termo de Consentimento Livre e esclarecido, versão 02 de abril de 2010;

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 07 de outubro de 2010.


Prof. Natan Moraes de Sá
Coordenador do CEP-FS/UnB

8.2. ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O(A) sr(a). está sendo convidado(a), através deste documento fornecido em duas vias, a participar de um projeto de pesquisa denominado “Análise genômica e funcional de genes codificadores de metiltransferases protéicas em linhagens de carcinoma ductal da mama e normal linfóide humana”.

Os pesquisadores da Universidade de Brasília e os médicos do Hospital da Universidade de Brasília (HUB) estão desenvolvendo este projeto colaborativo, sob a coordenação do Prof. Dr. Fábio Pittella Silva, para estudar os mecanismos celulares e moleculares que geram o câncer de mama. Um dos benefícios desse projeto de pesquisa é que fornecerá bases para o desenvolvimento de diagnósticos mais precisos. Ajudará a caracterização da doença na Região Centro-Oeste, Norte e Nordeste do país. Outro benefício é que medicamentos específicos para o tratamento do câncer poderão ser desenvolvidos.

Caso o(a) sr(a). aceite participar, o pesquisador poderá esclarecer quaisquer dúvidas que tiver a respeito do projeto e deste termo de consentimento.

O procedimento para o estudo será o seguinte:

- O(A) senhor(a) será convidado a responder um questionário referente ao histórico da doença, compondo dados que farão parte do prontuário médico.
- O(A) senhor(a) está ciente de que há uma suspeita de acometimento com uma doença chamada câncer de mama, que requer tratamento e acompanhamento médico. Uma das maneiras pelas quais se pode confirmar ou excluir tal suspeita é através das amostra(s) de biópsia(s), ou seja, retirada de pequeno(s) fragmento(s) do tecido do órgão afetado. Esse(s) fragmento(s) será(ão) examinado(s) por um(a) médico(a)-patologista treinado(a), que poderá utilizar técnicas modernas apropriadas (como a imunohistoquímica) para o diagnóstico e posteriormente, emitirá um laudo. Na maioria dos casos, o pesquisador-responsável irá recomendar o tratamento do tumor. Nesse caso, o(a) sr(a). será encaminhado a um médico-cirurgião do HUB, que lhe fornecerá todos os esclarecimentos com relação ao tratamento. No caso de tratamento cirúrgico, amostras do tecido poderão ser examinadas também pelo(a) patologista. Não haverá qualquer custo para a realização dos exames relacionados ao tratamento, ou para o tratamento em si, mesmo que cirúrgico.

O material coletado para diagnóstico e acompanhamento do tratamento, assim como o material removido cirurgicamente, será utilizado para as análises clínicas necessárias, sendo uma pequena quantidade do mesmo utilizada para o projeto de pesquisa. Neste momento, outra pequena amostra de tecido normal também será retirada. Nenhum nome ou endereço será associado com a amostra coletada, tornando sua participação confidencial. O tratamento bem como as análises clínicas não acarretarão em ônus financeiro para o(a) sr(a) e/ou sua família.

- As amostras biológicas serão utilizadas apenas pelos pesquisadores envolvidos neste projeto, sendo experimentalmente manipuladas no Laboratório de Farmacologia Molecular, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. As características

moleculares das mesmas serão analisadas por técnicas de biologia molecular e celular. As amostras não serão disponibilizadas para outros estudos em qualquer hipótese.

▪ Os dados e registros relacionados a este projeto serão mantidos no HUB e somente os pesquisadores diretamente relacionados ao projeto terão acesso aos mesmos. Se desejar, o(a) sr(a) será informado(a) dos resultados dessa pesquisa, que tem previsão de duração de 3 anos. Os resultados também serão publicados em revistas científicas e de interesse médico, sempre mantendo-se o seu anonimato.

A participação neste trabalho é voluntária, portanto o(a) sr(a) tem toda a liberdade de decidir se deseja participar ou não deste projeto. Poderá recusar-se a participar ou descontinuar a sua participação a qualquer momento, ou ainda recusar-se a fornecer qualquer informação (mesmo participando do estudo), tudo sem penalidades ou perda de benefícios a que tenha direito.

Li e entendi este TERMO. Durante a entrevista, eu me senti esclarecido quanto aos objetivos do trabalho de pesquisa. Estou ciente de que a participação no projeto é voluntária e não acarreta ônus para mim e/ou minha família. Sei ainda que em qualquer momento, posso pedir maiores esclarecimentos ao pesquisador responsável, bem como cancelar a participação sem que isso traga prejuízo a mim.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

_____ data: _____
Assinatura do(a) paciente

_____ data: _____
Assinatura do médico responsável pela pesquisa
Dr. João Nunes Neto – Cancerologista – CRM-DF 9165

_____ data: _____
Assinatura do coordenador do projeto de pesquisa
Prof. Dr. Fábio Pittella Silva – UNB

Telefones para contatos:

Comitê de Ética em Pesquisa, Faculdade de Ciências da Saúde, UnB (CEP/FS) – Tel: (61)3307-3799

Dr. João Nunes Neto – Tel: (61) 34485021

Prof. Dr. Fábio Pittella Silva – Tel: (61) 31071998