

CAROLINA AMARO DE MOURA

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE *SMYD4* EM
CÂNCER DE MAMA E SEU ENVOLVIMENTO NA CARCINOGENESE
MAMÁRIA**

BRASÍLIA

2013

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

CAROLINA AMARO DE MOURA

Análise do perfil de expressão do gene *SMYD4* em câncer de mama e seu envolvimento na carcinogênese mamária

Dissertação apresentada como requisito parcial à 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

CAROLINA AMARO DE MOURA

Análise do perfil de expressão do gene *SMYD4* em câncer de mama e seu
envolvimento na carcinogênese mamária

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

Aprovado em 22 de janeiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Pittella Silva (Presidente)
Universidade de Brasília, UnB

Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira
Universidade Católica de Brasília, UCB

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo
Universidade de Brasília, UnB

Prof^a. Dr^a. Marie Togashi (Suplente)
Universidade de Brasília, UnB

“Em algum lugar, algo incrível espera
para ser conhecido.”

Carl Sagan

Aos meus pais, Creuza e Hudson.

Ao meu amado, Hugo.

Às pessoas com câncer.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Creuza e Hudson por me proporcionarem todo o estudo, suporte, amor e carinho durante toda a minha vida.

Ao meu querido Hugo, pelo amor, amizade e companheirismo durante esta jornada.

Ao meu padrinho Francisco e aos meus avós Laura e Getúlio pelo imenso suporte na realização deste trabalho.

Aos meus verdadeiros amigos, Norranna e Pablo, dos quais sempre tive apoio.

À minha grande amiga Maíra Araujo que me acompanhou nesta etapa da minha carreira, seja superando as adversidades ou comemorando nossos êxitos.

Aos meus colegas de trabalho no Hospital Regional da Asa Norte por toda a compreensão e admiração pela minha pesquisa.

A todas as amigadas que fiz no grupo Patologia Molecular do Câncer e no Laboratório de Farmacologia Molecular.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

À todos que colaboraram com a realização deste trabalho, especialmente ao Dr. João Nunes, à Dr^a. Lislely Calixto e à colega Martha Estrêla pela coleta e organização das amostras.

Ao Professor Doutor Fábio Pittella Silva pela oportunidade, colaboração e docência.

Às pessoas que aceitaram participar deste trabalho.

Muito obrigada.

RESUMO

Modificações epigenéticas estão relacionadas a padrões de expressão gênica diferentes. A desregulação nos processos epigenéticos, incluindo metilação nas caudas de histona, tem sido associada à biologia das lesões cancerosas e seus resultados clínicos. Até agora, diversos genes codificadores de metiltransferases tem sido descritos e associados à carcinogênese mamária. Os genes codificadores de metiltransferases de lisina de histonas apresentam um domínio SET o qual é capaz de metilar resíduos de lisina nas caudas das histonas. A desregulação neste processo de metilação pode mudar a conformação da cromatina e permitir a transcrição de genes que agem na carcinogênese. Proteínas que contêm os domínios SET e MYND (SMYDs) constituem uma família de cinco proteínas altamente conservadas desde leveduras até vertebrados, e nem todas foram completamente caracterizadas. O gene *SMYD4* humano está localizado no cromossomo 17 (17p13.3), em uma região que perde comumente a heteroziguidade em cânceres de mama. No presente estudo, investigou-se o perfil de expressão do gene *SMYD4* em tumores de mama e seus tecidos não tumorais adjacentes, em sete diferentes linhagens celulares de câncer de mama e em treze diferentes tecidos humanos não cancerosos. Além disso, foram utilizadas células estáveis com *SMYD4* superexpresso na investigação da localização subcelular de sua proteína e na análise da proliferação celular em consequência desta superexpressão. Ademais, analisou-se a consequência da inibição de expressão deste gene em linhagem celular de câncer de mama. Diante desses objetivos, descobriu-se que *SMYD4* está frequentemente hipoexpresso em cânceres de mama, comparado às contrapartes não tumorais, e diminuídos em todas as linhagens celulares de câncer de mama. Interessantemente, há uma maior expressão nos tecidos mamários em comparação a todos os outros analisados. Além disso, observou-se maior proliferação em células com expressão do *SMYD4* silenciada. Os resultados demonstram novos caminhos na elucidação do papel de *SMYD4*, evidenciando a importância de sua hipoexpressão na progressão do câncer de mama.

Palavras-chave: SMYD4, expressão gênica, câncer de mama, tecidos normais.

ABSTRACT

Epigenetic modifications are related to different gene expression patterns. Misregulation of epigenetic processes, including methylation in histone tails, has been associated to the biology of cancer and their clinical outcome. Up to date, several methyltransferase genes have been described to be involved in breast carcinogenesis. Histone lysine methyltransferase genes encode proteins containing a SET domain with the ability to methylate lysine residues in histone tails. Misregulation on this methylation process can change the chromatin conformation and allow transcription of genes that operate in carcinogenesis. SET and MYND domain proteins (SMYDs) are a family of five proteins highly conserved from yeast to vertebrates, which have not yet been fully characterized. Human *SMYD4* gene is located at chromosome 17 (17p13.3) which is a region commonly exhibiting loss of heterozygosity in breast cancers. In the present study it was investigated the expression profile of *SMYD4* in breast tumors and its adjacent non-tumor tissues, in seven different breast cancer cell lines and in thirteen human normal tissues. In addition it was used stable cell lines overexpressing *SMYD4* to investigate its subcellular localization, as well as its impact on cellular growth behavior before *SMYD4* overexpression. It was also analyzed the effects of *SMYD4* inhibition on the proliferation of a breast cancer cell line. It was found that *SMYD4* is frequently downregulated in breast cancers compared to its non-cancerous counter-parts and frequently decreased in all breast cancer cell lines. Interestingly, it showed a higher expression in breast tissues comparing to all normal tissues analyzed. In addition it was found an increased proliferation in cells with silenced expression of *SMYD4*. These results shed new lights on the role of *SMYD4*, evidencing the importance of its downregulation for breast cancer progression.

Keywords: *SMYD4*, gene expression, breast cancer, normal tissues.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo esquemático de alteração estrutural na cromatina por modificações epigenéticas.	21
Figura 2 – Estrutura do gene <i>SMYD4</i> , RNA mensageiro e proteína.	25
Figura 3 – Avaliação da integridade do RNA extraído de amostras clínicas.	31
Figura 4 – Teste do cDNA sintetizado a partir do RNA extraído de amostras clínicas.	31
Figura 5 – Curva de padronização por qPCR dos ensaios de <i>β-actina</i> e <i>SMYD4</i>	32
Figura 6 – Determinação de valores atípicos entre as amostras clínicas.	34
Figura 7 – Determinação da quantidade mínima de G418 em células HEK293.	35
Figura 8 – Determinação da quantidade mínima de puromicina em células MDA-MB-231.	36
Figura 9 – Modelo esquemático do vetor de expressão.	37
Figura 10 – Confirmação da digestão do plasmídeo de expressão de <i>SMYD4</i>	37
Figura 11 – Esquema de diluição para seleção de uma única célula.	38
Figura 12 – Avaliação dos níveis de expressão de <i>SMYD4</i> dos clones transfectados com o vetor de superexpressão.	39
Figura 13 – Modelo esquemático do vetor de shRNA pGFP-V-RS.	40
Figura 14 – Controle de transfecção dos plasmídeos controle de shRNA.	41
Figura 15 – Controle de transfecção dos plasmídeos shRNA para <i>SMYD4</i>	42
Figura 16 – Western Blot das células com o controle mock e com a superexpressão.	44
Figura 17 – Comparação entre <i>SMYD4</i> e os outros membros da família SMYD.	46
Figura 18 – Alinhamento da sequência dos domínios MYND dos membros da família SMYD.	46
Figura 19 – Alinhamento da sequência dos domínios SET dos membros da família SMYD.	47
Figura 20 – Análise de quantificação relativa do gene <i>SMYD4</i> em sete linhagens de câncer de mama.	48
Figura 21 – Expressão relativa do gene <i>SMYD4</i> em amostras de câncer de mama.	49
Figura 22 – Expressão relativa do gene <i>SMYD4</i> em diferentes tecidos humanos.	50

Figura 23 – Coloração por giemsa para avaliação do efeito de superexpressão do gene <i>SMYD4</i> em células HEK293.	51
Figura 24 – Ensaio de MTT para avaliação do efeito de silenciamento do gene <i>SMYD4</i> por shRNA em células MDA-MB-231.....	52
Figura 25 – Localização subcelular de <i>SMYD4</i> por imunocitoquímica.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil para 2012	17
Tabela 2 – Diferentes metiltransferases de lisina de histona	23
Tabela 3 – Linhagens celulares de câncer de mama descritas por receptores e tipo tumoral	27
Tabela 4 – Características clínicas e histopatológicas das amostras tumorais de câncer de mama	29
Tabela 5 – Sequência dos shRNAs para silenciamento do gene <i>SMYD4</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

17p13.3	Cromossomo 17, braço curto, região 1, banda 3, sub-banda 3
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
c-erB2/HER2	Receptor do fator de crescimento epitelial do tipo 2
CO ₂	Dióxido de carbono
C _T	<i>Cycle threshold</i>
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNase I	Desoxirribonuclease I
G418	Geneticina
H_K_me_	Identificação da histona, número do resíduo de lisina, grau de metilação
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney 293</i>
HKMT	Metiltransferases de lisina de histona
I.C.	Intervalo de confiança
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
qPCR	PCR em tempo real
QR	Quantificação relativa
RE	Receptor de estrógeno
RNase	Ribonuclease
RP	Receptor de progesterona

SAM	S-adenosilmetionina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
shRNA	<i>small hairpin</i> RNA
SMYD	Família de proteínas que contêm os domínios SET e MYND
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TBS-T	Solução salina tamponada com Tris acrescentada de Tween 20
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VEGFR1	Receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 O câncer.	16
1.2 O câncer de mama.....	18
1.3 A heterogeneidade do câncer de mama.	19
1.4 Alterações moleculares e câncer.	20
1.5 A família <i>SMYD</i> e o gene <i>SMYD4</i>	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivos gerais	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 MÉTODOS	27
3.1 Comparação da sequência de aminoácidos entre membros da família <i>SMYD</i>	27
3.2 Linhagens celulares	27
3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) de diferentes tipos de tecido	28
3.4 Coleta de amostras clínicas	28
3.5 Extração do RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)	29
3.6 PCR em Tempo Real (qPCR)	32
3.7 Análises dos dados de PCR em Tempo Real	33
3.8 Avaliação da viabilidade celular por reação de redução do MTT	34
3.9 Determinação da quantidade mínima do agente seletivo	35
3.10 Estabelecimento de células estáveis para superexpressão do gene <i>SMYD4</i>	36
3.11 Avaliação com coloração giemsa do efeito da superexpressão do <i>SMYD4</i> ..	39
3.12 Silenciamento do gene <i>SMYD4</i> por shRNA em linhagem MDA-MB-231 de câncer de mama	40
3.13 Western Blot.....	42
3.14 Localização subcelular de <i>SMYD4</i> por imunocitoquímica.....	44
3.15 Aspectos Éticos.....	45
4 RESULTADOS	46
4.1 Os principais domínios de <i>SMYD4</i> assemelham-se aos outros membros da família <i>SMYD</i>	46
4.2 <i>SMYD4</i> está hipoexpresso em linhagens celulares de câncer de mama.....	48
4.3 <i>SMYD4</i> está hiporregulado na maioria das amostras de câncer de mama	49
4.4 <i>SMYD4</i> está mais expresso em tecido mamário.....	50

4.5 Avaliação do efeito de superexpressão do gene <i>SMYD4</i>	51
4.6 Avaliação do efeito de silenciamento do gene <i>SMYD4</i>	52
4.7 A proteína SMYD4 está localizada no citoplasma.....	53
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO.....	58
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER.

O câncer representa um grande problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. As estatísticas mundiais mostram que, no ano 2000, cerca de seis milhões de pessoas morreram por essa causa e que aproximadamente 43% dessas mortes eram de mulheres (1). Nas últimas décadas, a doença ganhou uma dimensão maior. A Organização Mundial da Saúde estimou 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas com câncer no ano 2030. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda (2). Além disso, o câncer foi visto como principal causa de morte no mundo em 2008, em que contabilizou 7,6 milhões de mortes, cerca de 13% do total (3).

A incidência global do câncer continua a crescer amplamente por conta do envelhecimento e crescimento da população mundial e também por causa dos hábitos que podem causar câncer. Tais fatores devem ser levados em consideração principalmente em países em desenvolvimento, onde o câncer de mama feminino, de pulmão e colorretal estão ocorrendo em frequências altas (4). No Brasil, o câncer de mama é o que mais afeta as mulheres e, entre os homens, o mais incidente é o câncer de próstata. As estimativas mostram que esses tipos de câncer são cerca de 3 vezes mais incidentes que outros tipos entre essas populações (Tabela 1). Neste sentido, alguns aspectos devem ser enfatizados quanto aos fatores de risco, como o fato de o mesmo fator poder ser de risco para várias doenças – como o tabagismo – e de vários fatores de risco estarem envolvidos na gênese de uma mesma doença – agentes causais múltiplos. Estudos destes fatores de risco, sejam isolados ou combinados, permitem estabelecer relações de causa-efeito entre eles e determinados tipos de câncer (5).

Tabela 1 – Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil para 2012

Mulheres			Homens		
Localização primária	Casos novos	Percentual	Localização primária	Casos novos	Percentual
Mama Feminina	52.680	27,90%	Próstata	60.180	30,80%
Colo do Útero	17.540	9,30%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,80%
Cólon e Reto	15.960	8,40%	Cólon e Reto	14.180	7,30%
Glândula Tireoide	10.590	5,60%	Estômago	12.670	6,50%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,30%	Cavidade Oral	9.990	5,10%
Estômago	7.420	3,90%	Esôfago	7.770	4,00%
Ovário	6.190	3,30%	Bexiga	6.210	3,20%
Corpo do Útero	4.520	2,40%	Laringe	6.110	3,10%
Sistema Nervoso Central	4.450	2,40%	Linfoma não Hodgkin	5.190	2,70%
Linfoma não Hodgkin	4.450	2,40%	Sistema Nervoso Central	4.820	2,50%

Legenda: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma (2).

Além dos hábitos e comportamentos de cada indivíduo, segundo Weinberg, em 2008 (6):

A natureza do câncer sugere que este seja a doença do caos, o colapso da ordem biológica existente no corpo humano. Mais especificamente, a desordem observada no câncer deriva-se diretamente do mau funcionamento do controle que normalmente é responsável por determinar quando e onde as células ao longo do corpo irão multiplicar-se.

Os tumores têm sido reconhecidos como tecidos muito complexos, compostos de múltiplos e distintos tipos celulares que participam de interações heterotópicas entre si (7). Além disso, o câncer também tem sido apontado como doença crônico-degenerativa que apresenta desenvolvimento prolongado e progressivo se não houver interferência em algum de seus estágios, tratando-se de um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, mas que podem ser diferentes em aspectos etiológicos, de frequência e de manifestações clínicas (8, 9). Todavia, apesar de todas essas considerações, o câncer é considerado a doença crônica com o maior potencial de cura se detectado precocemente (10).

O câncer é a segunda causa mais comum de morte, depois das doenças cardiovasculares, e o envelhecimento da população possibilita o aumento dessa estatística. Por isso, os testes moleculares para esta enfermidade tendem a crescer

nos próximos anos e, atualmente, várias empresas têm desenvolvido testes de predisposição baseando-se em variações genômicas associadas a fases anteriores da doença. Neste sentido, a associação do diagnóstico molecular com a terapêutica direcionada é uma estratégia bem sucedida no desenvolvimento de drogas anticâncer (11).

Diante desses fatos, com o advento dos marcadores moleculares em câncer, tornou-se mais fácil o manejo clínico dos pacientes, auxiliando nos processos de diagnóstico, prognóstico, estadiamento, avaliação da resposta terapêutica, detecção de recidivas, localização de metástases, detecção precoce de recorrência e nos tratamentos com imunorradioterapia (12, 13). Desta forma, a busca por estes marcadores tem crescido cada vez mais no ramo da pesquisa em câncer, e novas descobertas têm facilitado em todos os aspectos supracitados.

1.2 O CÂNCER DE MAMA.

O câncer de mama é o segundo tipo mais comum e é a neoplasia de maior incidência na população feminina mundial, com aproximadamente um milhão de casos novos por ano (1, 2, 3). A estimativa de novos casos de câncer de mama no Distrito Federal em 2012 foi de 880 para cada 100 mil mulheres e de 52.680 (27,9%) novos casos no Brasil (2). Alguns fatores são determinantes para a variação mundial da incidência do câncer de mama, como a oferta de serviços diagnósticos, diferenças nos fatores de reprodução e hormonais (4, 14).

As mulheres mais atingidas pelo câncer de mama são as de idade entre 45 e 65 anos, dada a tendência de aumentar o número de mulheres nessa faixa etária em virtude do aumento da expectativa de vida (15). Entretanto, outros fatores além da idade estão envolvidos com o surgimento da doença, dos quais se pode citar a exposição a radiações ionizantes, grande ingestão de gorduras saturadas, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, primeira gestação após os 30 anos de idade, uso indiscriminado de hormônios, consumo de álcool e antecedentes familiares positivos. Além disso, por ser de etiologia desconhecida, o câncer de mama não pode ser evitado, mas sabe-se que atividade física moderada, dieta rica em frutas e verduras, primeira gestação antes dos 30 anos de idade, menarca tardia e menopausa precoce são alguns dos fatores de proteção (15, 16).

De acordo com o Ministério da Saúde, a primeira dificuldade que se enfrenta no estudo das neoplasias é a sua definição, pois ela se baseia na morfologia e na biologia do processo tumoral, podendo ser modificada com a evolução do conhecimento (17). No caso do câncer de mama, o rastreamento e o diagnóstico são realizados por meio de exames de imagem, e o tratamento é determinado com base em fatores prognósticos e preditivos da resposta a determinadas terapias. Dentre esses fatores, destacam-se as características clínicas (idade do paciente e estadiamento), anatomopatológicas (tipo/subtipo histológico, grau histológico, acometimento de linfonodos regionais), presença de receptores específicos e, mais recentemente, a expressão de determinados genes (18). Apesar da importante caracterização histopatológica, uma caracterização molecular mais rica pode tornar o tratamento mais específico e eficaz, melhorando o prognóstico do paciente com câncer de mama, já que os diferentes tipos de câncer de mama têm patologia e perfis heterogêneos (19).

1.3 A HETEROGENEIDADE DO CÂNCER DE MAMA.

O câncer de mama tem sido cada vez mais visto como uma doença muito diversificada devido às características como comportamento biológico, prognóstico e evolução da doença, o que vem sendo confirmado por estudos moleculares (20). Um dos maiores desafios a ser enfrentado é a heterogeneidade tumoral do carcinoma de mama, já que desfechos distintos podem surgir em relação aos fatores prognósticos e às respostas aos tratamentos instituídos mesmo em tumores que apresentam tipos histológicos, estádios e graus de diferenciação iguais (21). Neste sentido, acredita-se que as divergências demonstradas no comportamento biológico entre tumores microscopicamente similares possam ser justificadas pela complexidade do câncer de mama e pelo acúmulo de alterações moleculares (22).

Nas últimas décadas, a heterogeneidade do câncer de mama vem sendo muito estudada em decorrência da descoberta de receptores hormonais como o Receptor do Fator de Crescimento Epitelial do tipo 2 (HER2), o Receptor de Estrógeno (RE) e o Receptor de Progesterona (RP). Tais receptores tornaram-se importantes alvos terapêuticos da oncologia clínica atual, contudo, estudos indicam que até 15% das neoplasias de mama não expressam nenhum desses receptores

(23). Diante da diversidade de características moleculares, um dos objetivos da investigação molecular do carcinoma de mama atualmente é encontrar alvos terapêuticos em tumores de todos os subtipos moleculares (24).

Até o final dos anos 90, os pacientes que tinham o diagnóstico de carcinoma de mama eram tratados como se tivessem doenças semelhantes, baseando-se principalmente numa classificação morfológica que impossibilitava justificar por que os casos com o mesmo diagnóstico e estágio podiam ter desfechos clínicos marcadamente diferentes (24). Nos dias de hoje, a atribuição de medidas preventivas ou intervenções no tratamento baseando em características individuais pode melhorar os resultados ao comparar com o uso de uma mesma estratégia para todos os indivíduos acometidos pela doença (25). A evolução rápida entre o diagnóstico da doença e a terapia adaptada às características genéticas individuais estão cada vez mais presentes devido ao recente desenvolvimento no campo da farmacogenômica (11).

A prevenção do câncer é fundamental na diminuição da morbi-mortalidade e melhora na qualidade de vida dos acometidos, pois em muitos dos casos, a doença apenas é diagnosticada em fases mais avançadas, resultando na piora do prognóstico. Desta maneira, o controle depende essencialmente de ações nas áreas da promoção da saúde, proteção específica e de diagnóstico precoce da doença (9). Diante desses fatos, um dos maiores desafios dos pesquisadores é melhorar os diagnósticos para direcionar condutas terapêuticas mais individualizadas (24) e a busca por marcadores é um dos caminhos para se diminuir a mortalidade por câncer de mama, de forma a melhorar a instituição de terapias que possibilitem alterar o curso da doença (12).

1.4 ALTERAÇÕES MOLECULARES E CÂNCER.

Dentre alguns dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de um carcinoma, estão o acúmulo de mutações, instabilidades cromossômicas e alterações epigenéticas que promovem aumento da taxa de proliferação e dano celular, o que prejudica progressivamente o detalhado e complexo sistema de regulação do crescimento e da morte celular (24). Desta forma, o câncer é reconhecido como uma doença genética e epigenética e muito esforço tem sido

devotado nos últimos anos para elucidar oncogenes e genes supressores tumorais envolvidos na transformação celular maligna. O reconhecimento de que a metilação do DNA e as modificações nas histonas são características presentes no câncer humano tornou o estudo dos mecanismos epigenéticos extremamente importante na pesquisa sobre o câncer (26, 27).

Epigenética é definida como modificações herdáveis durante a divisão celular, que não implicam em mudança na sequência do DNA, envolvendo mecanismos que atuam na mudança da acessibilidade da cromatina para regulação transcricional por meio de modificações do DNA e modificação ou rearranjo de nucleossomos (28) (Figura 1).

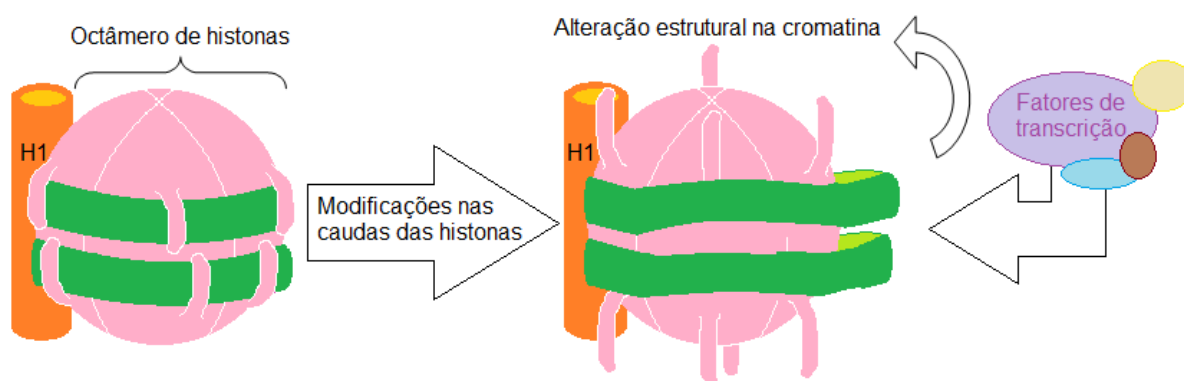


Figura 1 – Modelo esquemático de alteração estrutural na cromatina por modificações epigenéticas.

Alguns processos na cauda das histonas são capazes de mudar a acessibilidade da cromatina para regulação transcricional. Adaptado de Pierce (28).

O nucleossomo é a unidade básica da cromatina e consiste em, aproximadamente, 146 pares de bases do DNA enroladas ao redor de um octâmero de proteínas conhecidas como histonas, as quais são reconhecidas pelo importante papel que desempenham na manutenção do equilíbrio dinâmico da cromatina (30). O octâmero contém quatro histonas – H2A, H2B, H3 e H4 –, sendo um tetrâmero H3-H4 e dois dímeros H2A-H2B, que estão sujeitas a um número de modificações pós-traducionais (31, 32).

A investigação dos mecanismos epigenéticos implicados na gênese e na progressão do câncer tem permitido a obtenção de novos métodos de diagnóstico e de acompanhamento, redirecionando de forma drástica a terapêutica do paciente com neoplasia (33). Além disso, por se tratar de alterações epigenéticas, ou seja,

que não implicam em mudança na sequência de DNA, as mesmas podem ser revertidas, o que tem se apresentado como um campo promissor na busca de agentes terapêuticos (30).

As histonas têm papel no controle da expressão gênica e estrutura da cromatina, e algumas modificações nestas proteínas participam na supressão de tumores por intermédio do silenciamento de genes (34, 35, 36). A informação epigenética pode ser gerada por caminhos como a modificação química e remodelagem das histonas – que fazem parte do empacotamento do DNA no núcleo eucariótico – e padrão de metilação do DNA (28, 37).

As caudas aminoterminais das histonas estão sujeitas a várias modificações pós-traducionais como metilação, acetilação, fosforilação e outras (30, 38, 39). A metilação da histona tem surgido como outra modificação que impacta significativamente a estrutura da cromatina (40) e alterações na metilação e acetilação de histonas estão relacionadas à biologia das lesões cancerosas e seus resultados clínicos (41). O conhecimento acerca dos mecanismos da desregulação destes processos pós-traducionais em histonas e a contribuição dos mesmos na tumorigênese mamária é criticamente importante no desenvolvimento de novas terapias alvo-específicas para os pacientes de câncer de mama (27).

A metilação de histonas ocorre principalmente nos resíduos de lisina e arginina. Numerosas metiltransferases de lisina de histona (HKMTs) têm sido identificadas, e a grande maioria metila resíduos de lisina na cauda N-terminal. Todas as HKMTs que metilam lisinas na cauda N-terminal possuem um domínio SET, o qual promove a atividade enzimática, e catalisa a transferência de um grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para o resíduo em questão. No entanto, uma exceção é a enzima Dot1, a qual metila a lisina 79 da histona H3 (H3K79) no core globular da histona e não contém um domínio SET, mas ainda não está claro o motivo de esta enzima ser estruturalmente diferente de todas as outras (42).

O desequilíbrio de metilação das lisinas das histonas altera a expressão de genes envolvidos na tumorigênese, incluindo proto-oncogenes e reguladores do ciclo celular. Este processo é comumente catalisado pela família de proteínas que contém o domínio SET (41). Neste sentido, muitas metiltransferases contendo o domínio SET e algumas de suas funções já foram descritas, e várias estão associadas à carcinogênese e à histona H3 (Tabela 2).

Tabela 2 – Diferentes metiltransferases de lisina de histona

Gene	Sítio e grau de metilação
EZH1	H3K27me1, H3K27me2
EZH2	H3K27me1, H3K27me3, H1K25me1
MLL	H3K4me3
MLL3	H3K4me3
WHSC1	H3K36me3, H4K20me1, H4K20me3
WHSC1L1	H3K4me2, H3K27me2, H2K27me3
PRDM2	H3K9me2
PRDM9	H3K4me3
SETD1A	H3K4me3
SETD1B	H3K4me3
SETD2	H3K36me3
SETD7	H3K4me1
SETD8	H4K20me1, H4K20me2
SETDB1	H3K9me3
SETDB2	H3K9me3
SETMAR	H3K36me2
SUV38H1	H3K9me3
SUV39H2	H3K9me3
SUV420H1	H4K20me2, H4K20me3
SEV420H2	H4K20me2, H4K20me3
NSD1	H3K36me2, H4K20me2
EHMT1	H3K9me2, H3K27me1, H1K25me1, H1K186me1
EHMT2	H3K9me1, H3K9me2, H3K27me1, H1K186me1, H1K25me1
SMYD2	H3K36me2
SMYD3	H3K4me3, H4K20me3
ASH1L	H3K36me1, H3K36me2

Legenda: H3 – histona 3; H4 – histona 4; Kn – posição da lisina metilada; me1 – monometilação; me2 – dimetilação; me3 – trimetilação. Adaptado de Khare e colaboradores (43).

1.5 A FAMÍLIA *SMYD* E O GENE *SMYD4*.

As proteínas que contêm os domínios SET e MYND (*SMYDs*) são conservadas desde as leveduras até os vertebrados, e atualmente cinco *SMYDs* foram reportados no genoma humano (44). O envolvimento de membros da família *SMYD* na carcinogênese foi evidenciado nos estudos que caracterizaram completamente o gene *SMYD3* (38, 40, 45). Nesses trabalhos, observou-se o aumento anormal de expressão do *SMYD3* na maioria dos carcinomas

hepatocelular, colorretal e de mama. A sua superexpressão em células NIH3T3 resultou no aumento da proliferação celular de forma significativa. Além disso, observou-se que o SMYD3 modula a estrutura da cromatina por meio de sua atividade específica intrínseca de metilação da H3K4, sendo também capaz de promover a metilação na lisina 831 do receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR1), o que resultou em um ganho funcional desta tirosina-quinase (46). Este fato abre precedentes para a importância da ação das enzimas da família SMYD como potenciais reguladoras de sinais celulares por meio da metilação proteica, tanto de proteínas histonas quanto proteínas não histonas, e como potenciais alvos para o desenvolvimento de novas terapias de intervenção.

As HKMTs da família SMYD estão num grupo separado de outras enzimas modificadoras de cromatina por conta da natureza de seus domínios SET e da presença do domínio MYND. Este, por sua vez, forma um motivo dedo de zinco que media interações proteína-proteína e, além disso, foi descrito em diversos reguladores que demonstraram mediar funções biológicas distintas (41). A identificação da cadeia de interação dos genes *SMYD2*, *SMYD3* e *SMYD5* sugere um grupo de papéis similares para as proteínas SMYD, envolvendo modificação da cromatina, controle da expressão gênica e resposta a danos no DNA (47). Em 2009, um novo componente da família SMYD, o gene *SMYD4* (Figura 2), foi descrito, indicando que tal gene seria um potencial supressor tumoral (48). Neste trabalho, foi demonstrado que o rompimento da expressão de *SMYD4* está associado à tumorigênese de uma linhagem celular mamária não cancerosa e que, ao re-expressar este gene em células tumorais, houve redução na proliferação destas células. Além disso, foi demonstrado que o gene *SMYD4* estava hipoexpresso em 5 casos de câncer de mama, em um número total de 10 casos. Entretanto, um estudo aprofundado do perfil de expressão do gene *SMYD4* em pacientes com câncer de mama, assim como a identificação da localização subcelular da sua proteína, ainda são necessários para o entendimento de seu papel na tumorigênese.

A investigação de genes codificadores de metiltransferases faz-se importante para o entendimento mais aprofundado da relação entre metilação das histonas e proteínas não histonas com a expressão gênica e o controle epigenético. É sabido que a ruptura do balanço na metilação de lisinas nas histonas altera a regulação da expressão gênica incluindo a de genes envolvidos na tumorigênese como os proto-

oncogenes e os reguladores do ciclo celular (41). Também sabe-se que deleção em 17p13.3 está frequentemente envolvida em vários tipos de cânceres (48). Nesse contexto, a investigação do perfil de expressão e o reconhecimento do envolvimento do gene *SMYD4* em carcinomas de mama podem vir a adicionar informações relevantes ao conhecimento atual sobre os processos moleculares que ocorrem tanto em células normais como em células cancerosas.

SMYD4 (17p13.3 1.682.829 - 1.733.175)

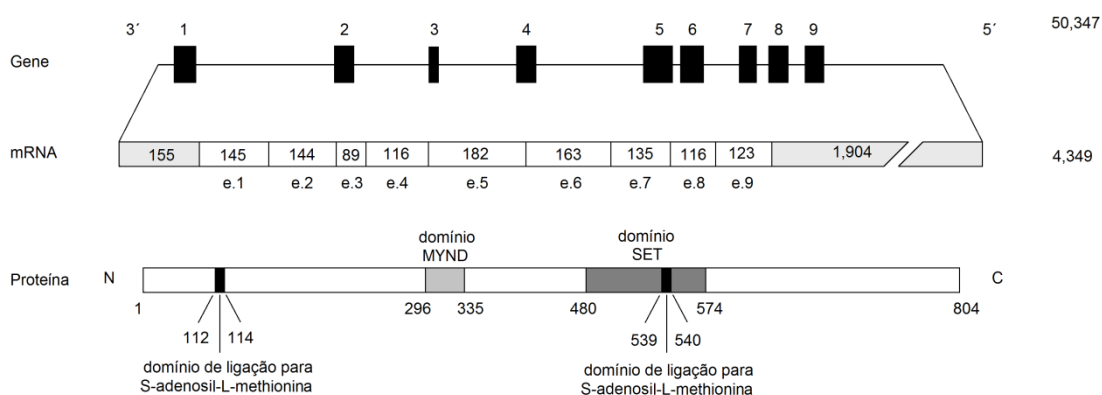


Figura 2 – Estrutura do gene *SMYD4*, RNA mensageiro e proteína.

O gene *SMYD4*, de aproximadamente 50kpb, é dividido em nove regiões exônicas (RefSeq: NM_052928.2) (49). O gene está localizado no cromossomo 17 (17p13.3) e codifica uma proteína de 804 aminoácidos que tem um peso molecular de aproximadamente 89kDa (Swiss-Prot: Q8IYR2) (50).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este projeto teve como objetivo a análise do perfil de expressão comparativo do gene *SMYD4* entre linhagens celulares e amostras tumorais de pacientes com câncer de mama, além de verificar os níveis de expressão em diferentes tecidos humanos. Além disso, objetivou-se a caracterização funcional de *SMYD4* no contexto da carcinogênese.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar os principais objetivos deste trabalho, foram realizadas as seguintes etapas:

- Avaliação da similaridade entre as proteínas da família SMYD;
- Obtenção de linhagens celulares e amostras clínicas de câncer de mama e isolamento do RNA dessas amostras;
- Avaliação do perfil de expressão do gene *SMYD4* em linhagens celulares e amostras clínicas de câncer de mama, bem como de diferentes tecidos humanos;
- Avaliação do efeito de superexpressão de *SMYD4* na proliferação celular por meio de vetores de expressão deste gene em células estáveis;
- Avaliação do efeito de silenciamento de *SMYD4* na proliferação celular via RNA de interferência;
- Localização subcelular da proteína SMYD4.

3 MÉTODOS

3.1 COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS ENTRE MEMBROS DA FAMÍLIA SMYD

Para verificar as possíveis semelhanças entre os membros da família SMYD, realizaram-se comparações de todas as cinco proteínas, bem como de seus domínios SET e MYND, por meio dos programas *BLAST* e *Align* da base de dados UniProt (50).

3.2 LINHAGENS CELULARES

Um grupo de sete linhagens celulares de câncer de mama foi utilizado neste estudo, sendo o RNA das linhagens HCC-1954, CAMA-1, SKBR3, MDA-MB-231, MDA-MB-436 e MD-MB-468 gentilmente cedidos pela Dr^a. Anamaria Camargo Aranha (Instituto Ludwig de Pesquisa do Câncer, São Paulo). Além do RNA de tais linhagens, células de HCC-1954, MCF-7 e MDA-MB-231 foram obtidas por meio do *American Type Culture Collection* (ATCC) e mantidas sob as condições recomendadas. As principais características das linhagens celulares de câncer de mama estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 – Linhagens celulares de câncer de mama descritas por receptores e tipo tumoral

Linhagem	RE	RP	c-erbB2	Tipo tumoral
HCC1954	-	-	+	carcinoma ductal
MCF7	+	+	-	carcinoma ductal invasivo
CAMA1	+	-	-	adenocarcinoma
SKBR3	-	-	+	adenocarcinoma
MDAMB231	-	-	-	adenocarcinoma
MDAMB436	-	-	-	carcinoma ductal invasivo
MDAMB468	-	-	-	adenocarcinoma

Legenda: aspectos patológicos das linhagens celulares de câncer de mama utilizadas na análise da quantificação relativa de *SMYD4*, adaptado de Neve e colaboradores (51). RE – receptor de estrogênio; RP – receptor de progesterona; c-erbB2 – receptor tipo 2 para fator de crescimento epidérmico humano (Her2/Neu).

Além disso, a linhagem HEK293, gentilmente cedida pela Dr^a. Galina Gulis (Instituto de Biologia, UnB), também foi utilizada para experimentos de localização subcelular.

As células em cultura foram mantidas à 37°C, em estufa úmida com 5% de dióxido de carbono (CO₂), em *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Sigma) suplementado com bicarbonato de sódio (5mM), penicilina (100UI/ml), estreptomicina (0,1mg/ml) (Life Technologies) e 10% de soro fetal bovino (Cripion Biotecnologia Ltda.).

3.3 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) DE DIFERENTES TIPOS DE TECIDO

Um painel comercial de RNA total de doze tecidos normais de diferentes órgãos (pulmão, intestino delgado, cérebro, cólon, rim, músculo esquelético, fígado, baço, músculo cardíaco, testículo, estômago e placenta) foi obtido da empresa *OriGene Technologies*. O cDNA foi sintetizado utilizando *The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), seguindo o protocolo do fabricante.

3.4 COLETA DE AMOSTRAS CLÍNICAS

As amostras foram adquiridas em cirurgias de mastectomia realizadas em mulheres de 30 a 64 anos desde o primeiro semestre de 2010 até o segundo semestre de 2012 no Hospital Universitário de Brasília (HUB), no Distrito Federal. Antecedendo a coleta, todas as pacientes participantes deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) um dia antes da cirurgia (Anexo A).

Foram retirados dois fragmentos do tecido tumoral e, sempre que possível, um fragmento de uma contraparte não tumoral de cada paciente por uma equipe treinada de médicos residentes imediatamente após a retirada da mama; além disso, os dados clínicos de cada paciente presentes no prontuário foram registrados. Cada fragmento foi dividido em duas partes, sendo a primeira encaminhada para laudo histopatológico e a segunda para armazenamento em nitrogênio líquido. Após o laudo, todas as amostras tumorais que obtiveram malignidade maior ou igual a 70%

foram submetidas à extração de RNA. As características clínicas e histopatológicas dos pacientes estão descritas na tabela 4.

Tabela 4 – Características clínicas e histopatológicas das amostras tumorais de câncer de mama

Amostra	GM	Idade	GH	Estágio	Qt-Neo	c-erbB2	RE	RP
Tumor 1	100%	61	3	T2N0M0	Não	-	+	+
Tumor 2	100%	32	1	T2N0M0	Sim	+	+	-
Tumor 3	100%	58	3	T3N2aM0	Sim	-	-	-
Tumor 4	80%	60	1	T2N1M0	Não	-	+	+
Tumor 5	80%	54	2	T4dN3M0	Sim	-	+	+
Tumor 6	80%	64	2	YPT4PN1M0	Sim	-	-	-
Tumor 7	100%	43	3	T2N1M0	Não	*	*	*
Tumor 8	80%	56	3	T2N1aM0	Sim	-	-	-
Tumor 9	80%	30	*	T1SN0M0	Não	+	-	-
Tumor 10	80%	36	*	T1cN3aM0	Sim	*	*	*
Tumor 11	100%	58	1	T2N0M0	Não	-	-	-
Tumor 12	80%	60	3	T2N3M0	Sim	-	+	-

Legenda: GM – Grau de Malignidade; GH – Grau Histológico; Qt-Neo – Quimioterapia Neoadjuvante; c-erbB2 – receptor tipo 2 para fator de crescimento epidérmico humano (Her2/Neu); RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona. Grau histológico determinado de acordo com o método de Scarff Bloom-Richardson, modificado de acordo com Elston e Ellis (52) Estadiamento de acordo com a classificação Tumor-Nódo-Metástase de 2004 (53).

3.5 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

As amostras armazenadas em nitrogênio líquido selecionadas para o estudo foram retiradas rapidamente dos criotubos e postas em um novo microtubo de 1,5mL livre de ribonucleases (RNAses). O fragmento foi macerado mecanicamente utilizando brunidores de ponta moldada e espátulas, ambos de aço inox, com o microtubo mergulhado em nitrogênio líquido, sem descongelar a amostra. É importante ressaltar que tais instrumentais foram previamente tratados com RNase ZAP (Sigma) e fornadas a 200°C por 2 horas, com a finalidade de evitar degradação do RNA por RNAses. Após a maceração, acrescentou-se 1mL de TRIzol® (Invitrogen) em cada tubo, homogeneizando a amostra e centrifugando-a a 15000rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a camada de gordura no sobrenadante foi removida e o restante do sobrenadante foi transferido para um novo tubo livre de RNAses; o material precipitado foi descartado. O tubo permaneceu em temperatura ambiente por cinco minutos para dissociação do

complexo nucleoprotéico e, dado o tempo, adicionou-se 200 μ L de clorofórmio, agitando o tubo vigorosamente por 15 segundos, deixando-o em temperatura ambiente por três minutos. O tubo foi então centrifugado durante 20 minutos a 15000rpm a 4°C.

Para isolar o RNA total, a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo livre de RNAses, adicionando-se em seguida 500 μ L de isopropanol. O tubo foi invertido de três a cinco vezes para homogeneizar e mantido em temperatura ambiente por dez minutos. Para precipitar o RNA total, o tubo foi centrifugado por 15000rpm durante 12 minutos a 4°C; caso o precipitado fosse muito pequeno ou invisível, acrescentou-se 1 μ L de glicogênio livre de RNAses (Sigma) e a centrifugação foi feita novamente.

Após a precipitação, o isopropanol foi descartado e acrescentou-se 1mL de etanol 75% gelado livre de RNAses. O tubo foi vortexado por cerca de 10 segundos e centrifugado a 15000rpm durante 7 minutos a 4°C. Após a centrifugação, descartou-se o etanol e a lavagem com etanol gelado foi repetida mais duas vezes. Após a última lavagem, o etanol 75% foi descartado e os tubos com o RNA precipitado foram secos em temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. Foram adicionados de 10 a 50 μ L de água MiliQ, dependendo do tamanho do precipitado, e o tubo foi posto em termobloco a 65°C durante 10 minutos. Dado o tempo, o material foi ressuspendido e a quantificação e pureza foram medidas usando o espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). Guardou-se 1 μ L de cada amostra que obtivesse quantificação superior a 1 μ g/ μ L e volume suficiente para esta concentração das amostras que obtivessem valores inferiores.

Após a extração do RNA total, todas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificar a integridade do material (Figura 3) e depois tratadas com desoxirribonuclease I (DNase I; Sigma).

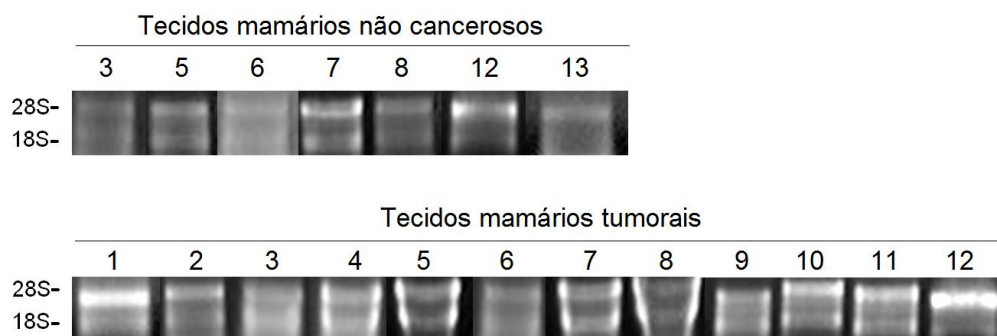


Figura 3 – Avaliação da integridade do RNA extraído de amostras clínicas.

Eletroforese do RNA extraído de amostras clínicas (quantidade mínima: 1µg; máxima: 3µg). Gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo; Contra-parte não tumoral das pacientes 3, 5, 6, 7, 8, 12 e 13 (acima) e amostras tumorais 1 a 12 (abaixo).

Em seguida, o cDNA foi sintetizado com 2µg do RNA extraído utilizando o kit de transcrição reversa de cDNA *The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante. Após a síntese do cDNA, este foi testado por reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) usando iniciadores para o gene da β -actina (Integrated DNA Technologies; sequência *forward* 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3' e reversa 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3') seguindo a seguinte ciclagem: 94°C por 2 minutos, 94°C por 30 segundos/60°C por 30 segundos/72°C por 30 segundos (28 ciclos) e 72°C por 1 minuto. O produto da PCR foi submetido à eletroforese e a qualidade do material extraído foi confirmada com a amplificação das bandas (Figura 4).

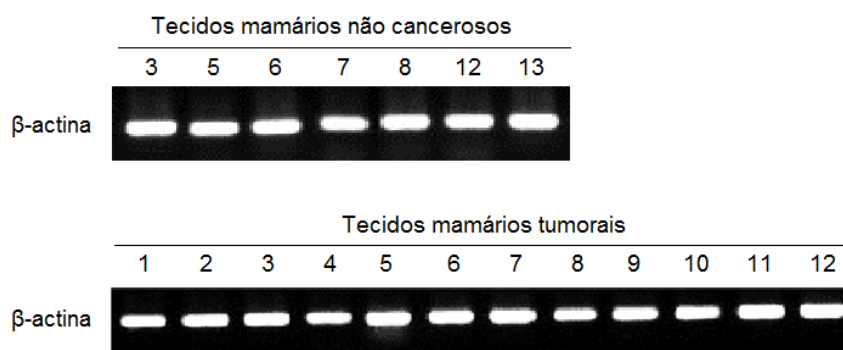


Figura 4 – Teste do cDNA sintetizado a partir do RNA extraído de amostras clínicas.

Eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo. cDNA sintetizado a partir do RNA extraído de amostras clínicas. Contra-parte não tumoral das pacientes 3, 5, 6, 7, 8, 12 e 13 (acima) e amostras tumorais 1 a 12 (abaixo).

3.6 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

O desenho e a construção dos iniciadores e das sondas para o gene *SMYD4* e para o gene constitutivo *β -actina* foram feitos por meio do serviço *Assay by Design* fornecido pelo fabricante para ensaios com o sistema Taqman® (Applied Biosystems). Assim que adquiridos, os ensaios para *β -actina* (ID Hs99999903_m1) e para o gene *SMYD4* (ID Hs00736236_m1) foram padronizados por diluição seriada utilizando cDNA da linhagem MCF7 (Figura 5).

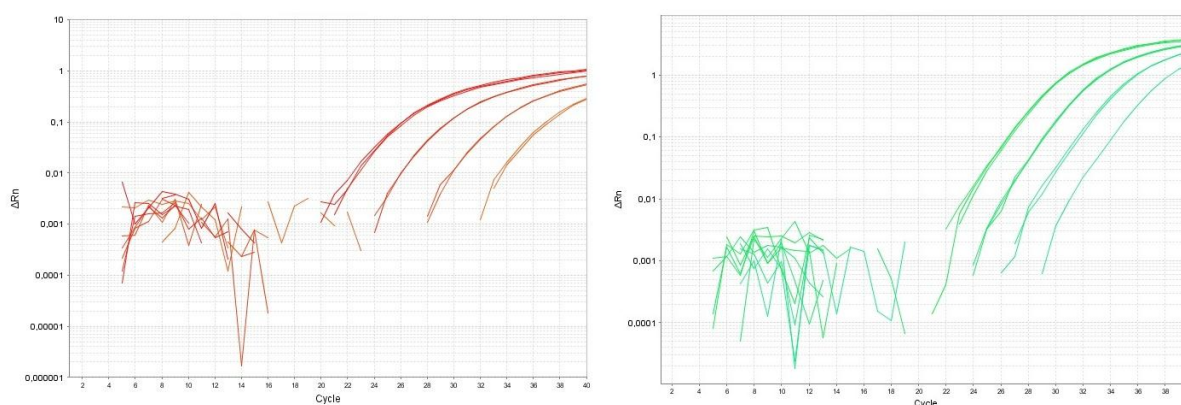


Figura 5 – Curva de padronização por qPCR dos ensaios de *β -actina* e *SMYD4*.

Curvas de padronização do ensaio de *β -actina* (à esquerda, em vermelho) e do ensaio de *SMYD4* (à direita, em verde). Valor de eficiência dos ensaios em aproximadamente 90%.

Depois de determinar a linha de *threshold* ideal de cada ensaio, foi dada continuidade ao PCR em tempo real. Para uma reação, utilizou-se 2,5 μ L de água MilliQ, 5 μ L de MasterMix Universal para Taqman® (Applied Biosystems), 0,5 μ L do ensaio de iniciadores e sonda (Applied Biosystems) e 2 μ L de amostra (previamente diluída 1:100 em água MilliQ), totalizando 10 μ L de volume final. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems) em triplicata para cada gene e os ciclos foram determinados automaticamente pelo programa do StepOnePlus™ (Applied Biosystems; *Holding stage*: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C; 1 minuto a 60°C).

3.7 ANÁLISES DOS DADOS DE PCR EM TEMPO REAL

Os dados gerados pelo equipamento foram organizados em uma tabela utilizando o programa Excel (Microsoft) e todos os cálculos para chegar na quantificação relativa pelo método $\Delta\Delta C_T$ foram baseados no manual do fabricante do equipamento (Applied Biosystems) (54). A média dos valores de todo *Cycle threshold* (C_T) do gene *SMYD4* foi calculada e normalizada por subtração do valor de C_T do gene endógeno (β -*Actina*) co-amplificado, gerando o valor ΔC_T . Em seguida, o ΔC_T do grupo controle (média do ΔC_T das amostras não-tumorais de mama) foi subtraído de todos os outros, gerando o valor $\Delta\Delta C_T$. A quantidade do gene-alvo, normalizada com uma referência endógena e relativa ao calibrador foi convertida em quantificação relativa (QR) pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Utilizando o valor de QR final, os gráficos foram gerados em Excel (Microsoft).

Além da análise de quantificação relativa pelo método $\Delta\Delta C_T$, outra forma de análise foi utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Para verificar diferença significativa entre o grupo controle de amostras de tecido mamário não canceroso (n=7) e as linhagens celulares de câncer de mama (n=7), foi aplicado o teste t não pareado utilizando os valores de ΔC_T das variáveis. Quanto às análises das amostras clínicas tumorais, os dados foram primeiramente inseridos no programa SPSS 1.7 (SPSS Inc.) para identificar possíveis valores atípicos (Figura 6) e, como a amostra tumoral 6 demonstrou ser muito discrepante das outras amostras, esta foi retirada da análise subsequente. Em seguida, foi aplicado o teste t não pareado utilizando os valores de ΔC_T do grupo controle de amostras de tecido mamário não canceroso (n=7) e amostras clínicas tumorais sem o valor atípico encontrado (n=11). A análise estatística não foi realizada comparando o tecido mamário com o painel de diferentes tecidos humanos porque o segundo não constitui um grupo amostral homogêneo; desta forma, fez-se apenas a análise de quantificação relativa pelo método $\Delta\Delta C_T$ nas referidas amostras.

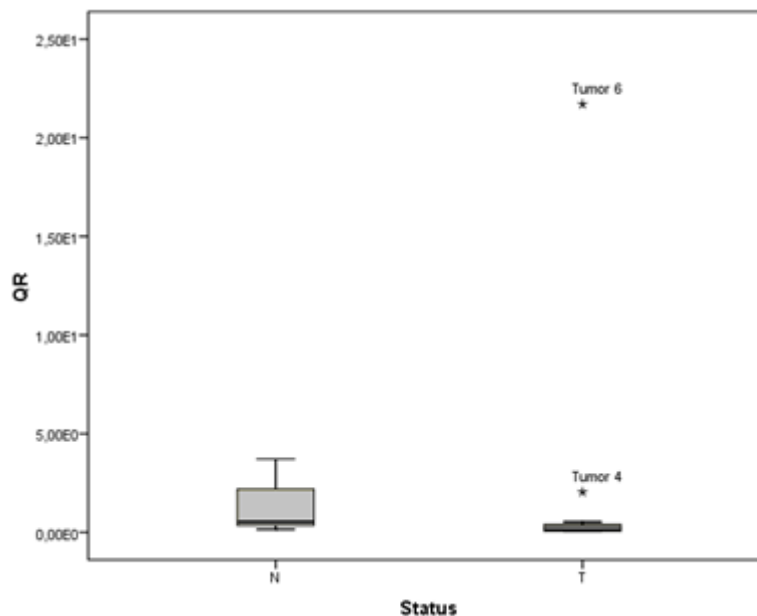


Figura 6 – Determinação de valores atípicos entre as amostras clínicas.

A análise realizada pelo programa SPSS 1.7 (SPSS Inc.) mostrou uma amostra muito discrepante (Tumor 6) entre as amostras tumorais. N – amostras de tecido mamário não canceroso; T – amostras tumorais de câncer de mama; QR – quantificação relativa.

3.8 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR REAÇÃO DE REDUÇÃO DO MTT

Para avaliar a viabilidade celular nos ensaios de determinação da quantidade mínima do agente seletivo e de efeitos de silenciamento do *SMYD4*, realizou-se a reação de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), que consiste em medir a atividade de enzimas mitocondriais que reduzem o sal de MTT (amarelo) em formazan (roxo). Se não houver redução, ou seja, mudança colorimétrica, há indicação de morte celular (55). Para tal, o meio de cultura foi retirado, acrescentou-se DMEM sem soro fetal bovino suplementado com MTT (Sigma) diluído na concentração de 5mg/mL em tampão fostato-salino 1x (PBS 1x). As células foram incubadas a 37°C durante 4 horas com 5% de saturação de CO₂ protegidas da luz. Após a incubação, o meio foi removido e adicionou-se a solução reveladora (isopropanol acidificado com 0,04M de ácido clorídrico) recém-preparada. O conteúdo foi ressuscitado até que o formazan estivesse completamente dissolvido; depois foi distribuído em placa de 96 poços para leitura em absorbância de 570nm no leitor de placas *DTX 800 Multimode detector* (Beckman Coulter).

3.9 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE MÍNIMA DO AGENTE SELETIVO

Os vetores utilizados possuíam resistência à geneticina (G418) ou puromicina. A concentração mínima do agente seletivo para obtenção de células estáveis foi determinada antes da transfecção dos vetores de expressão e silenciamento gênico (shRNA), com a finalidade de avaliar a quantidade mínima de antibiótico necessária para a seleção de células transfectadas. Para tal, as células HEK293 foram plaqueadas em placas de 12 poços, na densidade de $2,5 \times 10^4$ utilizando as concentrações finais de 500 $\mu\text{g/mL}$, 700 $\mu\text{g/mL}$, 900 $\mu\text{g/mL}$, 1100 $\mu\text{g/mL}$ e 1300 $\mu\text{g/mL}$ de antibiótico geneticina (G418). O meio foi renovado a cada 48 horas e a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT no 2º, 4º, 6º, 8º, 10º e 12º dia após o início da seleção (Figura 7). Em células MDA-MB-231 o plaqueamento foi realizado na densidade de 1×10^4 em placas multipoços e 24 horas depois o meio com antibiótico puromicina foi adicionado nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 1,5 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$. O meio foi renovado a cada 48 horas e a morte celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT nos 4 primeiros dias após o início da seleção (Figura 8).

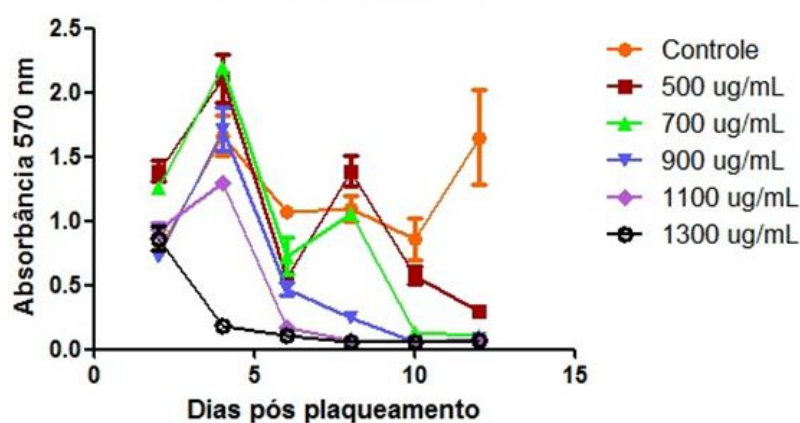


Figura 7 – Determinação da quantidade mínima de G418 em células HEK293.

Avaliação da ação do antibiótico nas concentrações 500 $\mu\text{g/mL}$, 700 $\mu\text{g/mL}$, 900 $\mu\text{g/mL}$, 1100 $\mu\text{g/mL}$ e 1300 $\mu\text{g/mL}$. Viabilidade celular avaliada por meio do ensaio de MTT no 2º, 4º, 6º, 8º, 10º e 12º dia após o início da seleção.

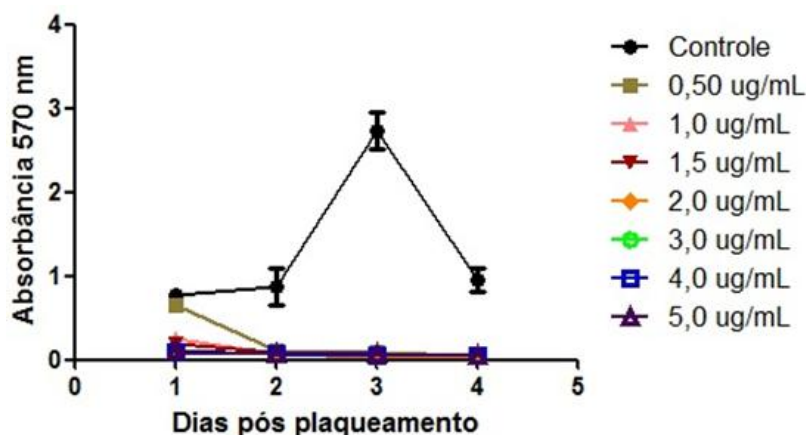


Figura 8 – Determinação da quantidade mínima de puomicina em células MDA-MB-231.

Avaliação da ação do antibiótico nas concentrações 0,5µg/mL, 1µg/mL, 1,5µg/mL, 2µg/mL, 3µg/mL, 4µg/mL e 5µg/mL. Morte celular avaliada por meio do ensaio de MTT nos dias 1, 2, 3 e 4 após o plaqueamento.

3.10 ESTABELECIMENTO DE CÉLULAS ESTÁVEIS PARA SUPEREXPRESSÃO DO GENE *SMYD4*

As células *Human Embryonic Kidney 293* (HEK293) foram utilizadas na transfecção do vetor de superexpressão do gene *SMYD4* humano marcado com Myc-DDK (*TrueORF™ cDNA Clones and PrecisionShuttle™ Vector System*; pCMV6-SMYD4-Myc/DDK) obtido pela empresa *OriGene Technologies* (Figura 9). Este mesmo plasmídeo foi utilizado na construção de um vetor vazio (mock) para controle. A digestão de 1µg do plasmídeo pCMV6-SMYD4-Myc/DDK foi realizada com 1µL de endonuclease *XhoI* e *BamHI* (Promega), 2µL de *Bovine Serum Albuminum* (10x), 2µL de tampão de endonucleases (10x) e 18µL de água milliQ, incubando por 3 horas a 37°C; o produto final foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 10). As bandas observadas no tamanho esperado foram eluídas usando o kit *GenElute™ Extraction Kit* (Sigma) de acordo com as recomendações do fabricante, e o material foi quantificado por NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). Em seguida, foram realizadas reações de desfosforilação com 1 µg de DNA, 2µL de tampão da enzima 10x, 1µL de fosfatase alcalina (Promega) e 20µL de água milliQ. A reação foi incubada a 37°C por 3 horas e, após o procedimento de desfosforilação, o material foi tratado com T4 DNA Ligase (Promega). Os produtos desta reação foram inseridos por eletroporação em *Escherichia coli* DH5α e, após a transformação nestas bactérias, as mesmas foram incubadas e o plasmídeo purificado de acordo com o protocolo do kit *GenElute™*

Five-minute Plasmid Miniprep Kit (Sigma). Em seguida, o plasmídeo mock foi obtido em maior quantidade por *maxiprep* seguindo protocolos conhecidos (56).

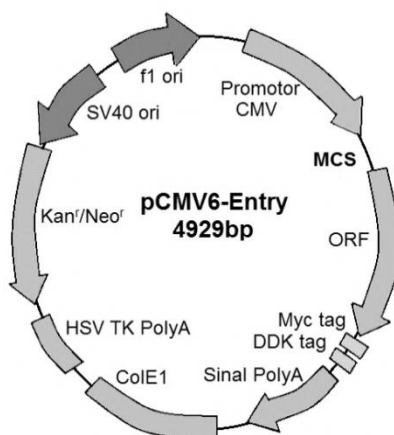


Figura 9 – Modelo esquemático do vetor de expressão. Esquema ilustrativo do vetor de expressão representando as principais regiões.

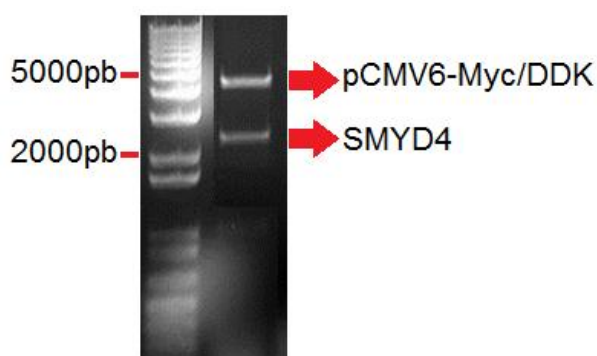


Figura 10 – Confirmação da digestão do plasmídeo de expressão de SMYD4.

Digestão realizada com as enzimas XhoI e BamHI no plasmídeo de expressão pCMV6-SMYD4-Myc/DDK. Marcador 1kb plus (Invitrogen) utilizado para verificar o tamanho dos fragmentos. Gel de agarose 1% com brometo de etídeo.

Para a transfecção dos plasmídeos, as células foram incubadas em uma placa de seis poços com DMEM sem antibiótico. Um dia após a incubação, adicionou-se 4µg do plasmídeo em 250µL de Opti-MEM® (Invitrogen; reação 1) e 10µL de Lipofectamina® (Invitrogen) em 250µL de Opti-MEM® (reação 2), incubando ambas as reações por 5 minutos em temperatura ambiente. Depois disso, as reações foram transferidas para um único tubo, o qual foi incubado por 20 minutos em temperatura ambiente. As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C por 4 horas com 5% de CO₂. O meio de cultura foi removido e as células foram

mantidas com DMEM suplementado com o antibiótico G418 (700 μ g/mL), com a finalidade de selecionar apenas as células transfectadas, sob as mesmas condições supracitadas de incubação.

Depois as células foram diluídas em uma placa de 96 poços (8 poços na coluna vertical, identificados em ordem alfabética de A a H, por 12 poços na linha horizontal, identificados em ordem numérica de 1 a 12), de forma seriada, com o objetivo de separar as células e obter clones de superexpressão do gene *SMYD4* originados de uma única célula. Após a seleção com antibiótico, foram plaqueadas 2×10^4 células no primeiro poço da placa (1A). Em seguida, as células foram diluídas na proporção de 1:2 no sentido 1A \rightarrow 1H da placa. Após a primeira diluição, a primeira coluna (1A-1H) foi diluída na proporção de 1:2 em todas as outras colunas (2A-2H a 12A-12H) (Figura 11). As colônias provenientes de uma única célula foram transferidas para placas de 24 poços após 2 semanas. Os níveis de superexpressão do gene *SMYD4* foram verificados por qPCR (Figura 12).

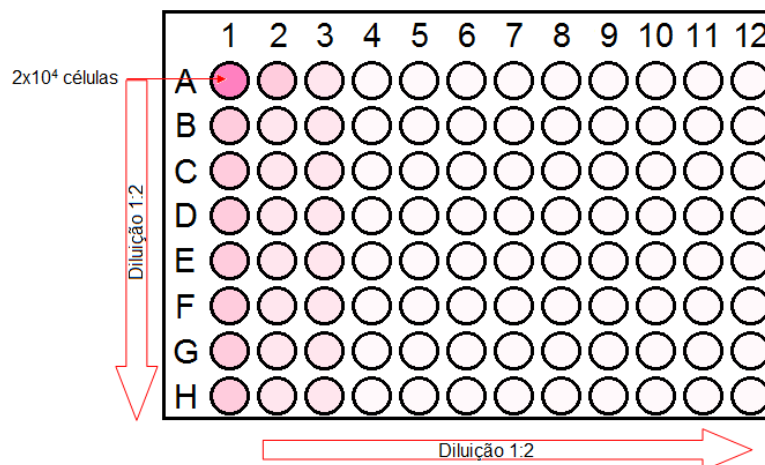


Figura 11 – Esquema de diluição para seleção de uma única célula. Modelo de esquematização da diluição seriada em placa de 96 poços para obtenção de apenas um clone de superexpressão.

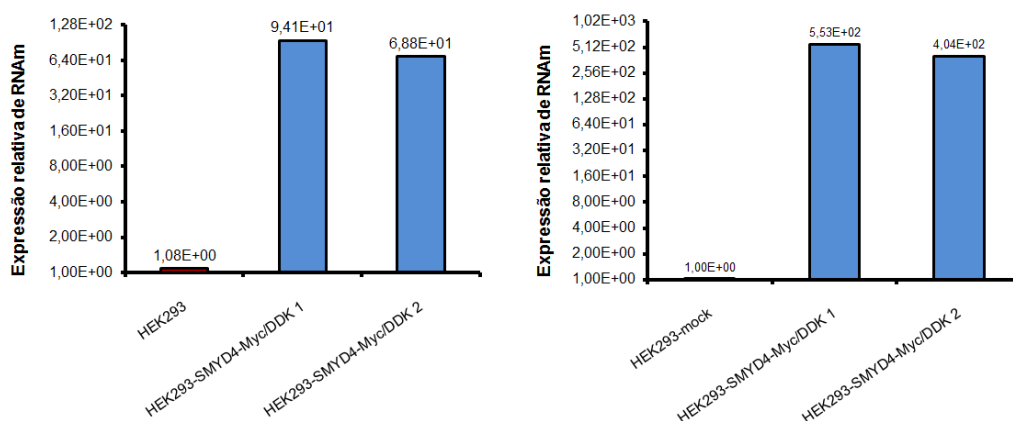


Figura 12 – Avaliação dos níveis de expressão de *SMYD4* dos clones transfectados com o vetor de superexpressão.

Os níveis de expressão de *SMYD4* foram avaliados por qPCR para verificar se houve superexpressão comparando com HEK293 não transfectadas (gráfico à esquerda) e HEK293 transfectada com o vetor vazio (mock; gráfico à direita).

3.11 AVALIAÇÃO COM COLORAÇÃO GIEMSA DO EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DO *SMYD4*

Para avaliar o efeito da superexpressão de *SMYD4*, fez-se coloração das células com giemsa (Fluka Analytical). Foram plaqueadas as células contendo os plasmídeos de superexpressão, mock e células HEK293 não transfectadas na densidade de 5×10^4 em placas multipoços. Primeiramente, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS 1x. Depois, adicionou-se cuidadosamente metanol absoluto, incubando em seguida por 15 minutos em temperatura ambiente sob agitação. O metanol foi removido em seguida e a placa foi seca naturalmente em temperatura ambiente por 15 minutos. Depois, adicionou-se giemsa (diluído na proporção de 1:10 em água destilada), incubando por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação. Depois o giemsa foi removido e as placas foram lavadas gentilmente com água, deixando-as secar naturalmente. As imagens das placas foram registradas e analisadas nos dias 5, 10 e 15 após o plaqueamento.

3.12 SILENCIAMENTO DO GENE *SMYD4* POR shRNA EM LINHAGEM MDA-MB-231 DE CÂNCER DE MAMA

Para o ensaio de inibição de *SMYD4*, foram utilizadas células MDA-MB-231 e plasmídeos comerciais de shRNA (HuSH™ da empresa OriGene Technologies), descritos na tabela 5 e esquematizados na figura 13.

Tabela 5 – Sequência dos shRNAs para silenciamento do gene *SMYD4*

Número ID	Sequência	Identificação
GI305925	TAACGCTCAGGCGATGACCACCATAACAAC	shRNA SMYD4 1
GI305926	CAACACCAGCGTGTCTTCATTAGCACTG	shRNA SMYD4 2
GI305927	TCACTGTGTCATGCTAACCGCTCGGCAGC	shRNA SMYD4 3
GI305928	CTCTATTGTCACCGATGTTTGAAGCACAC	shRNA SMYD4 4

Legenda: grupo de construções de shRNA contendo quatro tipos de vetores de expressão gene-específica em plasmídeo pGFP-V-RS.

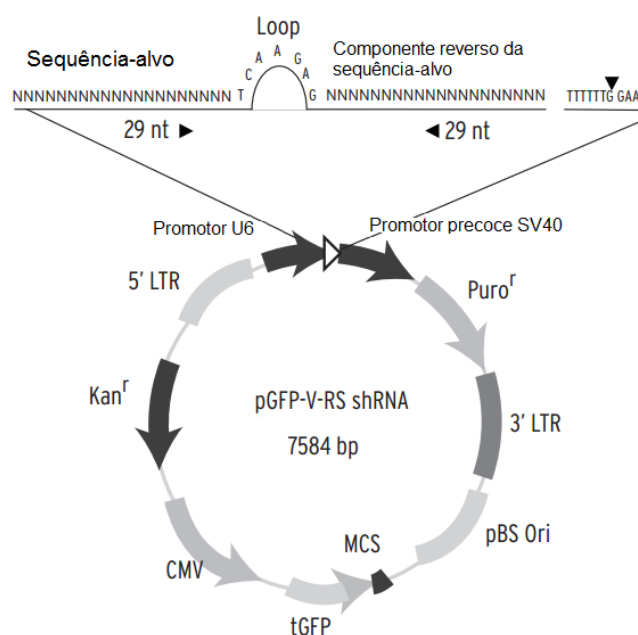


Figura 13 – Modelo esquemático do vetor de shRNA pGFP-V-RS.
Modelo representativo do vetor de shRNA ilustrando as principais regiões.

As células foram incubadas em uma placa de seis poços com DMEM sem antibiótico e, 24 horas depois, foram incubados de forma concomitante e em microtubos separados, 250µL de Opti-MEM® (Invitrogen) com 4µg de DNA

plasmidial e, 250µL de Opti-MEM® com 10µL de Lipofectamina® (Invitrogen) por 5 minutos em temperatura ambiente. Depois disso, o conteúdo de ambos os microtubos foram transferidos para um único tubo, o qual foi incubado por 20 minutos em temperatura ambiente. As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C por 4 horas com 5% de CO₂ e, passado o tempo, o meio de cultura foi removido e as células foram mantidas com DMEM suplementado com o antibiótico puromicina (0,5µg/mL), com a finalidade de selecionar apenas as células transfectadas, sob as mesmas condições supracitadas de incubação. Para saber se as células foram realmente transfectadas, estas foram submetidas à citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences) e, após a confirmação da transfecção (Figuras 14 e 15), deu-se continuidade ao experimento. É importante ressaltar que as células transfectadas com o quarto shRNA para *SMYD4* (shRNA *SMYD4* 4) não sobreviveram ao procedimento e, por isso, este shRNA não foi utilizado nos experimentos subsequentes.

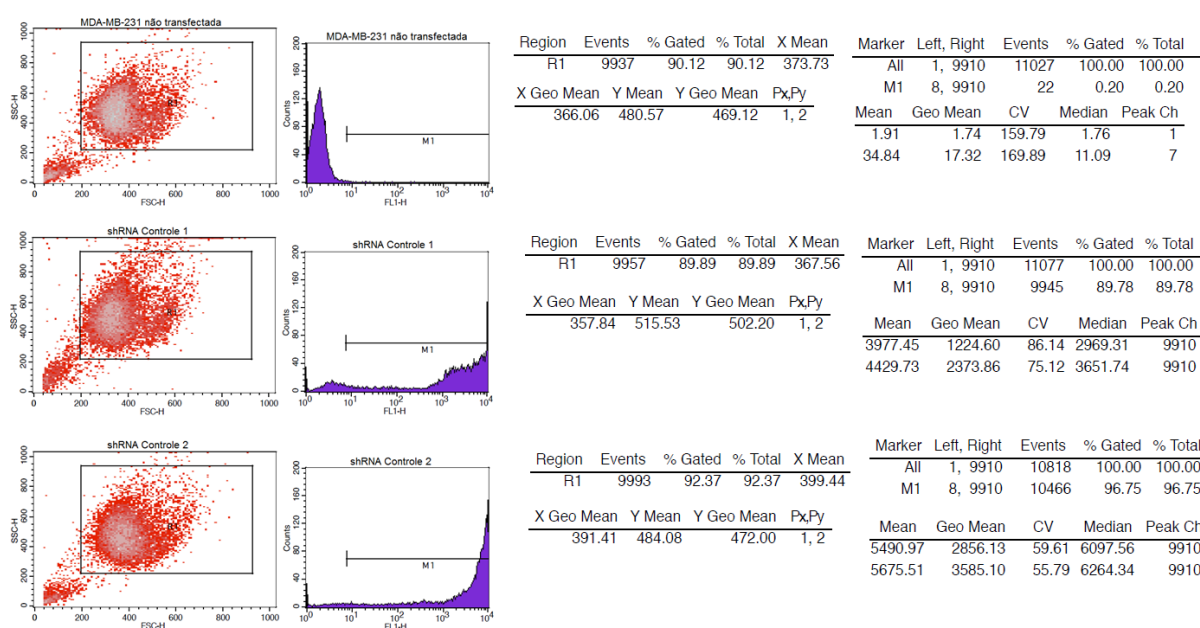


Figura 14 – Controle de transfecção dos plasmídeos controle de shRNA.

Citometria de fluxo de MDA-MB-231 não transfectadas e com detecção de fluorescência emitida por GFP das células transfectadas com vetores de shRNA controle (1 e 2) e de MDA-MB-231 não transfectadas.

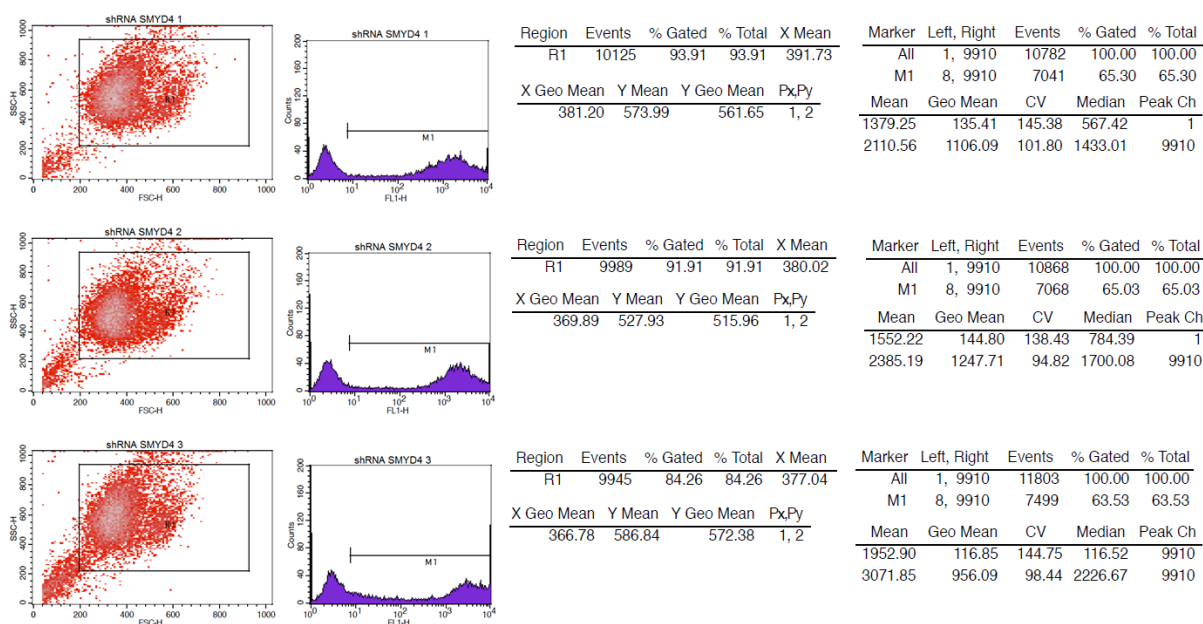


Figura 15 – Controle de transfecção dos plasmídeos shRNA para *SMYD4*.

Citometria de fluxo com detecção de fluorescência emitida por GFP das células transfectadas com os vetores de shRNA para *SMYD4*.

A leitura dos efeitos de inibição do gene *SMYD4* foi feita por reação da redução de MTT nos dias 1, 3 e 6 após o plaqueamento. É importante ressaltar que durante o ensaio, as células foram mantidas em meio DMEM completo, sem a suplementação adicional de antibióticos.

3.13 WESTERN BLOT

Os clones estáveis de superexpressão de *SMYD4* (clone 1 e clone 2) e o clone de células estáveis contendo o vetor mock foram submetidas à extração de proteínas para confirmação e avaliação da produção da proteína. Primeiramente, o meio de cultura foi removido e as células fixadas foram lavadas cuidadosamente com 1mL de PBS 1x, removendo-o em seguida. Depois as células foram retiradas da placa em 1mL de PBS 1x e o conteúdo foi transferido para um novo tubo, o qual foi centrifugado a 2000rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100µL do tampão RIPA ao tubo (cloreto de sódio a 150mM, Triton 1%, Tris-hidroclorato a 50mM, pH 7,5), ressuspensando vigorosamente o material e mantendo o tubo no gelo. O lisado final foi incubado no gelo durante 30 minutos e centrifugado a 15000rpm durante 1 minuto a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a quantificação foi realizada

usando reagente de Bradford (BioRad). Para a quantificação, preparou-se 200 μ L de solução de albumina de soro bovino (BSA) a 8 μ g/ μ L e, a partir dessa solução, procedeu-se as diluições em água milliQ para a obtenção das demais concentrações (0,5 μ g/ μ L, 1 μ g/ μ L, 2 μ g/ μ L, 4 μ g/ μ L), com a finalidade de obter uma curva padrão de 5 pontos. Em seguida, o reagente de Bradford foi distribuído em uma placa de 96 poços. Depois, as diferentes concentrações de BSA e as amostras com quantidade ainda desconhecida foram adicionadas aos poços com reagente de Bradford, em duplicata. A leitura foi feita em absorbância de 595nm no leitor de placas *DTX 800 Multimode detector* (Beckman Coulter) e após a leitura, fez-se a curva padrão em Excel (usando as concentrações de BSA) e, a partir desta, determinou-se a concentração de cada uma das amostras.

As proteínas foram diluídas em tampão específico (1% de SDS, 10% de glicerol, 10mM de Tris-Hidrocloreto, 1mM de ácido etilenodiamino tetra-acético, 2-mercaptoetanol em aproximadamente 0,05mg/mL de azul de bromofenol) para serem desnaturadas a 96°C por 5 minutos em banho-maria e, após a desnaturação, utilizou-se 30 μ g de cada para separação por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Em seguida, foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF). A membrana foi bloqueada com solução de caseína 5% (2g de leite em pó desnatado em 40mL de solução salina tamponada com Tris, ou TBS, e adição de Tween 20 (TBS-T)) por 30 minutos em temperatura ambiente sob agitação constante. Em seguida, a solução de caseína 5% foi descartada e a membrana foi lavada com TBS-T três vezes durante 5 minutos em cada lavagem. Assim, incubou-se a membrana overnight a 4°C com anticorpo primário anti-SMYD4 (Abcam Inc.) diluído em *Antibody Diluent Reagent Solution* (Invitrogen) na proporção de 1:500. No dia seguinte, o anticorpo primário foi removido e a membrana marcada foi lavada três vezes com TBS-T durante 5 minutos. Em seguida, esta foi incubada por 1 hora, em agitação constante e temperatura ambiente, com solução de caseína 1% (50mg de leite em pó desnatado em 5mL de TBS-T) contendo o anticorpo secundário anti-IgG marcado com peroxidase (GE Healthcare Life Sciences) na proporção de 1:5000. A membrana foi lavada novamente com TBS-T três vezes por 5 minutos, tratada com ECL (GE Healthcare Life Sciences) e observada no ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences). A mesma membrana foi então submetida à remoção dos anticorpos

adsorvidos, utilizando um tampão de *stripping* (1,5g de glicina, 0,1g de SDS, 1mL de Tween 20 e 99mL de água destilada), incubando por 10 minutos em temperatura ambiente, sob agitação constante. O tampão foi descartado e adicionado novamente, incubando por 5 minutos sob as mesmas condições. Passado o tempo, fizeram-se duas lavagens com PBS 1x, incubando por 10 minutos sob as mesmas condições. Depois disso, a membrana foi lavada com TBS-T três vezes, por 5 minutos, e bloqueada com solução de caseína 5% em temperatura ambiente, sob agitação constante. Após o bloqueio, incubou-se a membrana overnight a 4°C com anticorpo primário anti- β -actina (Cell Signaling Technology) diluído em *Antibody Diluent Reagent Solution* (Invitrogen) na proporção de 1:1000 e, a partir desta etapa, deu-se continuidade ao experimento da mesma forma supracitada. A figura 16 mostra as bandas para SMYD4 (aproximadamente 89kDa) e β -actina (aproximadamente 42kDa).

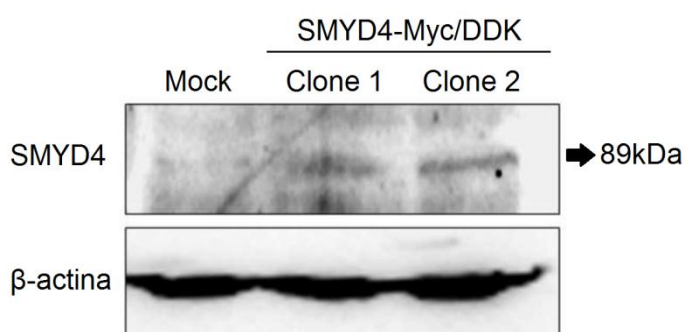


Figura 16 – Western Blot das células com o controle mock e com a superexpressão.

Confirmação da expressão proteica de SMYD4 por Western Blot em células transfectadas com o mock e nos clones de superexpressão. β -actina utilizada como controle.

3.14 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE SMYD4 POR IMUNOCITOQUÍMICA

Para verificar onde a proteína SMYD4 está localizada na célula, os clones de superexpressão foram transferidos para uma lâmina de quatro câmaras (BD Biosciences) na densidade de 5×10^4 células por câmara, incubada em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. Dois dias depois, o meio foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos. Depois, foram lavadas três vezes com PBS 1x e tratadas com Triton X-100 0,1% (Roche) por 2 minutos em agitação leve. Após a lise celular, foram feitas novas lavagens com PBS 1x (3 vezes, 3 minutos cada, agitação leve) e em seguida

adicionou-se BSA 3% (diluído em PBS 1x), deixando a lâmina sob agitação leve por 10 minutos. Após o bloqueio, as células foram incubadas durante 1 hora com os anticorpos primários anti-Myc (IgG de camundongo; Sigma) e anti-DDK (IgG de camundongo; OriGene Technologies) diluídos na proporção de 1:500 em BSA 3%. Em seguida, foram lavadas 3 vezes com PBS 1x por 3 minutos, em agitação leve, e tratadas com o anticorpo secundário CF568 Donkey anti-IgG de camundongo (Biotium) diluído na proporção de 1:1000 em BSA 3%, incubadas por 40 minutos ao abrigo da luz. Depois foram lavadas com PBS 1x novamente (4 vezes, 5 minutos, agitação leve) e, após a adição de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories) para marcação nucléica, a lâmina foi coberta com lamínula e observada em microscópio confocal HCS-A (Leica).

3.15 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB), baseado na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, protocolado no número 025/09 (Anexos B e C).

4 RESULTADOS

4.1 OS PRINCIPAIS DOMÍNIOS DE SMYD4 ASSEMELHAM-SE AOS OUTROS MEMBROS DA FAMÍLIA SMYD

Ao comparar todas as cinco proteínas humanas da família SMYD nos programas *BLAST* e *Align* da base de dados *UniProt* (50), foram obtidas de 31% a 39% de grau de similaridade entre as sequências (Figura 17). Além disso, ao comparar os principais domínios da família SMYD, SET E MYND, observou-se similaridade na posição de alguns aminoácidos (Figuras 18 e 19).

Alignments	Entry	Entry name	Protein names	Organism	Length	Identity
	Q8IYR2	SMYD4_HUMAN	SET and MYND domain-containing protein 4	Homo sapiens (Human)	804	100.0%
	Q9NRG4	SMYD2_HUMAN	N-lysine methyltransferase SMYD2	Homo sapiens (Human)	433	36.0%
	Q9H7B4	SMYD3_HUMAN	SET and MYND domain-containing protein 3	Homo sapiens (Human)	428	39.0%
	Q8NB12	SMYD1_HUMAN	SET and MYND domain-containing protein 1	Homo sapiens (Human)	490	31.0%
	Q6GMV2	SMYD5_HUMAN	SET and MYND domain-containing protein 5	Homo sapiens (Human)	418	36.0%

Figura 17 – Comparação entre SMYD4 e os outros membros da família SMYD.

Equiparação das sequências das cinco proteínas da família SMYD pelo programa *BLAST* da base de dados *UniProt* (50).

```

48  ----VNFVCHTCFKRQEKLRRCGQCKFAHYCDRTCQKDAWLNH-KNECSAIKRYG----- 97  Q8NB12  SMYD1_HUMAN
48  ----RGNHCEYCFTRKEGLSKCGRCKQAFYCNVECQKEDWPMH-KLECSPMVVF----- 97  Q9NRG4  SMYD2_HUMAN
45  ----RGVVCDRCLLGKEKLMRCSQCRVAKYCSAKCQKKAWPDH-KRECKCLKSCK----- 94  Q9H7B4  SMYD3_HUMAN
288 RVTNGDLYCHRCLKHTLATVPCDGC SYAKYCSQECLQQAWELYHRTECP L-GG LL----- 341 Q8IYR2  SMYD4_HUMAN
90  KPGQVLPHPELCTVRKDLHQNCPHCQ-VMYCSAECRLAATEQYHQVLC PGPSQDDPLHPL 148 Q6GMV2  SMYD5_HUMAN
          * * * * *

```

Figura 18 – Alinhamento da sequência dos domínios MYND dos membros da família SMYD.

Comparação entre as sequências do domínio MYND (em rosa) da família SMYD por alinhamento realizado no programa *Align* da base de dados *UniProt* (50). Asterisco: resíduos conservados; dois pontos: mutações conservativas; um ponto: mutações semi-conservativas.

```

116 -----REG---TGLT-----EGCLVSVDDLQNHVEHFGEEEQKDLRV 149 Q8NB12 SMYD1_HUMAN
118 -----IHP---ERTP-----SEKLLAVKEFESHLDKLDNEKKDLIQS 151 Q9NRG4 SMYD2_HUMAN
113 -----MDG---APSE-----SEKLYSFDLESINKLTEDKKEGLRQ 146 Q9H7B4 SMYD3_HUMAN
386 NQVKTLNYGLGESEKNGNIVETPIPGCDINGKYENNYNAVFNLLPHTENHSPEHKFLCAL 445 Q8IYR2 SMYD4_HUMAN
201 -E-----EIV-HKLLG---DKFKGQLELL-----RRL 223 Q6GMV2 SMYD5_HUMAN

150 DVDT-----FLQYWPPQSQ-----FSMQ-----YISHIFGVINCNGFT 183 Q8NB12 SMYD1_HUMAN
152 DIAA-----LHHFYSKHL---GF---PDND-----SLVVLFAQVNCNGFT 185 Q9NRG4 SMYD2_HUMAN
147 LVMT-----FQHFMREEIQDASQL-----PPAF-----DLFEAPAKVICNSFT 184 Q9H7B4 SMYD3_HUMAN
446 CVSALCRQLEAASLQAIPTEIRIVNSSQLKAAVTPELCPDVTIWGVAMLRHMLQLQCNAQA 505 Q8IYR2 SMYD4_HUMAN
224 FTEALY---EEAVSQWFT-----PDGF-----RSLFALVGTNGQG 255 Q6GMV2 SMYD5_HUMAN
: . : : *

184 -----LSDQRGLQAVGVGIFPNLGLVN 205 Q8NB12 SMYD1_HUMAN
186 -----IEDE-ELSHLGSALFPDVALMN 206 Q9NRG4 SMYD2_HUMAN
185 -----ICNA-EMQEVGVGLYPSISLLN 205 Q9H7B4 SMYD3_HUMAN
506 MTTI-----QHTG-----PKGSIVTDS-RQVRLATGIFPVISLLN 539 Q8IYR2 SMYD4_HUMAN
256 IGTSSLSQVWHACDTLELKPQDREQLDAFIDQLYKDIEAATGEFLNCEGSLFVLQSCCN 315 Q6GMV2 SMYD5_HUMAN
. . . : *

206 HDCWPNCTVIFNNGNHEAVKSMFHTQMRIELRALGKISEGEEELTVSYIDE--LNVS-EER 262 Q8NB12 SMYD1_HUMAN
207 HSCCPNVIVTYRGT-----LAEVRAVQEIKPGEVFTSYIDL--LYPT-EDR 250 Q9NRG4 SMYD2_HUMAN
206 HSCDPNCSIVFNGE-----HLLLRARDIEVGEELTICVLDL--LMTS-EER 249 Q9H7B4 SMYD3_HUMAN
540 HSCSPNNTSVSFIST-----VATIRASQRIRKQGEILHCVGPKSRMGV-AER 585 Q8IYR2 SMYD4_HUMAN
316 HSCVPNAETSFPENN-----FLLHVTALEDIKPGEIICISYLDCCQRERSRHSR 364 Q6GMV2 SMYD5_HUMAN
* . * * : : * * * * : *

```

Figura 19 – Alinhamento da sequência dos domínios SET dos membros da família SMYD.

Comparação entre as sequências do domínio SET (em amarelo) da família SMYD por alinhamento realizado no programa *Align* da base de dados UniProt (50). Os aminoácidos em verde representam sítios de ligação. Asterisco: resíduos conservados; dois pontos: mutações conservativas; um ponto: mutações semi-conservativas.

4.2 *SMYD4* ESTÁ HIPOEXPRESSO EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA

Para investigar a expressão do gene *SMYD4* em câncer de mama, primeiramente fez-se uma análise de quantificação relativa (método $\Delta\Delta C_T$) em sete linhagens de câncer mamário (HCC1954, MCF7, CAMA1, SKBR3, MDA-MB-231, MDA-MB-436 e MDA-MB-468). Nesta análise, foi observado que todas as linhagens testadas demonstraram baixa expressão do gene *SMYD4* em comparação ao grupo controle de tecido mamário não canceroso obtido de pacientes (Figura 20). Após verificar a expressão relativa nestas linhagens, aplicou-se um teste estatístico (teste t não paramétrico) e constatou-se uma diferença significativa entre esses grupos ($p=0,0015$; I.C. 95%).

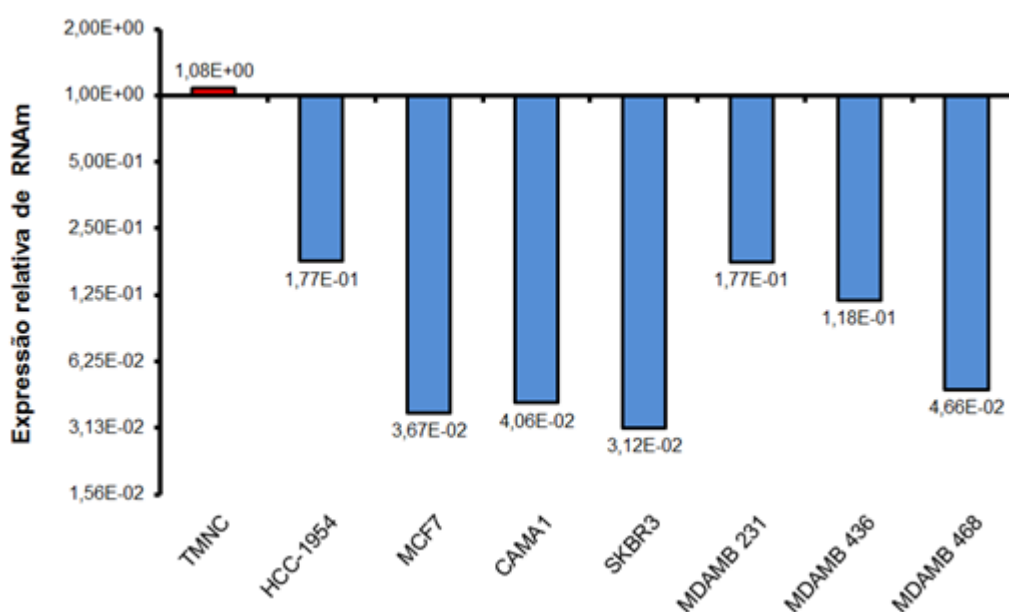


Figura 20 – Análise de quantificação relativa do gene *SMYD4* em sete linhagens de câncer de mama.

Comparação de expressão do gene *SMYD4* entre um grupo de sete amostras de tecido mamário não canceroso (TMNC) e sete linhagens celulares de câncer de mama. β -actina utilizada na normalização; método $\Delta\Delta C_T$.

4.3 SMYD4 ESTÁ HIPORREGULADO NA MAIORIA DAS AMOSTRAS DE CÂNCER DE MAMA

Após constatar hipoexpressão do gene *SMYD4* em linhagens celulares de câncer de mama, verificaram-se os níveis de sua expressão em amostras tumorais de pacientes. A análise de quantificação relativa (método $\Delta\Delta C_T$) nas onze amostras tumorais demonstrou uma hipoexpressão do gene em comparação ao grupo controle de tecido mamário não canceroso obtido de pacientes (Figura 21). Diante da análise de quantificação relativa da expressão de *SMYD4*, aplicou-se um teste estatístico (teste t não paramétrico) e constatou-se uma diferença significativa entre esses grupos ($p=0,0206$; I.C. 95%). Vale ressaltar que, na análise inicial, observou-se um valor atípico muito discrepante das demais amostras tumorais (Tumor 6), cuja expressão de *SMYD4* demonstrou estar muito elevada, e, por este motivo, esta amostra foi desconsiderada das demais análises.

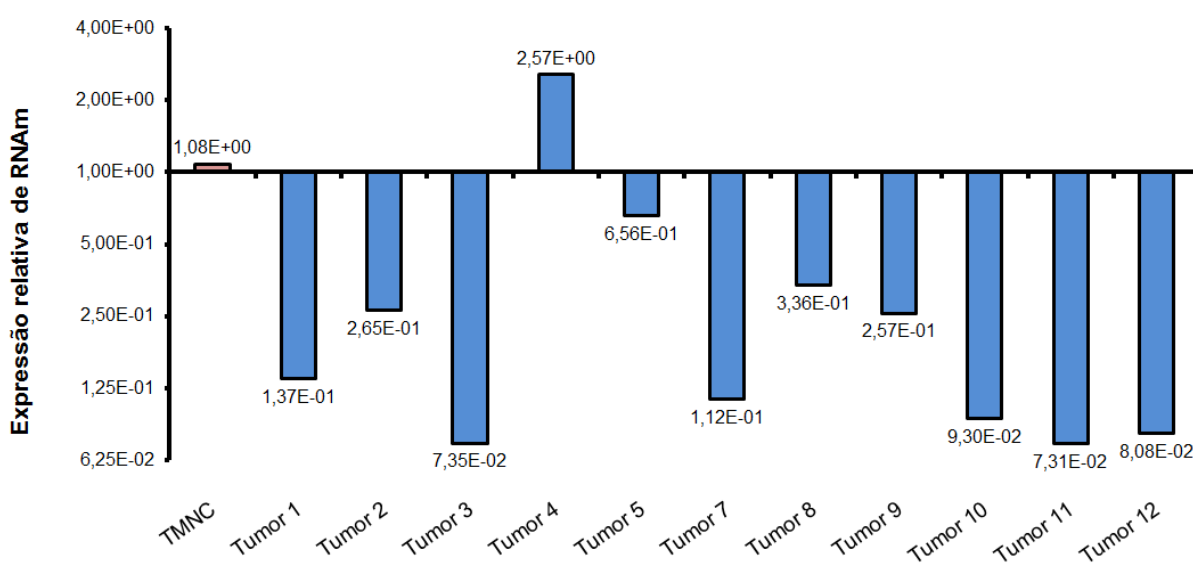


Figura 21 – Expressão relativa do gene *SMYD4* em amostras de câncer de mama.

Comparação de expressão do gene *SMYD4* entre um grupo de sete amostras de tecido mamário não canceroso (TMNC) e onze amostras de tecido tumoral de mama. β -actina utilizada na normalização; método $\Delta\Delta C_T$.

4.4 SMYD4 ESTÁ MAIS EXPRESSO EM TECIDO MAMÁRIO

Para determinar o padrão de expressão do gene *SMYD4* em tecidos humanos não tumorais, foi utilizado um painel comercial de RNA de doze tipos de tecido humano, e a expressão de *SMYD4* de cada tipo de tecido foi comparada por análise de quantificação relativa (método $\Delta\Delta C_T$) à do grupo de tecidos mamários não cancerosos obtidos de pacientes. Esta análise revelou que *SMYD4* tem uma maior expressão no grupo controle de tecido mamário dentre todos os outros tecidos analisados (Figura 22) e também demonstrou estar relativamente mais expresso em músculo esquelético e com expressão diminuída em pulmão, placenta e tecidos do trato digestório (cólon, intestino delgado, e estômago).

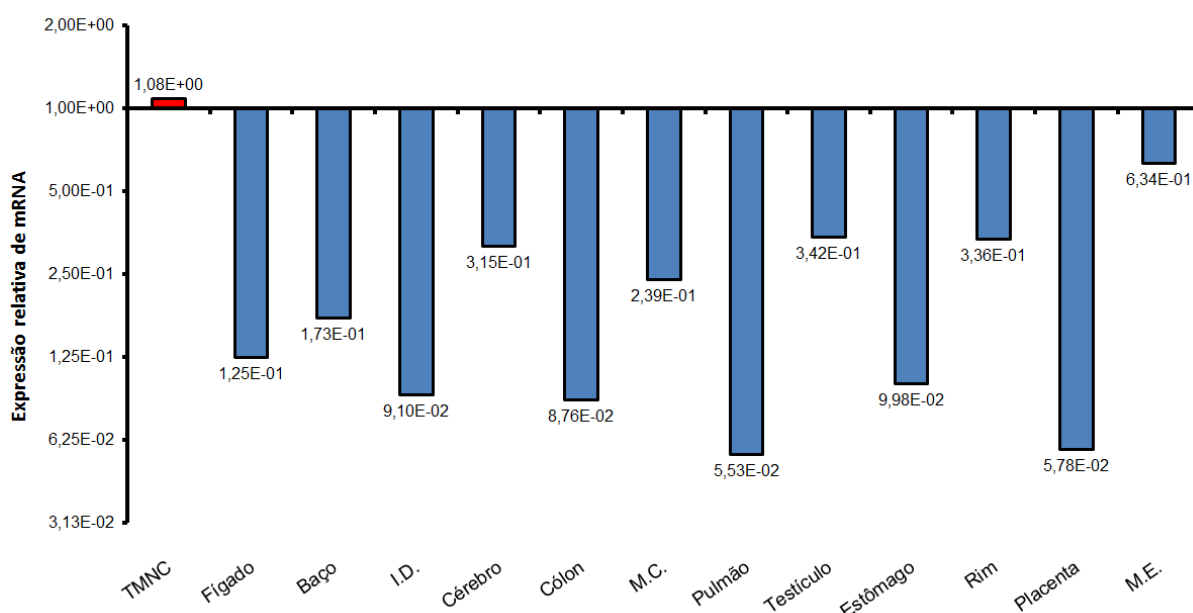


Figura 22 – Expressão relativa do gene *SMYD4* em diferentes tecidos humanos.

Comparação de expressão do gene *SMYD4* entre um grupo de sete amostras de tecido mamário não canceroso (TMNC) e doze tipos de tecido humano. β -actina utilizada na normalização; método $\Delta\Delta C_T$. I.D. – intestino delgado; M.C. – músculo cardíaco; M.E. – músculo esquelético.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE SUPEREXPRESSÃO DO GENE *SMYD4*

Para avaliar os efeitos do gene *SMYD4* no crescimento celular, foram obtidos dois clones de células HEK293 estáveis superexpressando o gene *SMYD4*. Os efeitos da superexpressão na proliferação celular foram analisados comparando-se a taxa de crescimento dos dois clones superexpressando *SMYD4* com a taxa de células HEK293 transfectadas com o vetor vazio (HEK293-mock) e células HEK293 não transfectadas. A taxa de crescimento foi analisada pela densidade celular visualizada por coloração de giemsa nos dias 5, 10 e 15 após o plaqueamento (Figura 23). Observou-se uma diminuição sutil na proliferação das células após a superexpressão do *SMYD4* em relação aos dois controles. Esta diferença é melhor evidenciada após 10 dias do plaqueamento das células.

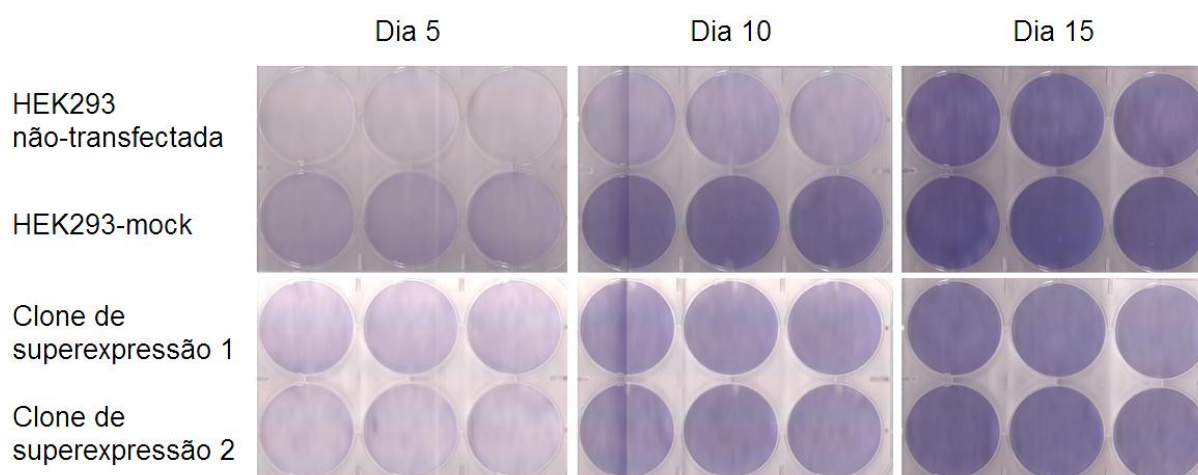


Figura 23 – Coloração por giemsa para avaliação do efeito de superexpressão do gene *SMYD4* em células HEK293.

Leituras nos dias 5, 10 e 15 após o plaqueamento referente ao ensaio de superexpressão do gene *SMYD4*. HEK293 não transfectadas e HEK293-mock foram utilizadas como controle.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE SILENCIAMENTO DO GENE *SMYD4*

Para a investigação dos efeitos de silenciamento do gene *SMYD4*, foram inseridos vetores contendo sequências específicas de shRNA para o gene *SMYD4* (Tabela 5) em células MDA-MB-231, utilizando um vetor com sequência inespecífica (controle 1) e outro vetor vazio (controle 2) como controles. Verificou-se os possíveis efeitos no crescimento celular por ensaio de MTT após o silenciamento. Diante dos resultados do ensaio de MTT, pôde-se observar um drástico aumento na proliferação celular de células transfectadas com os vetores de silenciamento 1 e 2 para *SMYD4* no sexto dia após o plaqueamento (Figura 24).

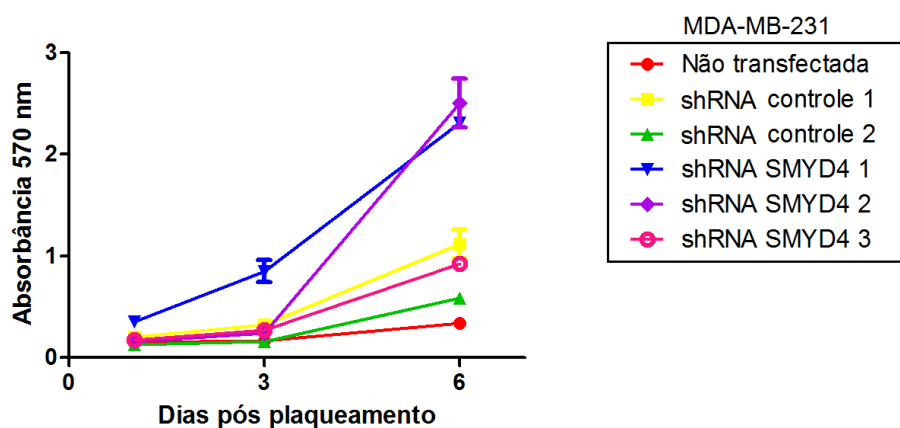


Figura 24 – Ensaio de MTT para avaliação do efeito de silenciamento do gene *SMYD4* por shRNA em células MDA-MB-231.

Leituras nos dias 1, 3 e 6 após o plaqueamento referente ao ensaio de silenciamento do gene *SMYD4*. MDA-MB-231 não transfectadas e MDA-MB-231 transfectadas com plasmídeo de sequência inespecífica (controle 1) e plasmídeo vazio (controle 2) foram utilizadas como controle.

4.7 A PROTEÍNA SMYD4 ESTÁ LOCALIZADA NO CITOPLASMA

Para verificar a localização subcelular da proteína SMYD4, foram utilizadas células estáveis HEK293 que expressassem um vetor contendo o gene *SMYD4* (pCMV6-SMYD4-Myc/DDK). Como demonstrado nas figuras 12 e 16, as análises por qPCR e Western Blot confirmaram a superexpressão estável de *SMYD4* em dois clones de células ao comparar com células com o vetor vazio e células não transfectadas. Sabendo disso, fez-se uma análise por imunocitoquímica em microscópio confocal dos clones de superexpressão em células estáveis e verificou-se que a proteína SMYD4 está principalmente localizada no citoplasma, de forma difusa (Figura 25).

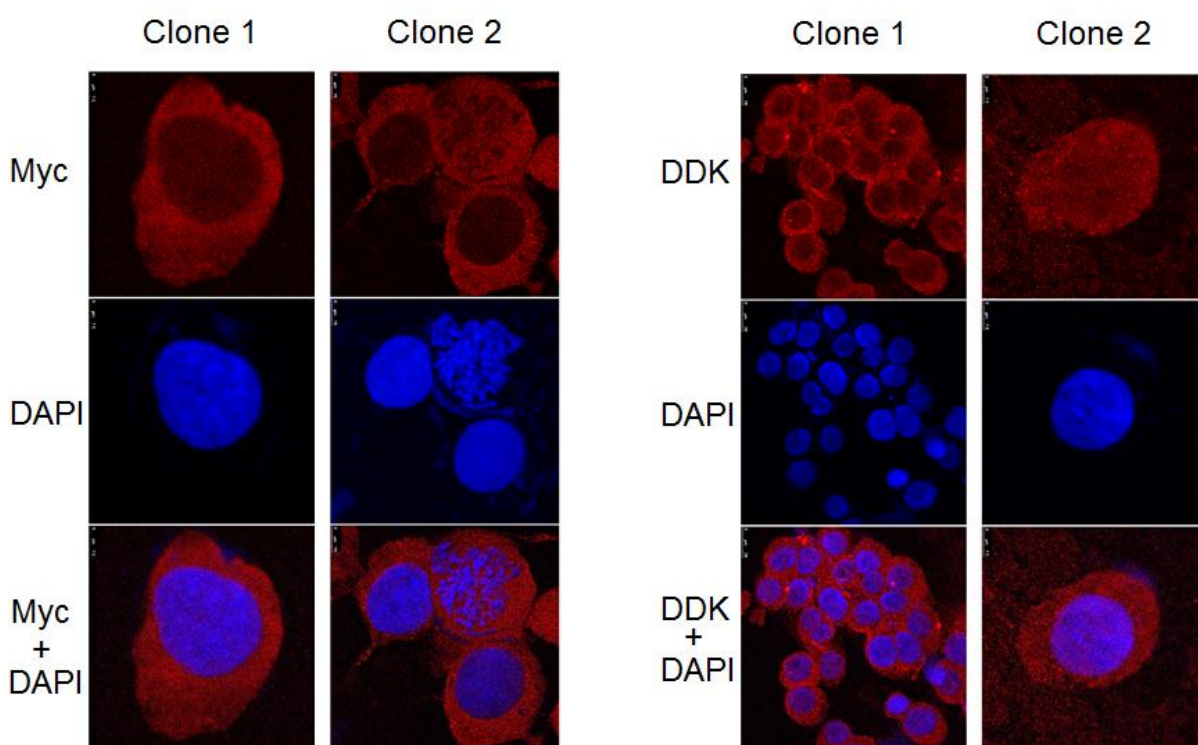


Figura 25 – Localização subcelular de SMYD4 por imunocitoquímica.

A proteína SMYD4 exógena marcada por Myc (painel à esquerda) e DDK (painel à direita), os quais foram definidos na imagem por anticorpos anti-Myc e anti-DDK. Microscopia confocal usando anticorpo secundário conjugado com CF568 (em vermelho), núcleo celular marcado com DAPI (azul). Clones 1 e 2 representando células de superexpressão estável de SMYD4 em células HEK293.

5 DISCUSSÃO

O domínio SET foi originalmente identificado como uma sequência conservada entre três proteínas de *Drosophila melanogaster*: *Suppressor of Variegation 3-9* (Su(var)3-9), *Enhancer of Zeste* (E(z)) e *Trithorax*. As proteínas contendo um domínio SET foram inicialmente classificadas em quatro subfamílias baseando na homologia do domínio e nomeadas após os primeiros membros SUV39, SET1, SET2 e RIZ; subsequentemente, uma quinta subfamília foi identificada e designada após a descoberta do gene *SMYD3* (45, 57).

Atualmente, metiltransferases de lisina contendo o domínio SET são divididas em sete grupos baseando na homologia da sequência deste domínio, sendo a família SMYD caracterizada pela inserção de um domínio dedo-de-zinco MYND. Primeiramente, as proteínas contendo o domínio SET foram caracterizadas como enzimas modificadores de histonas e, subsequentemente, foi descoberto que algumas HKMTs poderiam também modificar proteínas não-histonas. A importância biológica da metilação de proteínas não-histonas, assim como as consequências de sua desregulação no câncer, foram colocadas em evidência pelas investigações dos genes *SMYD2* e *SMYD3* (45, 46, 58).

O alinhamento da proteína *SMYD4* com os outros quatro membros da família SMYD demonstrou que esta proteína possui aminoácidos em posições equivalentes às dos domínios SET e MYND dos outros SMYDs, no entanto, o mecanismo atribuído a essas regiões na proteína *SMYD4* ainda precisa ser detalhadamente estudado. Tal semelhança na posição de alguns aminoácidos compartilhada nesses domínios sugere possível analogia entre os mecanismos de ação da proteína *SMYD4* às demais proteínas da família SMYD. Apesar de ainda não haver nenhum trabalho associando estes domínios à atividade desta proteína, o gene *SMYD4* foi recentemente descrito como um potencial supressor tumoral envolvido no desenvolvimento de câncer de mama (48).

No presente estudo, foi demonstrado que *SMYD4* está hipoexpresso em sete linhagens de câncer de mama com diferentes expressões de receptores e características celulares, o que corrobora com os achados anteriores, os quais demonstraram que a ruptura da expressão de *SMYD4* está associada com a tumorigênese demonstrada em uma linhagem celular mamária não-tumorigênica (48). Diante dos resultados, pôde-se notar uma diferença de expressão em

HCC1954 e MDA-MB-231, as quais demonstram maior expressão ao compará-las com as outras linhagens. Apesar de sua expressão ainda ser menor que o grupo controle, HCC1954 foi coletada de um carcinoma invasivo primário, enquanto MDA-MB-231 tem origem em adenocarcinoma metastático proveniente de efusão pleural, o que representa um tumor mamário mais agressivo. Assim, os resultados sugerem que os níveis de expressão de *SMYD4* podem não estar relacionados ao grau de agressividade do tumor.

Além disso, *SMYD4* também mostrou estar hipoexpresso em grande parte das amostras tumorais de câncer de mama em comparação com um grupo controle de tecido mamário saudável, o que também está de acordo com a ideia do trabalho anterior de que *SMYD4* atua como potencial gene supressor tumoral em câncer de mama. Apesar de estes resultados demonstrarem uma expressão diminuída de *SMYD4* na maioria das amostras tumorais, o pequeno número de casos não possibilita fortes associações com as características clínicas e patológicas dos pacientes por não permitir a aplicação de testes estatísticos estratificados. No entanto, ao analisar os dados de expressão gênica por microarranjo na base de dados OncoMine, observou-se uma expressão diminuída significativa de *SMYD4* em 34 casos de carcinoma ductal invasivo, 20 casos de carcinoma lobular e 9 casos de carcinoma ductal *in situ* (59, 60), o que corrobora com os achados no presente estudo. Esses resultados reforçam a ideia de *SMYD4* agir como um possível supressor tumoral e sugerem que este pode ter função oposta àquela revelada para o gene *SMYD3* na carcinogênese mamária (40).

Ademais, o presente estudo constatou que o gene *SMYD4* demonstrou estar expresso de forma distinta em diferentes tipos de tecido humano. Curiosamente, a expressão mostrou ser maior em tecido mamário ao comparar com todos os outros tecidos examinados. Este achado indica que a distribuição tissular de *SMYD4* pode ser completamente diferente do que fora descrito para os outros membros da família SMYD, evidenciando a importância do *SMYD4* no tecido mamário e sugerindo que este pode atuar de forma diferenciada entre os diferentes tipos tissulares. Em outros estudos, verificou-se expressão elevada de outros membros da família SMYD em músculo esquelético e cardíaco (41, 45, 61). Além disso, já foi demonstrado que o gene *SMYD1* está especificamente expresso em precursores de músculo cardíaco e esquelético antes da diferenciação celular desses tecidos, agindo em conjunto com

uma série de proteínas cardíacas regulatórias e sendo essencial na cardiomiogênese (61); assim, ao contrário de *SMYD1*, o presente estudo mostrou que o gene *SMYD4* está menos expresso em músculo cardíaco.

Quanto ao gene *SMYD2*, este apresenta elevada expressão em músculo cardíaco e em tecido cerebral, apesar de já estar claro que esta metiltransferase não é tão essencial quanto é o gene *SMYD1* no desenvolvimento do tecido cardíaco (41, 61). Além disso, o gene *SMYD3* também apresentou alta expressão em tecido testicular e em músculo esquelético, mas não em músculo cardíaco (45). Apesar de ser interessante notar que outros membros da família SMYD dividem um padrão de expressão similar em tecidos humanos não cancerosos (41, 45, 61), *SMYD4* demonstrou estar mais expresso em tecido mamário, sendo o único gene da família SMYD a ter esse perfil atualmente.

Com relação ao efeito de superexpressão de *SMYD4* em células HEK293, observou-se uma sutil redução na taxa de crescimento celular e, apesar do mecanismo pelo qual a superexpressão do gene *SMYD4* interfere no crescimento das células não ter sido elucidado, o ensaio com shRNA demonstrou que, ao silenciar este gene, eleva-se a taxa de proliferação celular. Estes resultados sugerem que o gene *SMYD4* possa estar diretamente envolvido em mecanismos de controle da proliferação celular. Além disso, esses resultados corroboram com os achados de Hu e colaboradores, que demonstraram que uma maior expressão de *SMYD4* levou à redução na proliferação celular *in vitro*. Tal trabalho mostra ainda que, células com baixa expressão de *SMYD4* sofrem um aumento na proliferação celular independente de ancoragem (48), o que é uma característica de células cancerosas.

Por fim, quanto à identificação da localização da proteína SMYD4 dentro da célula, os resultados presentes neste trabalho mostram que SMYD4 está situada no citoplasma, sugerindo que esta proteína talvez esteja associada a outros substratos proteicos não-histonas, o que já foi descrito em trabalhos anteriores sobre a atividade de SMYD2 e SMYD3 (46, 47, 58, 62). Nesses trabalhos, a atividade enzimática de metiltransferase de SMYD2 está associada à repressão de p53, a qual é fundamental na supressão tumoral. Esta observação evidenciou a ação de *SMYD2* como um oncogene putativo por ser capaz de metilar a proteína p53 (58). Outro exemplo é a associação de SMYD2 ao supressor de tumor Rb, o qual é

metilado em vários processos celulares (62). Além disso, também foi demonstrado que SMYD2 é capaz de metilar HSP90 e suas co-chaperonas (47). A metiltransferase SMYD3 também está associada à metilação do receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR1), aumentando o poder de atuação desta tirosina-quinase (46). Desta forma, apesar de ainda não estar claro se SMYD4 age como metiltransferase, a identificação da localização subcelular de SMYD4 no citoplasma sugere que esta proteína pode atuar juntamente com outros substratos não histonas.

6 CONCLUSÃO

Ao considerar o câncer como um dos maiores problemas de saúde no mundo atual, sendo o câncer de mama um dos que mais acometem e matam mulheres em todo o mundo, é importante que novas pesquisas direcionadas a melhorias no diagnóstico e tratamento destes pacientes sejam realizadas. Neste sentido, também é importante entender que, por ser uma doença de cunho genético, estudos moleculares tornam-se cada vez mais frequentes e essenciais na busca de terapias mais individualizadas.

Neste estudo, o gene *SMYD4* demonstrou estar hipoexpresso em amostras e linhagens celulares de câncer de mama, o que indica uma atuação deste gene na modulação da carcinogênese mamária, agindo como supressor tumoral. Ademais, apesar de ter observado apenas uma sutil redução na proliferação celular pelo efeito da superexpressão do *SMYD4*, o silenciamento deste gene mostrou estar associado ao aumento na taxa de crescimento celular, o que reafirma a ideia de que *SMYD4* seja um potencial supressor tumoral. Além disso, verificou-se que a proteína *SMYD4* está localizada principalmente no citoplasma, sugerindo que esta tenha uma atividade maior no citosol e talvez possa atuar como uma metiltransferase de proteínas não histonas. No entanto, sua atividade enzimática ainda precisa ser investigada.

Analisados em conjunto, esses dados apontam para o envolvimento do gene *SMYD4* na carcinogênese mamária, sugerindo-o como um novo alvo molecular para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e tratamento. Contudo, outros trabalhos e novas investigações são necessários para contribuir no entendimento da importância do *SMYD4* no processo tumorigênico em tecido mamário e ajudar a elucidar o mecanismo no qual sua atividade está envolvida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministério da Saúde (Brasil), Instituto Nacional de Câncer. Câncer no Brasil. Dados dos registros de base populacional [Internet]. [local desconhecido]: MS/INCA; 2003 [acesso em 2012 Mai 12]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/regpop/2003/>.
2. Ministério da Saúde (Brasil), Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012. Incidência de Câncer no Brasil. Brasília: MS/INCA, 2012.
3. International Agency for Research on Cancer. Fact Sheets [Internet]. França: IARC; [atualizada em 2010; acesso em 2012 Mai 12]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/>.
4. Jemal A, Bray F, Center MM *et al*. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011;61:69-90.
5. Ministério da Saúde (Brasil), Instituto Nacional de Câncer. Câncer no Brasil. Prevenção e detecção [Internet]. [local desconhecido]: MS/INCA; [acesso em 2012 Mai 12]. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=13.
6. Weinberg, RA. A natureza do câncer. In:_____. A biologia do câncer. Artmed. Porto Alegre: Artmed; 2008. p. 25-56.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of câncer: the next generation. Cell. 2011 Mar;144:646-74.
8. Silva CALO, Oliveira KM, Carvalho CBO *et al*. Prevalência de fatores associados ao câncer entre alunos de graduação nas áreas da saúde e ciências biológicas. Rev Bras Cancerol. 2010;56(2):243-9.

9. Tonani M, Carvalho EC. Risco de câncer e comportamentos preventivos: a persuasão como estratégia de intervenção. *Rev Latinoam Enferm*. 2008 Set-Out;16(5):67-74.
10. Muniz RM, Zago MMF, Schwartz E. As teias da sobrevivência oncológica: com a vida de novo. *Texto & Contexto Enferm*. 2009 Jan-Mar;18(1):25-32.
11. Barra GB, Caixeta MCSASB, Costa PGG *et al*. Diagnóstico molecular – passado, presente e futuro. *RBAC*. 2011;43(3):254-60.
12. Eisenberg ALA, Koifman S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). *Rev Bras Cancerol*. 2001;17(4):377-88.
13. Oliveira GG, Fonseca CA. Uso de marcadores tumorais no diagnóstico e acompanhamento do tratamento do câncer. *REF*. 2011;8(2):60-74.
14. Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Research*. 2004; 6:229-239.
15. Pereira QLC, de Siqueira HCH. Acesso à mamografia: percepções dos responsáveis pela política da saúde da mulher. *Rev Min Enferm*. 2011 Jul-Set;15(3):365-71.
16. Pinho VFS, Coutinho ESF. Risk factors for breast cancer: a systematic review of studies with female samples among the general population in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2005 Mar-Abr;21(2):351-60.
17. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Atenção à Saúde/ Departamento de Regulação, Avaliação e Controle/Coordenação Geral de Sistemas de Informação. Manual de bases técnicas da oncologia – SIA/SUS - Sistema de informações ambulatoriais. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

18. Ministério da Saúde (Brasil), Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Recomendações para redução da mortalidade por câncer de mama no Brasil: balanço 2012. Rio de Janeiro: INCA, 2012.
19. Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nature*. 2007 Oct;7:791-8.
20. Corrêa PB, Toralles MBP, Abe-Sandes K *et al*. Câncer de mama triplo negativo e sua associação com ancestralidade africana. *Rev Cien Med Bio*. 2010;(Supl 1):3-7.
21. Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression, profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2006 Mar;59(3):225-31.
22. Duda-Szymanska J, Sporny S. The practical value of breast cancer molecular classification. *Pol Merkur Lekarski*. 2011 Jul;31(181):5-8. Acesso em in: PubMed; PMID 21870701.
23. Cadore E. A expressão das claudinas 1, 3, 4, 7 e E-caderina em uma série de tumores de mama triplo-negativos [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012 [acesso em 2012 Mai 12]. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/39662>.
24. Vieira DSC, Dufloth RM, Schmitt FCL *et al*. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. *Rev Bras Ginecol Ostet*. 2008 Oct;30(1):42-7.
25. Wacholder S, Hartge P, Prentice R *et al*. Performance of common genetic variants in breast cancer risk models. *N Engl J Med*. 2010 Mar 18;362(11):986-93.
26. Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumor-suppressor genes. *Br J Cancer*. 2006;94(2):179-83.

27. Huang Y, Nayak S, Jankowitz R *et al.* Epigenetics in breast cancer: what's new? *Breast Cancer Res.* 2011; 14(6):225.
28. Muller HR, Prado KB. Epigenética: um campo da genética. *RUBS.* 2008 Set-Dez;1(3):61-9.
29. Pierce BA. Controle da expressão gênica. In:_____. *Genética: um enfoque conceitual.* Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 421-49.
30. Menditi KBC, Kang HC. O papel das proteínas histonas nas neoplasias hematológicas. *Rev Bras Cancerol.* 2007;53(4):453-60.
31. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001 Ago;293(5532):1074-80.
32. Karlic R, Chung HR, Lasserre J *et al.* Histone modification levels are predictive for gene expression. *PNAS.* 2010 Feb 16;107(7):2926-31.
33. Ward LS. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002 Ago;46(4):351-60.
34. Fahrner JA, Eguchi S, Herman JG *et al.* Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res.* 2002 Dez;62(24):7213-8.
35. Ballestar E, Paz MF, Valle L *et al.* Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *EMBO J.* 2003 Dez; 22(23):6335-45.
36. Fraga MF, Esteller M. Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell Cycle.* 2005 Out;4(10):1377-81.

37. Holloway AF, Oakford PC. Targeting epigenetic modifiers in cancer. *Curr Med Chem.* 2007;14(24):2540-7.
38. Silva FP, Hamamoto R, Kunizaki M *et al.* Enhanced methyltransferase activity of SMYD3 by the cleavage of its N-terminal region in human cancer cells. *Oncogene.* 2008 Abr 24;27(19):2686-92.
39. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Rev Genet.* 2009 Mai;10:295-304.
40. Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M *et al.* Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2006 Fev;97(2):113-8.
41. Brown MA, Sims RJ 3rd, Gottlieb PD *et al.* 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 Jun 28;5:26.
42. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011 Mar;21(3):381-95.
43. Khare SP, Habib F, Sharma R *et al.* Histome: a relational knowledgebase of human histone proteins and histone modifying enzymes [internet]. [local desconhecido]: ACTREC/CoEE/IISER; 2011 [acesso em 2012 Mai 14]. Disponível em: <http://www.actrec.gov.in/histome/>.
44. Thompson EC, Travers AA. A *Drosophila* Smyd4 homologue is a muscle-specific transcriptional modulator involved in development. *PLoS ONE.* 2008 Ago;3(8):e3008.
45. Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M *et al.* SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nature Cell Biol.* 2004 Jul 4;6(8):731-40.

46. Kunizaki M, Hamamoto R, Silva FP *et al.* 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.
47. Abu-Farha M, Lanouette S, Elisma F *et al.* Proteomic analyses of the SMYD family interactomes identify HSP90 as a novel target for SMYD2. *J Mol Cell Biol.* 2011;3(5):301-8.
48. Hu L, Zhu YT, Qi C *et al.* Identification of Smyd4 as a potential tumor suppressor gene involved in breast cancer development. *Cancer Res.* 2009 Mai;69(9):4067-72.
49. National Center for Biotechnology Information [base de dados na internet]. Bethesda (MD): US National Library of Medicine. [acesso em: 2012 Mar 8]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/114826>
50. The UniProt Consortium [base de dados na internet]. c2002-2012 [acesso em: 2012 Mar 8]. Disponível em: <http://www.uniprot.org/>
51. Neve RM, Chin K, Fridlyand J *et al.* A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 2006;10(6):515-27.
52. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer : experience from a large study with long term follow up. *Histopathology* 1991;19:403-10.
53. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer. Tumores de mama. In:_____. TNM: classificação de tumores malignos. Rio de Janeiro: INCA, 2004. p.137-48.
54. Applied Biosystems. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real time quantitative PCR. Applied Biosystems, 2008.
55. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983;65:55-63.

56. Sambrook J, Russell DW. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: maxipreparation. In:_____. Molecular Cloning. 3ª edição. Nova Iorque: CSHL PRESS; 2001. p. 1.38-42.
57. Fog CK, Jensen KT, Lund AH. Chromatin-modifying proteins in cancer. *APMIS* 2007;115(10):1060-89.
58. Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ *et al.* Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature* 2006;444(7119):629-32.
59. Zhao H, Langerod A, Ji Y *et al.* Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast. *Mol Biol Cell* 2004;15:2523-36.
60. Rhodes DR, Yu J, Shanker K *et al.* Oncomine: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* 2004;6(1)1-6.
61. Tan X, Rotllant J, Li H *et al.* SMYD1, a histone methyltransferase, is required for myofibril organization and muscle contraction in zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(8):2713-18.
62. Saddic LA, West LE, Aslanian A *et al.* Methylation of the retinoblastoma tumor suppressor by SMYD2. *J Biol Chem* 2010 Nov;285(48):37733-40.

ANEXOS

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

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 examinados 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

ANEXO B – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

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.

Pesquisadora Responsável: Fabio Pittella Silva

Data de Entrada: 23/04/2009

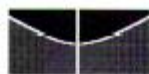
Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **025/09** com o título: “Análise genômica e funcional de genes codificadores de metiltransferases protéicas em Linhagens de Carcinoma Ductal de Mama e Normal”, analisado na 5ª Reunião Ordinária, realizada no dia 09 de Junho de 2009.

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, 13 de Junho de 2009.

Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP-FS/UnB

ANEXO C – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA



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