

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR
FACULDADE DE MEDICINA (FM)

IMPACTO DAS DESMETILASES DE HISTONA DA FAMÍLIA KDM4 NO
PROGNÓSTICO DA LEUCEMIA LINFOIDE CRÔNICA

LUMA DAYANE DE CARVALHO FILIÚ BRAGA

Brasília

2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR
FACULDADE DE MEDICINA (FM)

IMPACTO DAS DESMETILASES DE HISTONA DA FAMÍLIA KDM4 NO
PROGNÓSTICO DA LEUCEMIA LINFOIDE CRÔNICA

LUMA DAYANE DE CARVALHO FILIÚ BRAGA

ORIENTADOR: PROF. DR. FELIPE SALDANHA DE ARAÚJO

COORIENTADOR: PROFA. DRA. JULIANA LOTT DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Patologia Molecular.

Brasília

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Braga, Luma Dayane de Carvalho Filiú

IMPACTO DAS DESMETILASES DE HISTONA DA FAMÍLIA KDM4 NO PROGNÓSTICO DA LEUCEMIA LINFOIDE CRÔNICA / Luma Dayane de Carvalho Filiú Braga; orientador Felipe Saldanha de Araujo; co-orientador Juliana Lott de Carvalho. -- Brasília, 2018. 69 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, 2018.

1. Leucemia Linfóide Crônica. 2. Desmetilase de histona. 3. KDM4. 4. ZAP-70. 5. Cariótipo.

I. Araujo, Felipe Saldanha de, orient. II. Carvalho, Juliana Lott de, co-orient.

LUMA DAYANE DE CARVALHO FILIÚ BRAGA

IMPACTO DAS DESMETILASES DE HISTONA DA FAMÍLIA KDM4 NO
PROGNÓSTICO DA LEUCEMIA LINFOIDE CRÔNICA

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 29 de Novembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araujo – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Enrique Roberto Arganaraz - Universidade de Brasília

Prof. Dr. Rodrigo Haddad - Universidade de Brasília

Brasília

2018

“A persistência é o menor caminho do êxito”.
(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força e saúde para vencer mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, sou extremamente grata e feliz por me incentivarem, pelos ensinamentos, por acreditarem no meu potencial, pelo imenso amor que têm por mim e pelos meus irmãos. À minha mãe quero agradecer também, por continuamente estar ao meu lado e sempre me encher com seu carinho. Aos meus irmãos, agradeço especialmente a Yasminn (“Nega”) e o Tarek pela cumplicidade, amizade e infância que tivemos. Novamente, deixo o meu obrigada a “Nega”, por me auxiliar com a minha filha e estar sempre pronta a me ajudar.

Ao meu marido Mikael, por todo amor, carinho, compreensão e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada. Obrigada por permanecer ao meu lado e por ter me presenteado com a nossa princesa, Maria Luísa (“Mallu”).

À minha filha “Mallu”, por me fazer amadurecer e crescer a cada dia e por ter me mostrado o verdadeiro amor incondicional.

Aos meus amigos por me apoiarem, aconselharem e ouvirem minhas lamurias. Laise e Karlinha, minhas amigas da graduação, obrigada por sempre estarem prontas para me ajudar, pelas conversas, por me ouvirem e pelos momentos felizes. Sou grata a Mairinha, por ter me acolhido na sua casa, na época que estávamos fazendo especialização, onde fortalecemos a nossa amizade. Raquel e Amandda, companheiras de laboratório, agradeço imensamente por terem me ajudado em alguns experimentos quando eu estava grávida e me auxiliaram em tantos outros momentos. Sou grande

admiradora de todas vocês!

Agradeço a parceria com a Universidade Católica de Brasília, em particular à minha coorientadora Profa. Juliana Lott de Carvalho por todos os seus ensinamentos, pela paciência, por esclarecer as minhas dúvidas e por compartilhar seu tempo comigo. Sou grata também ao laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília, em especial ao Prof. Francisco.

Agradeço ao meu orientador Prof. Felipe Saldanha de Araujo, pela oportunidade e pela confiança em mim depositada. Além disso, manifesto aqui minha gratidão por compartilhar sua sabedoria, o seu tempo e sua experiência para me auxiliar no decorrer do projeto.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Leucemia Linfoide Crônica	17
1.1.1. Epidemiologia.....	17
1.1.2. Fisiopatologia	17
1.1.3. Diagnóstico e estadiamento clínico	21
1.1.4. Marcadores prognósticos	23
1.2. Epigenética e câncer	27
1.2.1. Subfamília KDM4	28
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. Geral:	33
2.2. Específicos:.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Casuística	35
3.2. Isolamento das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP).....	35
3.3. Citogenética	36
3.4. Processamento das amostras para extração do RNA	36
3.5. Extração do RNA e transcrição reversa	37
3.6. PCR em tempo real	38
3.7. Análise estatística	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Características clínico-laboratoriais da coorte estudada.....	40
4.2. Expressão de KDM4 na leucemia linfoide crônica.....	41
4.3. A expressão diferencial do gene KDM4 se associa ao maior número de leucócitos e a expressão da proteína ZAP-70 em pacientes com LLC.....	42
4.4. Expressão dos genes KDM4 em relação à instabilidade genômica e alterações cromossômicas na LLC	44
5. DISCUSSÃO.....	47
6. CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS	54
8. ANEXO (Artigo publicado).....	65

RESUMO

BRAGA, Luma Dayane de Carvalho Filiú. IMPACTO DAS DESMETILASES DE HISTONA DA FAMÍLIA KDM4 NO PROGNÓSTICO DA LEUCEMIA LINFOIDE CRÔNICA. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

A leucemia linfóide crônica (LLC) é uma doença neoplásica caracterizada pelo acúmulo de linfócitos B no sangue, medula e tecidos linfóides secundários, o que resulta em linfocitose, linfadenopatia e esplenomegalia. Apesar de possuir marcadores prognósticos definidos, como anormalidades cromossômicas específicas e expressão da proteína ZAP-70, a fisiopatologia da LLC é desconhecida. Atualmente, tem-se demonstrado a importância de alterações epigenéticas no desenvolvimento do câncer. Especificamente, alterações na família da desmetilase de histona KDM4 estão relacionadas ao surgimento e progressão do câncer de cólon, mama, gástrico, próstata e do meduloblastoma. No presente trabalho investigamos o envolvimento das desmetilases da família KDM4 no desenvolvimento e na progressão da LLC. Inicialmente, avaliamos o nível de expressão gênica de KDM4A, KDM4B e KDM4C em 59 casos de LLC e 10 amostras de células B isoladas de indivíduos saudáveis. Em seguida, foi utilizada a técnica de Citometria de Fluxo para determinar a expressão da proteína ZAP-70 nos pacientes com LLC e também foi determinado o cariótipo desses casos por bandeamento G. O gene KDM4A se mostrou mais expresso em amostras de LLC, comparado as amostras controle. Por outro lado, KDM4B se mostrou menos expresso na LLC, enquanto não houve diferença de expressão de KDM4C entre as amostras de LLC e as amostras controle. Em seguida, estratificamos a expressão dos genes investigados, segundo a expressão positiva ou negativa da proteína ZAP-70 (cut-

off 20%). Embora não tenhamos encontrado associação entre ZAP-70 e a expressão de KDM4A, os pacientes com expressão positiva de ZAP-70 apresentam menor expressão de KDM4B e KDM4C, quando comparados aos pacientes com baixa expressão de ZAP-70. Além disso, a baixa expressão de KDM4B e de KDM4C se associou ao acúmulo de células leucêmicas. Mais importante, a baixa expressão de KDM4B e KDM4C mostrou associação tanto com a maior incidência de alterações citogenéticas preditivas de mau prognóstico, como com a presença de cariótipo complexo na LLC. Em conjunto, esses achados mostram que a menor expressão dos genes KDM4B e KDM4C está associada ao pior prognóstico na LLC, em que há expressão elevada de ZAP-70 e aquisição de cariótipo complexo. Esses dados podem servir de base para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a LLC, visando controlar processos epigenéticos e a progressão dessa leucemia.

Palavras-chave: Leucemia Linfóide Crônica, desmetilase de histona, KDM4, ZAP-70, cariótipo.

ABSTRACT

BRAGA, Luma Dayane de Carvalho Filiú. IMPACT OF HISTONE DEMETHYLASES FROM THE KDM4 FAMILY ON THE PROGNOSIS OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a neoplastic disease characterized by the accumulation of B-cells in the blood, bone marrow and secondary lymphoid tissues, resulting in lymphocytosis, lymphadenopathy and splenomegaly. Although this leukemia has well-defined prognostic markers, such as specific chromosomal abnormalities and ZAP-70 expression, the pathophysiology of CLL is unknown. The importance of epigenetic alterations in cancer development has been shown recently and reveals increasing importance. Particularly, alterations in the family of histone demethylase KDM4 are related to onset and progression of colon, breast, gastric, prostate cancer and medulloblastoma. In the present work we investigated the involvement of the demethylase family KDM4 in the development and progression of CLL. Initially, we evaluated the transcriptional profile of KDM4A, KDM4B and KDM4C in 59 cases of CLL, and compared to 10 B cells samples isolated from healthy donors. Next, ZAP-70 expression was determined by flow cytometry in CLL patients. The karyotype of these cases was determined by G-banding. Interestingly, KDM4A expression was higher in CLL samples, compared to normal B-cells. In contrast, KDM4B expression was decreased in CLL, and no difference was detected in the transcriptional levels of KDM4C between CLL and control samples. Then, the expression of the investigated genes was stratified, according to ZAP-70 positive or negative expression (cut-off of 20%). Even though no association between ZAP-70 and

the expression of KDM4A expression was found, the patients with positive expression of ZAP-70 showed lower expression of KDM4B and KDM4C, when compared to patients with low expression of ZAP-70. In addition, the low expression of KDM4B and KDM4C was significantly associated with the accumulation of leukemic cells. More importantly, the low expression of KDM4B and KDM4C showed association with higher incidence of adverse cytogenetic alterations, as well as the presence of complex karyotype. Taken together, these findings reveal that the lower expression of KDM4B and KDM4C is associated with a worse prognosis in CLL, including the high expression of ZAP-70 and acquisition of complex karyotype. These results may pave the way for the development of new therapeutic approaches for CLL, aimed at controlling epigenetic processes and the progression of this leukemia.

Keywords: Chronic Lymphocytic Leukemia, histone demethylase, KDM4, ZAP-70, karyotype.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sinalização do receptor de células B.....Pg 18.
- Figura 2.** Diferentes modalidades de interação entre a célula B da LLC e o microambiente.....Pg 20.
- Figura 3.** Mecanismos epigenéticos.....Pg 27.
- Figura 4.** Diagrama da árvore genealógica da histona lisina desmetilase (KDM)...Pg 28.
- Figura 5.** Apresentação esquemática da desmetilação da lisina histona para transcrição gênica.....Pg 30.
- Figura 6.** Expressão do gene KDM4A, KDM4B e KDM4C na LLC.....Pg 42.
- Figura 7.** Associação entre expressão dos genes da família KDM4 e a contagem de leucócitos em pacientes com leucemia.....Pg 43.
- Figura 8.** Expressão dos genes da família KDM4 e a expressão de ZAP-70 em pacientes com LLC.....Pg 43.
- Figura 9.** Expressão de KDM4 em pacientes que possuem cariótipo favorável, intermediário e desfavorável.....Pg 44.
- Figura 10.** Expressão de KDM4 e número de alterações cromossômicas.....Pg 45.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Estadiamento de Binet.....Pag 23.
- Tabela 2.** Alterações cromossômicas mais recorrentes na LLC.....Pag 25.
- Tabela 3.** Classificação funcional e substratos das desmetilases de lisina de histona
..... Pag 29.
- Tabela 4.** Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LLC.....Pag 41.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR: Receptor de androgênio
Bcl2: Proteína oncogênica antiapoptótica
BCR: Receptores de Células B
CD: *Cluster of differentiation* (inglês)
CMSP: Células Mononucleares do Sangue Periférico
cDNA: DNA complementar
Del: Deleção de braço cromossômico
dL: Decilitro
DNA: Desoxiribonuclease
ER: Receptor de estrogênio
FISH: Hibridização fluorescente *in situ*
H1.4K26: Metilação no resíduo de Lisina 26, do isotipo 4 da histona
H3K36: Metilação da lisina 36 da histona 3
H3K9: Metilação da lisina 9 da histona 3
Hb: Hemoglobina
Igs: Imunoglobulina de superfície
IgV_H: Região variável da cadeia pesada na imunoglobulina
Jumonji (jmj): Domínio de Jumonji, sítio catalítico das KDMs.
JmjC: Domínio catalítico JumonjiC presente em desmetilases de histona.
JmjD: Proteínas contendo domínio JmjC
JmjN: Domínio catalítico JumonjiN presente em desmetilases de histona.
kDa: Unidade Quilodalton
KDM: Desmetilase de lisina de histona
KDM4/JmjD2: Desmetilase de lisina de histona subfamília 4
KDM4A/JMJD2A: Desmetilase de lisina de histona subfamília 4 tipo A
KDM4B/: Desmetilase de lisina de histona subfamília 4 tipo B
KDM4C/GASC1: Desmetilase de lisina de histona subfamília 4 tipo C
LLC: Leucemia Linfóide Crônica
Pb: Pares de bases
PBS: Tampão fosfato-salino
PCR: Reação em cadeia polimerase
PHD: Homeodomínio da planta
RT-PCR: PCR em tempo real
Rpm: Rotações por minuto
SYK: Tirosina Cinase Esplênica
TCR: Receptores de Células T
ZAP-70: Proteína Cinase 70 kda associada a cadeia Zeta
μL: Microlitro

I – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leucemia Linfoide Crônica

1.1.1. Epidemiologia

A leucemia linfoide crônica (LLC) é caracterizada pela proliferação clonal e o acúmulo de células B maduras, tipicamente CD5+ no sangue periférico, medula óssea, baço e nódulos linfáticos (HALLEK, 2013). Trata-se de uma enfermidade com curso clínico altamente variável, de maior prevalência entre idosos, especialmente com idade média de 64 a 70 anos (GOMES et al., 2018). A LLC é uma doença comum nos países ocidentais, representando cerca de 25% das leucemias que acometem indivíduos adultos (RAI; JAIN, 2016; SCARFÒ; FERRERI; GHIA, 2016). É importante ressaltar que o risco de desenvolvimento da LLC é quase duas vezes maior em homens (1,7: 1) que em mulheres (DEVEREUX; CUTHILL, 2017; HALLEK, 2017; KIPPS et al., 2017).

1.1.2. Fisiopatologia

A maioria das células leucêmicas na LLC encontra-se na fase G0 do ciclo celular, não respondem aos estímulos mitogênicos usuais e são resistentes à apoptose (VROBLOVÁ et al., 2009). A inibição da apoptose é um elemento importante na desregulação da homeostase normal das células B nesta malignidade. Componentes centrais de resposta ao dano ao DNA são necessários para transmitir a presença de lesões genotóxicas à maquinaria apoptótica, entretanto, componentes desse sistema frequentemente estão mutados na LLC, como ocorre com ATM e p53 (FRENZEL; REINHARDT; PALLASCH, 2016).

As células neoplásicas recebem uma variedade de sinais de sobrevivência extracelular, entre elas, está a sinalização sustentada do receptor de célula B (BCR)

(FRENZEL; REINHARDT; PALLASCH, 2016). BCR pode ser sinalizado por seu ligante e possui arcabouço composto por imunoglobulinas de superfície de membrana que estão emparelhadas com uma estrutura de transdução de sinal, composta por CD79a/CD79b. Quando BCR é sinalizado ocorre fosforilação de CD79a/CD79b via tirosina quinase do baço (SYK) e tirosina quinase LYN, o que ativa a via da tirosina quinase de Bruton (BTK). O sinal BCR é ainda propagado por SYK através da associação com a molécula adaptadora de proteína de ligação de células B (BLNK) e os seus componentes de sinalização BTK e fosfolipase C γ 2 (PLC- γ 2). Concomitantemente, LYN fosforila e ativa a porção citoplasmática de CD19, levando ao recrutamento e ativação de fosfoinositol 3-quinase (PI3K) (STEVENSON et al., 2011; YU; KITTAI; TABBARA, 2015) (Figura 1).

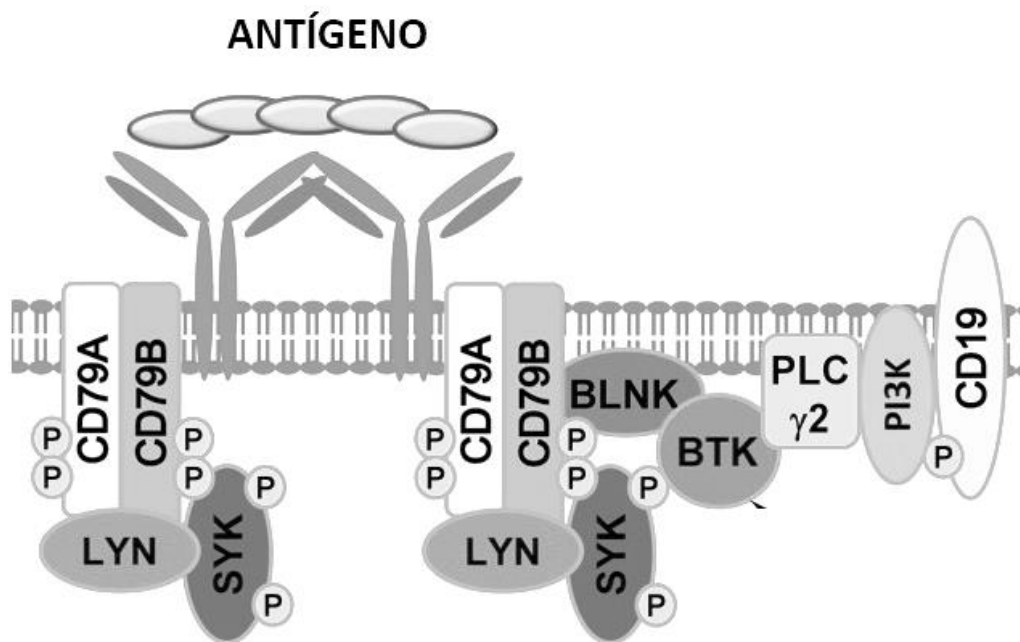


Figura 1. Sinalização do receptor de células B. Adaptado STEVENSON et al., 2011. A imagem mostra as principais vias de sinalização ativadas após a ativação do BCR.

Na LLC a ativação de BCR leva ao recrutamento intracelular e ativação das cinases SYK, ZAP-70, LYN e BTK, resultando na ativação das vias canônicas MEK/ERK, MAPK, PI3K/AKT e do fator nuclear kB (NF-kB) para antagonizar a

apoptose induzida por dano ao DNA e promover a sobrevivência e proliferação de células B neoplásicas (FRENZEL; REINHARDT; PALLASCH, 2016). De fato, foi demonstrado que a ativação da via NF- κ B em células da LLC induz a expressão de genes antiapoptóticos, como Bcl-x1 e Mcl1 (FRENZEL; REINHARDT; PALLASCH, 2016). Além disso, é importante ressaltar que o desequilíbrio entre proteínas antiapoptóticas e proapoptóticas da família Bcl-2 constitui também um dos mecanismos de resistência a apoptose na LLC (GOMES et al., 2017).

A proliferação celular constitui outro processo fisiopatológico envolvido na LLC e parece ser dependente das interações das células leucêmicas com o microambiente linfoide. Foi demonstrado que a proliferação dessas células ocorre nos gânglios linfáticos, em menor grau na medula óssea e é, em parte, suportado por linfócitos T ativados (BRACHTL et al., 2014). Nessa linha, sabe-se que células T e células estromais estimulam a sobrevivência e as vias de sinalização da proliferação de células leucêmicas, o que se dá por secreção de fatores solúveis, como quimiocinas e citocinas, ou por contato célula-célula, através de receptores de superfície e moléculas de adesão (HALLEK; SHANAFELT; EICHHORST, 2018).

Em órgãos linfáticos os macrófagos e células mesenquimais atraem células da LLC através dos receptores de quimiocinas CXCR4 e CXCR5, que são expressos em altos níveis nas células B leucêmicas. Nesse nicho, integrinas, particularmente a VLA-4 (CD49d), expressas na superfície das células da LLC, cooperam com os receptores de quimiocinas no estabelecimento da adesão célula-célula através dos respectivos ligantes nas células mesenquimais (VCAM-1 e fibronectina). As células macrofágicas também expressam os membros da família TNF (BAFF e APRIL) proporcionando sinais de sobrevivência às células da LLC através dos receptores correspondentes (BCMA, TACI e BAFF-R). A expressão de CD38 em células da LLC ativa ZAP-70 e as vias de

sobrevivência. A estimulação do complexo BCR (BCR e CD79a,b) e, conseqüentemente, das quinases SYK, BTK e PI3Ks são considerados fatores-chave na ativação e expansão do clone LLC. Por fim, a estimulação de BCR colabora para que as células da LLC secretem quimiocinas (CCL3, CCL4 e CCL22) para o recrutamento de células imunes (células T e monócitos). As células T são encontradas preferencialmente em centros de proliferação da LLC e podem interagir com células da LLC via CD40. Essas interações podem ser observadas na figura 2 (BURGER, 2011; CHOI; KASHYAP; KUMAR, 2016).

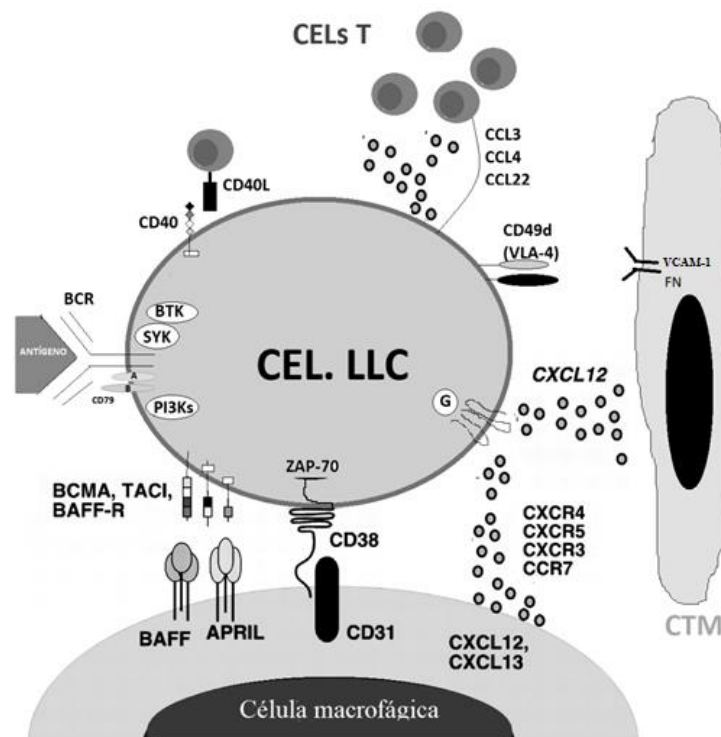


Figura 2. Diferentes modalidades de interação entre LLC e o microambiente. Adaptado BURGER, 2011. As células LLC são dependentes dos sinais de sobrevivência fornecidos através da interação entre as células macrofágicas e CTMs, o que facilita a sobrevivência das células LLC, sua proliferação, *homing* e retenção tecidual (CHOI; KASHYAP; KUMAR, 2016).

Dessa forma, o microambiente não apenas influencia as células leucêmicas, mas essas células alteram o microambiente em sua vantagem, ao estimular as células T em direção a um fenótipo imunossupressor ou induzindo células mesenquimais a fornecer sinais de sobrevivência, o que contribui para quimiorresistência e falha no tratamento

(BRACHTL et al., 2014). Além disso, esse nicho leva a vários eventos que regulam o ciclo celular, a apoptose, a proliferação e a migração de células leucêmicas (CHOI; KASHYAP; KUMAR, 2016).

1.1.3. Diagnóstico e estadiamento clínico

Morfologicamente, as células da LLC são pequenas e maduras, com expressão de alguns marcadores fenotípicos, como CD23⁺ e CD5⁺, além de níveis de imunoglobulinas de superfície (Ig_s), CD20 e CD79b mais baixos em comparação com células B normais (HALLEK et al., 2008; HALLEK, 2017). Em exame microscópico simples de amostras de LLC, com frequência encontra-se linfócitos danificados (sombras de gumprecht). Além disso, raramente as células LLC apresentam morfologia atípica (STRATI; JAIN; O'BRIEN, 2018).

Portanto, o diagnóstico da LLC é definido por linfocitose absoluta ($>5 \times 10^9/L$) por pelo menos três meses, e avaliação imunofenotípica das células B (HALLEK et al., 2008; HALLEK, 2017), sendo positiva para cadeia leve de imunoglobulina (k ou λ), CD5 e CD23, e apresentando baixos níveis de CD20, Ig_s e CD79b (STRATI; JAIN; O'BRIEN, 2018). Além do diagnóstico por imunofenotipagem, anormalidades genéticas identificadas por técnicas convencionais ou por hibridação fluorescente *in situ* (FISH) contribuem para melhor classificação do paciente (MONTSERRAT; BAUMAN; DELGADO, 2016).

Para o diagnóstico diferencial da LLC devem ser incluídas algumas entidades como o linfoma de células do manto (LCM), o linfoma da zona marginal esplênica e a leucemia prolinfocítica de células B (LLP-B). A detecção de t(11;14) por FISH permite a diferenciação do LCM da LLC. Ao contrário da LLC, o linfoma da zona marginal esplênica é raramente positivo para o CD23, enquanto pode ser positivo para o CD5 em

5% a 10% dos casos e, invariavelmente, não envolve a medula óssea. Por fim, a LLP-B apresenta mais de 55% de prolinfócitos no sangue periférico e é positiva para CD5, mas negativa para CD23 (STRATI; JAIN; O'BRIEN, 2018).

Como a LLC representa uma doença muito heterogênea, alguns pacientes permanecem assintomáticos com expectativa de vida normal, enquanto outros desenvolvem um padrão de doença progressiva (DELGADO et al., 2016) que afeta a evolução clínica, o tempo de proliferação celular e a capacidade de resposta ao tratamento (GOMES et al., 2018). Os sinais clínicos mais comuns são linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (OMAR; MAURICIO, 2013). No entanto, geralmente a LLC não causa sinais ou sintomas e é descoberta durante um exame de sangue de rotina (PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOAR, 2017).

Dois sistemas de estadiamento clínico foram amplamente utilizados para estratificar pacientes por grupos de risco com base em características clínicas e laboratoriais; e apresentam boa correlação prognóstica (RAI et al., 1975; BINET et al., 1981). Um dos sistemas é classificação de Binet, que é baseada no número de áreas ganglionares envolvidas, organomegalias, ou presença de citopenias (Tabela 1) (BINET et al., 1981). O estadio A (baixo risco) é caracterizado por $Hb \geq 10.0g/dL$, plaquetas $\geq 100 \times 10^3/\mu L$ e até duas áreas envolvidas. O estadio B é referente a $Hb \geq 10.0g/dL$, plaquetas $\geq 100 \times 10^3/\mu L$ e presença de três ou mais áreas ganglionares ou de órgãos envolvidos. O estadio C envolve todos os doentes com $Hb < 10.0g/dL$, e/ou plaquetas $< 100 \times 10^3/\mu L$ (BINET et al., 1981; RIBEIRO, 2011).

Tabela 1.Estadiamento de Binet.

Binet	A	B	C
Risco	Baixo	Intermediário	Alto
Manifestações clínicas	Linfocitose e até 2 áreas afetadas.	> 3 áreasafetadas	Anemia com ou sem trombocitopenia

Adaptado BINET, 1981.

1.1.4. Marcadores prognósticos

A identificação de fatores prognósticos além do estadiamento clínico está entre os avanços mais importantes na compreensão da LLC (GOMES et al., 2018). Entre os parâmetros prognósticos identificados, tem-se o estado mutacional da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina (IgV_H), anormalidades citogenéticas recorrentes, CD38, ZAP-70 e outros (JAMROZIAK; PULA; WALEWSKI, 2017).

A hipermutação do gene IgV_H é observada em 50-55% dos pacientes com LLC. Pacientes com IgV_H não mutada têm uma sobrevida mediana menor de 5-10 anos em comparação com 10-20 anos em pacientes com IgV_H mutada. Normalmente, há uma associação dos doentes com IgV_H não mutada com marcadores de mau prognóstico, como ZAP-70 e CD38 (YU; KITTAI; TABBARA, 2015).

ZAP-70, uma proteína de 70-kDa associada com o receptor de células T (TCR), é uma tirosina cinase essencial para iniciar a via de sinalização promovida pela ativação do receptor das células T. Embora não encontrada nos linfócitos B normais, a proteína ZAP-70 é altamente expressa na maioria das células LLC, na qual IgV_H não é mutada. Os linfócitos da LLC com mutação IgV_H raramente mostram a expressão desta proteína. A expressão de ZAP-70 em pacientes sem dano somático no gene da IgV_H está

relacionada a pior prognóstico e menor sobrevivência (GOMES et al., 2017). ZAP-70 também está envolvida na sinalização do BCR, pois pode atuar na LLC facilitando o recrutamento de cinases como SYK, que encontra-se associada ao CD79b do complexo BCR (ZHANG; KIPPS, 2014; GLADKIKH et al., 2017).

Outro marcador prognóstico é CD38, que apresenta expressão alterada na LLC. As células B com elevada expressão de CD38 mostram-se mais resistentes a apoptose, (EL-KINAWY; SHARAF; EL-HAMID, 2012). Além disso, pacientes com alta expressão de CD38 têm doença com progressão mais rápida e uma expectativa de vida mais curta (TEN HACKEN; BURGER, 2016).

A LLC apresenta elevado grau de variabilidade genética e pode ser iniciada pela perda ou adição de material cromossômico e modificações epigenéticas (HALLEK, 2017; KIPPS et al., 2017). Aproximadamente 80% dos pacientes com LLC possuem alterações cromossômicas comuns e essas alterações genéticas estão associadas ao desfecho clínico (tabela 2) (DOHNER et al., 2000; SHINDIAPINA; BROWN; DANILOV, 2014; ZHANG; KIPPS, 2014; KIPPS et al., 2017).

A del (13q) é a anormalidade genômica mais prevalente na LLC, pois está presente em 45-55% dos casos, e se associa a um prognóstico favorável. A del (17p) é encontrada em 7% dos pacientes, contudo a incidência aumenta para 30-37% em LLC refratária e está associada à perda do gene supressor de tumor TP53. A del (11q) é encontrada em 5-10% dos pacientes ao diagnóstico e estágio inicial da doença, mas aumenta para 23% em estágios avançados, e frequentemente está associado a alterações no gene ATM (envolvido no reparo do DNA). As deleções de 11q e 17p estão associadas ao desfecho clínico adverso. A trissomia 12 é encontrada em 16% dos pacientes com LLC e representa um prognóstico intermediário (DOHNER et al., 2000; KIPPS et al., 2017).

Também pode ser encontrado em aproximadamente 6% dos pacientes com LLC a del 6q, o que representa um prognóstico intermediário, além de outras aberrações genômicas recorrentes raras. Alguns pacientes (~ 20%) apresentam complexidade genômica (três ou mais alterações cromossômicas). Essas novas anormalidades cromossômicas podem ser adquiridas durante o curso da doença e ocasionar vantagem de sobrevivência, o que resulta em doença mais agressiva e diminuição da eficácia terapêutica (RODRÍGUEZ-VICENTE; DÍAZ; HERNÁNDEZ-RIVAS, 2013).

Tabela 2. Alterações cromossômicas mais prevalentes na LLC.

CARIÓTIPO	PREVALÊNCIA*	PROGNÓSTICO
Del (13q)	45-55%	Favorável
Del (17p)	7% inicial	Desfavorável
	30-37% LLC refratária	
Del (11q)	5-10% inicial	Desfavorável
	23% estágios avançados	
Trissomado 12	16%	Intermediário
Del (6q)	0~6%	Intermediário

*EUA (DOHNER et al., 2000).

As aberrações genômicas também podem ser detectadas por PCR, como a mutação TP53 (vista na deleção 17p) e mutação ATM (observada na deleção 11q) (EICHHORST; HALLEK, 2016; STRATI; JAIN; O'BRIEN, 2018). Recentemente, a aplicação do sequenciamento de próxima geração (NGS) identificou novas mutações ou deleções genéticas, incluindo NOTCH1, SF3B1 e BIRC3 (BALIAKAS et al., 2015), mas sua validação e a aplicação à prática comum é prejudicada por custos, além de limitações de execução e análise (STRATI; JAIN; O'BRIEN, 2018).

NOTCH1 codifica um fator de transcrição que regula várias vias que induzem a

diferenciação de progenitores hematopoiéticos em células T imaturas e células B maduras. Mutações em NOTCH1 ocorrem em ~60% das leucemias linfoblásticas agudas da linhagem T e na LLC foram detectadas em ~ 10% nos novos casos diagnosticados, e casos de LLC progressivo e/ou recidivado entre 15% a 20%. Mutações em NOTCH1 também são mais frequentes nas populações de células LLC que expressam IgV_H não mutados e com trissomia do 12. Casos com mutações NOTCH1 parecem ter um perfil distintivo de expressão gênica e definem um subgrupo de pacientes de alto risco, que apresentam desfechos clínicos comparáveis aos de casos com mutações no TP53, independente de outros fatores de risco (ZHANG; KIPPS, 2014).

O SF3B1 regula o programa de *splicing* alternativo de genes, pois é um componente crítico para a excisão precisa de introns de pré-mRNA, que controlam a progressão do ciclo celular e a apoptose. Mutações no SF3B1 podem aumentar a proliferação e/ou sobrevivência de células neoplásicas. Na LLC as mutações no SF3B1 foram observadas em ~10% dos casos recentemente diagnosticados e em ~17% dos casos com doença progressiva em estágio terminal (ROSSI et al., 2011; WANG et al., 2011; ZHANG; KIPPS, 2014)

Alteração de BIRC3 se associa a desfechos clínicos desfavoráveis, independentemente de outros fatores de risco. BIRC3 pode atuar na promoção da sinalização canônica do NF-κB, o que contribui para o crescimento e a sobrevivência de células da LLC. Consistentemente, células da LLC portadoras de mutações em BIRC3 apresentam ativação constitutiva de NF-κB e mostram-se menos responsivas à quimioterapia convencional (ZHANG; KIPPS, 2014).

1.2. Epigenética e câncer

Além das lesões genéticas, a interrupção dos mecanismos epigenéticos também desempenha um papel na oncogênese (GUIÈZE; WU, 2015). A epigenética refere-se ao estudo de mudanças hereditárias na expressão de genes que ocorrem sem alteração na sequência de DNA (KANWAL; GUPTA, 2012), podendo levar a modificação no fenótipo sem alterar o genótipo de uma célula (ZAIDI et al., 2012). A metilação do DNA e as modificações das histonas são as duas principais modificações epigenéticas envolvidas na regulação da transcrição gênica (TIAN et al., 2013) (Figura 3).

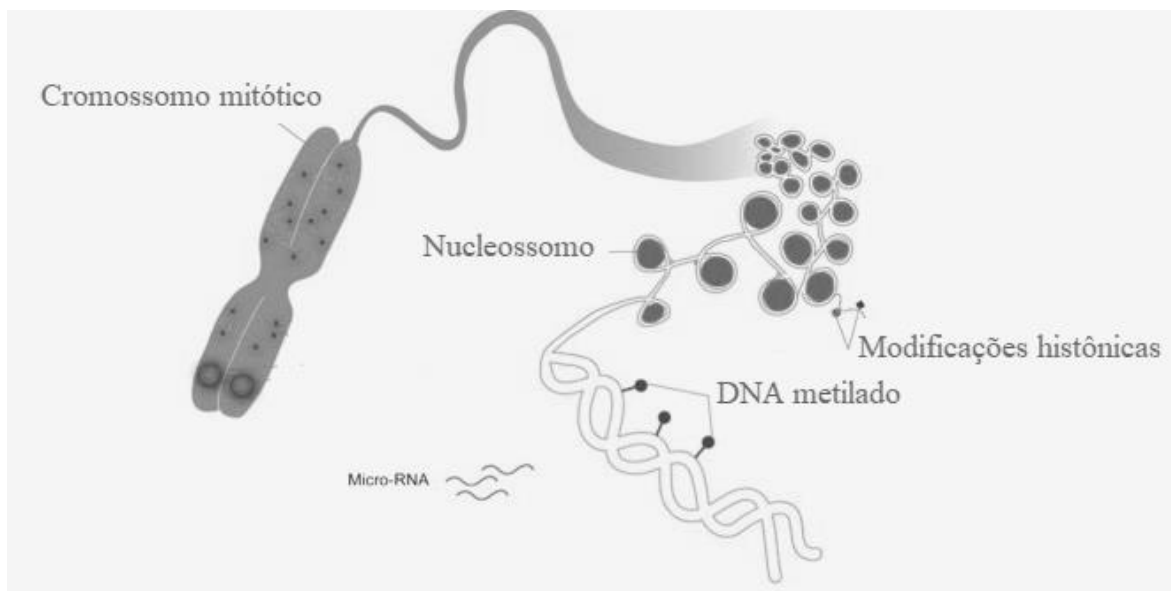


Figura 3. Mecanismos epigenéticos. Adaptado de ZAIDI et al., 2012. A imagem mostra mecanismos epigenéticos bem definidos, entre eles modificações de histonas, metilação do DNA, e a modulação não codificada da expressão gênica mediada por RNA. Alguns desses mecanismos são hereditários através de sucessivas divisões celulares e contribuem para a manutenção do fenótipo celular (ZAIDI et al., 2012).

As histonas são proteínas altamente conservadas que desempenham papéis importantes na compactação de DNA, além de também possuírem funções dinâmicas em muitos processos fisiológicos e moleculares. As modificações covalentes da cauda das histonas, em particular sobre os resíduos de lisina, são parte essencial dos mecanismos epigenéticos para regular processos, como o reparo do DNA e a transcrição

de genes (HATCH et al., 2017). Essas modificações são controladas por diferentes grupos de enzimas que regulam a metilação das histonas, acetilação, ubiquitilação, sumoilação e fosforilação (TIAN et al., 2013).

As marcas de modificação por metilação nos resíduos de lisina mono-, di- ou trimetilados (me1/ me2/ me3), que se localizam principalmente nas caudas das histonas flexíveis são estabelecidas e rigorosamente regulados por histona metiltransferases (KMT) e desmetilases (KDM) (LABBÉ; HOLOWATYJ; YANG, 2014; PEDERSEN et al., 2016) (Figura 4).

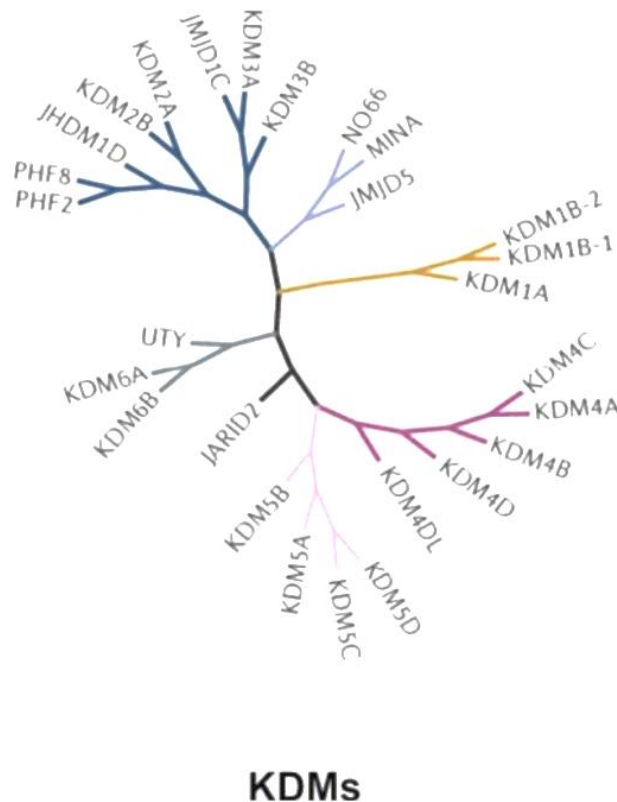


Figura 4. Diagrama da árvore genealógica da histona lisina desmetilase (KDM). Adaptado TIAN et al., 2013. KDMs estão agrupados em ramos com base na similaridade de suas seqüências de aminoácidos (TIAN et al., 2013).

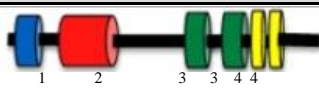

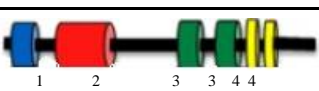
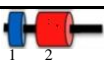
1.2.1. Subfamília KDM4

Uma das famílias de KDM é representada pela presença do domínio Jumonji C (JmjC) que pertence ao grupo de proteínas JMJD, compreendendo as subfamílias

KDM2 a KDM7. Esta família atua através de um mecanismo de reação de dioxigenase que requer Fe^{2+} , O_2 e 2-oxoglutarato (2-OG) para desmetilação de histonas. Uma das maiores subfamílias de JMJD é composta pelas proteínas JMJD2A-D, mais conhecida como KDM4A-D (BERRY; JANKNECHT, 2013; TIAN et al., 2013; HATCH et al., 2017). As proteínas KDM4A, B e C compartilham mais de 50% de identidade de sequência; cada uma contendo um domínio JmjN, domínio JmjC, dois homeodomínios de plantas (PHD) e dois domínios Tudor (LABBÉ; HOLOWATYJ; YANG, 2014).

Como pode ser visto na tabela 3, as proteínas KDM4 são capazes de reconhecer como substratos as histonas H3K9 e H3K36 di e trimetilado, como H1.4K26 trimetilado.

Tabela 3. Classificação funcional e substratos das desmetilases de histona.

Símbolo oficial	Outros nomes	Localização do gene	Domínios	Substratos
KDM4A	JMJD2A, JHDM43A, JMJD2, TDRD14A	1p34.1		H3K9me2/m3. H3K36me2/me3 H1.4K26me2/me3
KDM4B	JMJD2B, TDRD14B	19p13.3		H3K9me2/m3. H3K36me2/me3 H1.4K26me2/me3
KDM4C	GASC1, JMJD2C, JHDM3C, TDRD14C	9p24.1		H3K9me2/m3. H3K36me2/me3 H1.4K26me2/me3
KDM4D	JMJD2D	11q21		H3K9me2/m3. H1.4K26me2/me3

Adaptado LABBÉ; HOLOWATYJ; YANG, 2014

Nota: Domínio JmjN¹, Domínio JmjC², PHD: PlantHomeodomain³, Domínio Tudor⁴.

Em geral, a trimetilação H3K9 e H1.4K26 estão associadas à repressão da transcrição ou à formação de heterocromatina; enquanto a metilação H3K36 foi percebida com a expressão de genes ativadores (BERRY; JANKNECHT, 2013; TIAN

et al., 2013) (Figura 5).

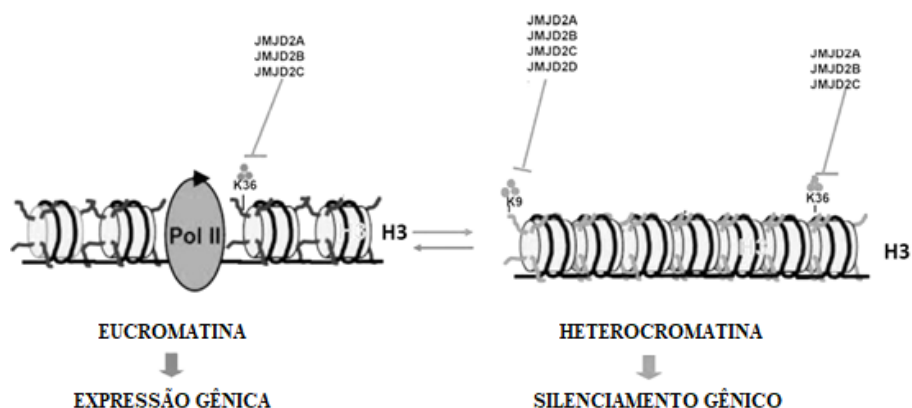


Figura 5. Apresentação esquemática da desmetilação da lisina histona para transcrição gênica. Adaptado TIAN et al. 2013. Em geral, a metilação das lisinas H3K36 está associada à eucromatina e ativação transcricional, enquanto a metilação das lisinas H3K9 está relacionada à heterocromatina e à repressão transcricional. Acredita-se também que a trimetilação de H3K36 esteja correlacionada com a repressão transcricional (TIAN et al., 2013).

A metilação inadequada das histonas com a desregulação de processos celulares subjacentes está vinculada a várias doenças humanas. Os membros da subfamília KDM4 são geralmente hiperexpressos em cânceres humanos, alteram o equilíbrio proliferativo celular normal (LABBÉ; HOLOWATYJ; YANG, 2014; PEDERSEN et al., 2016), e estão associados à baixa regulação de H3K9me3 e à ativação de genes (DUAN, et al. 2015).

De modo geral, KDM4A, B e C são amplamente expressos em tecidos humanos normais, incluindo-se o baço, ovários e cólon. Nesses sítios, os níveis de expressão de KDM4A e C são aproximadamente 3-6 vezes maiores que os do KDM4B (LABBÉ; HOLOWATYJ; YANG, 2014).

Além da expressão de KDM4A ser elevada na próstata, também há aumento da expressão em alguns cânceres, como no câncer de pulmão, mama, ovário e no carcinoma de células escamosas. O *knockdown* desse gene leva a inibição da

proliferação celular e indução de apoptose. Além disso, atua no processo de reparo do DNA e, portanto, alterações na sua expressão podem levar a instabilidade do genoma. KDM4B apresenta uma atividade catalítica muito menor em comparação com outras proteínas KDM4 (BERRY, JANKNECHT, 2013) e está envolvida na resposta dos receptores nucleares no câncer de mama e próstata, assim como KDM4A (LABBÉ; HOLOWATYJ; YANG, 2014).

KDM4C também apresenta expressão elevada em vários tipos de câncer, incluindo carcinoma de células escamosas esofágicas, câncer de mama e próstata, meduloblastoma, linfoma primário de células B, linfoma de Hodgkin e leucemia mieloide aguda. KDM4C pode promover tumorigênese através de vários mecanismos, como por exemplo, por ativar a expressão de oncogenes como MDM2, um regulador de p53. Além disso, KDM4C se liga ao AR (receptor de androgênio) para estimular a expressão de genes dependentes de androgênio e a proliferação de células tumorais (LABBÉ; HOLOWATYJ; YANG, 2014).

Como pode ser visto, as desmetilases da família KDM estão desreguladas em diversos cânceres e até o momento inexistem dados relacionando a atuação desse processo epigenético na LLC. Sendo assim, no presente estudo avaliamos a expressão dos genes KMD4A, KDM4B e KDM4C em amostras de LLC e investigamos se essas desmetilases de histona exercem alguma influência no número de células leucêmicas, expressão da proteína ZAP-70 e no padrão cariotípico dos pacientes estudados.

II - OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Avaliar se a família de desmetilases KDM4 está envolvida no desenvolvimento e/ou progressão da LLC.

2.2. Específicos:

- Comparar a expressão dos genes da família KDM4 entre pacientes com LLC e indivíduos saudáveis;

- Investigar a associação entre a expressão dos genes KDM4A, KDM4B e KDM4C e a leucometria dos pacientes avaliados;

- Analisar a expressão de ZAP-70 nas amostras de LLC e correlacioná-las com os dados de expressão gênica;

- Realizar estudo citogenético das amostras de LLC e correlacionar os resultados com os dados de expressão gênica.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

Nesse estudo foram utilizadas amostras oriundas de 59 pacientes com LLC, atendidos no Serviço de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. O diagnóstico de LLC desses pacientes foi determinado pela morfologia das células B, pela linfocitose absoluta e pelo padrão imunofenotípico (MATUTES et al., 1994). Adicionalmente, foi obtido sangue periférico de 10 doadores saudáveis pareados por idade (50 a 84 anos). Essas amostras foram usadas para isolamento de células B através de centrifugação por Ficoll-Hypaque e posterior separação imunomagnética. O termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) foi obtido para todos os pacientes e voluntários saudáveis e a execução do estudo foi aprovada pelo comitê de ética local.

3.2. Isolamento das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

As CMSP foram isoladas das amostras de sangue periférico coletadas de doadores saudáveis e de pacientes com LLC, por uso do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Sigma- Aldrich, St Louis, MO, USA). Resumidamente, em tubo cônico de 15mL foram adicionados 3mL de Ficoll, 4mL sangue total e 4mL PBS. Posteriormente, o material foi centrifugado a 360g, por 25 minutos. Após esse tempo, formou-se um anel de células mononucleares, que foi recolhido por pipetagem, lavado com PBS e depois foi realizada contagem celular.

3.2.1. Citometria de fluxo

As amostras de sangue periférico dos pacientes com LLC foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA. As CMSP foram isoladas em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Sigma- Aldrich, St Louis, MO, USA), após centrifugação e ajustamos 10^6 células por tubo para proceder a imunofenotipagem. O painel inicial de

citometria de fluxo utilizada para diagnóstico dos casos recrutados consistiu em 3 tubos: CD20 FITC, CD79b PE, CD19 PE-Cy5, CD5 APC; anti- λ FITC, anti- κ PE, CD19 PE-Cy5, CD5 APC; Anti- λ FITC, anti- κ PE, CD19 PE-Cy5, CD5 APC. Todos os anticorpos monoclonais foram obtidos da Becton Dickinson (San Jose, CA, USA), exceto os anticorpos anti- λ e anti- κ (Dako, Carpinteria, CA, USA). Ademais, foi analisada a expressão do marcador prognóstico ZAP-70 (San Jose, CA, USA), sendo considerado positivo os casos em que havia mais de 20% de positividade (SARGENT; CRAIG; SWERDLOW, 2009). Esses testes foram realizados no Citometro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) do Laboratório de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP.

3.3. Citogenética

A análise do cariótipo foi realizada por bandeamento G no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Em suma, foram utilizadas 1×10^7 CMSP, sendo que a metáfase foi induzida em meio RPMI-1640 (Invitrogen, Gaithersburg, MD) com 20% de SBF na presença do oligonucleotídeo imunoestimulatório DSP30 (TIBMOlBiol, Berlin, Germany) e interleucina 2 (IL-2). Após 72 horas em cultura, foi adicionado colcemid (Sigma, Munich, Germany) antes da preparação e espalhamento dos cromossomos.

3.4. Processamento das amostras para extração do RNA

Após coleta, as amostras de LLC foram submetidas à centrifugação com gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich), antes de terem o RNA extraído. Nas amostras controles, as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas pelo uso do Ficoll-Hypaque e posteriormente submetidas a separação imunomagnética para isolamento de células B, conforme instruções do

fabricante (MiltenyiBiotec, Bergisch-Gladbach, Germany). Em suma, as CMSPs foram incubadas com o anticorpo monoclonal CD19 conjugado com microbeads (MiltenyiBiotec) e, posteriormente, a suspensão celular foi dispensada em uma coluna LS (MACS SeparationColumns; MiltenyiBiotec) previamente acoplada em um imã (SuperMACS). As células CD19 tinham na sua superfície beads e ficaram retidas no campo magnético. Posteriormente a coluna foi retirada do campo magnético e as células obtidas para avaliação da pureza. Foram submetidas a extração de RNA pelo método de TRIZOL-LS (Invitrogen Inc) as amostras que apresentaram marcação para CD19 superior a 90%, conforme determinado por Citometria de Fluxo.

3.5. Extração do RNA e transcrição reversa

O RNA total dos pacientes com leucemia e amostras purificadas CD19+ dos doadores saudáveis foram isoladas usando o reagente TRIZOL-LS. Em síntese, em um tubo (15mL) foram adicionados 750µL de TRIZOL-LS gelado e 250µL de PBS contendo a suspensão celular. Após o período de incubação de 5 min, 200µL de clorofórmio gelado foi acrescentado na mistura. Esse material foi então centrifugado por 15 min a 12.000g, a 4°C. Findado esse processo, foram obtidas três fases. A fase aquosa foi transferida para outro tubo (1,5mL), onde foram adicionados 500µL de isopropanol gelado. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 12.000 g a 4°C. Finalizado esse processo foi adicionado 1mL de álcool gelado 100%. Por fim, a mistura foi centrifugada por 5 min a 7.500g, a 4°C, o etanol descartado e o pellet foi ressuspensão em 20µL de água DEPC (Dietilpirocarbonato).

Após obtenção do RNA, analisamos a qualidade desse material por meio do espectrofotômetro Nanodrop. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado usando 1µg do total de RNA pelo Kit de transcrição reversa *High Capacity* (Applied

BioSystems, Foster City, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

3.6. PCR em tempo real

A análise quantitativa da expressão dos genes (KDM4A-C,) foi realizada em amostras controle (células B) e em amostras de LLC no equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus (ThermoFisher). A metodologia empregada para a análise da expressão dos genes foi TaqMan (AppliedBiosystems), com uso do kit GoTaq Probe qPCR (Promega). O gene calibrador utilizado foi GAPDH, cuja eficiência de amplificação é a mesma dos genes alvos, o que possibilitou a análise dos dados pela metodologia ddCt (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001).

3.7. Análise estatística

Foi utilizado o *software* Prism6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) para as análises estatísticas. O nível de significância adotado foi de 5% (CI 95%). Todos os testes aplicados foram não paramétricos, pois a população não apresenta uma distribuição normal. Para as comparações envolvendo dois grupos, utilizamos o teste Mann-Whitney e para três grupos, o Kruskal-Wallis.

IV - RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Características clínico-laboratoriais da coorte estudada

Foram analisadas as características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais dos 59 pacientes com LLC (tabela 4). A mediana de idade ao diagnóstico foi de 63 anos (variando de 43 a 85 anos). A distribuição em gênero mostra 24 casos do sexo feminino (40,7) e do sexo masculino 35 casos (59,3%). Quanto ao estágio clínico ao diagnóstico: 39 pacientes (66%) apresentavam-se no estágio Binet A, 13 pacientes em Binet B (22%) e 7 pacientes em Binet C (12%). As alterações citogenéticas mais prevalentes foram: 3 casos (5,08%) com deleção do 17p, 6 casos (10,16%) com trissomia 12. Nessa corte, 17 pacientes (28,8%) apresentaram cariótipo de prognóstico favorável (deleção 13q e cariótipo normal); 22 pacientes (37,3%) cariótipo intermediário (trissomiado 12, deleção 11q e outros achados com 1 anormalidade); e 20 pacientes (33,9%) com cariótipo desfavorável (cariótipo complexo, deleções 17 e 11). Quanto ao número de alterações cromossômicas, 15 indivíduos com 0 alteração (25,4%), com 1 alteração 22 indivíduos (37,3%), 2 alterações 6 indivíduos (10,16%) e 3 alterações 15 indivíduos (25,4%) com 3 alterações. Em relação à expressão de ZAP-70 nas amostras de LLC foram encontrados 39 casos (67,2%) com expressão positiva (> 20%) de ZAP-70 e 19 casos (32,8%) com expressão negativa.

Tabela 4. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LLC.

CARACTERÍSTICAS	PACIENTES (%)
SEXO	
Masculino	35 (59,3%)
Feminino	24 (40,7%)
IDADE	63 (43-85 anos)
ESTADIO CLÍNICO	
Binet A	39 (66%)
Binet B	13 (22%)
Binet C	7 (12%)
ANÁLISE CITOGENÉTICA	
Deleção 17p	3 (5,08%)
Trissomia 12	6 (10,16%)
Normal	15 (25%)
CARIÓTIPO – STATUS*	
Favorável	17 (28,8%),
Intermediário	22 (37,3%)
Desfavorável	20 (33,9%)
Nº DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS	
0	15 (25,4%)
1	22 (37,3%)
2	6 (10,16%)
3	15 (25,4%)
EXPRESSÃO DE ZAP-70	
>20%	40 (67,2%)
<20%	19 (32,8)

* Seguida a classificação de DOHNER et al., 2000; MAYR et al., 2006; NABHAN; RACA; WANG, 2005.

4.2. Expressão de KDM4 na leucemia linfóide crônica

Nos genes avaliados da família KDM4, encontramos diferença no nível de expressão do gene KDM4A, sendo mais elevada em amostras de pacientes com LLC comparado com as amostras controle ($p=0,01$) (Figura 6A). Encontramos também diferença significativa no nível de expressão de KDM4B, sendo que em amostras de pacientes com LLC, houve menor expressão desse gene em relação as amostras controle ($p=0,001$) (Figura 6B). A expressão de KDM4C não teve diferença estatística entre os

grupos avaliados ($p=0,2$) (Figura 6C).

Para avaliação do impacto dos membros de KDM4 nas amostras de LLC, estratificamos a expressão desses genes em amostras com “elevada” e “baixa” expressão, baseando-se na mediana da expressão desses genes. Com isso, passamos a avaliar se a alta ou baixa expressão dos membros da família KDM estariam relacionados com os fatores prognósticos da LLC.

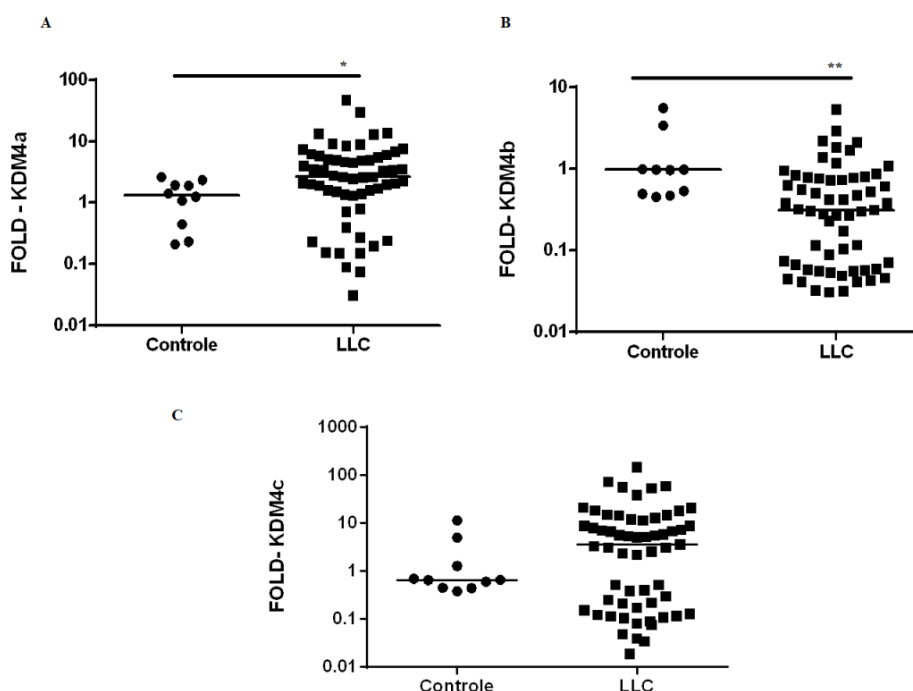


Figura 6. Expressão do gene KDM4A, KDM4B e KDM4C na LLC. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney. A: KDM4A. B: KDM4B. C: KDM4C. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.3. A expressão diferencial do gene KDM4 se associa ao maior número de leucócitos e a expressão da proteína ZAP-70 em pacientes com LLC.

Foi observado que os pacientes que apresentaram baixa expressão dos genes KDM4A, KDM4B e KDM4C tiveram um aumento no número de leucócitos circulantes ($p=0,005$; $p=0,0004$ e $p=0,01$; respectivamente) (Figura 7). Além disso, o grupo de pacientes com expressão positiva para ZAP-70 apresentou menor expressão KDM4B

($p= 0,009$) e KDM4C ($p= 0,03$). Não encontramos diferença quanto a expressão de KDM4A, segundo ZAP-70 (Figura 8).

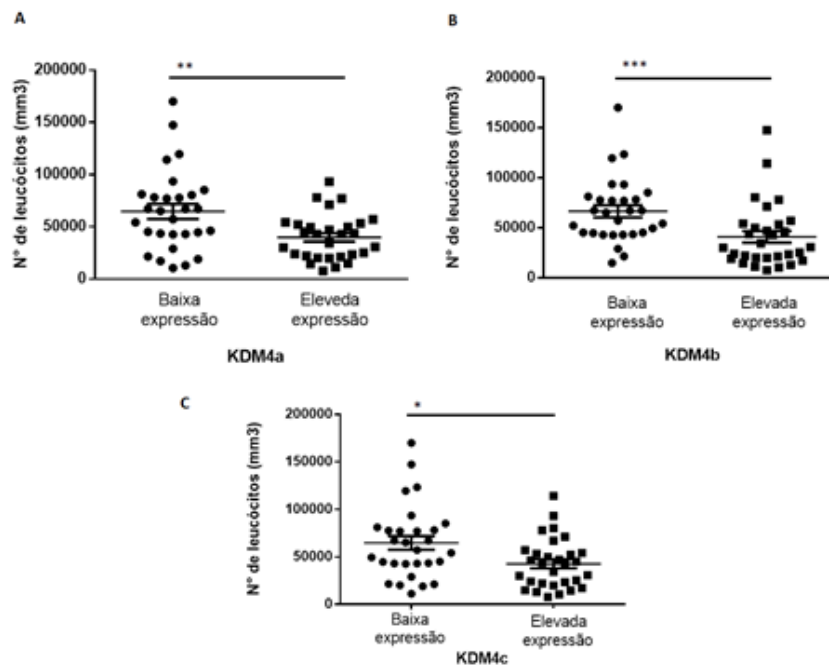


Figura 7. Associação entre expressão dos genes da família KDM4 e a contagem de leucócitos em pacientes com LLC. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney. A: KDM4A. B: KDM4B. C: KDM4C. Significado, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

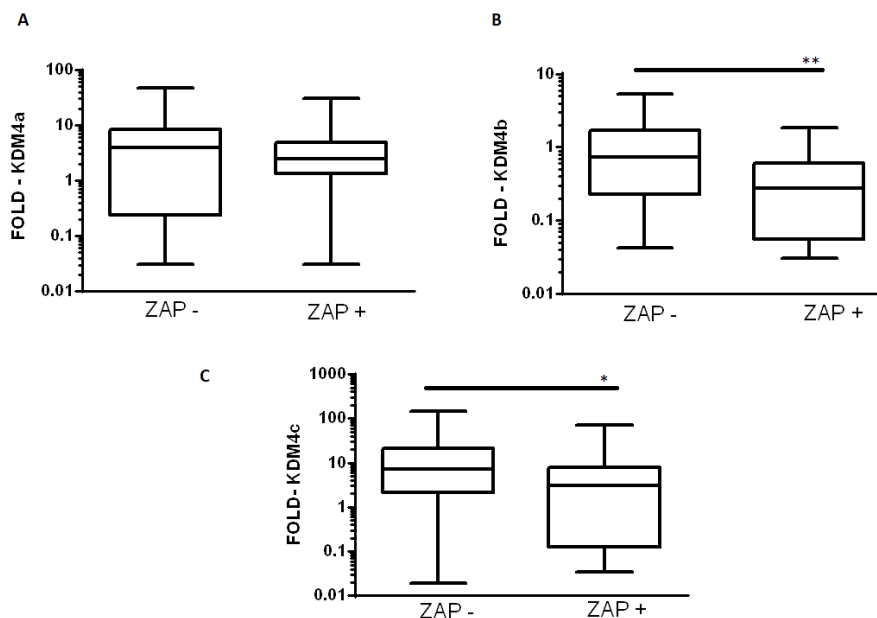


Figura 8. Expressão dos genes da família KDM4 segundo ZAP-70 em pacientes com LLC. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney. A: KDM4A. B: KDM4B C: KDM4C. Os símbolos significam: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.4. Expressão dos genes KDM4 em relação à instabilidade genômica e alterações cromossômicas na LLC

Avaliamos se o nível de expressão dos genes da família KDM4 exercia influência no resultado citogenético. Para isso, as amostras foram estratificadas em cariótipo favorável, intermediário e desfavorável. Não encontramos associação entre a expressão do gene KDM4A e os padrões prognósticos investigados. A expressão da desmetilase KDM4B foi menor em pacientes com cariótipo intermediário ($p < 0,05$) e em pacientes com cariótipo não favorável ($p < 0,001$). A expressão do gene KDM4C também foi menor em pacientes com cariótipo desfavorável ($p < 0,01$) (Figura 9).

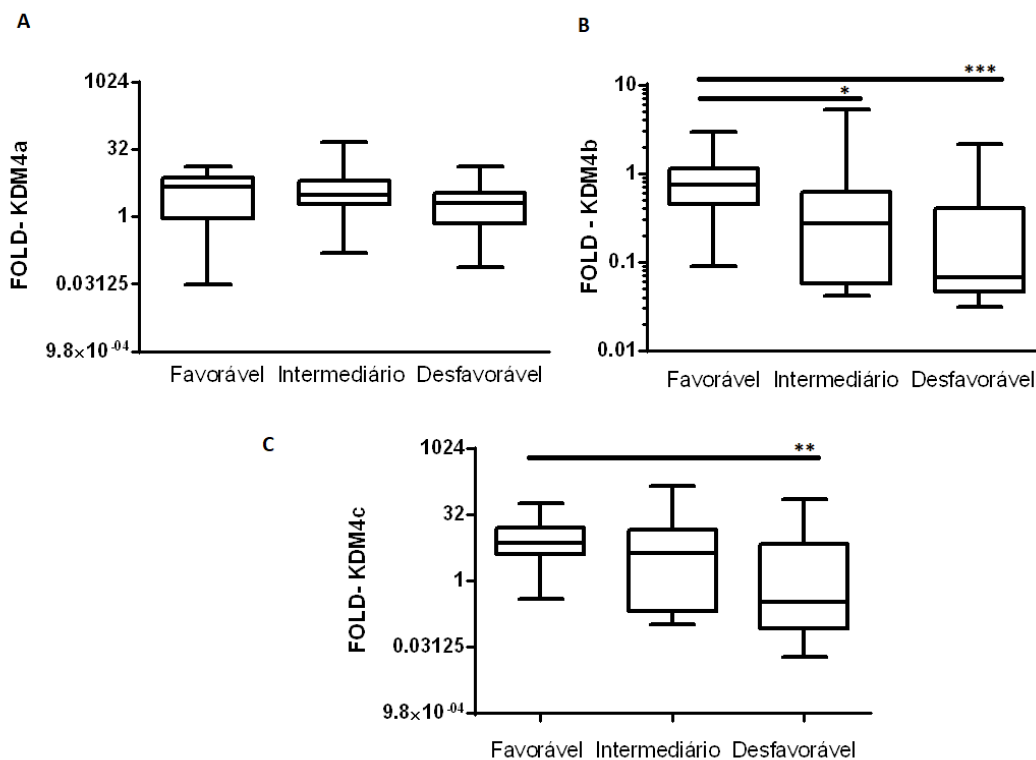


Figura 9. Expressão de KDM4 em pacientes que possuem cariótipo favorável, intermediário e desfavorável. A: KDM4A. B: KDM4C. C: KDM4B. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. * significa $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

Em seguida, avaliamos se a expressão dos genes KDM4 exercia correlação com a presença de cariótipo complexo em pacientes com LLC. Para isso, os pacientes com LLC foram classificados de acordo com o número de alterações cromossômicas. A

expressão do gene KDM4A não mostrou associação com a presença de cariótipo complexo na LLC. A expressão dos genes KDM4B e KDM4C foi reduzida em pacientes com 3 alterações cromossômicas ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 10).

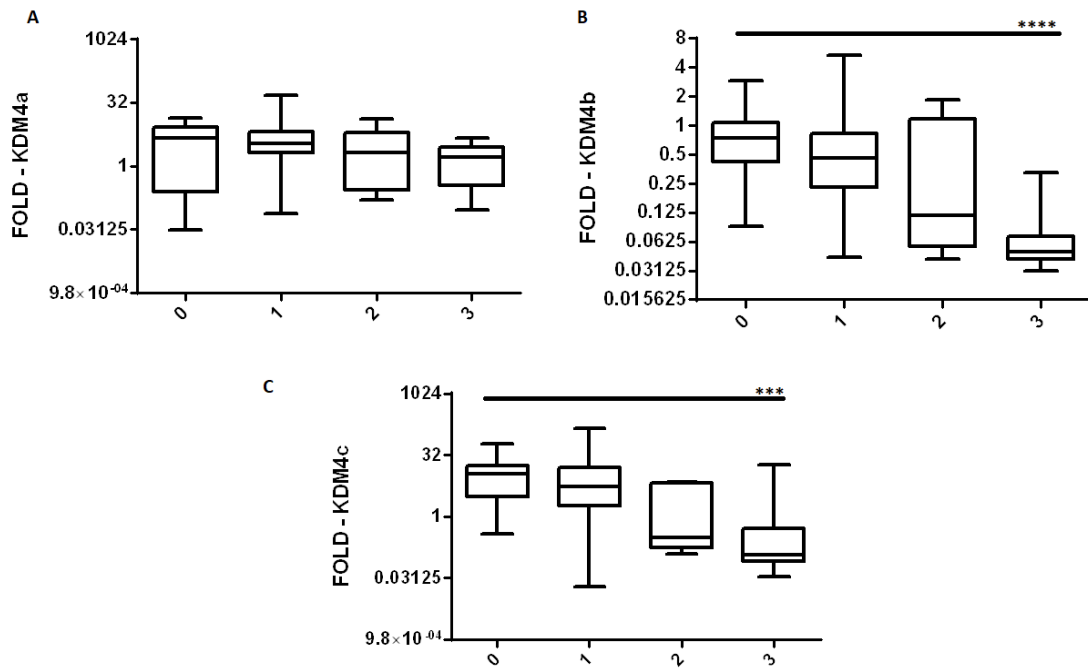


Figura 10. Expressão de KDM4 e número de alterações cromossômicas. A: KDM4A. B: KDM4B. C: KDM4C. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. O símbolo *** indica $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

V - DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Diversas desmetilases de histona estão desreguladas no câncer. Como consequência, essas alterações podem promover ativação da expressão de oncogenes, inibir a expressão de supressores de tumores, interferir no sistema de reparo do DNA, causar instabilidade cromossômica e interagir com receptores hormonais chaves que controlam a proliferação celular (LABBÉ; HOLOWATYJ; YANG, 2014). Os membros da família KDM4 parecem ter importantes funções relacionadas à carcinogênese (SOINI; KOSMA; PIRINEN, 2015), visto que podem contribuir para progressão do ciclo celular (CHEN et al., 2017). No presente estudo, a expressão das enzimas desmetilases de histona da subfamília KDM4 mostrou associação com fatores prognósticos adversos na LLC, como o aumento do número leucócitos, nível de expressão de ZAP-70, com o cariótipo desfavorável e complexidade genômica em pacientes com LLC.

No presente estudo evidenciamos expressão elevada do gene KDM4A em pacientes com LLC em relação ao grupo controle. Condizente com os nossos achados, Berry et al (2012) também relataram uma hiperexpressão desse gene em câncer de pulmão e em tumores mamários, salientando sua função oncogênica. Porém, é necessário determinar melhor as circunstâncias que permitem KDM4A exercer uma função pró-oncogênica, tendo em vista que somente em certos órgãos e tipos de células a expressão elevada de KDM4A estimula o crescimento do tumor (BERRY; JANKNECHT, 2013).

Em contraste, dados na literatura mostram que a baixa expressão de KDM4A leva a proliferação celular reduzida e indução da senescência (LABBÉ; HOLOWATYJ; YANG, 2014). Como observado por KIM et al (2012), que no câncer de cólon a baixa regulação de KDM4A em células neoplásicas resulta em proliferação celular reduzida,

aumento da apoptose e atraso na fase G2/M do ciclo celular. Apesar disso, notamos que os pacientes com LLC que apresentam diminuição da expressão do gene KDM4A possuem aumento da leucometria, um dos fatores envolvidos na progressão da doença.

A alteração na desregulação de KDM4B parece exercer um efeito mais intenso na LLC. Observamos uma correlação entre a diminuição da expressão de KDM4B com os marcadores de mau prognóstico, como elevada leucometria, expressão aumentada de ZAP-70 e anormalidades citogenéticas adversas, sugerindo um forte envolvimento com o progresso e agressividade da doença. Nessa linha, foi demonstrado que a deficiência de KDM4B parece estar envolvida com o crescimento e metástase de Hepatocarcinoma celular, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. (CHEN et al., 2017). Herlihy et al (2015), também mostraram expressão diminuída dos níveis KDM4B no melanoma uveal de mau prognóstico (M3), além de baixa regulação de outros genes modificadores epigenéticos.

Entretanto, há dados contrastantes na literatura que demonstram que o aumento da expressão de KDM4B é indispensável para a proliferação, capacidade de formação de colônias, invasão e sobrevivência de linhagens celulares de câncer de mama, tumores gástricos, de bexiga, de pulmão e câncer colorretal (BERRY; JANKNECHT, 2013). Além disso, tem se demonstrado que a baixa expressão desses genes comumente conduz a apoptose de células cancerígenas ou reduz a proliferação celular (LABBÉ; HOLOWATYJ; YANG, 2014), como observado nas células de câncer de cólon, que a inibição genética de KDM4B (dependente de p53 *in vivo*) compromete o crescimento tumoral subcutâneo (CASTELLINI et al., 2017). Ademais, KDM4B tem um efeito supressor sobre a instabilidade genômica e é uma proteína de resposta a danos no DNA (HERLIHY et al, 2015). Sendo assim, esses achados sugerem que KDM4B pode ter regulação de outros fatores e comportamento funcional diferente, dependendo do tipo de tumor em que sua expressão está alterada.

Assim como KDM4A, a expressão elevada de KDM4B associada com a malignidade é principalmente um reflexo do seu papel na promoção da proliferação celular, mas deve-se ter precaução para definir KDM4B como uma oncoproteína, pois a hiperexpressão de KDM4B em espécimes tumorais pode ser uma consequência e não uma causa da tumorigênese (CASTELLINI et al., 2017).

Diversos estudos mostram que as proteínas KDM4 interferem na estabilidade genômica e na regulação da carcinogênese (BLACK et al., 2013; LABBÉ; HOLOWATYJ; YANG, 2014; AWWAD; AYOUB, 2015). A desmetilação de H3K9-me3 por KDM4C parece ser um processo chave para manter a estabilidade cromossômica em câncer de mama triplo-negativo (GARCIA; LIZCANO, 2016). Por outro lado, o KDM4C é o único membro da subfamília KDM4 associado à segregação dos cromossomos durante a mitose na linhagem de osteossarcoma, U2OS (KUPERSHMIT et al., 2014), o que mostra sua potencial relevância na evolução do câncer, instabilidade cromossômica e em defeitos mitóticos (GUO; KIM; MAO, 2013).

Nesse estudo não encontramos diferença na expressão de KDM4C entre as amostras de LLC e as células B controle. Contudo, observamos que a baixa expressão de KDM4C apresentou o mesmo impacto que KDM4B nessa leucemia, tendo associação com os fatores de mau prognóstico. É importante destacar que em outros estudos, KDM4C é descrito como um oncogene que é amplificado e possui expressão elevada em várias neoplasias (RUI et al., 2010), incluindo as formas mais agressivas de cânceres de mama basais (LIU et al., 2009) e cânceres de pulmão (Li e Jiang, 2017).

Corroborando com a ideia de que há alterações nos processos epigenéticos no câncer, como previamente mencionado no trabalho de Herlihy et al (2015). Um estudo conduzido pelo nosso grupo mostrou que há outros processos epigenéticos que estão desregulados na LLC, como a baixa expressão da SUV39H1 (histona metiltransferases - HMTases), que mostrou-se associada à aquisição de cariótipos alterados e complexos. Foi encontrado ainda que a alta expressão de SUV39H2 está correlacionada com anormalidades citogenéticas em pacientes com LLC (CARVALHO ALVES-SILVA et al., 2017). De acordo com Mansouri et al (2018) uma fração das alterações epigenéticas se traduz em mudanças funcionais na LLC. Portanto, é possível que o padrão de desregulação epigenética na LLC contribua para a complexidade da doença e o prognóstico desfavorável de alguns pacientes, entretanto, ainda precisa ser esclarecido o circuito gênico alterado por esses processos epigenéticos.

VI - CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nos fazem inferir que a baixa expressão desta família KDM4, principalmente os genes KDM4B e KDM4C, tem relação com os fatores prognósticos na LLC, como o aumento do número leucócitos, da expressão de ZAP-70 e com o cariótipo desfavorável e complexidade genômica em pacientes com LLC. Esses dados podem servir de base para o desenvolvimento de novos estudos que visem elucidar o impacto molecular da epigenética nos mecanismos fisiopatológicos e no desenvolvimento da LLC.

VII - REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

AWWAD, S. W.; AYOUB, N. Overexpression of KDM4 lysine demethylases disrupts the integrity of the DNA mismatch repair pathway. **Biology Open**, p. BIO201410991, 2015.

BALIAKAS, P.; HADZIDIMITRIOU, A.; SUTTON, L. A.; et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, v. 29, n. 2, p. 329, 2015

BERRY, W. L.; JANKNECHT, R. KDM4/JMJD2 histone demethylases: epigenetic regulators in cancer cells. **Cancer Research**, v. 73, n. 10, p. 2936-2942, 2013.

BERRY, W. L.; SHIN, S., LIGHTFOOT, S. A.; et al. Oncogenic features of the JMJD2A histone demethylase in breast cancer. **International Journal of Oncology**, v. 41, n. 5, p. 1701-1706, 2012.

BINET, J. L.; AUQUIER, A.; DIGHIRO, G.; et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. **Cancer**. v. 48, n. 1, p. 198-206, 1981.

BLACK, J. C.; MANNING, A. L.; VAN RECHEM, C.; et al. KDM4A lysine demethylase induces site-specific copy gain and rereplication of regions amplified in tumors. **Cell**, v. 154, n. 3, p. 541-555, 2013.

BRACHTL, G.; HOFBAUER, J.P.; GREIL, R.; et al. The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia. **Annals of Hematology**, v. 93, n. 3, p. 361-374, 2014

BURGER, J. A. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. **ASH Education Program Book**, v. 2011, n. 1, p. 96-103, 2011.

CARVALHO ALVES-SILVA, J.; DO AMARAL RABELLO, D.; OLIVEIRA BRAVO, M.; et al. Aberrant levels of SUV39H1 and SUV39H2 methyltransferase are associated with genomic instability in chronic lymphocytic leukemia. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, n. 9, p. 654-661, 2017.

CASTELLINI, L.; MOON, E. J.; RAZORENOVA, O. V.; et al. KDM4B/JMJD2B is a p53 target gene that modulates the amplitude of p53 response after DNA damage. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 7, p. 3674-3692, 2017.

CHEN, Y. K.; BONALDI, T.; CUOMO, A.; et al. Design of KDM4 inhibitors with antiproliferative effects in cancer models. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 8, p. 869-874, 2017.

CHEN, Z.; WANG, X.; LIU, R.; et al. KDM4B-mediated epigenetic silencing of miRNA-615-5p augments RAB24 to facilitate malignancy of hepatoma cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 11, p. 17712, 2017.

CHOI, M. Y.; KASHYAP, M. K.; KUMAR, D. The chronic lymphocytic leukemia microenvironment: beyond the B-cell receptor. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 29, n. 1, p. 40-53, 2016.

DELGADO, J.; VILLAMOR, N.; LÓPEZ-GUILLERMO, A.; et al. Genetic evolution in chronic lymphocytic leukaemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 29, n. 1, p. 67-78, 2016.

DEVEREUX, S.; CUTHILL, K. Chronic lymphocytic leukaemia. **Medicine**, v. 45, ed. 5, p. 292 – 296, 2017.

DÖHNER, H.; STILGENBAUER, S.; BENNER, A.; et al. Genomic aberrations and

survival in chronic lymphocytic leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 26, p. 1910-1916, 2000.

DUAN, L.; RAI, G.; ROGGERO, C.; et al. KDM4/JMJD2 histone demethylase inhibitors block prostate tumor growth by suppressing the expression of AR and BMYB-regulated genes. **Chemistry & Biology**, v. 22, n. 9, p. 1185-1196, 2015.

EICHHORST, B; HALLEK, M. Prognostication of chronic lymphocytic leukemia in the era of new agents. **ASH Education Program Book**, v. 2016, n. 1, p. 149-155, 2016.

EL-KINAWY, N. S.; SHARAF, H M.; EL-HAMID; M. A. Prognostic significance of del 17p, ZAP-70 and CD38 as independent indicators for B-CLL: correlation to response to treatment and disease outcome. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 13, n. 2, p. 173-181, 2012.

FRENZEL, L. P.; REINHARDT, H. C.; PALLASCH, C. P. Concepts of chronic lymphocytic leukemia pathogenesis: DNA damage response and tumor microenvironment. **Oncology Research and Treatment**, v. 39, n. 1-2, p. 9-16, 2016.

GARCIA, J.; LIZCANO, F. KDM4C Activity Modulates Cell Proliferation and Chromosome Segregation in Triple-Negative Breast Cancer. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 10, p. BCBCR. S40182, 2016.

GLADKIKH, A. A.; POTASHNIKOVA, D. M.; TATARSKIY, V.; et al. Comparison of the mRNA expression profile of B-cell receptor components in normal CD5-high B-lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia: a key role of ZAP70. **Cancer Medicine**, 2017.

GOMES, L. C.; EVANGELISTA, F. C. G.; DE SOUSA, L. P.; et al. Prognosis

biomarkers evaluation in chronic lymphocytic leukemia. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, 2017.

GOMES, L. C.; FERRÃO, A. L. M.; EVANGELISTA, F. C. G.; et al. Advances in chronic lymphocytic leukemia pharmacotherapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 349-358, 2018

GUIÈZE, R.; WU, C. J. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 126, n. 4, p. 445-453, 2015.

GUO, Y.; KIM, C.; MAO, Y. New insights into the mechanism for chromosome alignment in metaphase. In: **International Review of Cell and Molecular Biology**. Academic Press, p. 237-262, 2013.

HALLEK, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. **American Journal of Hematology**, v. 88, n. 9, p. 803-816, 2013.

HALLEK, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. **American Journal of Hematology**, v. 92, p. 946 – 965, 2017.

HALLEK, M.; SHANAFELT, T.D.; EICHHORST, B.; et al. Chronic lymphocytic leukaemia. **The Lancet**, 2018.

HALLEK, M.; CHESON, B. D.; CATOVSKY, D.; et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the international workshop on chronic lymphocytic leukemia updating the national Cancer Institute – working group 1996 guidelines. **Blood**, v. 111, p. 5446-5456, 2008.

HATCH, S. B.; YAPP, C.; MONTENEGRO, R. C.; et al. Assessing histone demethylase inhibitors in cells: lessons learned. **Epigenetics & Chromatin**, v. 10, n. 1, p. 9, 2017.

HERLIHY, N.; DOGRUSÖZ, M.; VAN ESSEN, T. H.; et al. Skewed expression of the genes encoding epigenetic modifiers in high-risk uveal melanoma. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 56, n. 3, p. 1447-1458, 2015.

JAMROZIAK, K.; PUŁA, B.; WALEWSKI, J. Current Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. **Current Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia**, v. 18, p. 5, 2017.

KANWAL, R.; GUPTA, S. Epigenetic modifications in cancer. **Clinical Genetics**, v. 81, n. 4, p. 303-311, 2012.

KIM, T. D.; SHIN, S.; BERRY, W. L.; et al. The JMJD2A demethylase regulates apoptosis and proliferation in colon cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 4, p. 1368-1376, 2012.

KIPPS, T. J.; STEVENSON, F. K.; WU, C. J.; et al. Chronic lymphocytic leukemia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 16096, 2017.

KUPERSHMIT, I.; KHOURY-HADDAD, H.; AWWAD, S. W.; et al. KDM4C (GASC1) lysine demethylase is associated with mitotic chromatin and regulates chromosome segregation during mitosis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 10, p. 6168-6182, 2014.

LABBÉ, R. M.; HOLOWATYJ, A.; YANG, Z. Q. Histone lysine demethylase (KDM)

subfamily 4: structures, functions and therapeutic potential. **American Journal of Translational Research**, v. 6, n. 1, p. 1, 2014.

LI, N.; JIANG, D. Jumonji domain containing 2C promotes cell migration and invasion through modulating CUL4A expression in lung cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 305-315, 2017.

LIU, G.; BOLLIG-FISCHER, A.; KREIKE, B.; et al. Genomic amplification and oncogenic properties of the GASC1 histone demethylase gene in breast cancer. **Oncogene**, v. 28, n. 50, p. 4491, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MANSOURI, L.; WIERZBINSKA, J. A.; PLASS, C.; et al. Epigenetic deregulation in chronic lymphocytic leukemia: clinical and biological impact. **In: Seminars in cancerbiology**. Academic Press, 2018.

MATUTES, E.; MORILLA, R.; OWUSU-ANKOMAH, K.; et al. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. **Blood**, v. 83, n. 6, p. 1558-1562, 1994.

MAYR, C.; SPEICHER, M. R.; KOFLER, D. M.; et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 107, n. 2, p. 742-751, 2006.

MONTSERRAT, E.; BAUMAN, T.; DELGADO, J. Present and future of personalized medicine in CLL. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 29, n. 1, p.

100-110, 2016.

MOREAU, E. J.; MATUTES, E.; A'HERN, R. P.; et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). **American Journal of Clinical Pathology**, v. 108, p. 378–382, 1997.

NABHAN, C.; RACA, G.; WANG, Y. L. Predicting prognosis in chronic lymphocytic leukemia in the contemporary era. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 7, p. 965-974, 2015.

OMAR, A-S. J.; MAURICIO, V-G. J. Leucemia linfocítica crónica. **De interés para los profesionales del cuidado materno infantil, se incluye el artículo referente a los resultados del programa “mamá canguro”, llevado a cabo en el Hospital de la Mujer de nuestro estado, al igual que el reporte de un caso de amaurosis bilateral transitoria a consecuencia de eclampsia y preeclampsia. Para los odontólogos se presenta un estudio que compara la eficacia de la técnica incisiva y el**, p. 29, 2013.

PDQ Adult Treatment Editorial Board. Chronic Lymphocytic Leukemia Treatment (PDQ®). 2017.

PEDERSEN, M. T.; KOOISTRA, S. M.; RADZISHEUSKAYA, A.; et al. Continual removal of H3K9 promoter methylation by Jmjd2 demethylases is vital for ESC self-renewal and early development. **The EMBO Journal**, p. e201593317, 2016.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.

RAI, K. R.; JAIN, P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) - Then and now. **American journal of hematology**, v. 91, n. 3, p. 330-340, 2016.

RAI, K. R.; SAWITSKY, A.; CRONKITE, E. P.; et al. Clinical staging of chronic

lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 46, n. 2, p. 219-234, 1975.

RIBEIRO, A. A. R. Leucemia Linfocítica Crónica B-A importância da deleção 17p. 2011.

RODRÍGUEZ-VICENTE, A. E.; DÍAZ, M. G.; HERNÁNDEZ-RIVAS, J. M. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogeneous disease. **Cancer Genetics**, v. 206, n. 3, p. 49-62, 2013.

ROSSI, D.; BRUSCAGGIN, A.; SPINA, V.; et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. **Blood**, p. blood-2011-08-373159, 2011.

RUI, L.; EMRE, N. T.; KRUHLAK, M. J.; et al. Cooperative epigenetic modulation by cancer amplicon genes. **Cancer Cell**, v. 18, n. 6, p. 590-605, 2010.

SANDES, A. F.; CHAUFFAILLE, M. C. L.; OLIVEIRA, C. R.; et al. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 86, n. 2, p. 98-105, 2014.

SARGENT, R. L.; CRAIG, F. E.; SWERDLOW, S. H. Comparison of Bcl-2, CD38 and ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 2, n. 6, p. 574, 2009.

SCARFÒ, L.; FERRERI, A. J. M.; GHIA, P. Chronic lymphocytic leukaemia. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v. 104, p. 169 – 182, 2016.

SHINDIAPINA, P.; BROWN, J. R.; DANILOV, A. V. A new hope: novel therapeutic approaches to treatment of chronic lymphocytic leukaemia with defects in

TP53. **British Journal of Hematology**, v. 167, n. 2, p. 149-161, 2014.

SOINI, Y.; KOSMA, V-M.; PIRINEN, R. KDM4A, KDM4B and KDM4C in non-small cell lung cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 10, p. 12922, 2015.

STEVENSON, F. K.; KRYSOV, S.; DAVIES, A. J.; et al. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, p. blood-2011-06-338855, 2011.

STRATI, P.; JAIN, N.; O'BRIEN, S. Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, p. 651-664, 2018.

TEN HACKEN, E.; BURGER, J. A. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: implications for disease pathogenesis and treatment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 3, p. 401-413, 2016.

TIAN, X.; ZHANG, S.; LIU, H. M.; et al. Histone lysine-specific methyltransferases and demethylases in carcinogenesis: new targets for cancer therapy and prevention. **Current Cancer Drug Targets**, v. 13, n. 5, p. 558-579, 2013.

VROBLOVÁ, V.; SMOLEJ, L.; VRBACKY, F.; et al. Biological prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 52, n. 1, p. 3-8, 2009.

WANG, L.; LAWRENCE, M. S.; WAN, Y.; et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 26, p. 2497-2506, 2011

YU, E. M.; KITTAI, A.; TABBARA, I. A. Chronic lymphocytic leukemia: current

concepts. **Anticancer Research**, v. 35, n. 10, p. 5149-5165, 2015.

ZAIDI, S. K.; TROMBLY, D. J.; DOWDY, C. R.; et al. Epigenetic mechanisms in leukemia. **Advances in Biological Regulation**, v. 52, n. 3, p. 369-376, 2012.

ZHANG, S.; KIPPS, T. J. The Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. **Annu Rev Pathol**, v. 9, p. 103–118, 2014.

VIII – ANEXO



Unraveling *KDM4* histone demethylase expression and its association with adverse cytogenetic findings in chronic lymphocytic leukemia

Luma Dayane de Carvalho Filiú Braga¹ · Teresa Raquel Tavares Serejo¹ · Antonio Roberto Lucena-Araujo² · Francisco Assis Rocha Neves¹ · Juliana Lott de Carvalho³ · Eduardo Magalhaes Rego⁴ · Felipe Saldanha-Araujo¹



Received: 2 October 2018 / Accepted: 6 November 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

The acquisition of complex karyotypes is related to the progression of chronic lymphocytic leukemia (CLL) and patients with this condition have a poor prognosis. Despite recent advances in the classification of prognosis in CLL patients, understanding of the molecular mechanisms that lead to genomic instability and progression of this disease remains inadequate. Interestingly, dysregulated expression of *KDM4* members is involved in the progression of several cancer types and plays a role in the DNA damage response; however, the gene expression profile and the importance of *KDM4* members in CLL are still unknown. Here, we assessed the gene expression profile of *KDM4A*, *KDM4B*, and *KDM4C* in 59 CLL samples and investigated whether these histone demethylases have any influence on the prognostic markers of this leukemia. *KDM4A* gene expression was higher in CLL patients as compared with control samples. In contrast, CLL samples showed decreased levels of the *KDM4B* transcript in relation to control cases, and no difference was detected in *KDM4C* expression. Furthermore, patients with positive expression of *ZAP-70* had lower expression of *KDM4B* and *KDM4C* as compared with *ZAP-70*-negative patients. More importantly, patients with low expression of these histone demethylases had higher leukemic cell numbers and displayed adverse cytogenetic findings and the acquisition of a complex karyotype. The present data clearly show that the expression of *KDM4* members is dysregulated in CLL and impact the prognosis of this leukemia. These findings are useful for a better understanding of the impact of epigenetics on CLL progression.

Keywords *KDM4* · Chronic lymphocytic leukemia · Prognostic factors · *ZAP-70* · Karyotype

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a lymphoproliferative disorder characterized by the accumulation of mature CD5+ B-lymphocytes in the blood, bone marrow, lymph nodes, and/or other lymphoid tissues. There is a broad

spectrum of clinical presentation in CLL, in which some patients present an indolent disease pattern, living for many years without treatment, while others have an aggressive disease with a very poor prognosis. Given this heterogeneous clinical course of CLL, it is of fundamental importance to establish an effective tool for the classification of patients

* Felipe Saldanha-Araujo
felipearaujo@unb.br

Luma Dayane de Carvalho Filiú-Braga
luma.filiu@gmail.com

Teresa Raquel Tavares Serejo
raquelserejo@yahoo.com.br

Antonio Roberto Lucena-Araujo
araujoarl@hotmail.com

Francisco Assis Rocha Neves
nevesfar@gmail.com

Juliana Lott de Carvalho
julianalott@gmail.com

Eduardo Magalhaes Rego
edumrego@hotmail.com

¹ Laboratório de Farmacologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

² Laboratório de Hematologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

³ Laboratório de Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil

⁴ Laboratório de Hematologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

according to their prognosis. The Rai and Binet staging systems, developed in the 1970s, were used for decades to stratify CLL patients by their clinical characteristics, but these systems do not allow identification of the risk of progression. More recently, other prognostic parameters have begun to be used for the classification of CLL patients, including the mutational status of immunoglobulin heavy-chain variable region (IgVH) and the expression of CD38 and ZAP-70. Knowledge regarding chromosomal aberrations and genetic mutations in CLL has allowed refinement of the prognostic subgroups of this disease [1, 2]. Accordingly, it has been shown that the acquisition of complex karyotypes is related to the progression of CLL and that such patients have a poor prognosis [3, 4]. Despite advances in the classification of prognosis in CLL patients, understanding of the molecular mechanisms that lead to genomic instability and progression of this disease remains inadequate.

In recent years, the field of epigenetics has developed dramatically and it is now well known that the altered function of histone methyltransferases and demethylases contributes to cancer development and progression [5]. Dysregulation of histone demethylases in cancer can promote the activation of oncogenes, repression of tumor suppressors, alteration of DNA mismatch repair, and disruption of chromosomal stability. Specifically, aberrant expression of the histone demethylase members *KDM4A/JMJD2A*, *KDM4B/JMJD2B*, and *KDM4C/JMJD2C*, which catalyze the removal of H3K9 and H3K36 di- and trimethyl marks, has been detected in several cancer types, such as breast, colorectal, lung, prostate, esophageal, and lymphoma [6, 7]. More specifically, it has been shown that *KDM4* members play a role in the DNA damage response [8, 9].

To date, the gene expression profile and importance of *KDM4* members in CLL remain unknown. Here, we assessed the gene expression profile of *KDM4A*, *KDM4B*, and *KDM4C* in 59 CLL samples and investigated whether these histone demethylases have any influence on the prognostic markers of this leukemia.

Methods

Sample collection

Peripheral blood samples were collected from 59 consecutive CLL patients diagnosed according to Matutes score [10] and treated at the University Hospital of the Medical School of Ribeirao Preto (University of São Paulo, Brazil). In addition, peripheral blood samples from 10 age-matched healthy donors were obtained as a control. The present study was approved by the Local Ethical Committee and informed consent was obtained from all patients and healthy donors.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells and immunomagnetic selection of CD19+ B-cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from CLL patients and healthy donors were obtained following centrifugation of blood samples through Ficoll-Paque PLUS density gradient media (Amersham Biosciences). Subsequently, magnetic beads coupled to CD19 were employed for the immunomagnetic selection of control B-cells, following the manufacturer's recommendations (Miltenyi Biotec). All isolated CD19+ cells had a purity greater than 90% as determined by flow cytometry.

Determination of ZAP-70 protein expression by flow cytometry

Following identification of the CD19+CD5+ population, the protein expression of ZAP-70 was measured using a PE-conjugated anti-ZAP-70 antibody (Dako). The percentage of ZAP-70-positive cells was determined by comparison with an isotype control (cut-off, 20%). All samples were evaluated using a FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences), and data analysis was performed with the Cell Quest software (BD Biosciences).

Cytogenetic analysis

All samples were submitted to karyotype determination by standard G banding. Accordingly, PBMCs were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium supplemented with 20% fetal calf serum in the presence of IL-2 and CpG-oligonucleotide DSP30 (TIBMOlBiol) for 72 h, following which metaphase was induced by colcemid. At least 20 metaphases were analyzed per patient. Standard procedures were followed for chromosome preparation, and cytogenetic analysis was performed according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN).

Real-time PCR (RT-PCR)

All collected samples were submitted to RNA extraction using TRIzol reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. cDNA was generated from 1 µg total RNA with reverse transcriptase and random primers using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). RT-PCR reactions were performed using TaqMan® probes (Applied Biosystems) for *KDM4A* (Hs00206360_m1), *KDM4B* (Hs00392119_m1), and *KDM4C* (Hs00909577_m1). All reactions were carried out in duplicate relative expression levels and were

calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, with the mean of the control samples used as a calibrator. As an endogenous control, a *GAPDH* (Hs99999905_m1) probe was used. The assays were performed using a StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

Statistical analysis

The Mann–Whitney test was used for numerical comparisons between two groups. The influence of KDM expression on cytogenetic findings was determined by Kruskal–Wallis followed by the multiple comparison test (Dunn’s). All analyses were performed using the Prism 7 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) with a significance level of $p < 0.05$.

Results

The clinicopathological characteristics of our CLL cohort were described previously [11]. In brief, the patients were aged between 43 and 85 years old (mean, 63 years old); 25 were women and 34 were men; and there were 38 cases of Binet A, 12 cases of B, and 9 cases of C. Regarding ZAP-70 protein expression, 19 patients were negative and 39 were positive (cut-off for positivity, 20%). Among all patients, 17 were classified in the favorable karyotype group, 18 in the intermediate, and 24 in the unfavorable. Yet, 15 patients

showed a normal karyotype, while 29 patients had 1 or 2 alterations and 15 patients had a complex karyotype [3, 4, 12].

Interestingly, *KDM4A* gene expression was higher in CLL patients as compared with control samples ($p = 0.01$). In contrast, CLL samples showed a decreased level of the *KDM4B* transcript in relation to control cases ($p = 0.001$). Finally, no difference in *KDM4C* expression was detected between CLL and control cases (Fig. 1a–c). To investigate whether these histone demethylases had any association with the number of leukemic cells, we adopted the median value of *KDM4A*, *KDM4B*, and *KDM4C* to dichotomize CLL patients into “low” and “high” *KDM4* expression groups. For *KDM4A*, the median expression was 2.63, while for *KDM4B* and *KDM4C*, the median expression was 0.31 and 3.60, respectively. Importantly, the low expression levels of *KDM4A*, *KDM4B*, and *KDM4C* were associated with a higher number of white blood cells (WBC) ($p = 0.004$, $p = 0.0004$, and $p = 0.01$, respectively) (Fig. 1d–f). Considering these data, we investigated whether there was differential expression of these genes relative to ZAP-70 protein expression. Interestingly, although no association could be identified between *KDM4A* and ZAP-70, patients with positive expression of ZAP-70 had lower expression of *KDM4B* ($p = 0.01$) and *KDM4C* ($p = 0.03$) as compared with ZAP-70-negative patients (Fig. 2a, b).

Notably, investigation into the impact of *KDM4B* and *KDM4C* on cytogenetic risk revealed that there was a continuous decrease in the levels of *KDM4B* in patients with

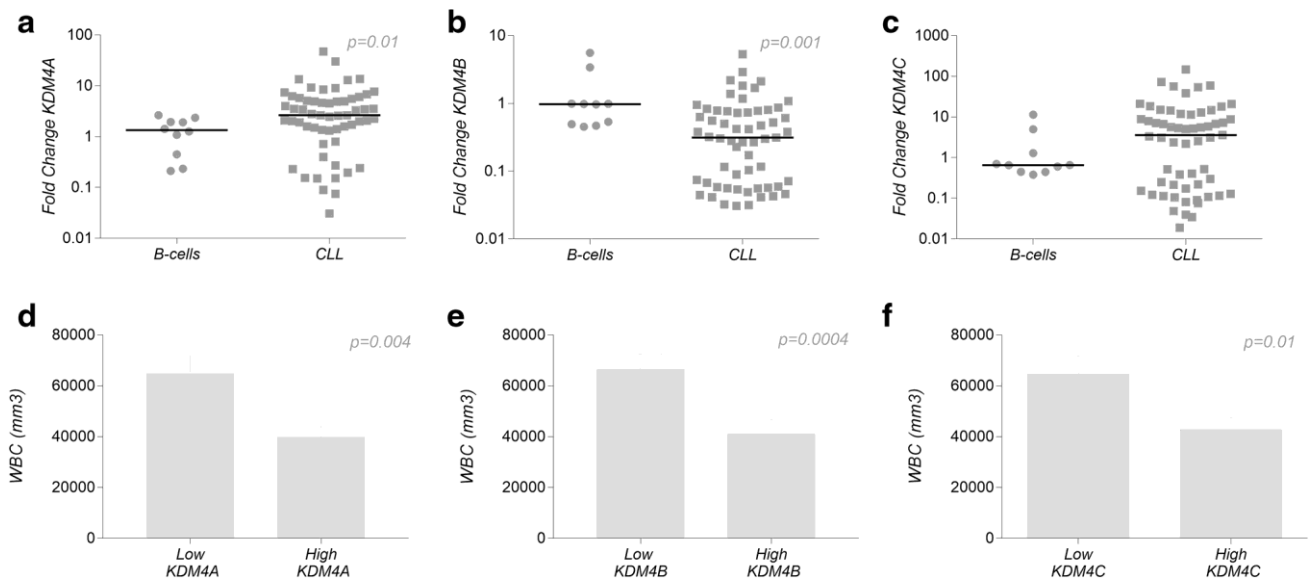


Fig. 1 *KDM4* expression in CLL patients and normal B-cells and its association with WBC count. **a** *KDM4A*, **b** *KDM4B*, and **c** *KDM4C* relative fold change values were calculated by the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, using the median C_t value from the control samples as a reference.

Patients with low expression of **d** *KDM4A*, **e** *KDM4B*, and **f** *KDM4C* presented with a higher number of white blood cells (WBC). The Mann–Whitney test was employed to compare differences between the groups

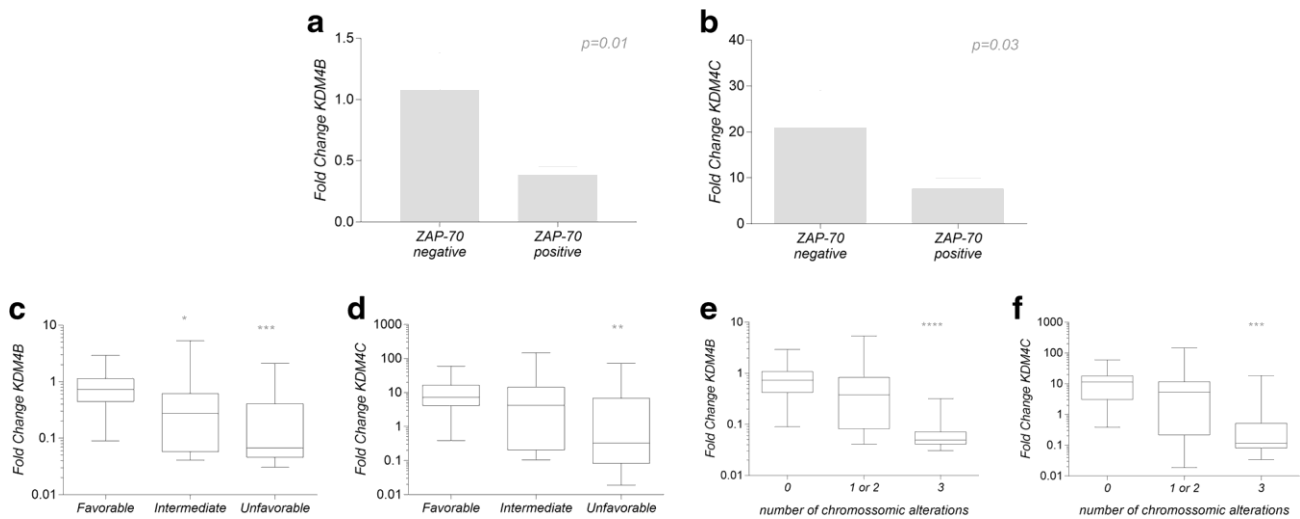


Fig. 2 Association of *KDM4* levels with ZAP-70 protein expression and with cytogenetic findings in CLL patients. CLL patients with positive expression of ZAP-70 showed lower expression of **a** *KDM4B* and **b** *KDM4C* as compared with ZAP-70-negative patients. The Mann–Whitney test was employed to compare differences between the groups. **c** *KDM4B* and **d** *KDM4C* expression in patients with

intermediate and unfavorable karyotypes ($p = 0.001$) as compared with patients with favorable cytogenetic results. Similarly, expression of *KDM4C* was significantly reduced in patients with an unfavorable karyotype ($p = 0.005$). No association between *KDM4A* and cytogenetic findings was noticed. We subsequently investigated the impact of the differential expression of these histone demethylases on the number of chromosomal alterations. Strikingly, decreased levels of *KDM4B* and *KDM4C* were associated with the acquisition of a complex karyotype in CLL ($p < 0.0001$ and $p < 0.0003$, respectively) (Fig. 2c–f).

Discussion

In the present study, we characterized the transcriptional levels of *KDM4A*, *KDM4B*, and *KDM4C* in CLL and demonstrated that the expression of these histone demethylases was associated with classical prognostic markers, such as the accumulation of leukemic cells, ZAP-70 protein expression, and adverse cytogenetic findings. Interestingly, CLL samples showed high expression of *KDM4A* as compared with healthy donors, and cases with low expression of this gene presented a high WBC count. *KDM4A* has previously been shown to be overexpressed in bladder and lung cancer, and in these tumors, *KDM4A* inhibition induces significant suppression of tumor progression [13]. Importantly, it has been demonstrated that dysregulated expression of *KDM4A* promotes localized copy gain of 1q12, 1q21, and Xq13.1 without indices global chromosome instability [14]. However,

we did not detect any association between the expression of *KDMA4A* and the acquisition of cytogenetic abnormalities in the present study. *KDM4A* and *KDM4B* are overexpressed in several cancer types including breast, lung, prostate, and melanoma [15]. Interestingly, our CLL samples showed low transcript levels of *KDM4B* as compared with control B-cells, but no difference was detected in *KDM4C* expression. Notably, our data reveal that CLL patients with positive expression of the prognostic marker, ZAP-70, have low expression of *KDM4B* and *KDM4C*. In accordance, beyond showing an increased number of leukemic cells, these patients also presented with adverse cytogenetic findings and the acquisition of a complex karyotype, which are useful markers for the identification of patients with aggressive CLL and a short overall survival time [3, 4, 16]. Importantly, beyond *KDM4A*, the overexpression of *KDM4B* and *KDM4C* also promotes chromosomal instability; once aberrant expression of these histone demethylases impairs the integrity of DNA mismatch repair, microsatellite instability (MSI) is promoted in addition to an increase in the frequency of spontaneous mutations [17]. More specifically, the association between *KDM4* members and genomic instability has been reinforced by the demonstration that *KDM4C* controls the expression of MDM2, which can destabilize the p53 protein and induce genomic instability [18]. It has been speculated that, due to the dysregulated expression of *KDM* members in the same cancer and their similar physiological functions, *KDM4* proteins may perform overlapping functions [7]. Our data are in agreement with this speculation, considering the different

associations of both *KDM4B* and *KDM4C* with indicators of poor prognosis in CLL.

Conclusion

To the best of our knowledge, this study is the first to comprehensively investigate the gene expression pattern of *KDM4* members in CLL and to demonstrate their impact on the prognosis of this leukemia, mainly with the acquisition of adverse cytogenetic findings. These findings are useful for a better understanding of the impact of epigenetics on CLL progression.

Acknowledgements This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval and informed consent The study was approved by the Ethical Committee of the Medical School Hospital of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and samples were collected after informed consent was obtained from patients and health donors.

References

1. Roos-Weil D, Nguyen-Khac F, Bernard OA. Chronic lymphocytic leukemia: time to go past genomics? *Am J Hematol.* 2016;91:518–28.
2. Barrientos JC. Sequencing of chronic lymphocytic leukemia therapies. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2016;2016:128–36.
3. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343:1910–6.
4. Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2006;107:742–51.
5. Højfeldt JW, Agger K, Helin K. Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12:917–30.
6. Labbé RM, Holowatyj A, Yang Z-Q. Histone lysine demethylase (KDM) subfamily 4: structures, functions and therapeutic potential. *Am J Transl Res.* 2013;6:1–15.
7. Berry WL, Janknecht R. KDM4/JMJD2 histone demethylases: epigenetic regulators in cancer cells. *Cancer Res.* 2013;73:2936–42.
8. Young LC, McDonald DW, Hendzel MJ. Kdm4b histone demethylase is a DNA damage response protein and confers a survival advantage following γ -irradiation. *J Biol Chem.* 2013;288:21376–88.
9. Khoury-Haddad H, Guttmann-Raviv N, Ipenberg I, Huggins D, Jeyasekharan AD, Ayoub N. PARP1-dependent recruitment of KDM4D histone demethylase to DNA damage sites promotes double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:E728–37.
10. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia.* 1994;8:1640–5.
11. Carvalho Alves-Silva J, do Amaral Rabello D, Oliveira Bravo M, Lucena-Araujo A, Madureira de Oliveira D, Morato de Oliveira F, et al. Aberrant levels of SUV39H1 and SUV39H2 methyltransferase are associated with genomic instability in chronic lymphocytic leukemia. *Environ Mol Mutagen.* 2017;58:654–61.
12. Nabhan C, Raca G, Wang YL. Predicting prognosis in chronic lymphocytic leukemia in the contemporary era. *JAMA Oncol.* 2015;1:965–74.
13. Kogure M, Takawa M, Cho H-S, Toyokawa G, Hayashi K, Tsunoda T, et al. Deregulation of the histone demethylase JMJD2A is involved in human carcinogenesis through regulation of the G(1)/S transition. *Cancer Lett.* 2013;336:76–84.
14. Black JC, Manning AL, Van Rechem C, Kim J, Ladd B, Cho J, et al. KDM4A lysine demethylase induces site-specific copy gain and rereplication of regions amplified in tumors. *Cell.* 2013;154:541–55.
15. Young LC, Hendzel MJ. The oncogenic potential of Jumonji D2 (JMJD2/KDM4) histone demethylase overexpression. *Biochem Cell Biol.* 2013;91:369–77.
16. Ouillette P, Collins R, Shakhani S, Li J, Peres E, Kujawski L, et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;118:3051–61.
17. Awwad SW, Ayoub N. Overexpression of KDM4 lysine demethylases disrupts the integrity of the DNA mismatch repair pathway. *Biol Open.* 2015;4:498–504.
18. Ishimura A, Terashima M, Kimura H, Akagi K, Suzuki Y, Sugano S, et al. Jmjd2c histone demethylase enhances the expression of Mdm2 oncogene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;389:366–71.