

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

LUIS HENRIQUE TOSHIHIRO SAKAMOTO

**Papel de metiltransferases de proteínas no desenvolvimento e
prognóstico de leucemias linfóides agudas da infância**

Brasília
2014

LUIS HENRIQUE TOSHIHIRO SAKAMOTO

Papel de metiltransferases de proteínas no desenvolvimento e prognóstico de leucemias linfóides agudas da infância

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular como cumprimento parcial dos requerimentos para obtenção de título de Doutor em Biologia Molecular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Sueli Soares Felipe
Co-Orientador: Prof. Dr. Fabio Pittella Silva

Brasília
2014

LUIS HENRIQUE TOSHIHIRO SAKAMOTO

Papel de metiltransferases de proteínas no desenvolvimento e prognóstico de leucemias linfóides agudas da infância

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular como cumprimento parcial dos requerimentos para obtenção de título de Doutor em Biologia Molecular

COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe
Universidade de Brasília (Presidente)
Instituto de Biologia

Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca
Universidade de Brasília
Instituto de Biologia

Dra. Isis Maria Quezado Magalhães
Hospital da Criança de Brasília José Alencar/DF

Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli
Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP

Prof. Dr. José Andres Yunes
Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini
Campinas/SP

Aprovada em: 16/05/2014

Local da defesa: Anfiteatro 2 – Instituto de Biologia da Universidade de Brasília

“Lembrar que você vai morrer é a melhor maneira que eu conheço para evitar a armadilha de pensar que você tem algo a perder. Você está nú. Não há razão para não seguir seu coração.”

Steve Jobs

Aos meus pais pela dádiva da vida, pelo amor incondicional e por me fazerem compreender que o conhecimento é o único bem que não nos pode ser tirado.

À você Mariana, minha filha querida, dedico o fruto desses quatro anos de estudo. Que um dia você possa me perdoar pelos momentos em que não pude estar contigo.

À você Mariane, minha alma-gêmea, dedico este trabalho, meu ser e meu infinito amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pela graça da vida e por me dar a saúde necessária para enfrentar o desafio da formação acadêmica e a inspiração para elaboração de novas idéias.

Agradeço a Profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe pela orientação e, principalmente, pelos conselhos de vida acadêmica. Mais do que minha orientadora, és um exemplo de que competência, caráter e perseverança só podem resultar em grandes obras e realizações.

Meus sinceros agradecimentos aos Professores Fabio Pittella Silva e Andrea Barretto Motoyama pela orientação, ajuda e parceria nesses anos de doutorado e por viabilizar, apesar da minha rotina atribulada, a realização dos experimentos em seu laboratório.

Aos membros da comissão julgadora, agradeço pela atenção dada a leitura e correção do manuscrito e por contribuir para o enriquecimento da tese. Particularmente, ao professor Carlos Andre por ter aceitado, mesmo de última hora, a árdua tarefa de avaliar esta tese e por tanto contribuir com o trabalho. Aos Professores Carlos Scrideli e José Andrés Yunes agradeço, por se disporem a vir até o Planalto Central e por contribuir para o enriquecimento da tese.

Muito obrigado, em especial, à Dra. Isis Maria Quezado Magalhães pelo incentivo à formação acadêmica, mesmo dentro desse ambiente escasso de idéias que é a Secretaria de Saúde do DF. Obrigado pelo apoio.

Ao colega Dr. José Carlos Martins Córdoba pelo apoio e por ter contribuído para o enriquecimento do trabalho durante o processo de qualificação.

Ao Professor Márcio Poças agradeço pelos ensinamentos adquiridos durante a disciplina de epigenética que me ajudaram a compreender um pouco mais as bases biológicas que sustentam meu estudo e pela contribuição dada na qualificação.

À querida amiga Professora Rosangela Vieira de Andrade muito obrigado pelo apoio e parceria nos projetos de pesquisa e por permitir que parte dos experimentos fossem realizados em seu laboratório.

Aos Professores Rui Caldas, Rinaldo Wellerson e Robert Pogue agradeço pelo apoio nos projetos de pesquisa junto à Universidade Católica de Brasília e por também viabilizarem a realização de parte dos experimentos em seu laboratório.

Agradeço também aos colegas Diana Gomez e Agenor pela ajuda com os experimentos da parte de proteínas, que serão concluídos posteriormente.

Muito obrigado à Professora Daniela Mara de Oliveira pela orientação e ajuda nos experimentos com citometria de fluxo.

Ao amigo e colega de laboratório Ricardo Camargo agradeço pela ajuda nos experimentos de cultura celular e pela parceria no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Genética da SES/DF. Também muito obrigado à Professora Beatriz Dolabela por ter concedido as linhagens celulares de leucemia utilizadas nesse estudo.

Aos meus colegas do Laboratório de Patologia Molecular do Câncer: Martha, Rubens, Fernanda, Hadassa, Luis Muniz, João Nunes, Karla, Brenno, Lúcio, Diego, Felipe, Orlene e Luciana (e aos que, eventualmente, tenha esquecido de mencionar), muito obrigado pelo convívio e pelos momentos de descontração.

Em especial à amiga Doralina Rabelo, pelo companheirismo e pela ajuda na organização do laboratório, muito obrigado.

Obrigado também aos Professores Antonio Francisco e Werner Treptow pelos momentos enriquecedores de “brainstorm” na disciplina de Biologia de Sistemas I e II.

Obrigado aos colegas do Hospital da Criança de Brasília: Paula, Lucélia, Flávia, Edvaldo, Carolina, Andrea e Fabrícia pelo apoio na assistência aos pacientes.

À minha comadre Raquel e à sempre amiga Estefânia obrigado pelo carinho e pelo apoio nos momentos difíceis.

Não posso deixar de agradecer aos meus antigos mestres Prof. Dr. André Vettore Oliveira e Profa. Dra. Beatriz de Camargo que me mostraram o caminho da pesquisa clínica e laboratorial e sem os quais jamais teria vislumbrado este doutorado.

Obrigado aos pacientes que cederam as amostras que possibilitaram a realização desse estudo. Espero que, no futuro, o resultado dele se converta em benefício para os pacientes que virão à seguir.

Papel de metiltransferases de proteínas no desenvolvimento e prognóstico de leucemias linfóides agudas da infância

RESUMO

As leucemias linfóides agudas (LLA) são o tipo mais comum de neoplasia maligna da infância, correspondendo a 25-30% de todos os cânceres nesse grupo e constituem um exemplo de sucesso terapêutico em oncologia pediátrica. Hoje, os mais eficazes centros de tratamento são capazes de gerar taxas de sobrevivência global em 5 anos de cerca de 80-90% na população assistida. Apesar de várias características clínicas, citogenéticas e moleculares já serem sabidamente definidoras de prognóstico, marcadores mais robustos ainda necessitam ser descobertos, tendo em vista que, mesmo em países desenvolvidos, cerca de 20% das crianças com LLA ainda evoluirão ao óbito pela neoplasia. Uma das alterações citogenéticas mais conhecidas consiste nos rearranjos da região cromossômica 11q23 que fusionam o gene *MLL* com diversos outros genes localizados em outros cromossomos. A presença desses rearranjos, de maneira geral, sinalizam um pior prognóstico em LLA. Tendo em vista que a proteína MLL consiste em uma metiltransferase de lisina, com função já sabidamente alterada no contexto das LLAs, foi aventada a hipótese da existência de alterações de expressão gênica em outros genes codificadores de metiltransferases de proteínas nesse tipo de neoplasia. Foram comparadas, após estudo-piloto para seleção dos melhores genes candidatos, 83 amostras de medula óssea de crianças com LLA ao diagnóstico com 8 controles não neoplásicos do mesmo tecido. Verificou-se, através de PCR em tempo real, que 8 dos 22 genes investigados (*SMYD2*, *SMYD5*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD8* e *SETMAR*) apresentavam hiperexpressão nas amostras leucêmicas. Além disso, as expressões aumentadas de *SMYD2*, *SETD2*, *SETD4* e *SETD8* relacionaram-se com um pior prognóstico na análise univariada. No modelo multivariado, o gene *SMYD2* mantinha-se como fator prognóstico independente, juntamente com as variáveis idade e a presença de blastos no 29º dia de quimioterapia. Foi observado, ainda, que pacientes com hiperexpressão de *SMYD2* ao diagnóstico, apresentavam redução progressiva desses níveis no 15º e 29º dias de quimioterapia. A hiperexpressão de *SMYD2* ainda se correlacionou com idade e hiperleucocitose na coorte estudada, o que sugeriu um possível papel dessa metiltransferase no controle da proliferação celular. Através de experimento com siRNA e citometria de fluxo com CFSE, observou-se que a taxa de proliferação da linhagem Nalm6, derivada de LLA, sofreu redução significativa após silenciamento específico de

SMYD2. Neste trabalho demonstrou-se, portanto, a existência de alteração da expressão de outros genes codificadores de metiltransferases de lisina em LLA da infância, além da já bem descrita para o gene *MLL*. Além disso, verificou-se que a expressão aumentada de alguns desses genes teve relação com pior prognóstico na coorte estudada. Finalmente, comprovou-se, em linhagem celular de leucemia, que o silenciamento do gene *SMYD2* é capaz de reduzir a taxa de proliferação celular, o que pode ser causado por alterações da atividade de metiltransferase desse gene tanto ao nível de proteínas histonas quanto não-histonas.

Palavras-chave: Leucemia linfóide aguda da infância, metiltransferases de proteínas, proliferação celular, CFSE, epigenética, expressão gênica, PCR em tempo real, *SMYD2*.

Role of protein methyltransferases in the development and prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemia

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood malignancy, accounting for 25-30% of all cancers in this group and constitutes an example of successful treatment in pediatric oncology. Nowadays, the most effective treatment centers are able to generate 5-years overall survival rates between 80 and 90%. Although several clinical, cytogenetic and molecular characteristics are already known to defining prognosis, more robust markers still need to be discovered, given that, even in developed countries, about 20% of treated children still die because of ALL. One of these alterations are rearrangements of chromosome region 11q23 that fuses the *MLL* gene with several other genes located in other chromosomes. The presence of these rearrangements, in general, indicates a worse prognosis in ALL. Given that *MLL* protein consists of a lysine methyltransferase with altered function in ALL we hypothesized the existence of gene expression alterations in other lysine methyltransferases encoding genes in this type of neoplasm. After a pilot-study for selection of the best candidate genes, we compared 83 bone marrow samples from children with ALL at diagnosis with 8 non-neoplastic controls. It was found, by real-time PCR, that 8 of the 22 investigated genes (*SMYD2*, *SMYD5*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD8* and *SETMAR*) showed overexpression in leukemic samples. Furthermore, the increased expressions of *SMYD2*, *SETD2*, *SET4* and *SETD8* genes were related to a worse prognosis in the univariate analysis. In the multivariate model, *SMYD2* gene remained as an independent prognostic factor, together with age and the presence of blasts on 29th day of chemotherapy. It was also observed that those patients who had *SMYD2* overexpression at diagnosis, showed progressive reduction of these levels in 15th and 29th days of chemotherapy. The overexpression of *SMYD2* gene was still correlated with age and hyperleukocytosis in our cohort, suggesting a possible role of this methyltransferase in the cell proliferation control. Through siRNA and CFSE flow cytometry experiments, it was observed that the proliferation rate of Nalm6 cell line was reduced after specific silencing of *SMYD2*. Therefore, it was demonstrated that other key lysine methyltransferases encoding genes are also abnormally expressed in childhood ALL, in addition to the already well described *MLL* gene. Furthermore, it was found that increased expression of some of these genes was

correlated with a bad prognosis in our cohort. Finally, it has been found that the knockdown of *SMYD2* gene is capable of reducing the rate of leukemia cell lines proliferation.

Keywords: childhood acute lymphoblastic leukemia, protein methyltransferase, cell proliferation, CFSE, epigenetics, gene expression, real-time PCR, *SMYD2*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Análise de sobrevida livre de evento (Kaplan-Meier) com 2855 crianças tratadas nos estudos consecutivos “Total-therapy” do St. Jude Children’s Research Hospital	23
Figura 2 – Arcabouço do protocolo alemão ALL BFM95 para os grupos “Standard” (SR), “Medium” (MR) e “High”-risk (HR).	24
Figura 3 – Reação genérica de transferência de grupamentos metil S_N2 a partir do substrato SAM para a cadeia lateral de resíduos de lisina ou arginina de histonas, conforme catalisada por metiltransferases de proteínas (PMT)	26
Figura 4 – Ilustração do nucleossomo com as 8 proteínas histônicas	27
Figura 5 – Diversidade de estados químicos obtidos pela metilação sequencial de resíduos de lisina catalisada por diversas famílias de metiltransferases de lisina	28
Figura 6 – Domínios conservados de metiltransferases de lisina	29
Figura 7 – Famílias de metiltransferases de lisina conforme similaridade com domínio SET de <i>Drosophila</i> .	30
Figura 8 – Famílias de metiltransferases de arginina conforme similaridade com domínio SET de <i>Drosophila</i> .	31
Figura 9 – Mapa epigenético para metilação de lisinas de histonas.	32
Figura 10 – Representação esquemática das várias etapas de ligação de CFDA-SE às proteínas celulares.	45
Figura 11 – Configuração da placa de cultura do experimento de calibração de tempos e escolha de linhagens para o ensaio de proliferação	47
Figura 12 – Passos para a quantificação do sinal de fluorescência de CFSE no detector FLI	49
Figura 13 - Configuração da placa de cultura do experimento de silenciamento por siRNA SMYD2.	51
Figura 14 – Expressão relativa dos 22 genes codificadores de metiltransferases de lisinas nas 29 amostras de medula óssea leucêmica utilizadas no estudo piloto, comparadas com 2 amostras não-neoplásicas	58
Figura 15 – Gráficos tipo bloxplot com valores de CNRQ (Calibrated Normalized Relative Quantification)	61

Figura 16 – Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier conforme contagem de leucócitos ao diagnóstico, presença de translocações recorrentes, imunofenotipagem e status medular no 29º dia de indução.	67
Figura 17 – Curvas de sobrevida em 30 meses obtidas pelo método de Kaplan-Meier de acordo com os níveis de expressão dos genes <i>SMYD2</i> , <i>SETD2</i> , <i>SETD4</i> e <i>SETD8</i> .	70
Figura 18 – Relação entre o percentual de blastos na medula óssea e expressão de <i>SMYD2</i> mRNA.	76
Figura 19 - Western-blot com extrato protéico total de amostras de medula óssea leucêmica ao diagnóstico com anticorpo anti-smyd2, normalizados com anticorpo anti-actina.	78
Figura 20 – Experimento de calibração para ensaio com CFSE na linhagem celular NALM6.	81
Figura 21 – Experimento de calibração para ensaio com CFSE na linhagem celular 697.	82
Figura 22 – Experimento de calibração para ensaio com CFSE na linhagem celular RS4;11.	83
Figura 23 – Experimento de calibração para ensaio com CFSE na linhagem celular REH.	84
Figura 24 – Experimento de interrupção do ciclo celular com mitomicina C.	86
Figura 25 – Silenciamento de <i>SMYD2</i> ao nível de RNAm após incubação com siRNA.	88
Figura 26 – Silenciamento de <i>SMYD2</i> com siRNA reduz a taxa de proliferação celular em linhagem Nalm-6.	89
Figura 27 – Representação gráfica dos valores relativos de fluorescência detectável correspondente ao CFSE no ponto de maior frequência do histograma gerado na aquisição com detector FL1 (488nm)	91
Figura 28 – Representação esquemática dos domínios conservados dos 5 membros da família SMYD.	97
Figura 29 – Resumo esquemático dos principais achados do estudo.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das características e sintomas principais de 724 crianças com LLA tratadas pelo CCSG (Children’s Cancer Study Group).	18
Tabela 2 – Classificação FAB das LLA	20
Tabela 3 – Marcadores de imunofenotipagem comumente utilizados para o diagnóstico das LLA	21
Tabela 4 – Anormalidades cromossômicas estruturais mais frequentes em LLA da infância	22
Tabela 5 – Características dos genes codificadores de metiltransferases de lisinas que foram avaliados inicialmente no estudo piloto	42
Tabela 6 – Tempos de leitura de fluorescência por citometria de fluxo para escolha da melhor linhagem celular a ser submetida aos experimentos de silenciamento por siRNA	47
Tabela 7 – Composição dos meios para transfecção com siRNA SMYD2	53
Tabela 8 – Análise estatística do estudo piloto com 29 amostras de medula óssea de pacientes com leucemia e 2 amostras de medula óssea não-neoplásicas para 22 genes codificadores de metiltransferases de lisina	59
Tabela 9 - Comparação entre os níveis de expressão de metiltransferases de lisinas em amostras de leucemias e medula óssea não-neoplásica	60
Tabela 10 – Comparação dos dados de expressão por qPCR do presente estudo com aqueles obtidos por estudo de microarranjo disponíveis na plataforma Oncomine®	63
Tabela 11 – Correlação entre os valores de CNRQ para os genes alvos estudados nas amostras de leucemia	64
Tabela 12 – Correlação entre os valores de CNRQ para os genes alvos estudados nas amostras controles	64
Tabela 13 – Características clínicas dos pacientes estudados	66
Tabela 14 – Análise univariada de sobrevida global pelo método de risco proporcional de Cox considerando nível de expressão (RNAm) de genes da família SET como fatores determinantes de óbito na população estudada	68

Tabela 15 – Frequências de valores de CNRQ para os 8 genes utilizados para a dicotomização dos níveis de expressão na análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier	69
Tabela 16 – Análise de qui-quadrado do nível de expressão de 4 genes codificadores de metiltransferases de lisina em relação a fatores prognósticos clássicos em LLA da infância	71
Tabela 17 – Análise de sobrevida global pelo método de regressão multivariada de Cox	72
Tabela 18– Resultados de log <i>CNRQ</i> de <i>SMYD2</i> nas amostras de medula óssea de pacientes com LLA em comparação com o percentual de células leucêmicas na medula óssea nos 15° e 29° dias de terapia indutória	74
Tabela 19 - Quantificação de proteínas do lisado total por espectrofotometria pelo método de Bradford	77
Tabela 20 – Valores de CNRQ de <i>SMYD2</i> para as 4 linhagens de LLA testadas	79
Tabela 21 – Valores de CNRQ de <i>SMYD2</i> , desvio padrão de CNRQ e percentual de redução de expressão	87
Tabela 22 – Valores absolutos de fluorescência em FLI no pico de concentração de células e mediana de fluorescência em FLI	91
Tabela 23 - Valores brutos de CNRQ das 83 amostras de LLA e 8 controles não neoplásicos (CTRL1-8)	115

LISTA DE ABREVIACOES

CCSG – Children’s Cancer Study Group

cDNA – DNA complementar

CFDA-SE – Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Ester

CFSE – Carboxifluoresceína Succinimidil Ester

CGH – Hibridização Genmica Comparativa

CNRQ – Quantificação Relativa Calibrada e Normalizada

Cq – Ciclo de quantificação

DNA – cido Desoxirribonucléico

DRM – Doença Residual Mínima

FAB – (Classificação) Franco-Americo-Britânica

FISH – Hibridização In Situ por Fluorescência

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

qPCR – PCR quantitativa

RNA – cido Ribonucléico

RQ – Quantificação Relativa

SFB – Soro Fetal Bovino

SMYD – SET and MYND (Myeloid, Nervy and DEAF-1) domain-containing protein

SNC – Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA – CLÍNICA E TERAPÊUTICA	18
1.2. BASE BIOLÓGICA PARA A HIPÓTESE PRINCIPAL DO ESTUDO	25
1.2.1. <i>Metilação de proteínas</i>	26
1.2.2. <i>O papel dos rearranjos com o gene MLL nas LLA da infância</i>	34
1.2.3. <i>Papel do gene MLL no desenvolvimento do sistema linfóide e na leucemogênese</i>	34
1.2.4. <i>Justificativa para a escolha dos genes estudados</i>	36
2. OBJETIVOS	37
3. PACIENTES E MÉTODOS	38
3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	38
3.2. COLETA DE DADOS CLÍNICOS	38
3.3. ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E EXTRAÇÃO DE RNA	39
3.4. ENSAIOS DE QPCR	40
3.5. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL DE AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA	43
3.6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E WESTERN-BLOT	43
3.7. CULTURA DE LINHAGENS CELULARES DE LLA	44
3.8. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR COM CARBOXIFLUORESCÉINA SUCCINIMIDIL ESTER (CFSE)	44
3.9. SELEÇÃO DE LINHAGENS PARA ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO COM CFSE	46
3.10. LEITURA DE SINAL POR CITOMETRIA DE FLUXO	48
3.11. INIBIÇÃO DO CICLO CELULAR COM MITOMICINA C	49
3.12. INCUBAÇÃO COM CFSE PRÉ-SILENCIAMENTO COM siRNA	50
3.13. TRANSFEÇÃO DE <i>SMYD2</i> siRNA COM REAGENTE LIPÍDICO CATIONICO	51
3.14. VERIFICAÇÃO DO SILENCIAMENTO DO GENE <i>SMYD2</i> POR siRNA	53
3.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS CLÍNICOS E EXPERIMENTAIS	54
4. RESULTADOS	56
4.1. ESTUDO PILOTO	56
4.2. COMPARAÇÃO ENTRE O NÍVEL DE EXPRESSÃO DE METILTRANSFERASES DE LISINAS EM AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA LEUCÊMICAS E NÃO-NEOPLÁSICAS	60
4.3. COMPARAÇÃO DOS DADOS OBTIDOS COM DADOS ARMAZENADOS NA PLATAFORMA ONCOMINE	62

4.4. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS.....	63
4.5. CORRELAÇÃO ENTRE O NÍVEL DE EXPRESSÃO DE METILTRANSFERASES DE LISINAS E DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES.....	65
4.6. NÍVEL DE EXPRESSÃO DE SMYD2 DURANTE A TERAPIA INDUTÓRIA.....	73
4.7. RESULTADOS DE WESTERN-BLOT (WB) DAS AMOSTRAS DE LLA	77
4.8. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR APÓS SILENCIAMENTO DE SMYD2 COM siRNA	79
4.8.1. Escolha da linhagem e concentração de CFSE.....	79
4.8.2. Tempos de Leitura no Citômetro	85
4.8.3. Expressão de SMYD2 por PCR em tempo real após silenciamento com siRNA.....	87
4.8.4. Proliferação celular após silenciamento com SMYD2 siRNA	88
5. DISCUSSÃO	93
6. CONCLUSÕES	104
7. PERSPECTIVAS	106
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXO I.....	114
ANEXO II	115

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA – CLÍNICA E TERAPÊUTICA

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) consiste de uma neoplasia do sistema hematopoiético, caracterizada pela expansão clonal maligna de células precursoras linfóides (Pui 1997; Pui, Mullighan et al. 2012).

Em crianças, constitui o tipo mais comum de câncer, correspondendo a aproximadamente 25% do total. Seu pico de incidência ocorre entre 2 e 5 anos de idade. Meninos são discretamente mais acometidos do que meninas, em especial na adolescência. Negros, apesar de serem menos afetados pela doença, comumente apresentam, ao diagnóstico, características clínicas desfavoráveis (Pui 1997; Margolin, Steuber et al. 2006; Pui, Pei et al. 2012). A **tabela 1** resume os percentuais de distribuição de algumas variáveis epidemiológicas e sintomas em um grupo de crianças tratada pelo grupo cooperativo norte-americano CCSG (Children's Cancer Study Group) (Imbach 2011).

Tabela 1 – Resumo das características e sintomas principais de 724 crianças com LLA tratadas pelo CCSG (Children's Cancer Study Group).

Característica	%
Idade (anos)	
<1	6
1-3	18
3-10	54
>10	22
Gênero	
Masculino	57
Feminino	43
Grupo Etnico	
Branco	59
Não Branco	41
Sintomas Gerais	
Febre	61
Sangramento	48
Dor óssea	23
Sintomas específicos	
Linfadenomegalia	50
Esplenomegalia	63
Hepatoesplenomegalia	68
Alargamento Mediastinal	7

Fonte: Imbach *et al.* (2011) (Imbach 2011).

A doença é caracterizada cito-morfológicamente pela substituição de mais de 20-25% dos componentes normais da medula óssea por linfoblastos neoplásicos, motivo pelo qual, em geral, os pacientes se apresentam com sinais e sintomas compatíveis com insuficiência de algum dos precursores hematopoiéticos normais (Margolin, Steuber et al. 2006). Dessa forma, são comuns as manifestações clínicas decorrentes da anemia, trombocitopenia, neutropenia ou combinações destas (Margolin, Steuber et al. 2006).

A elevada taxa de proliferação celular do clone leucêmico pode também acarretar na liberação, para o sangue periférico, de grande quantidade de células neoplásicas, o que leva ao quadro de leucocitose em graus variados. Situações de extrema gravidade podem surgir quando a quantidade de glóbulos brancos no sangue periférico atinge níveis acima de 50.000 células/mm³, condição denominada de hiperleucocitose (Kelly and Lange 1997).

Diferente do que ocorre em tumores sólidos, as neoplasias hematopoiéticas apresentam-se como doença sistêmica, o que torna os princípios oncológicos de sítio primário e metástases pouco relevantes. No entanto, a experiência adquirida no manejo das leucemias agudas desde a década de 60 do século passado mostrou que o sistema nervoso central e os testículos nos meninos necessitavam de abordagem terapêutica especial, uma vez que, utilizando-se quimioterápicos venosos em doses convencionais exclusivamente, uma parcela considerável dos pacientes acabava apresentando recaídas nos dois sítios, mesmo não apresentando doença detectável inicialmente nesses dois locais. T tamanha importância foi dada a essa observação que esses dois foram denominados de “santuários leucêmicos”, referindo-se aos locais no organismo onde os linfoblastos ficariam “adormecidos” e protegidos das doses sistêmicas de quimioterápicos. A definição desses santuários motivou a utilização de radioterapia craniana e testicular nos meninos para profilaxia da leucemia nos dois locais, conduta atualmente não mais preconizada face ao conhecimento de que a quimioprofilaxia do sistema nervoso central com tripla terapia intratecal e a utilização de metotrexato venoso em doses maiores que 1g/m² são suficientes para a prevenção desses padrões de recaída (Clarke, Gaynon et al. 2003; Pui 2006).

O diagnóstico das LLA é realizado através do exame do aspirado de medula óssea, a partir do qual se realizam: citomorfologia do esfregaço, imunofenotipagem por citometria de fluxo e caracterização citogenética.

A citomorfologia consiste no exame sob microscopia óptica convencional do esfregaço corado, geralmente, com Wright-Giemsa. Basicamente, observa-se a contagem de elementos

normais e anormais da medula óssea. À diferença do que ocorre nas Leucemias Mielóides Agudas (LMA), a classificação morfológica e citoquímica Franco-Americana-Britânica (FAB) mostrou-se pouco útil na definição prognóstica das LLA, à não ser para a morfologia FAB-L3, comumente associada ao imunofenótipo de célula B maduras (Pui 2006). As características que definem os subgrupos FAB são listadas na **tabela 2**.

Tabela 2 – Classificação FAB das LLA

Característica	L1	L2	L3
Frequência em LLA da infância	85%	14%	1%
Tamanho	Células pequenas	Tamanhos variados	Grandes
Cromatina	Fina e homogênea	Variável, heterogênea	Pontilhada e homogênea
Forma do núcleo	Oval	Irregular	Oval
Nucléolo	Ausente	Um ou mais	Proeminentes
Citoplasma	Escasso	Variável	Moderadamente abundante
Basofilia	Pouca	Variável	Intensa
Vacuolização citoplasmática	Variável	Variável	Proeminente

Fonte: Imbach *et al.* (2011).

À diferença da classificação FAB, a classificação imunológica das LLA mostra-se de importância fundamental para o diagnóstico, caracterização e seguimento dos pacientes. Através do perfil de marcadores antigênicos da membrana celular e intracitoplasmáticos, detectados através da utilização de anticorpos monoclonais, é possível classificar, primariamente as LLA em imunofenótipos B ou T e, em segundo lugar, em relação ao grau de diferenciação do linfoblasto leucêmico (Schrappe and Stanulla 2003). Dessa forma, o exame de imunofenotipagem por citometria de fluxo do aspirado da medula óssea tornou-se exame mandatório para o adequado manejo das LLA. A **tabela 3** resume os principais marcadores imunofenotípicos utilizados na caracterização das LLA.

Tal caracterização imunofenotípica tem correlação com alguns aspectos clínicos importantes:

- 85% das crianças com LLA B CD10+ (geralmente LLA de células precursoras B) têm também HLA-DR positivo e constituem classicamente um grupo de bom prognóstico
- Crianças com LLA imunofenótipo T em geral são mais velhas (pico de incidência de 8 anos), meninos (relação 4:1), com hiperleucocitose ao diagnóstico, apresentam massa mediastinal e manifestações clínicas extramedulares ao diagnóstico.

Tabela 3 – Marcadores de imunofenotipagem comumente utilizados para o diagnóstico das LLA

Imunofenótipo B				
Pró-B	Células precursoras B	Pré-B	B Madura	
CD19	CD19, CD22	CD19, CD22	CD19, CD22	
HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR	Ig citoplasmática	
CD24 +/-	CD24 +/-	CD24 +	Ig membrana	
	CD10 +/-	CD10 +	CD79a	
	CD79a	CD20 +/-		
		CD79a		
Imunofenótipo T				
Pró-T	Precursor precoce	T Precursor T	T maduro	
CD7	CD3	CD3	CD3	
	CD7	CD7	CD7	
	CD5	CD5	CD5	
	CD2 +/-	CD2	CD2	
		CD1	CD3	
		CD4 +/-	CD4 ou CD8	
		CD8 +/-		

Adaptado de Imbach *et al.* (2011).

A caracterização citogenética dos linfoblastos leucêmicos pode ser realizada através da combinação das técnicas de: citogenética convencional com bandeamento G, hibridização in

situ com fluorescência (FISH), hibridização genômica comparativa (CGH), citometria de fluxo (para determinação do índice de DNA) e PCR.

De forma geral, agrupando-se os achados obtidos por todas as técnicas sabe-se que:

- 85% das crianças com leucemia possuem alguma anormalidade cariotípica detectável no clone leucêmico;
- Pacientes com hipodiploidia (entre 41-45 cromossomos) possuem prognóstico desfavorável, enquanto aqueles com hiperdiploidia (47-50 cromossomos) costumam apresentar boa resposta ao tratamento.
- A translocação t(9;22) está presente em cerca de 3-5% das crianças com LLA e determina um mau prognóstico.
- Alterações cromossômicas envolvendo a região 11q23 estão associadas com mau prognóstico, como será descrito à seguir.

Resumidamente, as anormalidades cromossômicas estruturais mais frequentemente encontradas em LLA da infância são descritas na **tabela 4**.

Tabela 4 – Anormalidades cromossômicas estruturais mais frequentes em LLA da infância

Anormalidade	Fusão Gênica	Importância clínica
LLA precursora-B		
t(12;21)	ETV-RUNX1	Presente em 25% dos casos de LLA; bom prognóstico
t(9;22)	BCR-ABL	3-5% dos casos; prognóstico ruim
t(1;19)	TCF3-PBX1	5% dos casos; prognóstico moderado, muitas vezes com hiperleucocitose
11q23	MLL	Predominantemente em lactentes; prognóstico ruim
LLA T		
t(11;14)	LMO1- ou LMO2-TCRD	Predominantemente meninos com doença extramedular
LLA B Madura		
t(8;14)	MYC-IGH	Predominantemente meninos, morfologia L3.
t(8;22)		Prognóstico moderado com quimioterapia intensiva
t(2;8)		

Adaptado de Margolin *et al.* (2006) (Margolin, Steuber et al. 2006)

O tratamento das LLA da infância constitui um exemplo de sucesso terapêutico em oncologia, uma vez que as taxas de sobrevida globais em 5 anos passaram de menos de 20%

antes da década de 70 para 70-80% nos dias atuais (Pui, Carroll et al. 2011), como ilustra a **figura 1**. Essa melhora do prognóstico deve-se não apenas a descoberta de agentes quimioterápicos com atividade antileucêmica isoladamente eficazes como também ao conhecimento de que a combinação desses medicamentos proporcionava um maior controle da doença. Além disso, o conhecimento a respeito da biologia da célula leucêmica serviu de base para a determinação da duração, tempo e intensidade de cada etapa do tratamento (Pui 1997; Pui, Mullighan et al. 2012).

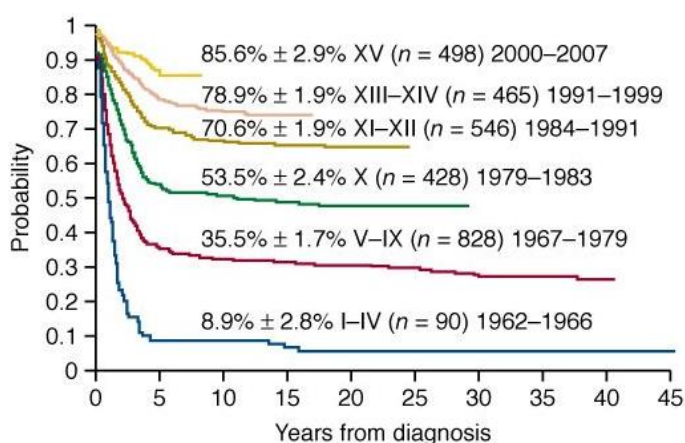


Figura 1 – Análise de sobrevida livre de evento (Kaplan-Meier) com 2855 crianças tratadas nos estudos consecutivos “Total-therapy” do St. Jude Children’s Research Hospital. Figura retirada de Lichtman *et al.* (2010) (Kaushansky, Lichtman et al. 2010).

Tendo em vista um melhor balanço entre eficácia e efeitos colaterais do tratamento, os pacientes são estratificados em grupos de risco de modo a intensificar o tratamento para aqueles que possuem maior chance de recaída e reduzir a toxicidade daqueles com maiores chances de cura.

Os critérios de estratificação de risco podem variar conforme o protocolo de terapia adotado em cada instituição, mas, em geral, constituem determinantes de pior prognóstico: extremos de idade ao diagnóstico (menores de 2 anos e maiores de 10 anos de idade), presença de hiperleucocitose ao diagnóstico, má ou não resposta à terapia indutória, má resposta à monoterapia com corticosteróides, presença de infiltração do sistema nervoso, presença de hipodiploidia nos linfoblastos e presença de translocações recorrentes do tipo t(9;22) *BCR-ABL* ou rearranjos cromossômicos envolvendo a região 11q23 (Pui, Campana et al. 2001; Margolin, Steuber et al. 2006; Pui, Carroll et al. 2011).

Os desenhos dos protocolos quimioterápicos utilizados no tratamento das LLA podem variar conforme a instituição de tratamento, no entanto, o arcabouço geral composto pela sequência: indução, consolidação/intensificação e manutenção é uma constante em todos eles (Margolin, Steuber et al. 2006; Pui, Pei et al. 2010), como ilustra a **figura 2**.

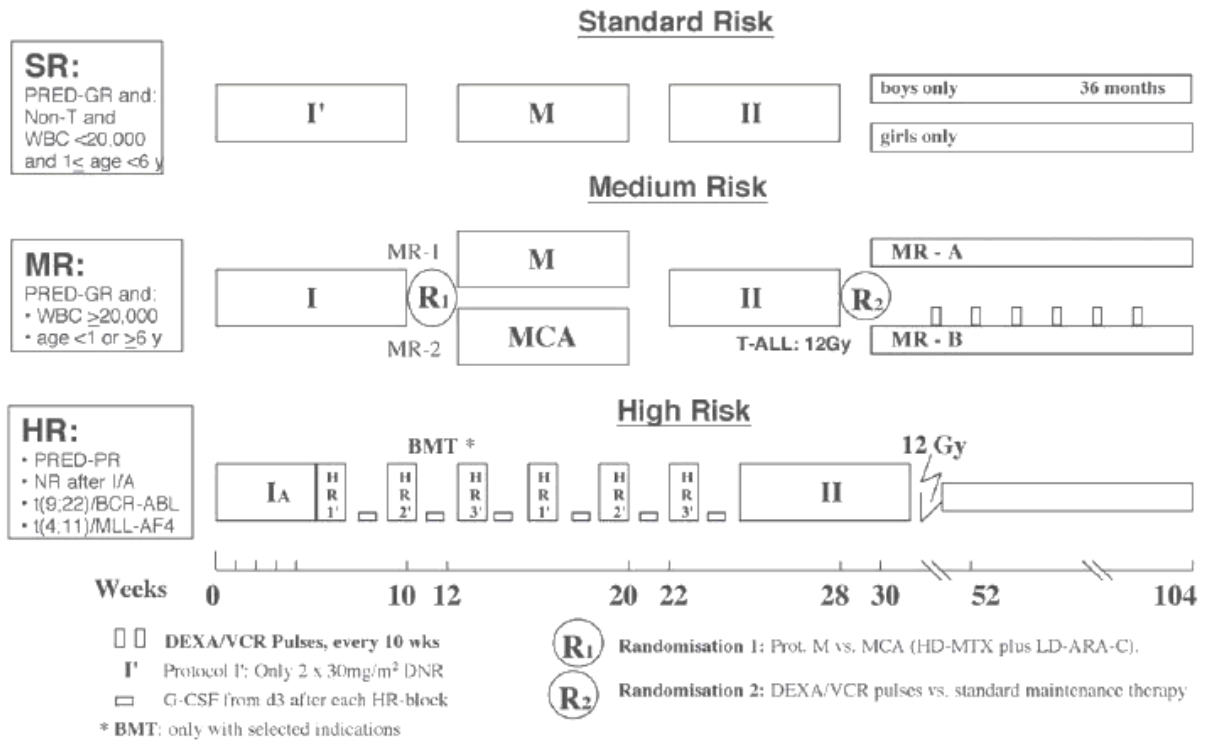


Figura 2 – Arcabouço do protocolo alemão ALL BFM95 para os grupos “Standard” (SR), “Medium” (MR) e “High”-risk (HR). Legenda: PRED-GR=bom respondedor à prednisona; WBC=contagem de leucócitos ao diagnóstico; I=indução; M=consolidação (metotrexate em altas doses); II=reindução; HR=blocos de consolidação alto risco; BMT=transplante de medula óssea; DEXA/VCR=pulsos com dexametasona e vincristina; G-CSF=Fator estimulador de colônias granulócitos. Figura retirada de Schrappe M & Stanulla M. (2003) (Schrappe and Stanulla 2003).

Resumidamente, durante a quimioterapia inicial de indução, utiliza-se a combinação corticosteroide, antraciclina, vincristina e quimioterapia intratecal com ou sem L-asparaginase com três objetivos essenciais: 1) induzir remissão medular cito-morfológica (medula óssea com menos de 5% de blastos); 2) permitir a recuperação dos elementos normais da medula óssea, anteriormente suprimidos pela expansão clonal exacerbada dos blastos leucêmicos; 3) iniciar a profilaxia da infiltração do sistema nervoso central pela leucemia (Margolin, Steuber et al. 2006).

A terapia de consolidação e intensificação tem como principal objetivo a eliminação do que se convencionou denominar de Doença Residual Mínima (DRM), que consiste em um nível de doença que não pode ser detectado pelo exame citológico do esfregaço da medula óssea, apesar de ainda existir no organismo (Campana and Coustan-Smith 2012). Nessa fase do tratamento utiliza-se quimioterapia intensiva com altas doses de metotrexato e, além disso, para aqueles com características de péssimo prognóstico, opta-se pela utilização de ciclos consolidativos com poliquimioterapia em blocos intensos compostos por citarabina em altas doses, tioguanina, mercaptina, ciclofosfamida, ifosfamida e etoposide em combinações diversas. Mantém-se, ainda, o objetivo de prevenir a infiltração da doença no SNC através de quimioterapia intratecal (Margolin, Steuber et al. 2006; Pui, Carroll et al. 2011).

O tratamento de manutenção é feito, geralmente, com quimioterapia em doses reduzidas de antimetabólicos (geralmente metotrexato e mercaptopurina ou tioguanina) utilizada para manter níveis terapêuticos constantes das drogas antineoplásicas por vários meses (em geral 2 anos), em uma estratégia que, comprovadamente, se mostrou crítica para a redução das taxas de recaída e óbito desses pacientes (Margolin, Steuber et al. 2006).

Apesar da otimização obtida com a estratificação dos pacientes por grupos de risco, sabe-se que mesmo os mais intensivos esquemas de quimioterapia não são capazes de curar todos os pacientes, principalmente aqueles com alto risco de recaída, visto que cerca de 40% deles ainda morrerão devido à leucemia. Mesmo para os pacientes classificados como baixo risco ainda existe 20% de taxa de recaída (Pui, Carroll et al. 2011; Pui, Mullighan et al. 2012). Parece evidente, portanto, que a eficácia da quimioterapia convencional chegou ao seu limite.

Nesse contexto, a definição de novos marcadores prognósticos, bem como o achado de novos alvos moleculares terapêuticos pode aumentar a eficácia do tratamento anti-neoplásico, sem, em contrapartida, aumentar a toxicidade ao mesmo (Pui, Mullighan et al. 2012). A elaboração de novos marcadores e terapêuticas, no entanto, depende de um profundo conhecimento da biologia das células que compõem o sistema hematopoiético, bem como dos processos que levam a leucemogênese.

1.2. BASE BIOLÓGICA PARA A HIPÓTESE PRINCIPAL DO ESTUDO

O presente estudo tem como objetivo principal a investigação de um ramo da epigenética ainda pouco estudado se comparado à enorme quantidade de pesquisas publicadas

em genômica, transcriptômica, metiloma de DNA e miRNoma, que consiste nas repercussões biológicas dos efetores de metilação protéica em câncer.

1.2.1. Metilação de proteínas

Metiltransferases de proteínas são enzimas que catalisam a transferência de grupos metil (CH_3) a partir de um substrato S-adenosil metionina (SAM) para resíduos de arginina ou lisina na porção nucleofílica da cadeia de aminoácidos (**figura 3**). A metilação constitui, portanto, uma modificação pós-traducional de proteínas e, atualmente, tem sido mais estudada em histonas (Black, Van Rechem et al. 2012).

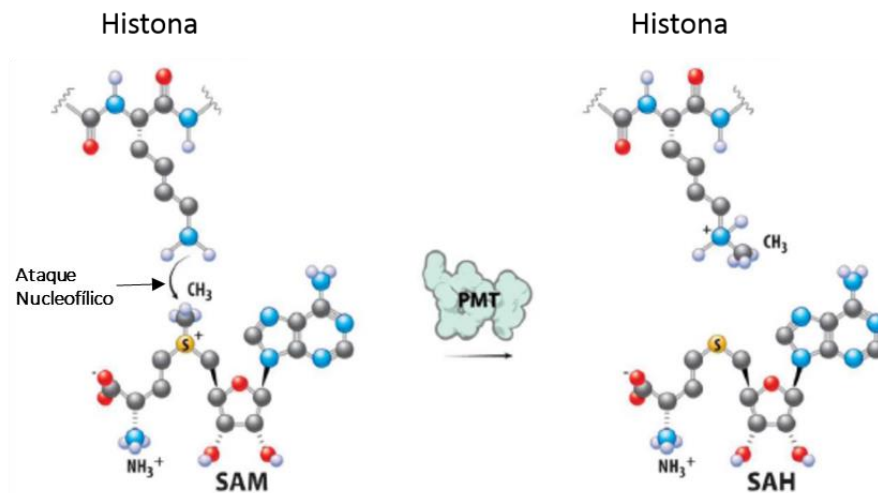


Figura 3 – Reação genérica de transferência de grupamentos metil $\text{S}_{\text{N}}2$ a partir do substrato SAM para a cadeia lateral de resíduos de lisina ou arginina de histonas, conforme catalisada por metiltransferases de proteínas (PMT). SAH (S-Adenosil-Homocisteína) constitui um subproduto da reação, resultante da doação do grupamento metil do substrato SAM. Adaptado de Copeland *et al.* (2013) (Copeland, Moyer et al. 2013).

O nucleossomo, conhecido como a unidade básica da cromatina, é composto por 145-147 pares de bases de DNA que envolvem octâmeros de histonas que, por sua vez consistem em duas cópias de cada um dos subtipos de histonas H2A, H2B, H3 e H4, conforme ilustra a **figura 4**.

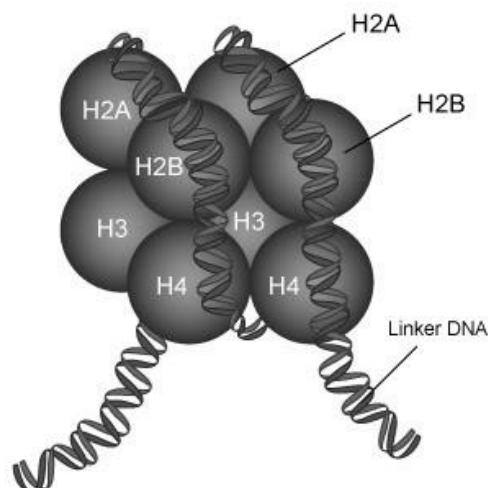


Figura 4 – Ilustração do nucleossomo com as 8 proteínas histônicas (um par de cada um dos subtipos H2A, H2B, H3 e H4) envolvidas pela dupla fita de DNA, que circunda o núcleo de histonas por 1,6 voltas em um comprimento de 146 pares de base. O DNA que não envolve o núcleo histônico é denominado DNA de ligação (Linker DNA). Retirado de PennState (2009) (PennState 2009)

Neste nível, sabe-se que as modificações covalentes que ocorrem em resíduos de lisinas e/ou argininas das extremidades N-terminal das histonas H3 e H4, estão envolvidas diretamente no controle da expressão gênica através do remodelamento da cromatina. No que tange a metilação de histonas, cada um dos seus resíduos de aminoácidos pode receber um ou dois grupamentos metil. No caso de lisinas, é possível, ainda, a adição de um terceiro grupo metil (**figura 5**). As modificações podem também ocorrer em um único resíduo das histonas ou simultaneamente em múltiplos aminoácidos.

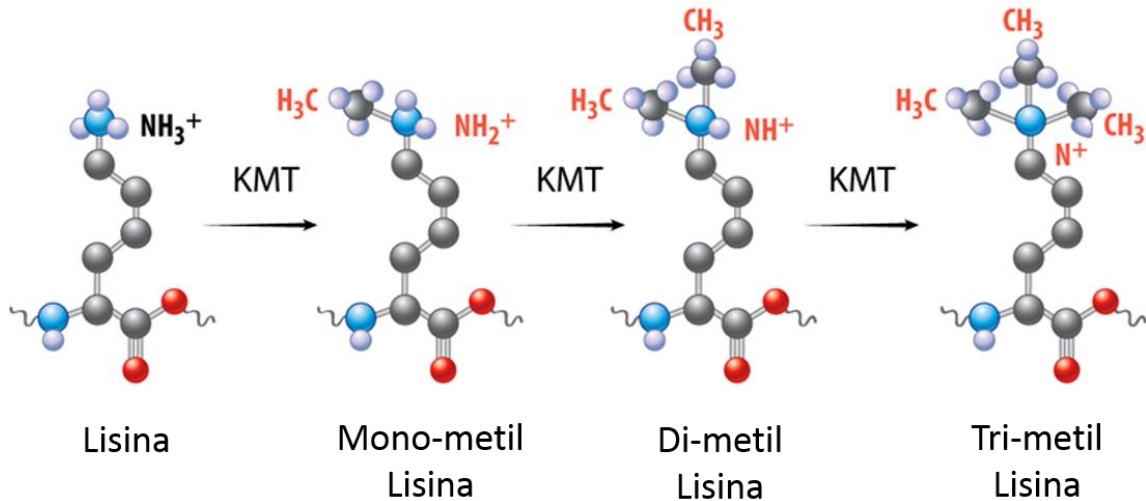


Figura 5 – Diversidade de estados químicos obtidos pela metilação sequencial de resíduos de lisina catalisada por diversas famílias de metiltransferases de lisina. Adaptado de Copeland *et al.* (2013) (Copeland, Moyer et al. 2013)

A atividade de histona metiltransferase em resíduos de lisina e arginina é catalisada por uma família de enzimas com um domínio catalítico conservado denominado SET (Suppressor of variegation, Enhancer of Zeste, Tritothorax). Até 2012 haviam sido descritas 50 proteínas com domínios SET e uma histona metiltransferase DOT1L que não contém o referido domínio (Albert and Helin 2010; Biancotto, Frige et al. 2010; Wagner and Jung 2012). A **figura 6** exemplifica os domínios conservados de algumas famílias de metiltransferases de lisinas.

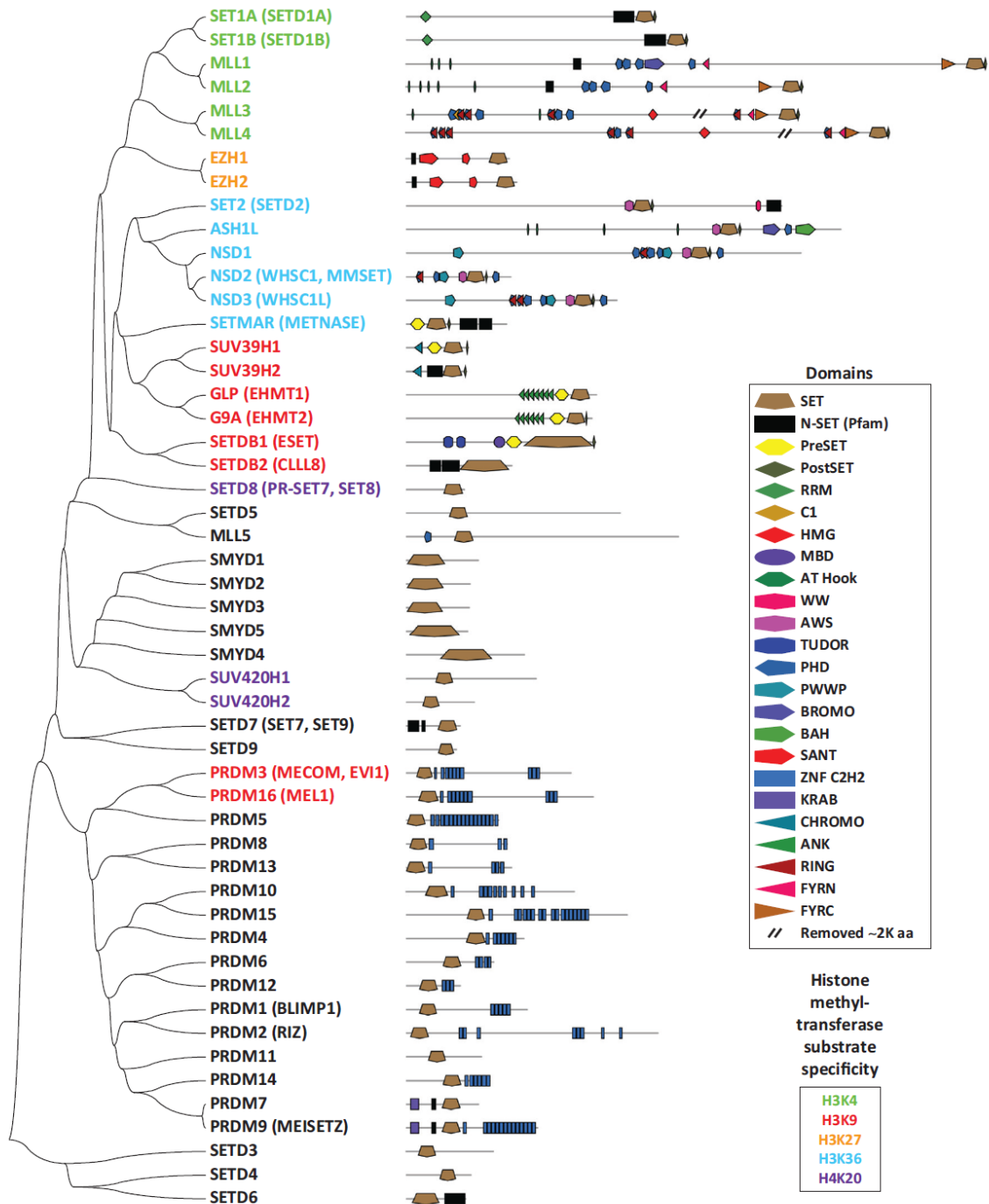


Figura 6 – Domínios conservados de metiltransferases de lisina. As características estruturais conservadas são indicadas de acordo com a legenda. Adaptado de Herz *et al.* (2013) (Biancotto, Frige *et al.* 2010; Herz, Garruss *et al.* 2013).

Do ponto de vista ortológico as metiltransferases de lisina e arginina podem ser subdivididas em famílias conforme a similaridade com o domínio canônico SET de *Drosophila*, como ilustram as **figuras 7 e 8**.

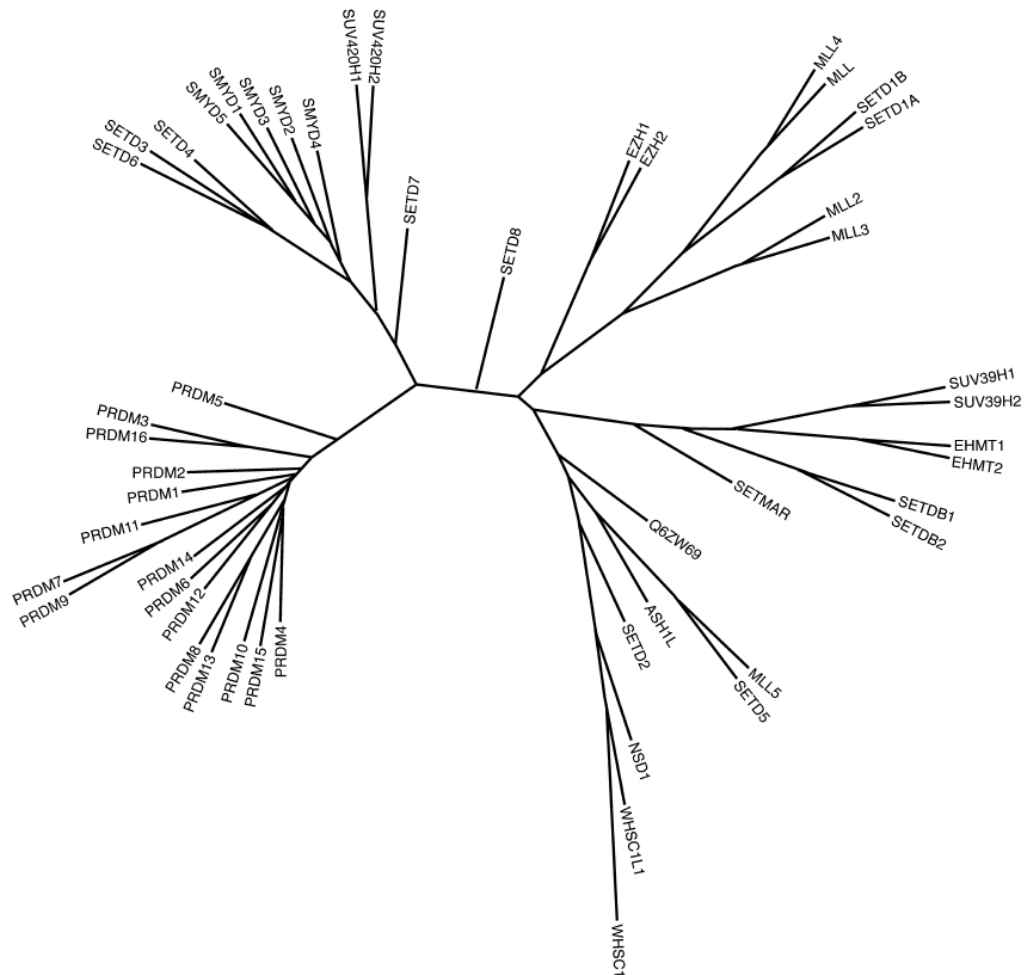


Figura 7 – Famílias de metiltransferases de lisina conforme similaridade com domínio SET de *Drosophila*. O comprimento dos ramos do diagrama em árvore é proporcional à distância de similaridade entre os vários membros das famílias. Retirado de Richon *et al.* (2011) (Richon, Johnston *et al.* 2011).

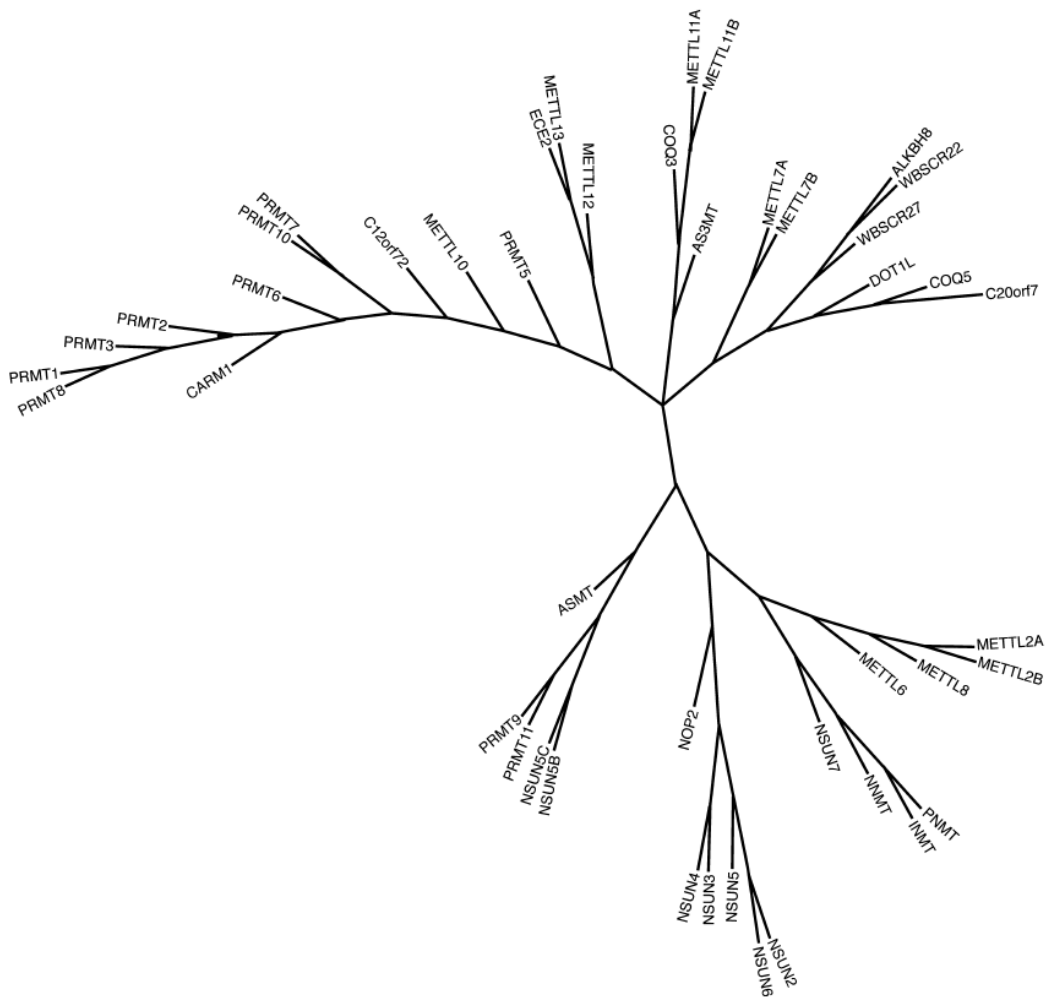


Figura 8 – Famílias de metiltransferases de arginina conforme similaridade com domínio SET de *Drosophila*. O comprimento dos ramos do diagrama em árvore é proporcional à distância de similaridade entre os vários membros das famílias. Retirado de Richon *et al.* (2011) (Richon, Johnston et al. 2011).

Diferente da repercussão biológica induzida pela acetilação de histonas, que parece estar mais relacionada a liberação da transcrição gênica, o efeito da metilação de resíduos nas histonas é dependente da quantidade de grupos metil adicionados (mono, di ou tri-metilação) e de qual resíduo de aminoácido sofreu a modificação. Desta forma, a metilação pode tanto compactar a cromatina, impedindo a transcrição, quanto pode descompactá-la, permitindo a atividade de transcrição do gene (Greer and Shi 2012).

Alguns padrões de metilação parecem, no entanto, se relacionar mais a determinadas consequências biológicas. Por exemplo, a metilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4) ao redor do sítio de início de transcrição (SIT) e a metilação das H3K36 e H3K79 na região codante

estão associadas com transcrição ativa. A metilação das H3K9 e H3K27 em regiões correspondentes a promotores se correlacionam com repressão transcricional (Lohrum, Stunnenberg et al. 2007; Albert and Helin 2010). A **figura 9** ilustra esses e outros perfis de assinatura epigenética em nível das modificações em caudas de histonas e suas possíveis repercussões.

No conjunto, o perfil, não apenas de metilação, como também das outras modificações pós-traducionais de histonas, causam impacto na dinâmica estrutural dos nucleossomos, afetando o acesso dos fatores de transcrição à fita de DNA (Greer and Shi 2012), constituindo o que se convencionou denominar código de histonas.

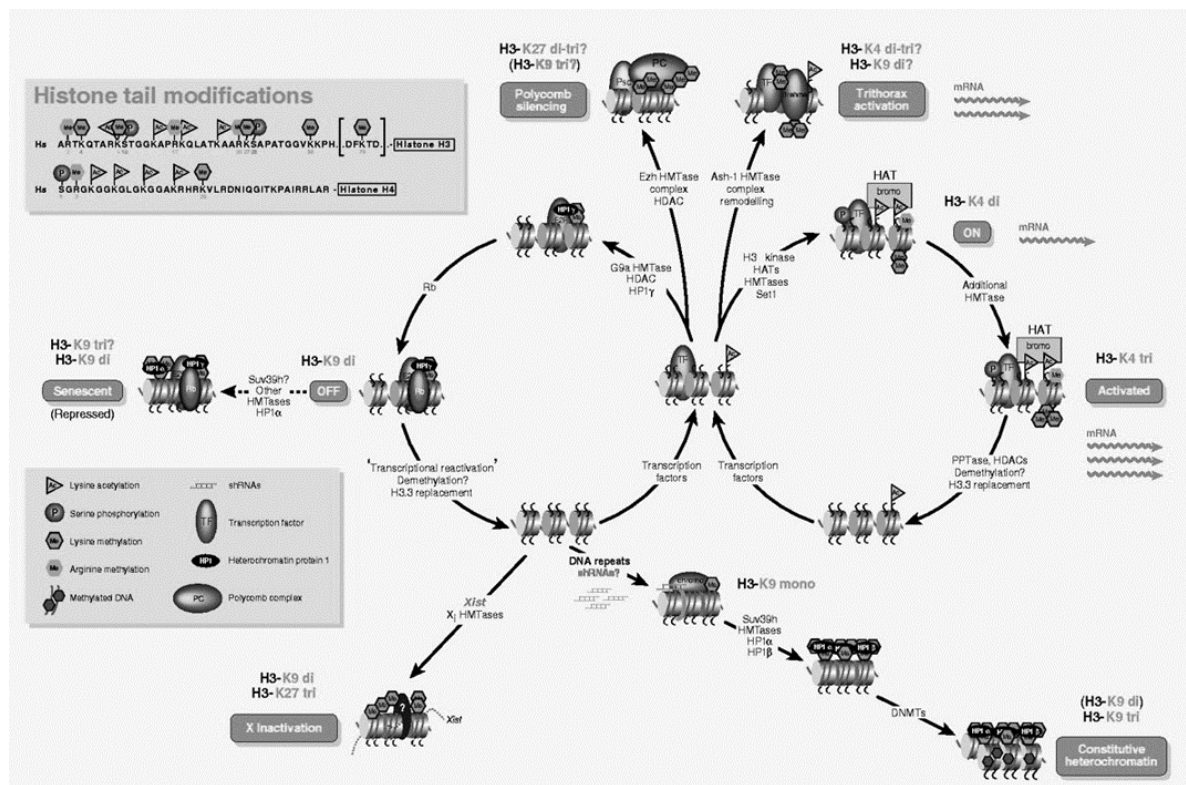


Figura 9 – Mapa epigenético para metilação de lisinas de histonas. Retirado de Lachner *et al.* (2003) (Lachner, O'Sullivan et al. 2003).

De fato, sabe-se hoje que a dinâmica de metilação das histonas tem importante papel em muitos processos fisiológicos como controle do ciclo celular, senescência, resposta ao estresse e ao dano ao DNA, bem como patológicos como em doenças neurológicas e câncer (Greer and Shi 2012).

Inicialmente as evidências que ligavam a metilação aberrante de histonas ao câncer se limitavam a correlação de determinados perfis às alterações de expressão de genes sabidamente envolvidos na carcinogênese. Kondo *et al.* (2003), por exemplo, demonstraram que a redução dos níveis de metilação de H3K4 e o aumento da metilação de H3K9, em conjunto com a metilação do DNA na região promotora, estão associados com o silenciamento dos genes p16, MLH1 e MGMT em câncer colorretal (Kondo, Shen et al. 2003). Posteriormente, o nível global de metilação de lisinas foi relacionado também a uma maior taxa de recorrência e óbito em determinados tipos de neoplasias. Park *et al.* (2008) demonstraram, através de estudo de imunohistoquímica, que o aumento dos níveis globais de trimetilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9me3) se correlacionava com pior prognóstico em adenocarcinoma gástrico (Park, Jin et al. 2008). Barlesi *et al.* (2007) verificaram, através de estratégia similar ao estudo anteriormente citado, que, em adenocarcinoma não-pequenas células de pulmão, a redução dos níveis globais de H3K4me2 parece estar relacionada com pior prognóstico da doença (Barlesi, Giaccone et al. 2007).

Além disso, observou-se que a desregulação da atividade das próprias metiltransferases de histonas também estava associada a maior agressividade de determinados tipos de cânceres e, em alguns casos, podia também estar relacionada ao próprio processo carcinogênico (Albert and Helin 2010). Um dos trabalhos pioneiros nessa área foi publicado por Hamamoto *et al.* (2004), em que descreveu-se que o gene *SMYD3* estava altamente expresso em células tumorais, em comparação com as normais e, além disso, tinha função crítica na proliferação de linhagens de carcinoma hepatocelular e colorretal (Hamamoto, Furukawa et al. 2004). O mesmo grupo identificou também que a expressão aberrante do gene *SMYD3* constituía um fator de risco para o desenvolvimento desses tipos de tumores. Ainda em relação à este gene, Hamamoto *et al.* (2006) descreveram que o mesmo estava relacionado à carcinogênese em tumores de mama (Hamamoto, Silva et al. 2006) e que a modulação da estrutura da cromatina induzida por ele estava relacionada a sua atividade específica intrínseca de metilação H3K4 (Silva, Hamamoto et al. 2008).

Bracken *et al.* (2003) mostraram que o gene *EZH2*, uma metiltransferase que contém domínio SET, é altamente expressa em vários tipos de tumores humanos e é essencial para a proliferação de células humanas transformadas e não-transformadas (Bracken, Pasini et al. 2003).

Em adição, foi demonstrado que, além da influência na carcinogênese através de sua ação de modificação pós-traducional em histonas, algumas metiltransferases protéicas também

exercem o mesmo papel em nível de proteínas não histonas. Kunizaki *et al.* (2007) descobriram que a metilação da lisina 831 induzida por *SMYD3* é capaz de aumentar a função de tirosina cinase do receptor 1 de *VEGF* (*VEGFR1*) (Kunizaki, Hamamoto et al. 2007), o que indica a importância da ação das metiltransferases de proteínas como reguladoras de sinalização intracelular durante a carcinogênese.

Saddic *et al.* (2010) demonstraram que a proteína do gene RB (Retinoblastoma) pode ser metilada por *SMYD2* na lisina 860 e que essa modificação é capaz de reprimi-la funcionalmente (Saddic, West et al. 2010).

1.2.2. O papel dos rearranjos com o gene *MLL* nas LLA da infância

A hipótese principal do presente estudo, que consiste no questionamento sobre um possível papel de metiltransferases de proteínas na leucemogênese e determinação prognóstica de crianças com LLA, não se embasou apenas no fato de o tema ser pouco estudado, mas sim em uma evidência já amplamente conhecida pelos oncologistas: a influência dos rearranjos somáticos que envolvem o gene *MLL* (Mixed Lineage Leukemia) localizado na região cromossômica 11q23 em leucemias de adultos e da infância (Muntean and Hess 2012).

As anormalidades cromossômicas estruturais que envolvem essa região, constituídas geralmente por translocações, deleções ou duplicações parciais, estão associadas com prognóstico reservado em leucemias agudas e estão presentes em cerca de 5-10% das LLA pediátricas (Pui, Behm et al. 1994). Em leucemias de lactentes (crianças menores de 1 anos com LLA ou LMA) esse porcentual chega a 50-70% (Pui, Ribeiro et al. 1996) e, em leucemias secundárias ao uso de epipodofilotoxinas, são encontradas em 85% (Felix, Hosler et al. 1995). Os rearranjos mais frequentemente descritos fusionam a região N-terminal de *MLL* com uma miríade de parceiros de translocação que incluem as regiões codificadoras dos genes: *AF4*, *AF9*, *ENL*, *AF10*, *AF6*, *ELL*, *AF1P*, *AF17* e *SEPT6* (Muntean and Hess 2012).

1.2.3. Papel do gene *MLL* no desenvolvimento do sistema linfóide e na leucemogênese

O sistema imunitário dos mamíferos é composto por 3 principais populações celulares linfóides: células B, células T e células NK (Natural Killer), que surgem embrionariamente a

partir de progenitores localizados nos órgãos linfoides centrais, tais como o fígado fetal, medula óssea e timo.

Essas populações podem ser reconhecidas através da expressão de antígenos de superfície celular ou intracitoplasmáticos, específicos do seu estado de maturação ou mesmo do subtipo funcional da célula. À semelhança dos outros tipos celulares que compõem o sangue, os linfócitos também se originam de células tronco hematopoiéticas que possuem capacidade de autoreplicação e de produzirem todos os tipos celulares do sistema hematopoiético (Bryder, Rossi et al. 2006).

Em condições fisiológicas, o gene *MLL* codifica uma metiltransferase de histonas que regula a transcrição, entre outros alvos, de genes da família *HOX*, essenciais durante os processos de formação do plano corporal no desenvolvimento embrionário e de ontogênese hematopoiética (Milne, Briggs et al. 2002; Argiropoulos and Humphries 2007). A proteína codificada em mamíferos é composta por 3969 resíduos de aminoácidos e é homóloga a proteína trithorax (*trx*) encontrada em *Drosophila*.

Para a embriogênese correta os genes da família *HOX* devem ser expressos de uma forma espaço-temporal estritamente refinada. Bernstein *et al.* (2006) mostraram em células tronco embrionárias que os genes da família *HOX* possuem uma assinatura epigenética bivalente com grandes áreas de metilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27), condição associada a um estado transcricionalmente silenciado, entremeadas por pequenas áreas de metilação de lisina 4 da histona H3 (H3K4), que são associadas a transcrição ativa. Os grupamentos metil especificamente nesses resíduos de lisina são depositados por *EZH2* (outro codificador de metiltransferase de lisinas) e genes do complexo *MLL*, respectivamente. Acredita-se que essa assinatura bivalente seja característica de genes que regulam o desenvolvimento embrionário e confere às regiões codificadas uma capacidade de pronta ativação transcricional pela RNA polimerase II no local e momento corretos (Bernstein, Mikkelsen et al. 2006).

No contexto patológico das leucemias com translocação envolvendo *MLL*-*AF9*, Krivtsov *et al.* (2006) mostraram que o seu produto protéico quimérico induz, nos progenitores granulócitos/macrófagos, uma assinatura de expressão gênica semelhante àquela observada nas células tronco hematopoiéticas, incluindo a expressão de vários genes da família *HOX*. Essa assinatura de expressão gênica nesses progenitores pode contribuir para a capacidade de auto-replicação das células tronco leucêmicas (Krivtsov, Twomey et al. 2006).

1.2.4. Justificativa para a escolha dos genes estudados

Face, portanto, às evidências do papel da atividade aberrante de metiltransferases protéicas tanto na carcinogênese quanto na determinação prognóstica de determinados tipos de tumores em adultos, bem como à já amplamente descrita influência da expressão alterada do gene *MLL* em leucemias de lactentes, o objetivo geral deste estudo foi investigar a possível influência de outras metiltransferases de lisinas em LLA da infância.

Além de investigar os genes da família *MLL*, já amplamente caracterizados por vários grupos de pesquisa, selecionamos, em especial, os genes da família *SETD* e *SMYD* pelo fato de alguns já terem função reconhecida na carcinogênese de tumores sólidos, mas ao mesmo tempo, por possuir membros pouco estudados em sua possível relação com a origem e evolução da leucemia. Além disso, incluímos no rastreamento inicial também representantes das famílias *EHMT* e *SUV39H* devido a existência de dados na literatura sobre a possível influência desses genes na carcinogênese de tumores sólidos (Lu, Tian et al. 2013; Cai, Ma et al. 2014).

O gene *EHMT2*, por exemplo, codifica uma proteína com atividade metiltransferases de lisina 9 da histona H3 (H3K9me2), uma marca epigenética classicamente associada ao silenciamento gênico (Tachibana, Sugimoto et al. 2002; Tachibana, Matsumura et al. 2008). Lu et al. (2013) mostraram, em linhagens de neuroblastoma humano, que a inibição farmacológica seletiva de *EHMT2* era capaz de diminuir os níveis de H3K9me2 *EHMT2*-induzida. Além disso, os autores verificaram que essa inibição acarretava na diminuição da taxa de proliferação celular dessas linhagens, bem como no aumento da apoptose através da via das caspases (Lu, Tian et al. 2013).

Cai et al. (2014) verificaram que a hiperexpressão do gene *Suv39H1* e a presença de H3K9me3 se correlacionavam com estádios avançados e presença de metástases em pacientes com carcinoma gástrico. Além disso, os autores demonstraram que o silenciamento do gene com siRNA era capaz de induzir apoptose e diminuir a taxa de proliferação celular em linhagens MGC803 de carcinoma gástrico (Cai, Ma et al. 2014).

Tendo em vista que outras metiltransferases de lisinas, à exceção do *MLL*, nunca foram descritas como aberrantemente expressas em LLA da infância, acreditamos que nosso estudo contribui para o incremento dos conhecimentos sobre a biologia dessa doença e, especialmente, possibilitou correlacionar novos achados com características clínicas de um número relevante de pacientes.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi verificar um possível papel da expressão de genes codificadores de metiltransferases de proteínas no desenvolvimento e prognóstico de leucemias linfóides agudas da infância.

Os objetivos específicos foram:

1. Determinar o perfil de expressão de genes codificadores de metiltransferases de lisina em amostras de medula óssea de crianças portadoras de LLA, no momento do diagnóstico.
2. Comparar o nível de expressão de genes codificadores de metiltransferases de lisinas nas amostras de leucemia e em amostras de medula óssea não-neoplásicas.
3. Verificar a existência de correlação entre o nível de expressão dos genes, que se mostraram diferencialmente expressos, com fatores prognósticos clássicos em LLA da infância.
4. Determinar, através de ensaios de proliferação celular em linhagens de leucemia, o efeito da inibição da expressão dos genes diferencialmente expressos por siRNA.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

No serviço de oncologia e hematologia pediátrica do Hospital da Criança de Brasília, realiza-se, rotineiramente, no momento do diagnóstico das LLA da infância, a pesquisa de translocações recorrentes através de RT-PCR qualitativa, a saber: t(12;21), t(1;19), t(9;22), t(4;11) e del1p.

A realização desse exame requer a obtenção de RNA para a detecção dos transcritos de fusão, os quais são produtos das translocações supracitadas. Após a realização da pesquisa, o RNA restante é estocado em freezer -80°C para pesquisas posteriores. Parte deste RNA foi, portanto, utilizado para a realização do presente estudo.

As amostras de medula óssea foram, desta forma, obtidas ao diagnóstico da leucemia sem uso prévio de quaisquer medicamentos antineoplásicos, sob consentimento livre e esclarecido do responsável pelo paciente (projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FEPECS, protocolo CEP 555/11, com número de aprovação no SISNEP: 0528.0.013.012-11). Oito amostras de medula óssea de pacientes portadores de púrpura trombocitopênica idiopática serviram de controle não-neoplásico para as reações de PCR.

Foram selecionados casos consecutivos diagnosticados no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2011 e que possuíam material de medula óssea estocada com quantidade e qualidade suficientes para a análise de expressão gênica por PCR em tempo real.

Também de forma rotineira, o serviço coleta, através de aspirado de medula óssea, amostras nos 15º e 29º dias de terapia para a avaliação do grau de resposta ao tratamento quimioterápico indutório. Essas amostras também são estocadas em freezer -80oC para posterior pesquisa de Doença Residual Mínima (DRM). Algumas dessas amostras também foram utilizadas para investigação neste trabalho.

3.2. COLETA DE DADOS CLÍNICOS

As características clínicas dos pacientes foram compiladas em banco de dados específico para este estudo a partir das informações contidas nos prontuários médicos. Os

seguintes dados foram coletados: nome, registro, data de nascimento, gênero, data do diagnóstico, leucometria ao diagnóstico, porcentual de blastos na medula óssea ao diagnóstico, presença de infiltração do sistema nervoso central ao diagnóstico, alterações citogenéticas por bandeamento G, imunofenotipagem dos linfoblastos, presença de translocações recorrentes por PCR convencional, classificações citomorfológicas nos 15º e 29º dias de terapia indutória, presença e data de recaída, presença e data do óbito e data do último seguimento.

Todos os pacientes foram submetidos ao protocolo terapêutico GBTLI-93 (Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemias da Infância) quando possuíam leucemia de imunofenótipo B (de Oliveira, Viana et al. 2004) ou ao protocolo BFM-95 (Berlim-Frankfurt-Munike) quando imunofenótipo T (Lauten, Moricke et al. 2012).

3.3. ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E EXTRAÇÃO DE RNA

Todas as amostras, inclusive controles não-neoplásicos, foram submetidas aos mesmos métodos de isolamento de células mononucleares e extração de RNA. Resumidamente, as amostras de medula óssea aspiradas foram armazenadas em tubos contendo EDTA e, no mesmo dia da coleta do material, submetidas a citocentrifugação com gradiente de Ficoll-histopaque (GE Life Science, densidade=1077g/dL) a 1000g, temperatura ambiente. A camada de células mononucleares foi isolada em tubo tipo eppendorf e submetida a 2 lavagens com PBS 1X (NaCl 8g / KCl 0,2g / Na₂HPO₄ 1,44g / KH₂PO₄ 0,24g – q.s.p. 1000mL) homogeneizada em 1mL de solução de TRIzol® (Life Technologies) e armazenada em freezer -80°C.

A extração de RNA seguiu as recomendações do reagente TRIzol® na seguinte sequência:

- a amostra armazenada em TRIzol® foi homogeneizada por 5 minutos à temperatura ambiente
- 0,2mL de clorofórmio foram adicionados ao tubo e vigorosamente vortexados por 15 segundos
- Centrifugação a 12000g por 15 minutos a 4°C
- Remoção da fase aquosa, reservando-a em tubo eppendoff seco RNase-free
- Resto da fase fenólica era armazenado em -80°C para posterior extração de DNA se necessária

- Precipitação do RNA adicionando-se 0,5mL de isopropanol puro gelado a fase aquosa, com incubação a temperatura ambiente por 10 minutos
- Centrifugação a 12000g por 10 minutos a 4°C
- Retirada do sobrenadante e ressuspensão do pellet em 1mL de etanol 75% gelado.
- Centrifugação a 7500g por 5 minutos a 4°C
- Remoção do sobrenadante e eluição do RNA em água RNase-free, após evaporação do etanol.

A qualidade do RNA extraído foi verificada através de aferição da absorbância nos comprimentos de onda 260 e 280nm e do cálculo da relação entre as densidades ópticas obtidas nos dois comprimentos no espectrofotômetro Nanovue® (GE LifeScience).

Cerca de 500ng de RNA foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% para visualização das bandas 18 e 28S do RNA ribossomal, a fim de se verificar a integridade do RNA extraído e possíveis contaminações com DNA genômico.

Após o processo de extração de RNA, observou-se que algumas delas não apresentaram qualidade ou quantidade adequada para a realização da RT-qPCR para a grande quantidade de genes a serem avaliados e, portanto, foram excluídas do estudo. No geral, entretanto, tanto a qualidade, quanto a quantidade de RNA extraídos foram adequadas.

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1µg de RNA total com kit High-Capacity® (AppliedBiosystems) conforme instrução do fabricante.

3.4. ENSAIOS DE QPCR

O cDNA sintetizado a partir do RNA das amostras foi utilizado como “template” para os ensaios de RT-PCR em tempo real (qPCR). A quantificação relativa para todos os genes pesquisados foi realizada em placas de 96 poços, em volume final de reação de 10µl, utilizando-se o equipamento StepOne Plus® (AppliedBiosystems, Foster City, CA). Cada reação de PCR foi realizada em poços separados para cada ensaio gene-específico, em triplicatas idênticas para cada amostra. Tendo em vista que não foi possível a corrida de todas as amostras em triplicatas em uma única placa para um único gene, optou-se por inserir uma amostra de controle de placas. Ou seja, uma única amostra, proveniente de uma única síntese de cDNA que foi colocada em triplicata em todas as placas. Espera-se, com isso, verificar possíveis variações de eficiência de

reação para o mesmo ensaio em placas e corridas de PCR separadas. Aceitou-se uma variação de Cq (Cycle of quantification) para a amostra controle de até 1 Cq de diferença entre uma placa e outra.

A solução final de reação continha: 1 μ L de cDNA, 5 μ L de Master Mix (AppliedBiosystems, Foster City, CA), 0,5 μ L ensaio Taqman (Gene Expression Assay, AppliedBiosystems, Foster City, CA) e 3,5 μ L de água ultrapura (Invitrogen).

As condições de ciclagem da PCR foram as seguintes: 95°C 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C 15 segundos e 60°C 40 segundos. O gene beta-actina (*ACTB*) foi usado como normalizador das quantificações relativas dos genes-alvos, utilizando-se o ensaio inventariado Taqman FAM-MGB (# 4331182). No total, foram analisados 22 genes codificadores de metiltransferases: *EHMT1*, *EHMT2*, *MLL*, *MLL2*, *MLL3*, *MLL4*, *MLL5*, *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6*, *SETD7*, *SETD8*, *SETMAR*, *SMYD1*, *SMYD2*, *SMYD4*, *SMYD5* e *SUV39H1*. Todos os ensaios de PCR em tempo real utilizados são inventariados pela Life Technologies e, portanto, já validados pela própria empresa. Ainda assim, realizamos, para todos os genes, testes de padronização com curvas de diluição de cDNA de amostras de linhagens celulares de câncer. Foram utilizados apenas ensaios que mostraram curvas de diluição com eficiência entre 90-110%, seguindo as recomendações MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR) (Bustin, Benes et al. 2009). A **tabela 5** sumariza os contextos de sequência para os quais os ensaios são direcionados, bem como algumas características conhecidas dos genes estudados.

Tabela 5 – Características dos genes codificadores de metiltransferases de lisinas que foram avaliados inicialmente no estudo piloto

Famílias	Símbolo	Nome do Gene	Localização Genômica	Contexto da Sequência	Exon Alvo	Reporter 1 Quencher	Referência NCBI	Tamanho da Proteína (aa)	Dominios Conservados
EHMT	EHMT1	euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1	9q34.3	CAAATCACAGACAGCTTGCTTGCC	2	NFQ	NM_001145527.1	1267	SET, pre-SET, ANK
	EHMT2	euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2	6p21.31	ACGCCAGGACAGTGGGGGGTGAC	15	NFQ	NM_025256.5	1210	SET, PHD, BROMO, BAH, AWS
MLL	MLL	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	11q23	AAATGAACAAGAAAGTGCGAACCT	29	NFQ	NM_001197104.1	3969	SET, PHD, post-SET, HMG
	MLL2	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	12q12-q14	ACACACTACAACCGGCCCATACCC	51	NFQ	NM_003482.3	5262	SET, PHD, post-SET, HMG
	MLL3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3	7q36.1	AACCATACAGACCAGGTATTGGTGG	24	NFQ	NM_17606.2	4911	SET, PHD, post-SET, HMG
	MLL4	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 4	19q13.1	ACCACTATTGAGGTGAGGCTTCGAG	33	NFQ	NM_014727.1	2715	SET, PHD, post-SET, HMG
	MLL5	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5 (trithorax homolog, Drosophila)	7q22.1	GTGACAAATGCA GCGTTGGCAACA	1	NFQ	NM_182931.2	1858	SET, PHD, Atrophon-1
SET	SETD1A	SET domain containing 1A	16p11.2	AGTCCCTAAGTTTAAAGCTGGACGAG	3	NFQ	NM_014712.1	1707	SET, RRM
	SETD1B	SET domain containing 1B	12q24.31	CGCAGACCCAGGGCATGAGCATC	3	NFQ	NM_015048.1	804	SET, post-SET
	SETD2	SET domain containing 2	3p21.31	CTCCACCAATTGTACAGATTATGC	13	NFQ	NM_014159.6	1845	SET, post-SET, AWS
	SETD3	SET domain containing 3	14q32.2	ACCAACGGCCTGACTACTGGTT	7	NFQ	NM_032233.2	214-594	SET
	SETD4	SET domain containing 4	21q22.13	AA GCTGAGAAATTTACATGCTGGAA	9	NFQ	NM_017438.3	440	SET
	SETD5	SET domain containing 5	3p25.3	CCTGTAA GAA GCGCTGGATAAAACA	2	NFQ	NM_001080517.1	924	SET (?)
	SETD6	SET domain containing 6	16q21	CTAGAATACTCTGCGAATTGCTTC	6	NFQ	NM_001160305.1	473	SET
	SETD7	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7	4q28	CTTCTTTGATGGCAGCACCTGGAG	2	NFQ	NM_030648.2	366	SET
	SETD8	SET domain containing (lysine methyltransferase) 8	12q24.31	GGGAGGCTCTGTACGCACAGGACC	11	NFQ	NM_020382.3	393	SET
	SETMAR	SET domain and mariner transposase fusion gene	3p26.2	GGCGCCCTCCAGTACTCTCTGAT	1	NFQ	NM_006515.3	429	SET, pre-SET, Transposase 1
SMYD	SMYD1	SET and MYND domain containing 1	2p11.2	ATGAGAACATCAGGCTGGCGGCGG	2	NFQ	NM_198274.3	490	SET, zf-MYND
	SMYD2	SET and MYND domain containing 2	1q41	GCCCTGAAGAAGGCCATTGCAATCA	10	NFQ	NM_020197.2	433	SET, zf-MYND
	SMYD4	SET and MYND domain containing 4	17p13.3	CGCCATGCAGGGAGATGACGTGCT	7	NFQ	NM_052928.2	804	SET, TPR
	SMYD5	SMYD family member 5	2p13.2	TGAGCAGCGCAAAGGAAAGGGGCT	1	NFQ	NM_006062.2	302, 412	SET
	SUV	SUV39H1	suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)	Xp11.23	CGGAAAATTTAAAGGCTGCAGCGT	1	NFQ	NM_003173.2	412

3.5. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL DE AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA

A partir do resto das amostras utilizadas para extração de RNA pelo método do reagente Trizol, tentou-se extrair proteína total conforme recomendado pelo próprio fabricante do reagente. Verificamos, no entanto, que, apesar de gerar quantidades expressivas de proteína, as amostras provenientes desse material não foram adequadas aos estudos com anticorpos. Optamos, portanto, por utilizar amostras com mononucleares que foram criopreservados a -80°C sem a adição do reagente TRIzol® para o estudo protéico.

A composição e concentrações do tampão de extração de proteínas foram as seguintes: Hepes 50mM pH7,5, NaCl 150mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, NP-40 1%, Triton-X100 0,5%, inibidor de proteases (Roche) 1 tablete/10mL.

O pellet de mononucleares armazenado no freezer -80°C era imediatamente incubado em 1mL de tampão de extração de proteínas gelado por 30 minutos. A cada 10 minutos a amostra era homogeneizada vigorosamente por pipetagem durante 1 minuto.

Em seguida, os extratos eram centrifugados a 10000g por 20 minutos a 4°C .

O sobrenadante com o extrato protéico total era armazenado em tubo seco e estocado a -80°C após congelamento rápido em nitrogênio líquido.

Cerca de 100 μL do lisado total eram utilizados para quantificação de proteínas pelo método espectrofotométrico de Bradford.

3.6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E WESTERN-BLOT

Os experimentos de WB com as amostras de pacientes foram realizados com 10 μg de extrato protéico total por poço.

Resumidamente, o lisado protéico total foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (gel concentrador a 4% e separador a 10%) a amperagem fixa de 20mA até saída do azul de bromofenol pela porção inferior do gel. As proteínas foram transferidas para membrana PVDF 0,2 μm em sistema tanque com tampão de transferência contendo: Tris-base 10mM, glicina 0,1M e metanol 10%.

A transferência foi realizada sob amperagem fixa de 400 mA por 3 horas em sistema de resfriamento. Após a transferência a membrana era incubada em solução bloqueadora (TBS-T + leite desnatado 5%) e, em seguida, em solução contendo o anticorpo primário contra a proteína de interesse. O anticorpo anti-smyd2 (abcam – ab108217) foi padronizado a uma titulação de 1:10.000. A normalização do “input” de quantidade de proteína foi feita com anticorpo anti-actina (CellSignaling – #4970), utilizado a uma titulação de 1:5000. A incubação com anticorpo primário foi realizada overnight em câmara fria sob agitação constante.

Após lavagens com solução bloqueadora, procedeu-se a incubação com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com HRP (Sigma – MFCD00162788). Utilizou-se a diluição 1:80.000 deste anticorpo. A visualização da membrana foi realizada no fotodocumentador Image Quant (GE Life Science), com kit ECL Prime (GE Life Science), baseado em quimioluminescência. A análise das imagens digitalizadas foi feita com software ImageJ (NIH – National Institute of Health - EUA) e o resultado final dado em porcentual da intensidade da proteína de interesse contra intensidade da actina.

3.7. CULTURA DE LINHAGENS CELULARES DE LLA

Para os estudos de proliferação celular foram utilizadas as linhagens celulares comercialmente disponíveis oriundas de pacientes portadores de LLA: RS4;11, ALL-697, REH e Nalm-6, gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Beatriz Dolabela do Laboratório de Biologia do Gene do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

As referidas linhagens foram cultivadas inicialmente em garrafas de cultura com meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) 10% e antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 100mg/mL).

3.8. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR COM CARBOXIFLUORESCÊNCIA SUCCINIMIDIL ESTER (CFSE)

Tendo em vista que as linhagens de interesse nesse estudo são provenientes de linfoblastos leucêmicos e, portanto, células em suspensão, utilizou-se, como forma de

quantificação da taxa de proliferação celular, o ensaio com CFSE acoplado à citometria de fluxo. Esse reagente, em sua forma inativa, é fornecido na forma de Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Ester (CFDA-SE). Conforme ilustra a figura 5, as moléculas de CFDA-SE penetram passivamente, e de forma inócua, através da membrana plasmática das células e, pela ação de esterases intracelulares são convertidas em CFSE que possui propriedades fluorescentes e, além disso, liga-se covalentemente aos grupamentos aminos de proteínas citoplasmáticas de baixa taxa de degradação. Uma vez ligado às proteínas, o CFSE não mais atravessa a membrana plasmática e, portanto, concentra-se de forma homogênea no citoplasma (Parish 2001).

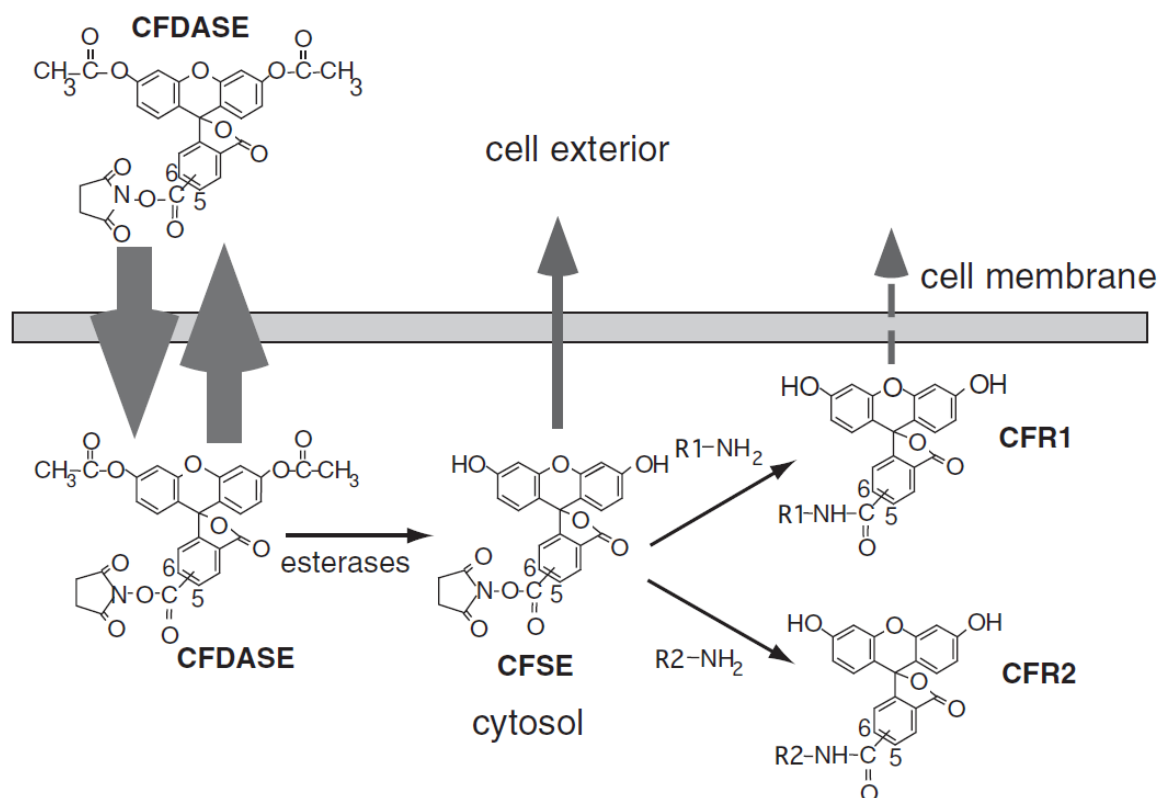


Figura 10 – Representação esquemática das várias etapas de ligação de CFDA-SE às proteínas celulares. Retirado de Parish CR & Warren HS. (2001) (Parish 2001)

Quando as células se dividem, cada célula filha permanece com metade do conteúdo de CFSE que detinha a célula mãe. A fluorescência verde do CFSE pode ser quantificada através de citometria de fluxo em equipamentos com fonte de excitação de 488nm no detector FL1.

Resumidamente, as linhagens celulares em cultura foram isoladas do meio RPMI-1640 através de citocentrifugação à temperatura ambiente e ressuspensas em PBS 1X à 37°C em uma concentração final de 1×10^7 células/mL.

Um total de 6×10^7 células em solução de PBS foi incubado, em um único tubo, com solução de CFSE (CellTrace® CFSE Cell Proliferation Kit - For Flow Cytometry - Life Technologies - #C34554) a uma concentração final de 20µM e incubado a 37°C por 15 minutos protegido da luz. À seguir, as células foram sedimentadas por centrifugação a 300x g por 5 minutos a temperatura ambiente e ressuspensas em meio RPMI-1640 suplementado com SFB 10% e antibiótico e incubadas a 37°C por 30 minutos no escuro. Posteriormente, as células conjugadas ao CFSE foram lavadas com meio RPMI-1640 sem antibiótico 2 vezes e distribuídas em placas de cultura de 6 poços a uma quantidade de 1×10^7 células/poço, em volume final de solução de 2,4mL em cada e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 24 horas.

3.9. SELEÇÃO DE LINHAGENS PARA ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO COM CFSE

A metiltransferase de lisinas *SMYD2* foi escolhida como alvo do estudo de proliferação celular através de siRNA (small interference RNA), devido aos achados encontrados no estudo com amostras clínicas.

A escolha da melhor linhagem celular a ser submetida ao ensaio de proliferação celular com CFSE seguido de silenciamento transiente de *SMYD2* levou em consideração o nível de expressão relativa de *SMYD2* da linhagem e o grau de compatibilidade com o reagente CFSE.

A expressão relativa de *SMYD2* foi quantificada por PCR em tempo real com o mesmo ensaio aplicado às amostras clínicas, utilizando-se como parâmetro de normalização o gene *ACTB* e a média geométrica dos RQ obtidos nas 8 amostras não neoplásicas.

Para verificar o grau de compatibilidade das células ao ensaio com CFSE, tendo em vista que não sabíamos se o mesmo possuía efeito citotóxico em linhagens de leucemia, realizamos um primeiro teste incubando as 4 linhagens com o reagente fluorescente, seguido de um período de 5 dias de cultura com leituras diárias de fluorescência no citômetro conforme mostra a **tabela 6**.

Tabela 6 – Tempos de leitura de fluorescência por citometria de fluxo para escolha da melhor linhagem celular a ser submetida aos experimentos de silenciamento por siRNA

Momento de Leitura	Tempo após incubação com CFSE
D0	Imediatamente após a incubação com CFSE
D1	24h
D2	48h
D3	72h
D4	96h
D5	120h

Observação: D0 não foi colocado na placa, apenas realizou-se a leitura no citômetro imediatamente após a incubação com CFSE.

O experimento foi realizado, em duplicata, em placas de cultura de 6 poços, contendo cada um 1×10^6 células em volume final de 3mL de meio de cultura RPMI 1640. A configuração da placa é ilustrada na **figura 11**.

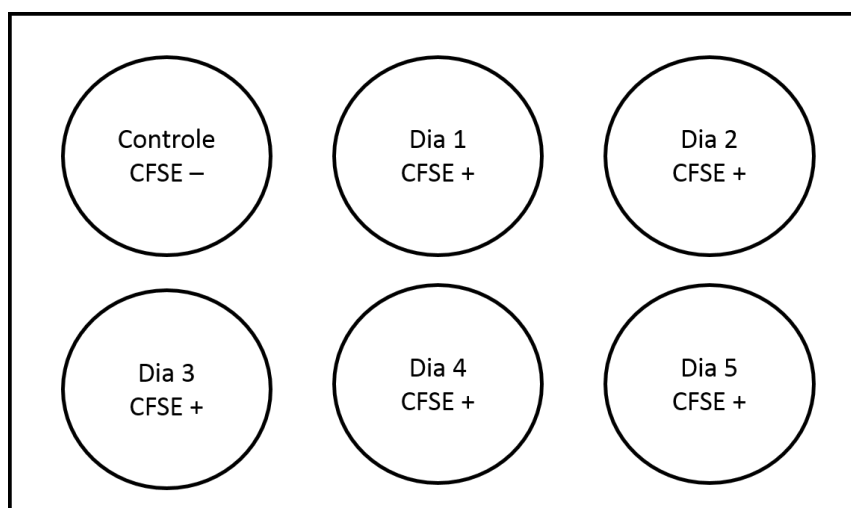


Figura 11 – Configuração da placa de cultura do experimento de calibração de tempos e escolha de linhagens para o ensaio de proliferação. Legenda: CFSE -, células foram mantidas em cultura até o 5º dia de experimento sem incubação com o reagente fluorescente; CFSE +, células incubadas com 20µM de CFSE.

3.10. LEITURA DE SINAL POR CITOMETRIA DE FLUXO

Todas as leituras de citometria de fluxo foram realizadas no equipamento Partec PAS localizado no Laboratório de Nanotecnologia do Instituto de Biologia da UnB. Foram contados de 50.000 a 100.000 eventos em cada leitura. A quantificação de CFSE foi realizada no detector FL1 (488nm), com voltagem de 387,5PnV.

A análise dos dados gerados na leitura pelo citômetro de fluxo foram todas realizadas no software FlowJo ® versão 10.0.7, conforme instrução do fabricante.

Conforme é ilustrado na **figura 12**, primeiramente foram realizadas leituras nos detectores SSC e FSC para verificação de granulosidade e tamanho celulares, respectivamente. Após garantir que a população celular era homogênea (tendo em vista se tratar de linhagens), o histograma com a frequência de detecção em FL1 era elaborado pelo próprio aparelho. Utilizamos, para todas as leituras, a detecção sem seleção de campos (“gates”), por entender que todas as células, teoricamente, se originam de um mesmo clone celular. O resultado do experimento é dado pela intensidade de sinal em FL1 onde existe a maior quantidade de células na população, ou seja, no pico do histograma.

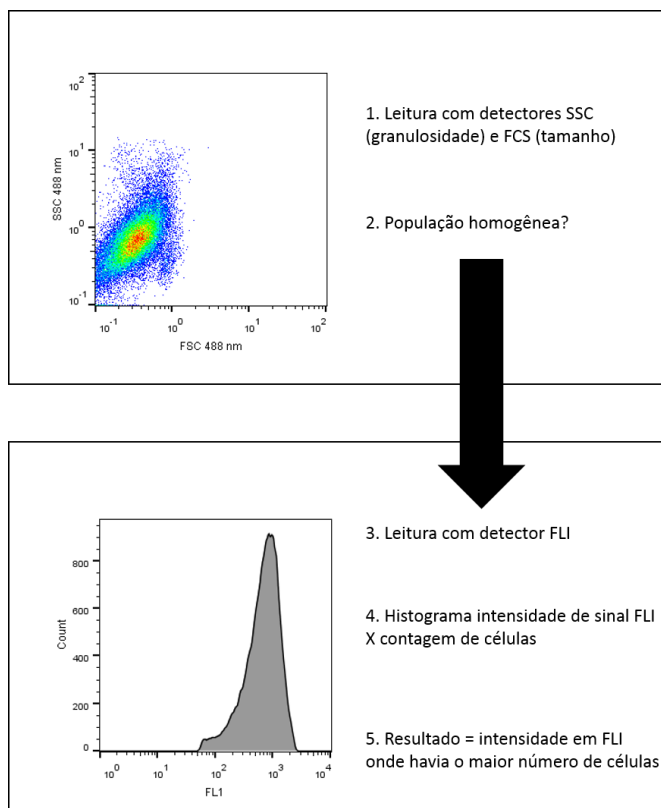


Figura 12 – Passos para a quantificação do sinal de fluorescência de CFSE no detector FLI

3.11. INIBIÇÃO DO CICLO CELULAR COM MITOMICINA C

Tendo em vista que todas as linhagens utilizadas apresentam altas taxas proliferativas, optou-se pela inibição do ciclo celular com mitomicina C (Mitomycin C from *Streptomyces caespitosus* – Sigma #M4287)

Resumidamente, duas alíquotas com cerca de 5×10^7 células diluídas em PBS 1x foram processadas de forma pareada neste experimento. Uma alíquota foi tratada com mitomicina C a uma concentração final de $50 \mu\text{g/mL}$ e incubada a 37°C por 20 minutos protegidas da luz. O mesmo procedimento foi realizado com a segunda alíquota, porém sem a adição de mitomicina C. Em seguida, ambas as alíquotas de células foram centrifugadas a 1000rpm por 3 minutos e ressuspensas em meio RPMI1640 suplementado com SFB 10% e antibióticos.

Cerca de 1×10^7 células de cada uma das alíquotas foram incubadas com CFSE conforme protocolo descrito no item 3.8, e mantidas sob cultivo em placas de 6 poços em

volume final de 3mL de RPMI 1640 suplementado com SFB 10% e antibiótico em incubadora de CO₂ a 37°C por 3 dias para posterior leitura no citômetro de fluxo.

Antes da análise no citômetro, cerca de 100µL de solução de células eram separados para determinação do número e viabilidade celular através de contagem em hemocitômetro e coloração com azul de Trypan.

3.12. INCUBAÇÃO COM CFSE PRÉ-SILENCIAMENTO COM SIRNA

A fim de se utilizar a citometria de fluxo com CFSE para medir a influência do silenciamento de *SMYD2* na taxa de proliferação celular de linhagens, foi necessário realizar a incubação com o reagente fluorescente antes do passo de transfecção com lipofectamina.

Detalhadamente, cerca de 6×10^7 células expandidas em RPMI 1640 suplementado com SFB 10% e antibióticos foram isoladas por citocentrifugação a 1000g, em temperatura ambiente e ressuspensas em 6mL de PBS 1x a 37°C. Esse volume foi dividido em duas alíquotas desiguais. A primeira, com 1mL de volume ou cerca de 1×10^7 células não foi incubada com CFSE e serviu de controle do nível de fluorescência basal das células. Para essa alíquota procederam-se os seguintes passos:

1. Centrifugação a 1000g, temperatura ambiente por 3 minutos;
2. Descarte do sobrenadante e ressuspensão da células em 300µL de meio Opti-MEM I e 2700µL de RPMI160 com SFB 10% sem antibiótico, totalizando 3mL de solução que foram distribuídos no primeiro dos 6 poços da placa de cultura.

A segunda alíquota, com as 5×10^7 células restantes diluídas em 5mL de PBS 1x a 37°C, foram submetidas aos passos seguintes:

1. Incubação com CFSE em concentração final de solução de 5µM, a 37°C em incubadora de CO₂, protegida da luz;
2. Centrifugação a 1000rpm por 3 minutos em temperatura ambiente;
3. Descarte do sobrenadante e ressuspensão do pellet em 10mL de RPMI 1640 suplementado com SFB 10% sem antibiótico;
4. Incubação por 30 minutos, a 37°C em incubadora de CO₂, no escuro;

5. Centrifugação a 1000g por 3 minutos em temperatura ambiente;
6. Descarte do sobrenadante e ressuspensão do pellet em 13,7mL de RPMI 1460 suplementado com SFB 10% sem antibiótico;
7. Distribuição de 2,7mL em cada um dos 5 poços restantes da placa de 6;
8. Manutenção da cultura em incubadora de CO₂, protegido da luz por 24h.

Nesta etapa a configuração da placa de cultura seguiu a ordem detalhada na **figura 13**, sendo que cada poço foi carregado com uma quantidade inicial estimada de 10⁷ células.

Importante a observação de que todo o procedimento a partir da incubação com CFSE foi realizado em ambiente protegido da luz, devido a fotossensibilidade do reagente.

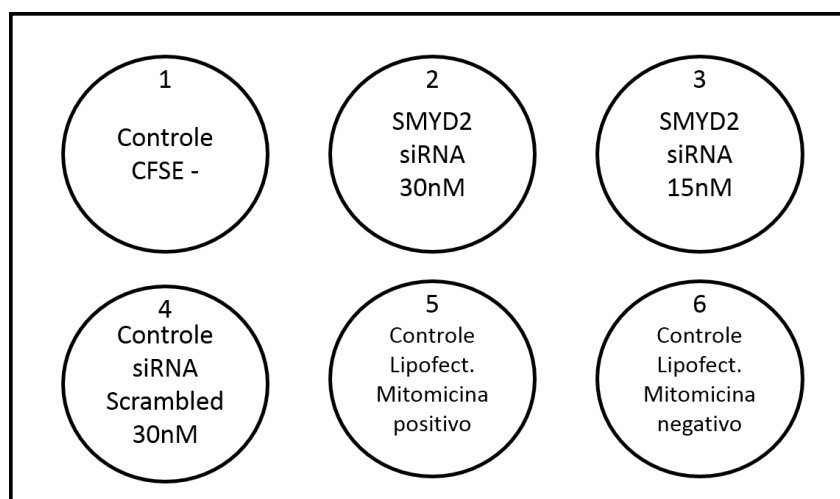


Figura 13 - Configuração da placa de cultura do experimento de silenciamento por siRNA SMYD2. Legenda: CFSE - , células foram mantidas em cultura até o 4º dia de experimento sem incubação com o reagente fluorescente; todos os demais poços receberam CFSE; Poço 2 recebeu siRNA SMYD2 na concentração de 30nM; Poço 3 recebeu siRNA SMYD2 a 15nM; Poço 4 recebeu controle negativo do siRNA; Poço 5 foi incubado com mitomicina C; Poço 6 foi incubado apenas com lipofectamina.

3.13. TRANSFECCÃO DE *SMYD2* SIRNA COM REAGENTE LIPÍDICO CATIÔNICO

Foram utilizados os seguintes reagentes comercialmente disponíveis:

1. Silencer ® Select Pre-designed siRNA SMYD2 (Ambion ® - #3792420)
2. Silencer ® Select Negative Control #2 siRNA (Ambion ® - #4390846) (scrambled)

3. Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Life Technologies® - #31985062)
4. Lipofectamine® 2000 Reagent (Life Technologies® - #11668-019)
5. Mitomicina C de *Streptomyces caespitosus* (Sigma #M4287)

Os controles utilizados para o experimento foram os seguintes:

- Controle CFSE – (poço 1): Controle negativo da fluorescência pelo CFSE, tendo em vista que as células apresentam uma fluorescência natural basal identificável pelo detector FL1. Esse controle também serviu para identificar possíveis alterações da simples exposição das células à lipofectamina.
- Controle siRNA - Silencer Negative Control (poço 4): Controle negativo do siRNA com sequências que não são direcionadas para nenhum produto gênico (Scrambled) e não interferem nem na viabilidade e nem na proliferação celular.
- Controle Lipofectamina + Mitomicina (poço 5): Controle do estado proliferativo celular. No caso do experimento deve demonstrar a situação de ausência ou baixa taxa de proliferação celular, na presença de lipofectamina, tendo em vista que todas as nossas linhagens possuem taxas de replicação elevadas.
- Controle Lipofectamina – Mitomicina (poço 6): Controle da influência da simples exposição ao agente lipídico catiônico na taxa de proliferação celular (sem mitomicina)

Após a incubação por 24h o conteúdo do poço 5 (MITOMICINA POSITIVO) foi retirado, colocado em tubo tipo falcon de 15mL e incubado com mitomicina C a uma concentração final de 50µg/mL por 20 minutos a 37°C. À seguir, o tubo foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado em 2.7mL de RPMI 1640 suplementado com SFB 10% sem antibiótico. Esse volume foi, então, devolvido ao poço de origem na placa de cultura.

Foram preparados 4 meios de controle e transfecção diferentes, conforme a **tabela 7**.

Tabela 7 – Composição dos meios para transfecção com siRNA SMYD2

Meio de Transfecção	MEIO 1	MEIO 2	POÇO
SMYD2 siRNA 30nM	<ul style="list-style-type: none"> • 9µL de SMYD2 siRNA 10µM • 150µL OPTIMEN I Incubação por 5 minutos	<ul style="list-style-type: none"> • 6 µL Lipofectamina 2000 • 150µL Opti-MEM Misturar gentilmente com MEIO 1 e incubar por 20 minutos à temperatura ambiente	2
SMYD2 siRNA 15nM	<ul style="list-style-type: none"> • 4,5µL de SMYD2 siRNA 10µM • 150µL OPTIMEN I Incubação por 5 minutos	<ul style="list-style-type: none"> • 6 µL Lipofectamina 2000 • 150µL Opti-MEM Misturar gentilmente com MEIO 1 e incubar por 20 minutos à temperatura ambiente	3
Controle siRNA Scrambled 30nM	<ul style="list-style-type: none"> • 9µL de Scrambled siRNA 10µM • 150µL OPTIMEN I Incubação por 5 minutos	<ul style="list-style-type: none"> • 6 µL Lipofectamina 2000 • 150µL Opti-MEM Misturar gentilmente com MEIO 1 e incubar por 20 minutos à temperatura ambiente	4
Controle lipofectamina		<ul style="list-style-type: none"> • 6 µL Lipofectamina 2000 • 300µL Opti-MEM Apenas incubar por 20 minutos à temperatura ambiente	5 e 6

Conforme instrução do fabricante, utilizamos a concentração final de *SMYD2* siRNA e Scrambled de 30nM nos poços 2 e 4. Utilizamos também uma concentração inferior de *SMYD2* siRNA (15nM) para verificar se havia relação entre concentração do mesmo e eficácia de silenciamento gênico de *SMYD2*.

Após mistura dos MEIOS 1 e 2, 300µL de tampões de transfecção foram acrescentados aos respectivos poços da placa de cultura conforme assinalado na tabela 7.

As células foram, então, mantidas em incubadora 5% CO₂ a 37°C, protegidas da luz por mais 3 dias e, em seguida, levadas para leitura no citômetro de fluxo conforme protocolo descrito anteriormente.

3.14. VERIFICAÇÃO DO SILENCIAMENTO DO GENE *SMYD2* POR SIRNA

Após o período de cultura de 72h após incubação com siRNA, o volume de células em cultura que sobrou de cada poço após leitura no citômetro de fluxo foi centrifugado separadamente a 1000g, temperatura ambiente, ressuspenso em tampão PBS 1x gelado RNase-free e armazenado em trizol para extração de RNA, seguindo o mesmo método descrito para as amostras clínicas.

As seis amostras de RNA total foram submetidas a síntese de cDNA e reação de PCR em tempo real conforme anteriormente detalhado.

3.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS CLÍNICOS E EXPERIMENTAIS

O cálculo do *fold-change* para a comparação inicial entre níveis de expressão nos grupos leucêmico e não-neoplásico do estudo piloto foi realizado através do software REST2009 (Relative Expression Software Tool, QIAGEN).

Os dados de PCR em tempo real com o total das amostras foram analisados com o software Biogazelle qBase Plus 2.2, dedicado a esse tipo de estudo. O programa utiliza o método qBase para os cálculos de expressão relativa de mRNA (Hellemans, Mortier et al. 2007). Após análise das curvas de amplificação no programa StepOne Software v2.2.2, as médias dos valores de Cq foram exportados diretamente para o software Biogazelle qBase Plus. O gene beta-actina (ACTB) foi utilizado como gene referência para a normalização da quantidade de cDNA carregado em cada reação. Para a comparação do nível de expressão entre amostras leucêmicas e grupo controle não neoplásico o valor de CNRQ (Calibrated Normalized Relative Quantification), que corresponde ao valor de fold-change do software REST, foi calculado utilizando-se a média geométrica de todas as amostras como referência.

O cálculo das diferenças entre grupos clínicos foi feito a partir dos valores de RQ (Relative Quantification) de cada gene alvo normalizados com os valores de RQ obtidos a partir de 8 amostras de medula óssea de pacientes portadores de PTI.

Como forma de aumentar a confiabilidade de nossos dados, os valores de CNRQ dos genes alvos que se mostraram diferencialmente expressos na comparação medula leucêmica contra medulas não-neoplásicas foram comparados com os valores de fold-change disponibilizados na plataforma pública on line de microarranjos Oncomine®. Foram utilizados como filtros de busca de dados os seguintes quesitos: “normal vs cancer comparison” e “childhood acute lymphoblastic leukemia”.

Utilizou-se o software estatístico SPSS 21.0 (IBM) para a análise dos dados clínicos, bem como daqueles gerados experimentalmente.

A comparação entre médias foi feita através de teste t de Student para amostras independentes ou teste t de Student para amostras pareadas ou pelo teste de Mann-Whitney a depender do objetivo da análise. A comparação entre variáveis categóricas foi realizada

através de teste de qui-quadrado. Análises de correlação para variáveis não paramétricas foram feitas através do método de Pearson.

O tempo de seguimento foi calculado a partir da data do diagnóstico até o momento do evento em questão ou data do último seguimento. Utilizou-se o método de Kaplan-Meier para o cálculo de sobrevida global dos pacientes. Análise uni e multivariada pelo método de Cox foi utilizada para a verificação da relação entre sobrevida e variáveis não-paramétricas. Uma vez verificada a significância estatística para as diferenças de sobrevidas obtidas pelo método de Cox, utilizou-se o método de log-rank para comparação das curvas geradas a partir do método de Kaplan-Meier após a categorização das variáveis não-paramétricas.

À exceção da correlação de Pearson, em que se considerou valor $p < 0,01$ de significância, nas demais análises utilizou-se um nível $p < 0,05$ para determinação de significância estatística entre as diferenças encontradas nos grupos estudados.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDO PILOTO

Tendo em vista a inexistência de dados na literatura sobre o suposto envolvimento de outras metiltransferases de lisinas, à exceção do supracitado *MLL*, no processo carcinogênico das LLA da infância, decidiu-se realizar primeiramente um estudo piloto em 22 genes codificadores de metiltransferases de lisinas. Essa conduta evitaria o desperdício de tempo e, em especial, de amostras clínicas caso não se verificasse, neste piloto, algum indício de expressão diferencial na comparação leucemia versus amostra de medula não-leucêmica.

Das 100 amostras inicialmente coletadas para o estudo final, foram selecionadas aleatoriamente 29 amostras que foram comparadas com 2 amostras de medula não neoplásica. Os dados do estudo piloto foram analisados com o programa REST 2009 que permite a comparação dos níveis de expressão em dois grupos distintos de amostras, neste caso, medulas leucêmicas contra amostras não-neoplásicas.

A **figura 14** mostra o resultado obtido a partir dos dados da média das triplicatas de Cq's obtidos para cada um dos genes, em relação ao gene normalizador beta actina (*ACTB*). A razão 1 de expressão significa que, em relação às duas amostras utilizadas como controle não-leucêmico, não houve diferença de expressão para o gene alvo nas amostras neoplásicas estudadas.

Visualmente, percebe-se que há uma grande variação, dentro do grupo estudado, no nível de expressão de vários genes pesquisados. Caso extremo pode ser notado em relação ao gene *SETD7*, com uma variação da ordem de 10^5 vezes entre valores máximo e mínimo observados. Alguns, no entanto, tiveram variação baixa, da ordem de 100 vezes entre valores máximo e mínimo, como foram os casos dos genes *SETD1B* e *SETD8*.

O achado mais promissor, entretanto, foi o de que três dos 22 genes alvos avaliados, *SETMAR*, *SMYD2* e *SMYD5*, mostraram-se superexpressos, quando realizada análise estatística através do software REST 2009, em uma ordem de 5,2; 3,5 e 2,8 vezes, respectivamente, quando comparadas amostras leucêmicas e controles não-neoplásicos (**tabela 8**).

Os outros genes analisados neste grupo de amostras não mostraram diferença estatisticamente relevante ($p > 0,05$).

O resultado descrito favoreceu a hipótese inicial do estudo e justificava o prosseguimento do mesmo para as demais amostras.

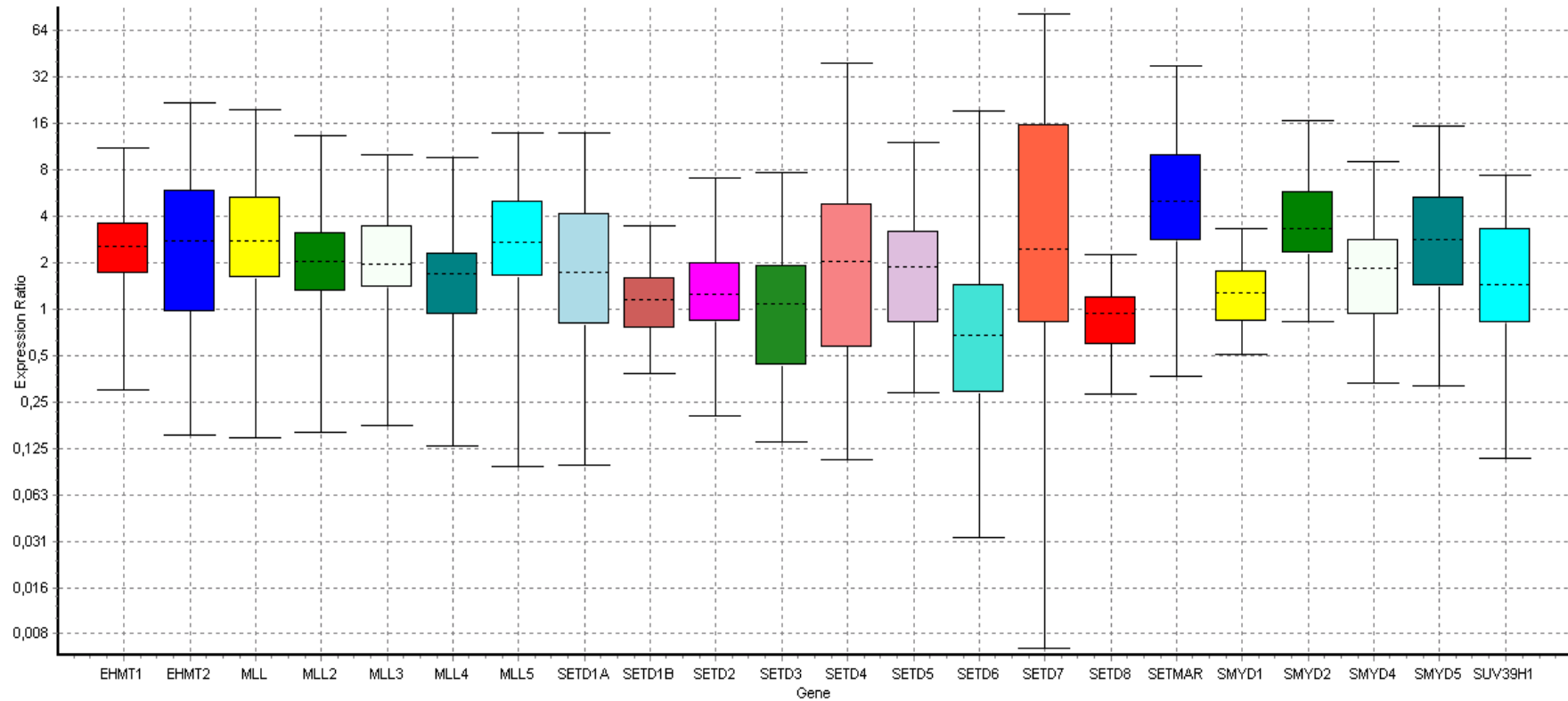


Figura 14 – Expressão relativa dos 22 genes codificadores de metiltransferases de lisinas nas 29 amostras de medula óssea leucêmica utilizadas no estudo piloto, comparadas com 2 amostras não-neoplásicas. Gráfico gerado a partir do software REST2009 - O gene ACTB foi utilizado como normalizador em todas as reações. A distância interquartil é representada pelos limites superior e inferior das barras coloridas. Os valores máximo e mínimo de expressão relativa são representados pelas linhas limites horizontais superior e inferior, respectivamente. A mediana da razão de expressão é representada pela linha vertical tracejada dentro da barra colorida.

Tabela 8 – Análise estatística do estudo piloto com 29 amostras de medula óssea de pacientes com leucemia e 2 amostras de medula óssea não-neoplásicas para 22 genes codificadores de metiltransferases de lisina.

Gene	p-value	Fold-Change (S.E range)	Interpretação
<i>EHMT1</i>	0,060		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>EHMT2</i>	0,075		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>MLL</i>	0,076		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>MLL2</i>	0,128		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>MLL3</i>	0,238		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>MLL4</i>	0,214		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>MLL5</i>	0,143		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>SETD1A</i>	0,269		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>SETD1B</i>	0,799		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>SETD2</i>	0,582		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>SETD3</i>	0,921		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>SETD4</i>	0,335		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>SETD5</i>	0,209		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>SETD6</i>	0,615		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>SETD7</i>	0,252		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>SETD8</i>	0,665		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>SETMAR</i>	0,002	5,146 (1,892 - 15,043)	SETMAR é 5,146 vezes mais expresso nas amostras de leucemias quando comparadas ao grupo controle
<i>SMYD1</i>	0,602		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>SMYD2</i>	0,003	3,498 (1,655 - 6,720)	SMYD2 é 3,498 vezes mais expresso nas amostras de leucemias quando comparadas ao grupo controle
<i>SMYD4</i>	0,196		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle
<i>SMYD5</i>	0,025	2,784 (1,100 - 7,515)	SMYD5 é 2,784 vezes mais expresso nas amostras de leucemias quando comparadas ao grupo controle
<i>SUV39H1</i>	0,323		Amostras de leucemia não foram diferentes do grupo controle

Análise estatística realizada com software REST2009

4.2. COMPARAÇÃO ENTRE O NÍVEL DE EXPRESSÃO DE METILTRANSFERASES DE LISINAS EM AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA LEUCÊMICAS E NÃO-NEOPLÁSICAS

A população estudada foi, à seguir, aumentada para 83 amostras de LLA da infância e o total de medulas não-neoplásica aumentada para 8. Devido à necessidade de otimização de tempo e recursos, optou-se por concentrar os esforços no estudo de genes da família SETD e SMYD, tendo em vista que os três genes assinalados pelo estudo piloto pertencem a essas subfamílias. Em especial os genes da família SETD ainda foram pouco explorados por outros grupos de pesquisa.

Os resultados da corrida de qPCR foram diretamente exportados para o software QBase-plus v2.0 (Biogazelle), utilizado em estudo de PCR em tempo real. A comparação do grupo de pacientes com leucemia contra pacientes sem neoplasia mostrou que, além das 3 metiltransferases observadas no estudo piloto, outras também encontravam-se diferencialmente expressas na comparação, desta vez realizada com 8 controles não-neoplásicos (**tabela 9**).

Tabela 9 - Comparação entre os níveis de expressão de metiltransferases de lisinas em amostras de leucemias e medula óssea não-neoplásica

Gene	p	Fold-change	95% CI
<i>SMYD2</i>	0,0004283	8,554	2,545 – 28,759
<i>SMYD5</i>	0,00000847	6,380	2,842 – 14,322
<i>SETD1B</i>	0,00122	3,132	1,478 – 6,636
<i>SETD2</i>	0,0191	7,240	1,277 – 41,029
<i>SETD3</i>	0,002834	5,726	1,726 – 16,127
<i>SETD4</i>	0,006323	8,5	1,757 – 41,116
<i>SETD8</i>	0,058	2,456	0,932 – 6,473
<i>SETMAR</i>	0,000000072	14,714	5,158 – 41,977

Realizada comparação de médias para amostras independentes com teste Mann-Whitney

Graficamente, podemos visualizar a diferença entre os grupos através de gráficos de dispersão, conforme observamos na **figura 15**.

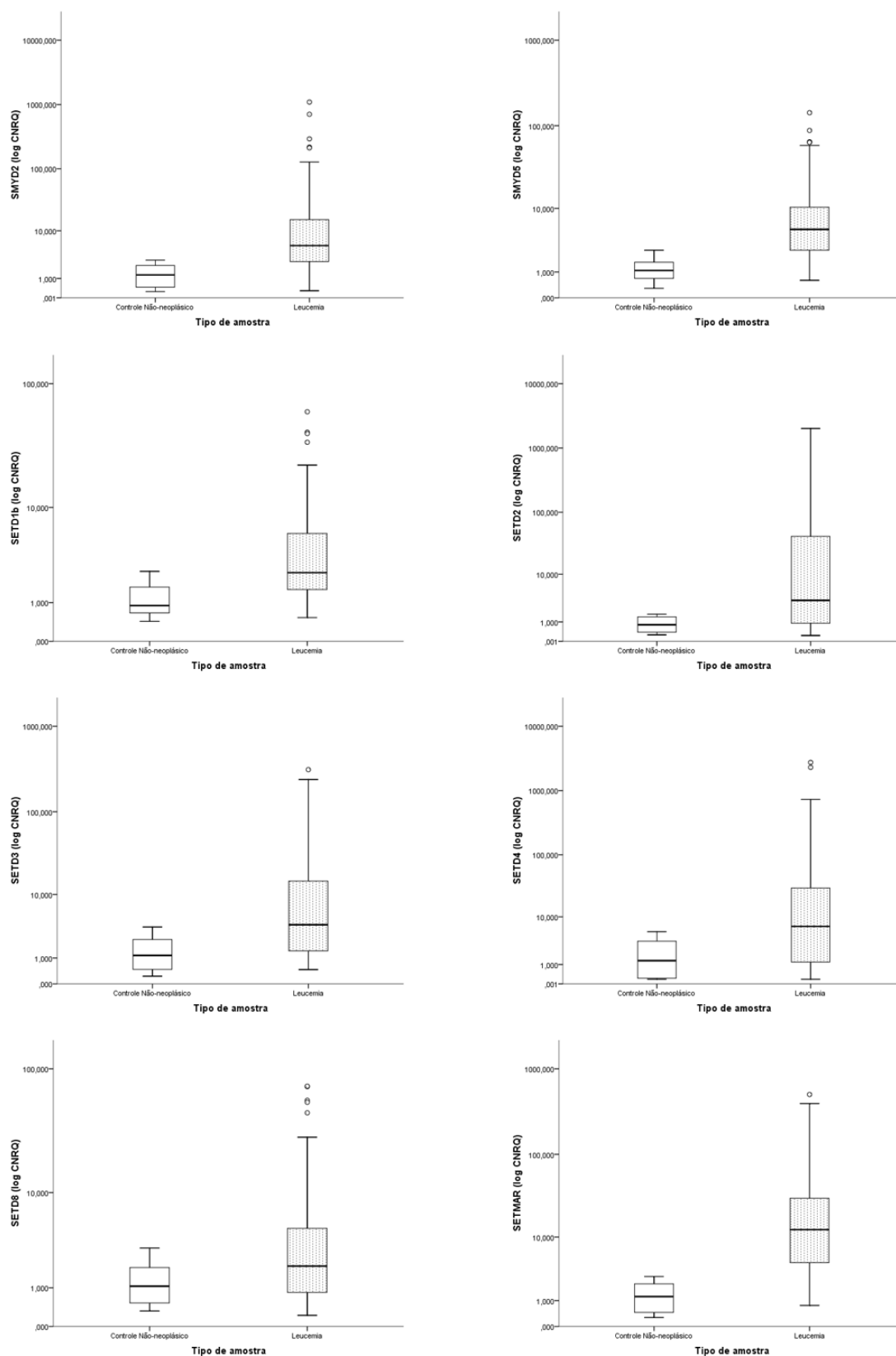


Figura 15 – Gráficos tipo bloxplot com valores de CNRQ (Calibrated Normalized Relative Quantification) – valores transformados para escala logarítmica devido à alta amplitude de valores.

Os genes que mostraram as maiores diferenças de expressão em relação ao controle não-neoplásico nas 83 amostras estudadas foram: *SETMAR* (14,714 vezes), *SMYD2* (8,554 vezes), *SETD4* (8,5 vezes) e *SETD2* (7,24 vezes).

4.3. COMPARAÇÃO DOS DADOS OBTIDOS COM DADOS ARMAZENADOS NA PLATAFORMA ONCOMINE

Uma das limitações em nosso estudo foi, certamente, a questão de termos poucos representantes no grupo de amostras não-neoplásicas (8 amostras), o que poderia gerar um viés significativo em termos de expressão diferencial nos genes pesquisados. Essa quantidade, por questões éticas inerentes, não tinha como ser aumentada a curto prazo e, portanto, decidiu-se contornar parcialmente o viés comparando-se nossos dados com os já existentes na literatura.

Tendo em vista a inexistência de estudos com PCR em tempo real para os genes estudados, decidiu-se comparar os dados de expressão obtidos neste estudo com os dados de expressão comparativa com microarranjo de cDNA disponibilizados na plataforma Oncomine ® versão 4.4.4.4.

Utilizou-se como filtro de análise estudos que comparavam leucemias linfóides agudas da infância com células normais. Nesse ínterim, Haferlach *et al.* (2010) comparam 359 amostras de pacientes com LLA linhagem B da infância com 74 amostras de mononucleares normais de sangue periférico (Haferlach, Kohlmann et al. 2010). Apesar de não necessariamente haver relação direta entre os dados gerados por PCR em tempo real e microarranjo, espera-se que pelo menos a tendência de hiper ou hipoeexpressão seja mantida nas duas metodologias. É importante também considerar que a precisão do ensaio de expressão por qPCR é superior à obtida por microarranjos de cDNA, uma vez que este último é mais comumente utilizado como método de varredura e não como validação.

Conforme **tabela 10**, os dados deste estudo parecem ser concordantes, pelo menos do ponto de vista categórico (hiperexpressão x hipoeexpressão), com aqueles obtidos por Haferlach *et al.* (2010). *SMYD2*, *SETD2* e *SETD4* também foram os genes que mais se mostraram hiperexpressos em LLA B da infância, quando comparada a mononucleares de sangue periférico (Haferlach, Kohlmann et al. 2010).

Tabela 10 – Comparação dos dados de expressão por qPCR do presente estudo com aqueles obtidos por estudo de microarranjo disponíveis na plataforma Oncomine®

Gene	Sakamoto <i>et al.</i>		Haferlach <i>et al.</i>	
	p	Fold-change	p	Fold-change
<i>SMYD2</i>	0,000428	8,554	<0,00001	1,448
<i>SMYD5</i>	0,000084	6,380	0,002	1,078
<i>SETD1B</i>	0,00122	3,132	0,055	1,062
<i>SETD2</i>	0,0191	7,240	<0,00001	1,590
<i>SETD3</i>	0,002834	5,726	<0,00001	1,227
<i>SETD4</i>	0,006323	8,5	<0,00001	1,404
<i>SETD8</i>	0,058	2,456	1,0	-1,206
<i>SETMAR</i>	<0,00001	14,714	<0,00001	1,096

Os gráficos gerados a partir da plataforma Oncomine® para o estudo citado foram compilados e podem ser vistos no adendo 1.

4.4. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

A análise de correlação de Pearson apenas para as amostras de leucemia (**tabela 11**) mostrou um nível significativo ($p < 0,01$) de correlação entre os níveis de expressão para todos os genes-alvo diferencialmente expressos em relação aos controles não-neoplásicos (**tabela 9**).

Quando a mesma análise é feita nas 8 amostras controle não-neoplásicas, ainda se observam alguns genes com nível de correlação significativo entre si, no entanto, nitidamente em menor grau do que observado nas amostras leucêmicas (**tabela 12**).

Tabela 11 – Correlação entre os valores de CNRQ para os genes alvos estudados nas amostras de leucemia

		SMYD5_cnrq	SMYD2_cnrq	SETMAR_cnrq	SETD8_cnrq	SETD4_cnrq	SETD2_cnrq	SETD1b_cnrq
SMYD5_cnrq	Correlação de Pearson	1	,697**	,830**	,879**	,654**	,820**	,850**
	Sig. (2 extremidades)		,000	,000	,000	,000	,000	,000
	N	83	83	83	83	83	83	83
SMYD2_cnrq	Correlação de Pearson	,697**	1	,728**	,857**	,572**	,867**	,703**
	Sig. (2 extremidades)	,000		,000	,000	,000	,000	,000
	N	83	83	83	83	83	83	83
SETMAR_cnrq	Correlação de Pearson	,830**	,728**	1	,919**	,816**	,894**	,847**
	Sig. (2 extremidades)	,000	,000		,000	,000	,000	,000
	N	83	83	83	83	83	83	83
SETD8_cnrq	Correlação de Pearson	,879**	,857**	,919**	1	,808**	,962**	,908**
	Sig. (2 extremidades)	,000	,000	,000		,000	,000	,000
	N	83	83	83	83	83	83	83
SETD4_cnrq	Correlação de Pearson	,654**	,572**	,816**	,808**	1	,814**	,805**
	Sig. (2 extremidades)	,000	,000	,000	,000		,000	,000
	N	83	83	83	83	83	83	83
SETD2_cnrq	Correlação de Pearson	,820**	,867**	,894**	,962**	,814**	1	,934**
	Sig. (2 extremidades)	,000	,000	,000	,000	,000		,000
	N	83	83	83	83	83	83	83
SETD1b_cnrq	Correlação de Pearson	,850**	,703**	,847**	,908**	,805**	,934**	1
	Sig. (2 extremidades)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	
	N	83	83	83	83	83	83	83

** Correlação com nível de significância $p < 0,01$.

Sig (2 extremidades) = valor da significância estatística por análise de correlação de Pearson. Valor de coeficiente de correlação com $p < 0,01$ significa que existe alto grau de concordância entre os valores de CNRQ entre os dois genes analisados para a mesma amostra (ex.: o nível de correlação entre SETMAR e SETD8 é de 91,9%)

Tabela 12 – Correlação entre os valores de CNRQ para os genes alvos estudados nas amostras controles

		smyd5_cnrq	SMYD2_cnrq	SETMAR_cnrq	SETD8_cnrq	SETD4_cnrq	SETD2_cnrq	SETD1b_cnrq
SMYD5_cnrq	Correlação de Pearson	1	,639	,826	,516	,539	,188	,591
	Sig. (2 extremidades)		,088	,012	,191	,168	,656	,123
	N	8	8	8	8	8	8	8
SMYD2_cnrq	Correlação de Pearson	,639	1	,948**	,841**	,950**	,502	,412
	Sig. (2 extremidades)	,088		,000	,009	,000	,205	,310
	N	8	8	8	8	8	8	8
SETMAR_cnrq	Correlação de Pearson	,826	,948**	1	,825	,895**	,418	,497
	Sig. (2 extremidades)	,012	,000		,012	,003	,303	,210
	N	8	8	8	8	8	8	8
SETD8_cnrq	Correlação de Pearson	,516	,841**	,825	1	,924**	,762	,680
	Sig. (2 extremidades)	,191	,009	,012		,001	,028	,063
	N	8	8	8	8	8	8	8
SETD4_cnrq	Correlação de Pearson	,539	,950**	,895**	,924**	1	,686	,490
	Sig. (2 extremidades)	,168	,000	,003	,001		,060	,218
	N	8	8	8	8	8	8	8
SETD2_cnrq	Correlação de Pearson	,188	,502	,418	,762	,686	1	,755
	Sig. (2 extremidades)	,656	,205	,303	,028	,060		,030
	N	8	8	8	8	8	8	8
SETD1b_cnrq	Correlação de Pearson	,591	,412	,497	,680	,490	,755	1
	Sig. (2 extremidades)	,123	,310	,210	,063	,218	,030	
	N	8	8	8	8	8	8	8

** Correlação com nível de significância $p < 0,01$

* Correlação com nível de significância $p < 0,05$

Observa-se, portanto, um aumento de expressão conjunto entre os genes que se mostraram diferencialmente expressos em amostras leucêmicas, comportamento este, nitidamente distinto do observado nas amostras não neoplásicas.

Essa coordenação observada sugere o envolvimento de um regulador transcricional comum ou de uma via biológica semelhante.

4.5. CORRELAÇÃO ENTRE O NÍVEL DE EXPRESSÃO DE METILTRANSFERASES DE LISINAS E DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES

Os dados clínicos de todos os paciente mostram que a coorte deste estudo não diverge, segundo os principais critérios clínicos de estratificação de crianças portadoras de LLA, do que é relatado classicamente pela literatura (**tabela 13**).

O tempo médio de seguimento para a população estudada foi de 30 meses. A sobrevida global em 30 meses na população estudada foi de 66,6%. A comparação das curvas de sobrevida pelo teste de log-rank mostrou que existe diferença significativa nas taxas de sobrevida global em 30 meses quando consideradas idade, contagem absoluta de leucócitos no sangue periférico ao diagnóstico, imunofenotipagem, achados de translocações recorrente e status da medula óssea no 29º dia de terapia indutória. Não houve diferença estatística na probabilidade de sobrevida global quando considerados gênero e comprometimento da medula óssea no 15º dia de indução (**figura 16**).

Tabela 13 – Características clínicas dos pacientes estudados (n=83)

Característica	N (%)
Total	83
Gênero	
Masculino	43 (51,8%)
Feminino	40 (48,2%)
Idade	
< 1 ano	1 (1,2%)
1-9 anos	53 (63,9%)
> 10 ano	29 (34,9%)
Leucometria (por dL)	
< 50.000	46 (57,4%)
> 50.000	34 (42,5%)
Imunofenotipagem	
Pro-B	3 (3,7%)
Pre-B/comum	67 (81,7%)
LLA-T	12 (14,6%)
Grupo de risco	
Alto	72 (86,7%)
Baixo	11 (13,3%)
Translocações recorrentes	
Nenhuma dentre as pesquisadas	55 (66,3%)
t(12;21)	18 (21,7%)
t(1;19)	8 (9,6%)
t(9;22)	1 (1,2%)
t(4;11)	1 (1,2%)
Status medular no 15º dia de indução	
< 5% blastos	52 (62,7%)
5-25% blastos	24 (28,9%)
> 25% blastos	7 (8,4%)
Status medular no 29º dia de indução	
< 5% blastos	77 (93,9%)
5-25% blastos	4 (4,9%)
> 25% blastos	1 (1,2%)
Recaída	
Sim	21 (25,3%)
Não	62 (74,7%)
Status Atual	
Vivo	59 (71,1%)
Óbito	24 (28,9%)

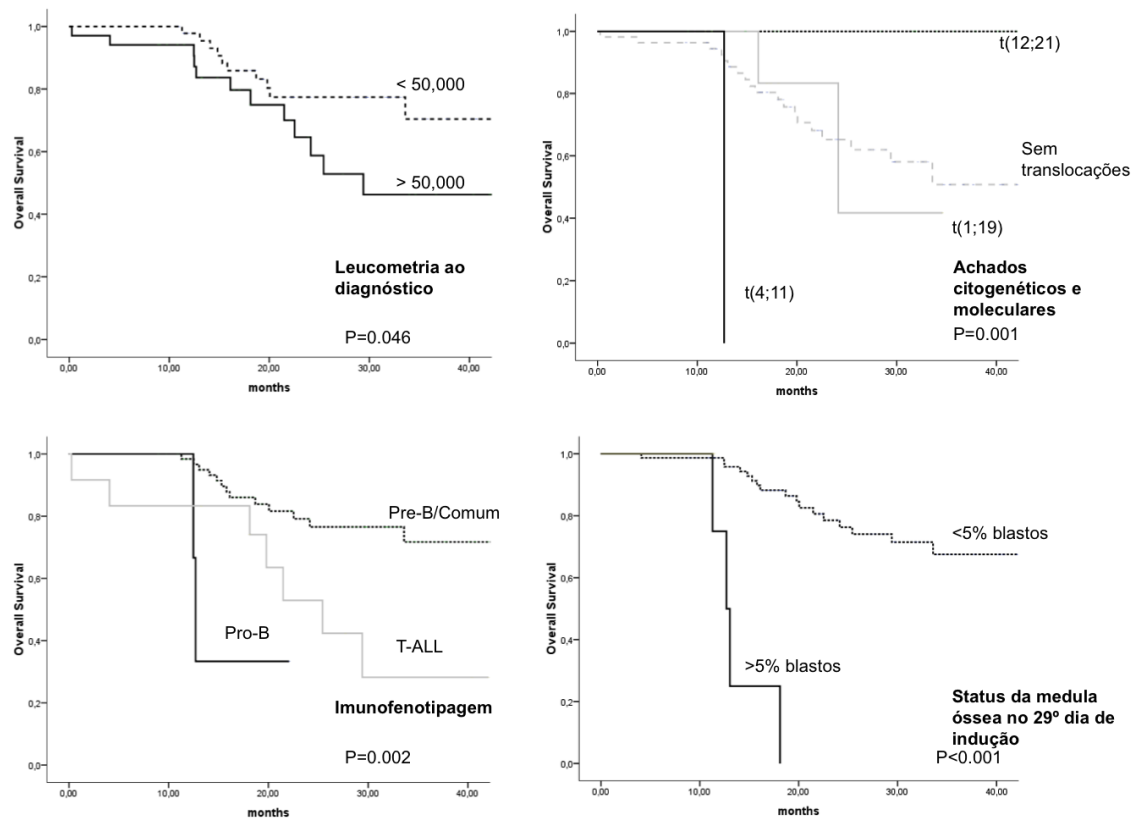


Figura 16 – Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier conforme contagem de leucócitos ao diagnóstico, presença de translocações recorrentes, imunofenotipagem e status medular no 29º dia de indução.

A análise univariada pelo método de risco proporcional de Cox revelou que dos genes que se mostraram diferencialmente expressos na comparação com as amostras controles, *SMYD2*, *SETD2*, *SETD4* e *SETD8* apresentaram nível de expressão diretamente relacionada ao risco de óbito dos pacientes estudados ($p < 0,05$), conforme mostra a **tabela 14**. Respectivamente, níveis mais elevados de expressão de *SMYD2*, *SETD2*, *SETD4* e *SETD8* foram relacionados a um risco de óbito 2,3; 2,0; 1,8 e 2,8 vezes maior do que na população com níveis menores.

Tabela 14 – Análise univariada de sobrevida global pelo método de risco proporcional de Cox considerando nível de expressão (RNAm) de genes da família SET como fatores determinantes de óbito na população estudada

Gene	p	Razão de Risco	95% IC
<i>SMYD2</i>	0,00388**	2,311	1,309 – 4,081
<i>SMYD5</i>	0,053	2,517	0,987 – 6,418
<i>SETD1B</i>	0,186	2,185	0,687 – 6,957
<i>SETD2</i>	0,000437**	2,072	1,380 – 3,109
<i>SETD3</i>	0,059	1,950	0,974 – 3,902
<i>SETD4</i>	0,0268**	1,796	1,069 – 3,016
<i>SETD8</i>	0,007953**	2,847	1,315 – 6,165
<i>SETMAR</i>	0,051	2,133	0,997 – 4,561

** estatisticamente significativo

Tendo em vista a proporcionalidade do risco de óbito em relação ao nível de expressão de *SMYD2*, *SETD2*, *SETD4* e *SETD8*, foi realizada a comparação das curvas de sobrevida através de método de log-rank, a partir das curvas de sobrevida geradas através do método de Kaplan-Meier.

Para dicotomização da variável expressão do gene alvo, definiu-se hiperexpressão quando o valor de CNRQ encontrava-se acima de 4 e hipoexpressão quando o valor era menor ou igual a 4. Esse ponto de corte foi arbitrariamente definido com base na média dos valores máximos de CNRQ dos genes *SMYD2*, *SMYD5*, *SETD1B*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD8* e *SETMAR* obtidos nas 8 amostras não neoplásicas que mostraram hiperexpressão na comparação com medulas leucêmicas. *SETD2* foi excluído dessa definição porque o valor máximo nas amostras não neoplásicas foi muito discrepante em relação aos demais (CNRQ *SETD2*=22,1). Verificou-se que esse valor de corte coincide, em média, com os percentis 50 e 75 das amostras leucêmicas, o que facilitou, posteriormente, a análise de correlação dos dados de PCR em tempo real com os dados clínicos (**tabela 15**)

TABELA 15 – Frequências de valores de CNRQ para os 8 genes utilizados para a dicotomização dos níveis de expressão na análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier

	SETD1b	SETD2	SETD3	SETD4	SETD8	SETMAR	SMYD2	SMYD5	
	cnrq	cnrq	cnrq	cnrq	cnrq	cnrq	cnrq	cnrq	
N	8	8	8	8	8	8	8	8	
Média	1,17375	3,4500	1,4712	2,0337	1,3012	1,35125	1,37375	1,20750	
Erro padrão	,256473	2,6709	,42480	,75860	,34918	,339876	,34488	,26285	
Mediana	,90000	,82000	1,1850	1,3200	1,0600	1,26000	1,27500	1,11000	
Variância	0,526	57,073	1,444	4,604	0,975	0,924	0,952	0,553	
Amplitude	2,070	21,850	3,360	5,270	2,750	2,550	2,600	2,290	
Mínimo	0,430	0,260	0,230	0,180	0,320	0,270	0,250	0,290	
Máximo	2,500	22,110	3,590	5,450	3,070	2,820	2,850	2,580	
Percentis	50	0,90000	0,8200	1,1850	1,3200	1,0600	1,26000	1,27500	1,11000
	75	1,81500	1,52250	2,45000	4,41500	2,2025	2,17250	2,32500	1,65500

Como pode ser observado nos gráficos da **figura 17**, as hiperexpressões de *SMYD2*, *SETD2*, *SETD4* e *SETD8* determinam claramente, na análise univariada, menor sobrevida aos pacientes.

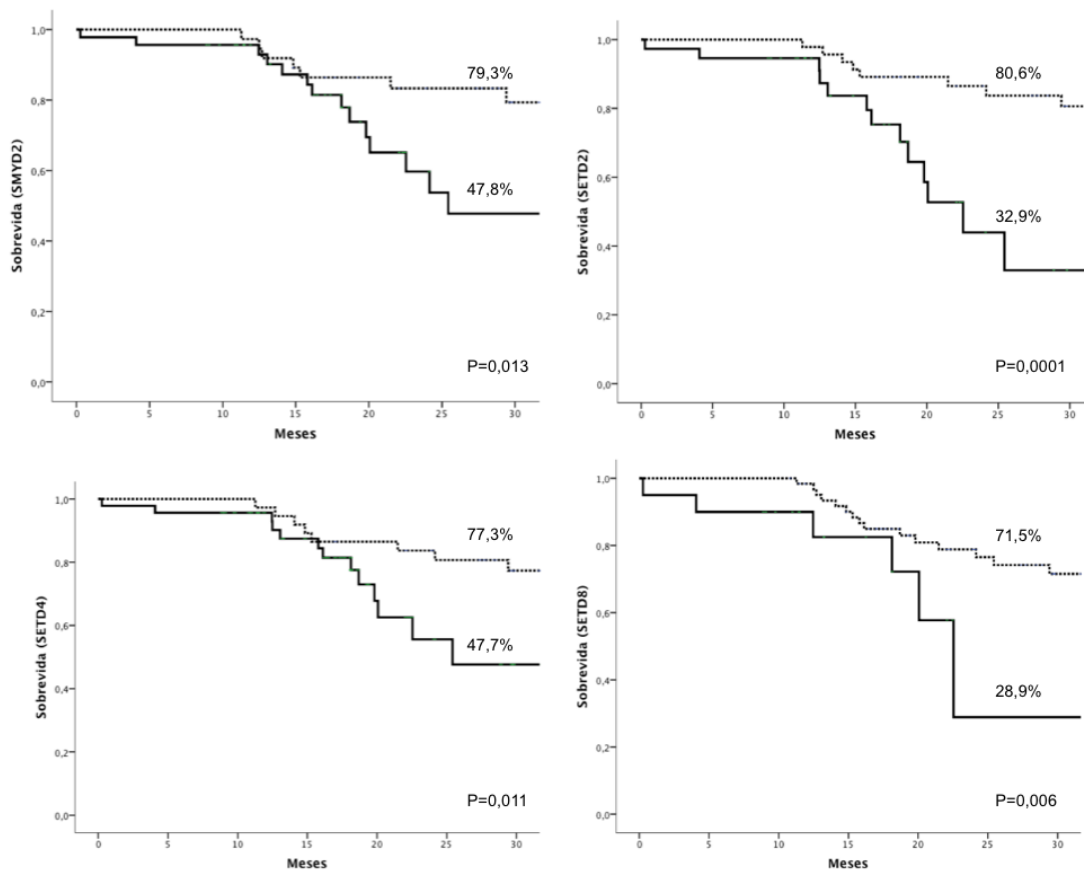


Figura 17 – Curvas de sobrevida em 30 meses obtidas pelo método de Kaplan-Meier de acordo com os níveis de expressão dos genes *SMYD2*, *SETD2*, *SETD4* e *SETD8*. Linha pontilhada – expressão basal do gene (fold-change < 4); linha contínua – hiperexpressão do gene-alvo (fold-change > 4).

Cálculo do qui-quadrado do nível de expressão de *SMYD2*, *SETD2*, *SETD4* e *SETD8* em relação a fatores prognósticos clássicos em LLA da infância mostrou haver algumas associações estatisticamente significativas, conforme **tabela 16**. A hiperexpressão de *SETD2* foi mais frequente naqueles pacientes com idade desfavorável ($p=0,029$). *SETD8* foi mais frequentemente hiperexpresso nas amostras com hiperleucocitose ($p=0,015$). *SMYD2* foi mais expresso nas amostras de pacientes com idade desfavorável e hiperleucocitose ($p=0,021$ e $p=0,023$, respectivamente).

Tabela 16 – Análise de qui-quadrado do nível de expressão de 4 genes codificadores de metiltransferases de lisina em relação a fatores prognósticos clássicos em LLA da infância

			Expressão Basal	Hiper-Expressão	p-valor
<i>SETD2</i>	Idade	Favorável	34	19	0.029**
		Desfavorável	12	18	
	Leucometria ao diagnóstico	Menos de 50.000	30	16	0.072
		Hiperleucocitose	15	19	
Grupo de risco	Baixo	8	3	0.331	
	Alto	38	34		
Imunofenótipo	B	41	30	0.356	
	T	5	7		
<i>SETD4</i>	Idade	Favorável	27	26	0.168
		Desfavorável	10	20	
	Leucometria ao diagnóstico	Menos de 50.000	23	23	0.365
		Hiperleucocitose	13	21	
Grupo de risco	Baixo	8	3	0.055	
	Alto	29	43		
Imunofenótipo	B	32	39	0.541	
	T	5	7		
<i>SETD8</i>	Idade	Favorável	43	10	0.183
		Desfavorável	20	10	
	Leucometria ao diagnóstico	Menos de 50.000	40	6	0.015**
		Hiperleucocitose	21	13	
Grupo de risco	Baixo	9	2	0.475	
	Alto	54	18		
Imunofenótipo	B	56	15	0.122	
	T	7	5		
<i>SMYD2</i>	Idade	Favorável	29	24	0.021**
		Desfavorável	8	22	
	Leucometria ao diagnóstico	Menos de 50.000	26	20	0.023**
		Hiperleucocitose	10	24	
Grupo de risco	Baixo	7	4	0.205	
	Alto	30	42		
Imunofenótipo	B	34	38	0.363	
	T	3	9		

Observação – Idade favorável: entre 2 e 9 anos de idade ao diagnóstico; Grupo de alto risco: idade favorável, ausência de hiperleucocitose ao diagnóstico e ausência de infiltração do sistema nervoso; Expressão basal do gene alvo: fold-change menor ou igual a 4. ** Considerados estatisticamente significativos.

As 5 variáveis clínicas (idade, hiperleucocitose ao diagnóstico, translocações cromossômicas recorrentes, imunofenótipo e presença de blastos no 29º dia de indução) e os valores de CNRQ dos 4 genes (*SMYD2*, *SETD2*, *SETD4* e *SETD8*) que mostraram correlação com a sobrevida global na análise univariada foram utilizados no modelo de análise multivariada de Cox.

Conforme pode ser observado na **tabela 17**, a presença de blastos no 29º dia de indução, idade desfavorável e nível elevado de *SMYD2* mantinham-se independentemente correlacionados com a sobrevida global dos pacientes com LLA. As demais variáveis não mantiveram sua significância estatística no modelo multivariado.

Tabela 17 – Análise de sobrevida global pelo método de regressão multivariada de Cox

Gene	Wald $\chi^2(1)$	p	Exp(B)	95% IC para Exp(B)
<i>Hiperleucocitose</i>	0,301	0,919	1,067	0,305-3,736
<i>Imunofenótipo</i>	1,269	0,260	2,582	0,496-13,457
<i>Translocações cromossômicas recorrentes</i>	3,691	0,055	5,252	0,967-28,526
<i>Idade desfavorável</i>	4,074	0,044***	2,889	1,301-8,092
<i>Blastos no D29</i>	8,877	0,003***	7,836	2,023-30,35
<i>SETD2_log</i>	0,007	0,931	1,060	0,286-3,926
<i>SETD4_log</i>	2,620	0,106	0,166	0,019-1,460
<i>SETD8_log</i>	0,750	0,387	0,347	0,032-3,814
<i>SMYD2_log</i>	3,693	0,049***	8,861	1,058-81,998

*** estatisticamente significativo ($p < 0,05$)

Baseado nos indícios de que *SMYD2* encontra-se diferencialmente expresso em medulas leucêmicas e que sua hiperexpressão correlaciona-se tanto com pior sobrevida global, como com a características clínicas clássicas de mau prognóstico (idade e

hiperleucocitose) na coorte estudada, optou-se por concentrar os esforços para melhor caracterizar as repercussões biológicas dessa hiperexpressão no contexto leucêmico.

Apesar de também haver relevância nos achados estatisticamente significativos encontrados para os demais genes, o aprofundamento dessa parte do estudo foi deixado para uma ocasião futura.

4.6. NÍVEL DE EXPRESSÃO DE *SMYD2* DURANTE A TERAPIA INDUTÓRIA

As diferenças observadas na comparação entre medulas leucêmicas ao diagnóstico e não-neoplásicas, juntamente com o achado de que parece haver relevância prognóstica para alguns dos genes hiperexpressos, levou ao questionamento sobre qual seria o comportamento de *SMYD2* durante o tratamento quimioterápico.

Tendo em vista que no período de indução do protocolo quimioterápico, nos 15º e 29º dias de tratamento, são coletadas rotineiramente novas amostras de medula óssea para avaliação citomorfológica, decidiu-se avaliar o comportamento do nível de expressão de *SMYD2* nesses momentos.

A ausência de blastos e a recuperação dos elementos normais da medula óssea nesses no D15 e D29 da indução constitui critério de resposta ao tratamento quimioterápico, bem como fator de bom prognóstico para esses pacientes. No 29º dia de terapia indutória mais de 95% dos pacientes já apresentam medula óssea com menos de 5% de blastos. Indivíduos com percentuais acima de 5% de linfoblastos leucêmicos na medula óssea em algum desses momentos, em especial no 29º dia de tratamento, têm maiores chances de recaída e óbito, comparados àqueles com medula óssea classificada como M1 (abaixo de 5% de blastos).

Foram selecionados 15 pacientes entre aqueles previamente investigados para o estudo do nível de expressão de *SMYD2* nas amostras de seguimento, conforme mostrado na **tabela 18**.

À exceção dos casos em que não há resposta ao tratamento quimioterápico de indução, em geral, a medula óssea do diagnóstico é muito mais representada por blastos leucêmicos (mais do que 25% de ocupação da medula é observada ao diagnóstico de todas as leucemias agudas) do que as medulas do 15º e 29º dias de tratamento. Assim, é razoável imaginar que, em termos de expressão gênica global da amostra, os achados encontrados na qPCR das medulas de diagnóstico reflitam o comportamento das células neoplásicas e que

os resultados das medulas no 15º dia e, em especial, 29º dia de tratamento sejam determinados pelo perfil de expressão dos componentes celulares normais da medula óssea.

Dessa forma, se há relação entre o padrão aberrante de expressão transcricional de *SMYD2* nas células leucêmicas, esperar-se-ia que a quantificação relativa deste reduzisse conforme a diminuição do percentual de blastos na medula óssea, que é observada citomorfologicamente nos 15º e 29º dias de tratamento indutório quimioterápico. A **tabela 18** resume os achados verificados nesta parte do estudo.

Tabela 18– Resultados de log *CNRQ* de *SMYD2* nas amostras de medula óssea de pacientes com LLA em comparação com o percentual de células leucêmicas na medula óssea nos 15º e 29º dias de terapia indutória

Caso	Imunofenótipo	Blastos Diagnóstico (%)	MO_D15 (%)	MO_D29 (%)	<i>SMYD2</i> Diagn. <i>CNRQ</i>	Valores de <i>CNRQ</i> (log10)	
						<i>SMYD2</i> D15	<i>SMYD2</i> D29
96	B	90	15	10	1,86	0,9658	0,7914
103	B	90	8	1	3,68	0,1291	0,307
105	T	90	18	2	8,41	0,0355	-0,361
114	B	80	30	0	7,86	0,3578	-0,9298
126	B	70	25	1	3,27	0,2961	-0,203
149	B	80	30	3	1,66	2,2323	0,2462
170	B	90	10	2	0,58	1,6195	0,4828
209	B	70	20	0	56,00	0,0246	-1,6145
244	B	97	16	1	8,23	0,3397	-0,1657
247	B	60	12	2	3,41	-0,0369	0,1551
249	B	98	8	0	14,80	-0,4008	-0,6496
268	B	90	14	0	20,99	-1,0353	-1,1282
310	B	90	30	25	1801,66	-1,6176	-3,0365
315	B	45	2	1	30,03	0,0312	-0,4159
322	B	94	1	0	1093,55	-1,1449	-2,3666

Legenda: MO_D15: Porcentual de células leucêmicas na medula óssea por exame citomorfológico do esfregaço da medula no 15º dia (D15) de terapia indutória. MO_D29: Porcentual de células leucêmicas na medula óssea por exame citomorfológico do esfregaço da medula no 29º dia (D29) de terapia indutória. Os *CNRQ* das amostras ao diagnóstico foram plotados em valores absolutos, definindo-se como hiperexpressão valores maiores do que 4. Valores de *CNRQ* para as amostras de seguimento forma transformados para log10, devido a distribuição não normal desse subgrupo das amostras: Os valores de *CNRQ* foram calculados com base na comparação pareada dos RQ de *SMYD2* das amostras de seguimento contra o valor de RQ de *SMYD2* das amostras ao diagnóstico. Os casos assinalados em escuro foram aqueles que apresentaram hiperexpressão de *SMYD2* ao diagnóstico quando comparados à média geométrica do total de amostras.

Pode-se notar, conforme mostra a **tabela 18**, que há uma nítida diferença em relação ao comportamento de expressão de *SMYD2* nos dois momentos de avaliação medular.

Analisando-se globalmente apenas a classificação medular citomorfológica, nota-se que no 15º dia de tratamento a maioria das amostras selecionadas ainda era representada por mais de 5% de blastos leucêmicos. No 29º dia de tratamento apenas 2 amostras ainda apresentavam mais de 5% de linfoblastos, traduzindo o que normalmente ocorre na população geral tratada, tendo em vista que cerca de 95% alcançam remissão medular ao término da indução.

Graficamente, os valores da **tabela 18** foram representados na **figura 18** para melhor visualização do comportamento da expressão de *SMYD2* nas amostras de seguimento.

Analisando-se conjuntamente os valores da **tabela 18** com o comportamento do gráfico da **figura 18-A**, nota-se que, de forma geral, a frequência de expressão aumentada de *SMYD2*, em relação à amostra do diagnóstico é maior no D15 (barras escuras) do que no D29 (barras brancas). Análise pelo teste t de Student para amostras pareadas, comparando amostras do D15 com as do D29 e utilizando o valor de RQ da amostra do diagnóstico como referência, mostrou haver redução significativa do nível de expressão de *SMYD2* no segundo momento quando comparado ao primeiro (-0,59 vs 0,12, respectivamente; IC 95% = 0,334-1,08; p=0,001).

A **figura 18-B** ilustra o comportamento dos percentuais de blastos detectáveis na medula óssea nos 3 momentos estudados (diagnóstico, D15 e D29).

Além disso, como pode ser notado nos gráficos de dispersão (**figura 18-C**), não parece haver correlação entre o nível de expressão de *SMYD2* e o percentual de células leucêmicas residuais no 15º dia de indução. De fato, análise de correlação de Spearman não mostrou correlação entre as duas variáveis no D15 ($R^2=0,3$; p=0,285).

No D29, entretanto, à exceção de um “outlier” nítido no gráfico de dispersão (**figura 18-C**, gráfico da direita), há correlação direta entre o nível de expressão do gene em questão e a quantidade de blastos detectáveis no exame citomorfológico do esfregaço (Spearman: $R^2=0,5$; p=0,05).

Além da análise global dos dados das amostras de seguimento, observamos que, se consideradas apenas aquelas amostras que apresentavam hiperexpressão significativa de *SMYD2* ao diagnóstico (marcadas em escuro na **tabela 18** e asteriscos na **figura 18-A**), todas as amostras do D29 apresentaram redução dos níveis de expressão desse gene alvo. Esse

achado sugere que talvez *SMYD2* seja um marcador de seguimento útil apenas para aqueles pacientes que apresentam níveis elevados de expressão ao diagnóstico.

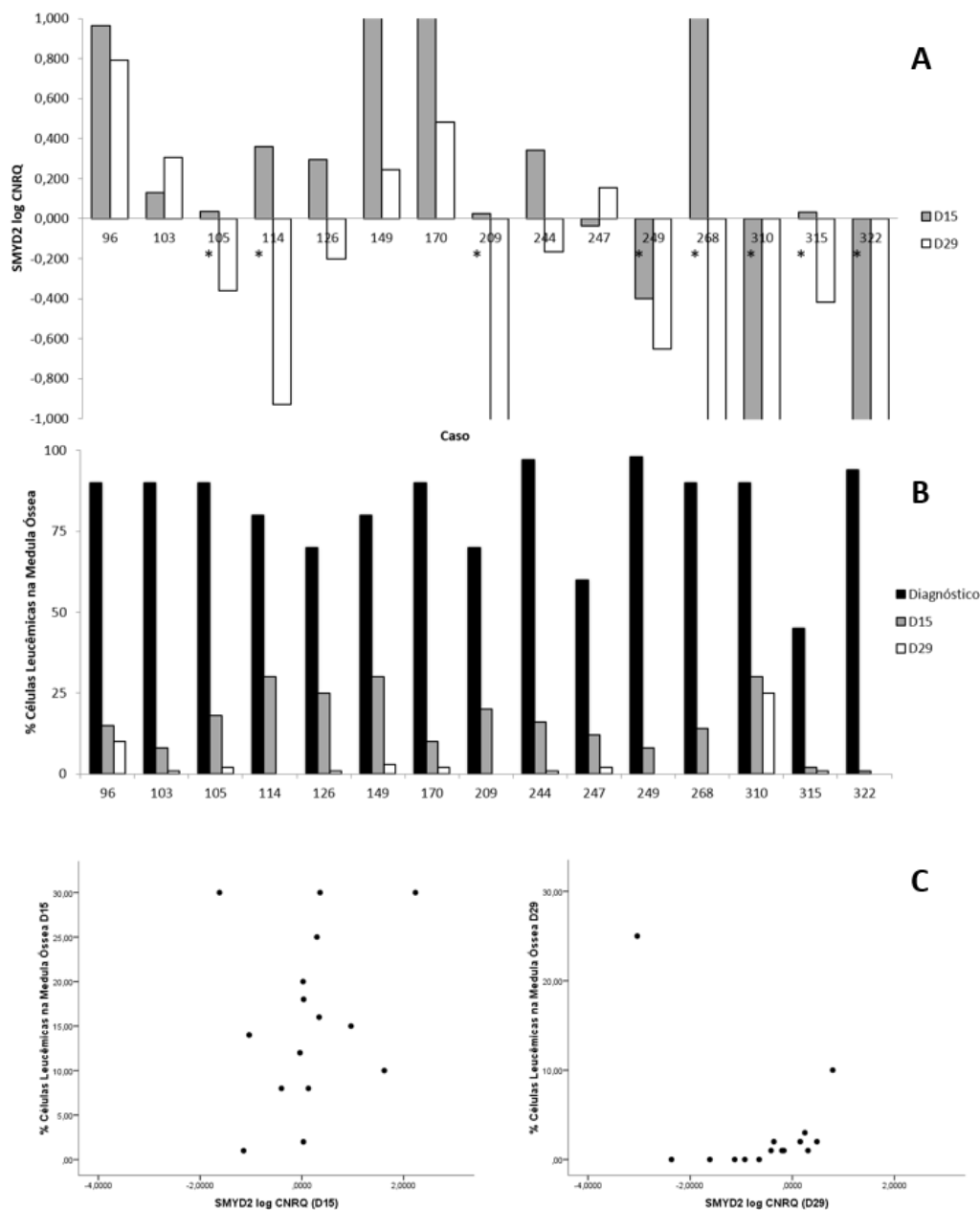


Figura 18 – Relação entre o percentual de blastos na medula óssea e expressão de *SMYD2* mRNA. (A) Valores dos log de RQ de *SMYD2* nos D15 e D29 de quimioterapia. As barras descontínuas significam que os valores máximo ou mínimo ultrapassaram o limite do gráfico. Os casos marcados com asterisco (*) foram classificados como alta expressão de *SMYD2* nas amostras do diagnóstico (CNRQ maior do que 4 comparado com as amostras não neoplásicas); (B) Comparação dos percentuais de linfoblastos leucêmicos no exame citomorfológico da medula ao diagnóstico, D15 e D29 da quimioterapia (valores absolutos); (C) Gráficos de dispersão mostrando a correlação entre o percentual de blastos e o nível de expressão de *SMYD2* mRNA na medula óssea nas amostras do D15 (esquerda) e D29 (direita).

4.7. RESULTADOS DE WESTERN-BLOT (WB) DAS AMOSTRAS DE LLA

Foram selecionadas 12 amostras de medula óssea, dentre as 83 amostras de LLA ao diagnóstico, para realização dos experimentos de WB, com o intuito de verificar se há relação entre a quantidade de RNAm de *SMYD2* observada nos experimentos de RT-qPCR e a quantidade da proteína detectável nas amostras.

A primeira tentativa de se trabalhar com as amostras armazenadas em Trizol®, pós extração de RNA não se mostrou eficiente, apesar de gerar quantidades, teoricamente, adequadas de proteínas para os experimentos de WB. Verificou-se, que mesmo após extrapolar a quantidade de lisado protéico para 20µg por poço na eletroforese em gel de poliacrilamida, não houve marcação com o anticorpo contra actina na membrana após incubação da membrana de PVDF.

Utilizou-se, então, novo lote de amostras congeladas a -80°C, sem a adição de reagente trizol, imediatamente após o processo de isolamento de mononucleares.

As quantificações pela espectrofotometria revelaram as concentrações listadas na **tabela 19**.

Tabela 19 - Quantificação de proteínas do lisado total por espectrofotometria pelo método de Bradford

Amostra	Conc. 1		Conc. 2		Desvio padrão concentração	Média concentração
	Abs1	ng/µL	Abs2	ng/µL		
264	1,7604	102,8717096	1,8731	111,4565194	6,070377225	107,1641145
247	1,9232	115,2728368	2,0486	124,8250564	6,754439255	120,0489466
219	1,7318	100,6931332	1,9521	117,4742654	11,86605237	109,0836993
213	1,4011	75,5023914	1,8862	112,4543988	26,12901501	93,9783951
87	1,9623	118,2512402	1,866	110,915684	5,187021533	114,5834621
88	1,9158	114,7091492	1,9561	117,7789614	2,170685024	116,2440553
95	1,9358	116,2326292	1,6117	91,5446358	17,45704755	103,8886325
103	1,8401	108,9427774	1,997	120,894478	8,451128541	114,9186277
104	1,9158	114,7091492	1,9609	118,1445966	2,429228153	116,4268729
108	1,9133	114,5187142	2,0037	121,4048438	4,869228936	117,961779
159	1,9352	116,1869248	1,9145	114,610123	1,114967245	115,3985239
170	1,27	65,51598	1,8948	113,1094952	33,65369734	89,3127376

Nota-se que, apesar de ao nível do RNAm todas as amostras apresentarem níveis detectáveis do transcrito do gene *SMYD2*, nem todas, de fato, apresentam expressão ao nível protéico. Além disso, como mostrado na **figura 19-A**, parece não haver relação entre a quantidade de proteína *SMYD2* (detectada por WB) e a de RNAm de *SMYD2* quando ambas são normalizadas para actina e *ACTB*, respectivamente.

Além disso, se consideradas as proporções entre RNAm e proteína, observamos que a variação entre as amostras é extremamente ampla (**Figura 19-B**).

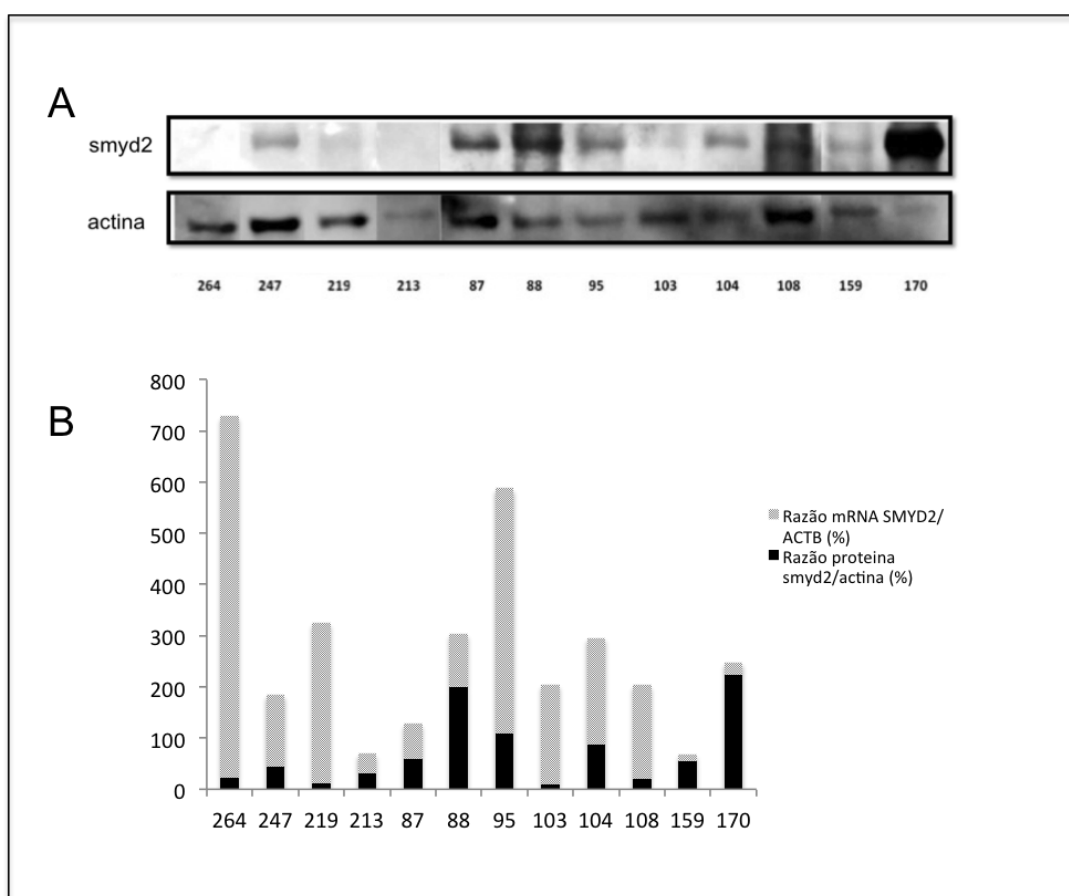


Figura 19 - Western-blot com extrato protéico total de amostras de medula óssea leucêmica ao diagnóstico com anticorpo anti-smyd2, normalizados com anticorpo anti-actina. (A) Gel de poliacrilamida 10% carregados com 10 μ g de extrato protéico total/poço. **(B)** Sobreposição das razões de expressão do transcrito SMYD2/ACTB por RT-qPCR e proteína smyd2/actina do experimento de Western-blot. Bandas do WB visualizadas com fotodocumentador Image Quant (GE Life Science) e intensidade das bandas com software ImageJ.

4.8. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR APÓS SILENCIAMENTO DE *SMYD2* COM SIRNA

Devido ao fato de que a hiperexpressão de *SMYD2* mostrou-se correlacionada com a presença de hiperleucocitose na coorte em questão, foi realizada investigação sobre o possível papel dessa alteração no estado proliferativo de células leucêmicas. Essa hipótese é reforçada pelo estudo de Cho et al, que demonstraram a redução da taxa de proliferação celular em linhagens de câncer de bexiga e pulmão após silenciamento com *SMYD2* siRNA (Cho, Hayami et al. 2012).

Para verificar a existência de tal relação também em leucemias, foi utilizado o método de citometria de fluxo para detecção e quantificação de células marcadas com CFSE após silenciamento de *SMYD2* com siRNA.

Antes do procedimento de silenciamento de *SMYD2* por siRNA foi realizada etapa de padronização dos experimentos com CFSE quanto à escolha da melhor linhagem celular a ser utilizada, concentração do reagente fluorescente e tempos de leitura no citômetro.

4.8.1. Escolha da linhagem e concentração de CFSE

As 4 linhagens derivadas de leucemias linfóides agudas disponíveis para o experimento de silenciamento apresentavam, à PCR em tempo real, hiperexpressão de *SMYD2* quando comparadas aos 8 controles normais não neoplásicos e, portanto, seriam adequadas ao experimentos com siRNA (**tabela 20**). Nota-se, entretanto, que ALL-697, Nalm6 e REH apresentam níveis de expressão de *SMYD2* muito superiores a RS4;11.

Tabela 20 – Valores de CNRQ de *SMYD2* para as 4 linhagens de LLA testadas

Linhagem	CNRQ <i>SMYD2</i>
RS4;11	7,50
Nalm-6	45,57
ALL-697	145,76
REH	39,48

O experimento de calibração da concentração de CFSE mostrou que a concentração final de 20µM do reagente, recomendada pelo fabricante, gerou níveis de fluorescência

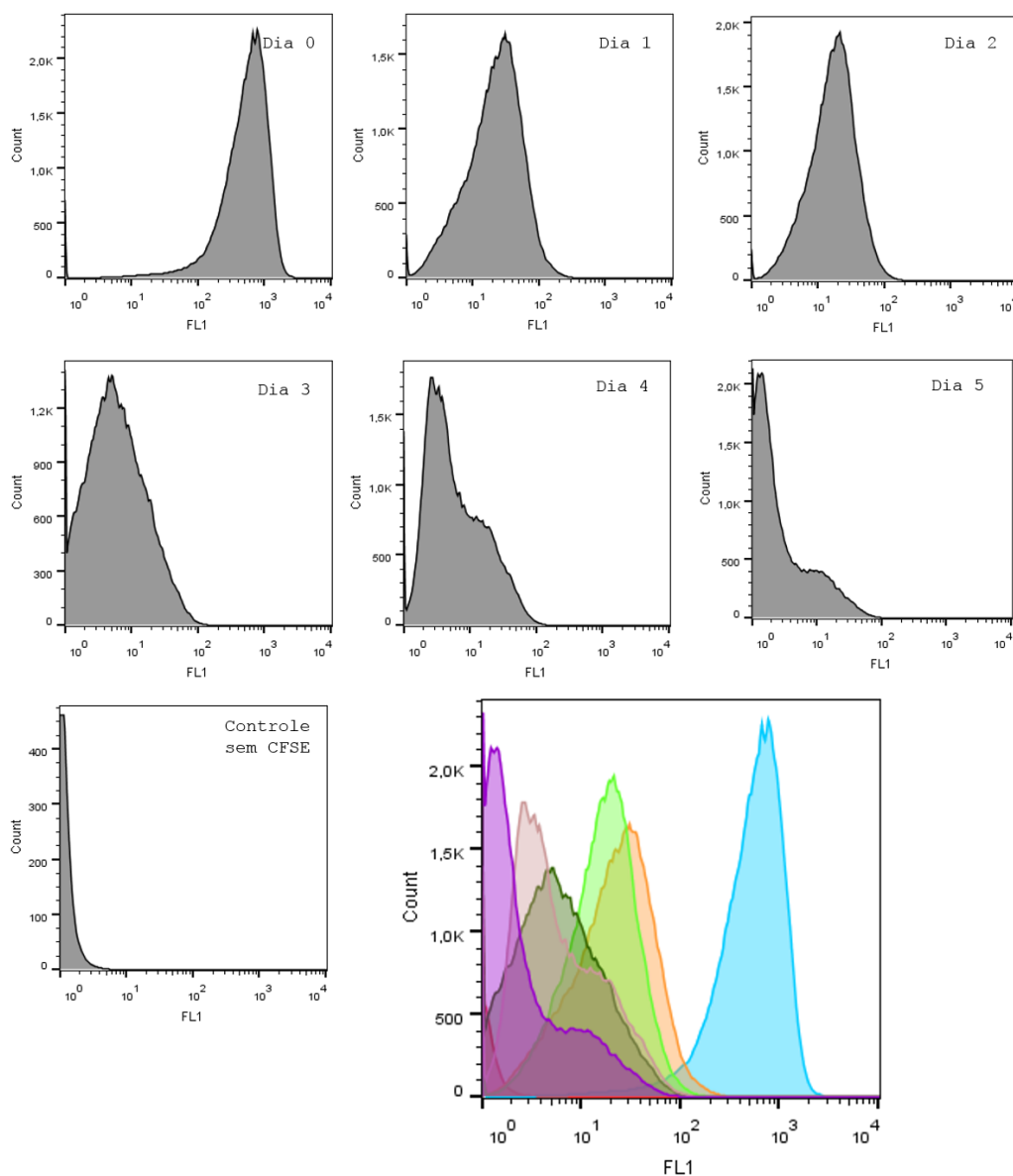
adequados para a detecção no citômetro de fluxo utilizado e permitia diferenciar várias divisões celulares antes de extrapolar o nível de fluorescência basal das células não marcadas (**figuras 20 a 23**).

Essa etapa de padronização permitiu também verificar que com um intervalo de 24h entre uma leitura e outra do meio de cultura é possível detectar nitidamente as diferenças de concentrações de CFSE nas células em divisão.

Uma observação realizada durante o experimento de calibração foi que do dia 0 de incubação com CFSE (imediatamente após incubação com o reagente) para o dia 1 de cultura (24h após a incubação com CFSE) há um hiato significativo de fluorescência, totalmente discrepante dos intervalos entre os demais picos dos dias subsequentes e que, portanto, não expressariam divisões celulares. Tal fato pode ser explicado devido à saída de quantidade significativa de CFSE do ambiente intracelular logo após a conversão do CFDA-SE pelas esterases intracelulares, fenômeno já descrito na literatura (Parish 2001).

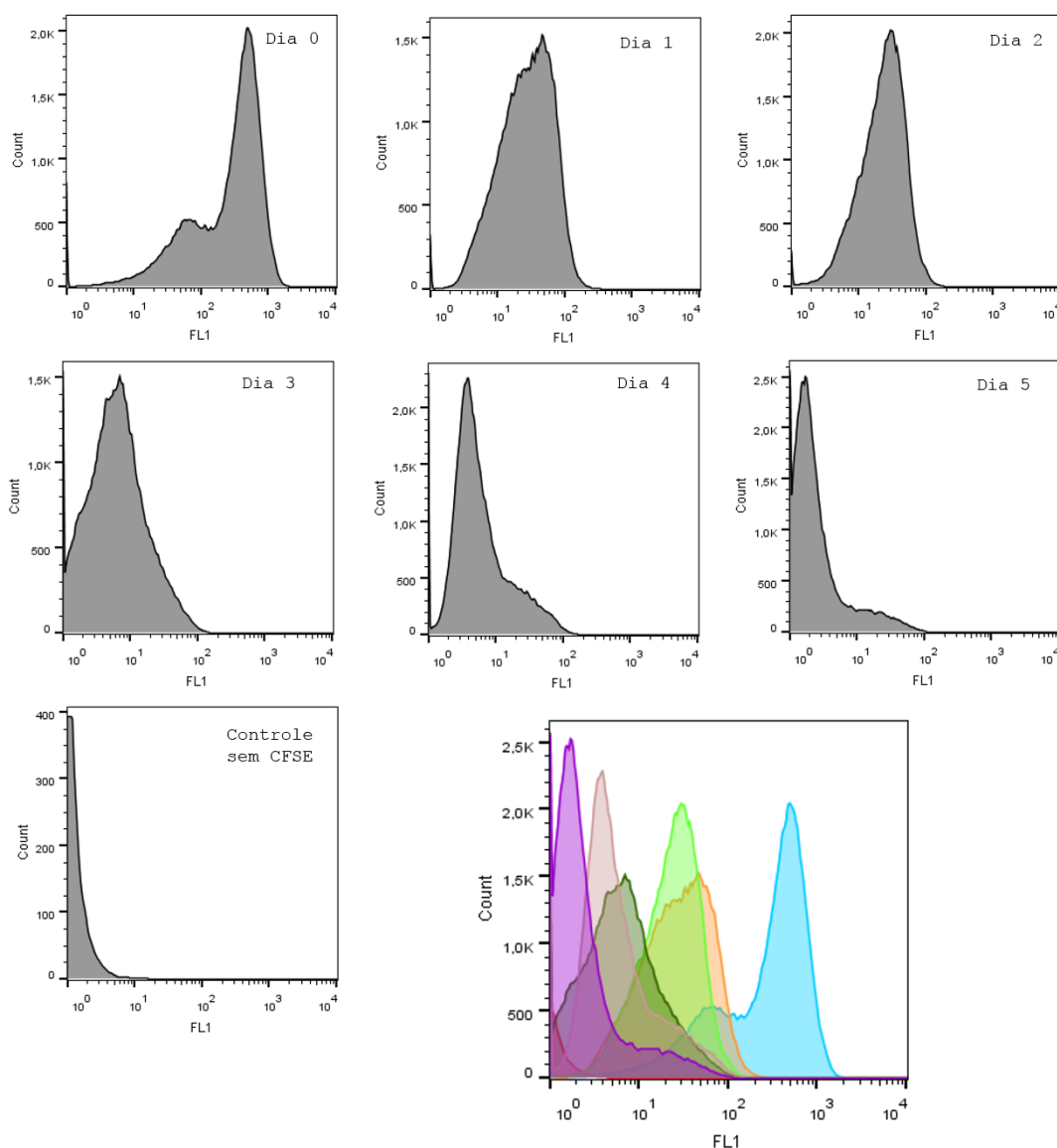
Dessa forma, padronizou-se que o início do experimento de transfecção do siRNA *SMYD2* se daria 24 horas após a exposição ao CFSE, para que se evitasse esse hiato.

Das 3 linhagens que mais expressaram *SMYD2* escolheu-se a Nalm-6 porque apresentou maior homogeneidade entre os picos de fluorescência no detector FL1 e, além disso, foi a que apresentou o segundo maior nível de expressão dentre células testadas. A linhagem ALL-697, apesar de apresentar o maior nível de expressão dentre as 3, não foi escolhida porque apresentou um pico duplo de fluorescência em FL1, o que poderia prejudicar a análise nos dias subsequentes.



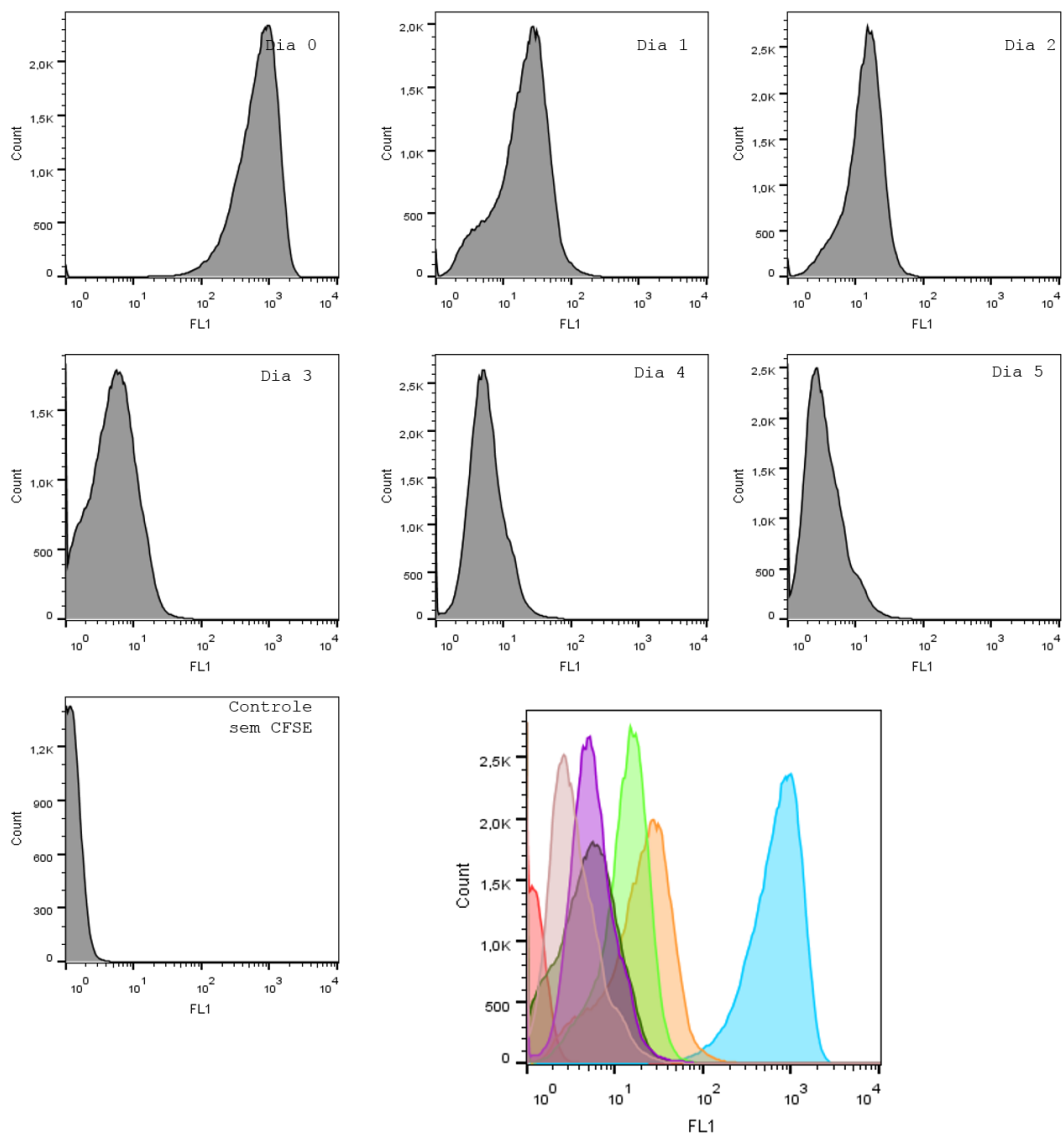
Sample Name	Count
NALM 6 CFSE positivo dia 5 sem gating.FCS	100000
NALM 6 CFSE positivo dia 4 (sem troca)(sem gating).FC	100000
NALM 6 CFSE positivo dia 3 sem gating.FCS	100000
NALM 6 CFSE positivo dia 2.FCS	100000
NALM 6 CFSE positivo dia 1.FCS	100000
NALM 6 CFSE positivo.FCS	100000
NALM 6 negativo.FCS	100000

Figura 20 – Experimento de calibração para ensaio com CFSE na linhagem celular NALM6. Realizadas leituras individuais no citômetro de fluxo com detector FL1 em cada um dos poços da placa de cultura a cada 24 horas, iniciando-se logo após incubação com o reagente fluorescente até o 5º dia de experimento. Gráficos em preto e branco correspondem aos histogramas individuais de cada uma das leituras diárias. A figura colorida corresponde a fusão de todos os histogramas em um único gráfico.



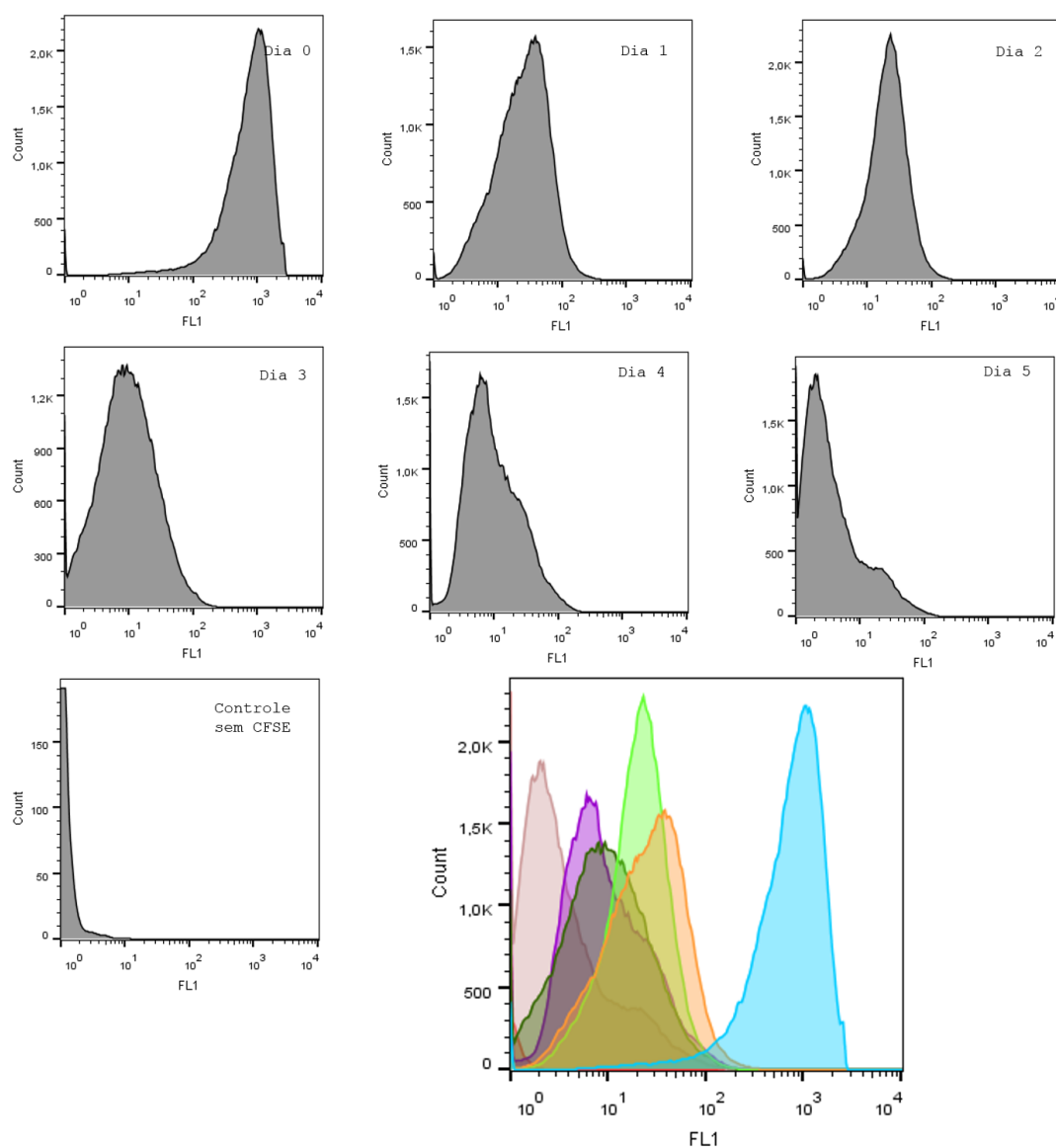
Sample Name	Count
697 CFSE positivo dia 5.FCS	100000
697 CFSE positivo dia 4 (sem troca).FCS	100000
697 CFSE positivo dia 3.FCS	100000
697 CFSE positivo dia 2.FCS	100000
697 CFSE positivo dia 1.FCS	100000
697 CFSE positivo.FCS	100000
697 negativo.FCS	100000

Figura 21 – Experimento de calibração para ensaio com CFSE na linhagem celular 697. Realizadas leituras individuais no citômetro de fluxo com detector FLI em cada um dos poços da placa de cultura a cada 24 horas, iniciando-se logo após incubação com o reagente fluorescente até o 5º dia de experimento. Gráficos em preto e branco correspondem aos histogramas individuais de cada uma das leituras diárias. A figura colorida corresponde a fusão de todos os histogramas em um único gráfico.



Sample Name	Count
RS CFSE positivo dia 5.FCS	100000
RS CFSE positivo dia 4 (sem troca)(sem gating).FC	100000
RS CFSE positivo dia 3.FCS	100000
RS CFSE positivo dia 2.FCS	100000
RS CFSE positivo dia 1.FCS	100000
RS CFSE positivo.FCS	100000
RS negativo.FCS	100000

Figura 22 – Experimento de calibração para ensaio com CFSE na linhagem celular RS4;11. Realizadas leituras individuais no citômetro de fluxo com detector FLI em cada um dos poços da placa de cultura a cada 24 horas, iniciando-se logo após incubação com o reagente fluorescente até o 5º dia de experimento. Gráficos em preto e branco correspondem aos histogramas individuais de cada uma das leituras diárias. A figura colorida corresponde a fusão de todos os histogramas em um único gráfico.



	Sample Name	Count
■	REH CFSE positivo.FCS	100000
■	REH CFSE positivo dia 1.FCS	100000
■	REH CFSE positivo dia 2.FCS	100000
■	REH CFSE positivo dia 3 sem gating.FCS	100000
■	REH CFSE positivo dia 4 (sem troca) (sem gating).FCS	100000
■	REH CFSE positivo dia 5 sem gating.FCS	100000
■	REH negativo.FCS	100000

Figura 23 – Experimento de calibração para ensaio com CFSE na linhagem celular REH. Realizadas leituras individuais no citômetro de fluxo com detector FLI em cada um dos poços da placa de cultura a cada 24 horas, iniciando-se logo após incubação com o reagente fluorescente até o 5º dia de experimento. Gráficos em preto e branco correspondem aos histogramas individuais de cada uma das leituras diárias. A figura colorida corresponde a fusão de todos os histogramas em um único gráfico.

4.8.2. Tempos de Leitura no Citômetro

O primeiro experimento de escolha da melhor linhagem celular e de teste da concentração de CFSE foi realizado em múltiplas leituras no citômetro de fluxo, sendo que para cada dia de cultura pós-exposição ao fluoróforo, realizou-se uma medida.

Tendo em vista que o citômetro de fluxo recebe um protocolo de calibração diário, optou-se por realizar a leitura de todo o experimento apenas no 4º e último dia de experimento (3 dias após a transfecção do siRNA), evitando-se, dessa forma, variações provenientes de diferenças na calibração do aparelho.

Dessa forma, foi necessária a introdução de um controle que demonstrasse o estado celular não proliferativo. Utilizou-se, para tanto, mitomicina C para induzir a parada do ciclo celular em um dos poços da placa de cultura. Após 72h de cultura, conforme mostra a **figura 24**, observamos que as células expostas a mitomicina C permaneciam com nível de fluorescência estável, enquanto as que não o foram, apresentaram redução do mesmo. Apesar de a contagem manual de células viáveis com câmara de Neubauer mostrar que o percentual de viabilidade era menor nas células expostas a mitomicina (90% sem mitomicina X 70% com mitomicina), considerou-se adequada a utilização do mesmo como parâmetro de parada do ciclo celular pelo fato do CFSE manter a mesma concentração intracelular tanto em células mortas quanto naquelas vivas, porém em G0.

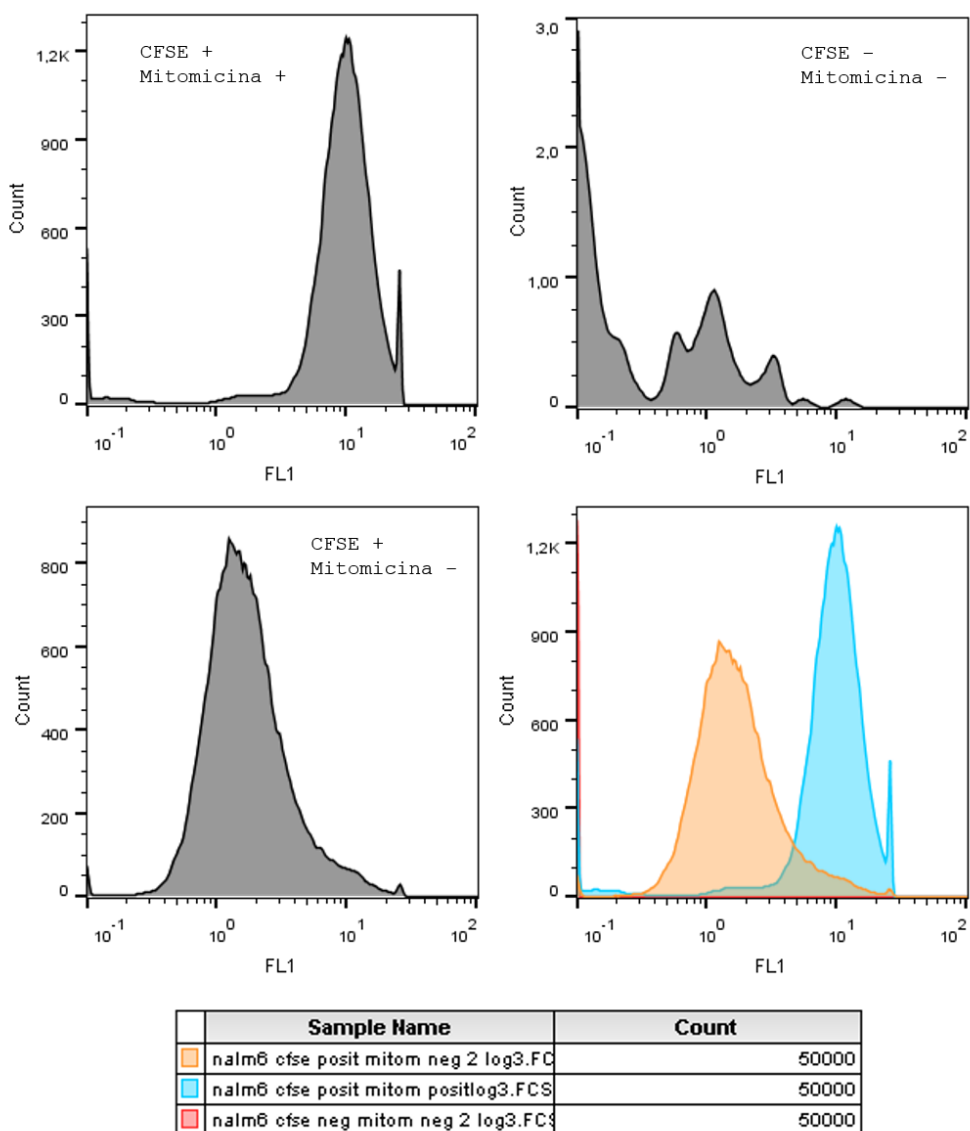


Figura 24 – Experimento de interrupção do ciclo celular com mitomicina C. Os gráficos em preto e branco mostram os histogramas gerados a partir da leitura no citômetro de fluxo com detector FL1 após 72h de cultura da linhagem NALM6 nas condições: com mitomicina e CFSE (Mitomicina + / CFSE +), sem mitomicina e com CFSE (Mitomicina - / CFSE +) e sem ambos os reagentes (Mitomicina - / CFSE -). A figura colorida representa a fusão de todos os histogramas.

4.8.3. Expressão de *SMYD2* por PCR em tempo real após silenciamento com siRNA

Os experimentos relatados nos itens 4.8.3 e 4.8.4 foram realizados em concomitância, tendo em vista a necessidade de se demonstrar o nível de expressão de *SMYD2* em cada uma das situações investigadas.

O silenciamento de *SMYD2* após incubação com siRNA foi verificado através de qPCR de alíquota de células isoladas antes da leitura no citômetro de fluxo. Conforme mostra a **tabela 21**, após 72h de transfecção com siRNA, demonstrou-se que o nível de expressão de *SMYD2* foi reduzido em 98,87% e 97,14% com *SMYD2* siRNA a 30nM e 15nM, respectivamente, o que comprova a eficácia do silenciamento por esse método. Graficamente os valores da tabela 21 são representados na **figura 25** para melhor visualização dos dados.

Quando as células são expostas a lipofectamina associada a mitomicina, sem a presença de siRNA, houve uma redução de 82,13% no nível de expressão de *SMYD2*, o que reforça o papel desse gene nas vias de controle do ciclo celular.

Tabela 21 – Valores de CNRQ de *SMYD2*, desvio padrão de CNRQ e percentual de redução de expressão.

Amostra	<i>SMYD2</i> CNRQ	Desvio Padrão CNRQ	Redução
Controle CFSE negativo	2,4480	0,5830	-144,80%
Controle Lipofectamina			
Mitomicina negativa	1,0850	0,1613	-8,50%
Controle Lipofectamina			
Mitomicina positiva	0,1787	0,0113	82,13%
siRNA Scrambled 30nM	1,0000	0,3097	0,00%
<i>SMYD2</i> siRNA 15nM	0,0286	0,0019	97,14%
<i>SMYD2</i> siRNA 30nM	0,0113	0,0014	98,87%

O cálculo do percentual de redução de expressão de *SMYD2* foi realizado, estabelecendo-se siRNA Scrambled 30nM como nível máximo de expressão do gene (100%).

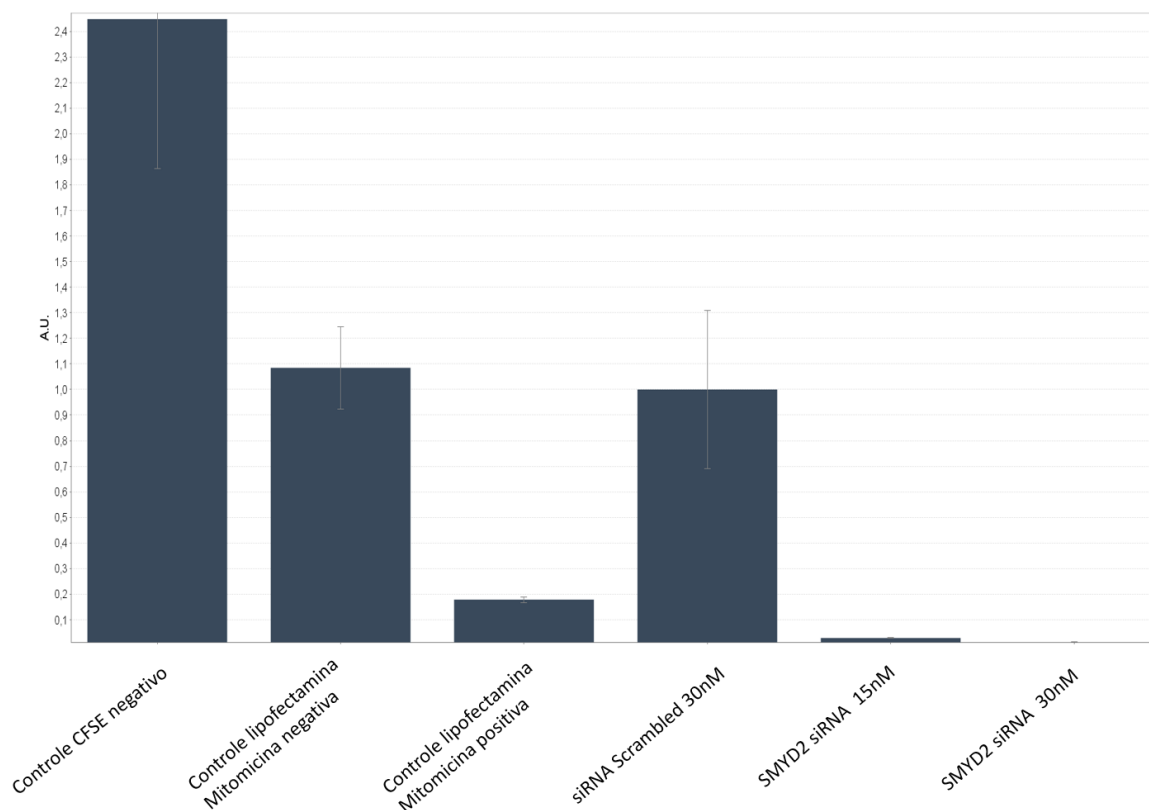


Figura 25 – Silenciamento de *SMYD2* ao nível de RNAm após incubação com siRNA. Gráfico mostrando o nível de expressão relativa de *SMYD2* por qPCR nas 6 situações estudadas após silenciamento com siRNA

4.8.4. Proliferação celular após silenciamento com *SMYD2* siRNA

As **figuras 26A e 26B** e a **tabela 22** mostram que os picos de frequência de concentração de CFSE permanecem praticamente os mesmos para as células submetidas a *SMYD2* siRNA 30nM, siRNA 15nM ou mitomicina C (picos em 835, 831 e 626 no detector FL1, respectivamente), o que significa que não houve diferença significativa entre as taxas proliferativas nessas situações.

Também se observa, tanto na **figura 26A** quanto na **tabela 22** que também não houve diferença relevante na taxa proliferativa das células incubadas com siRNA scrambled ou apenas com lipofectamina.

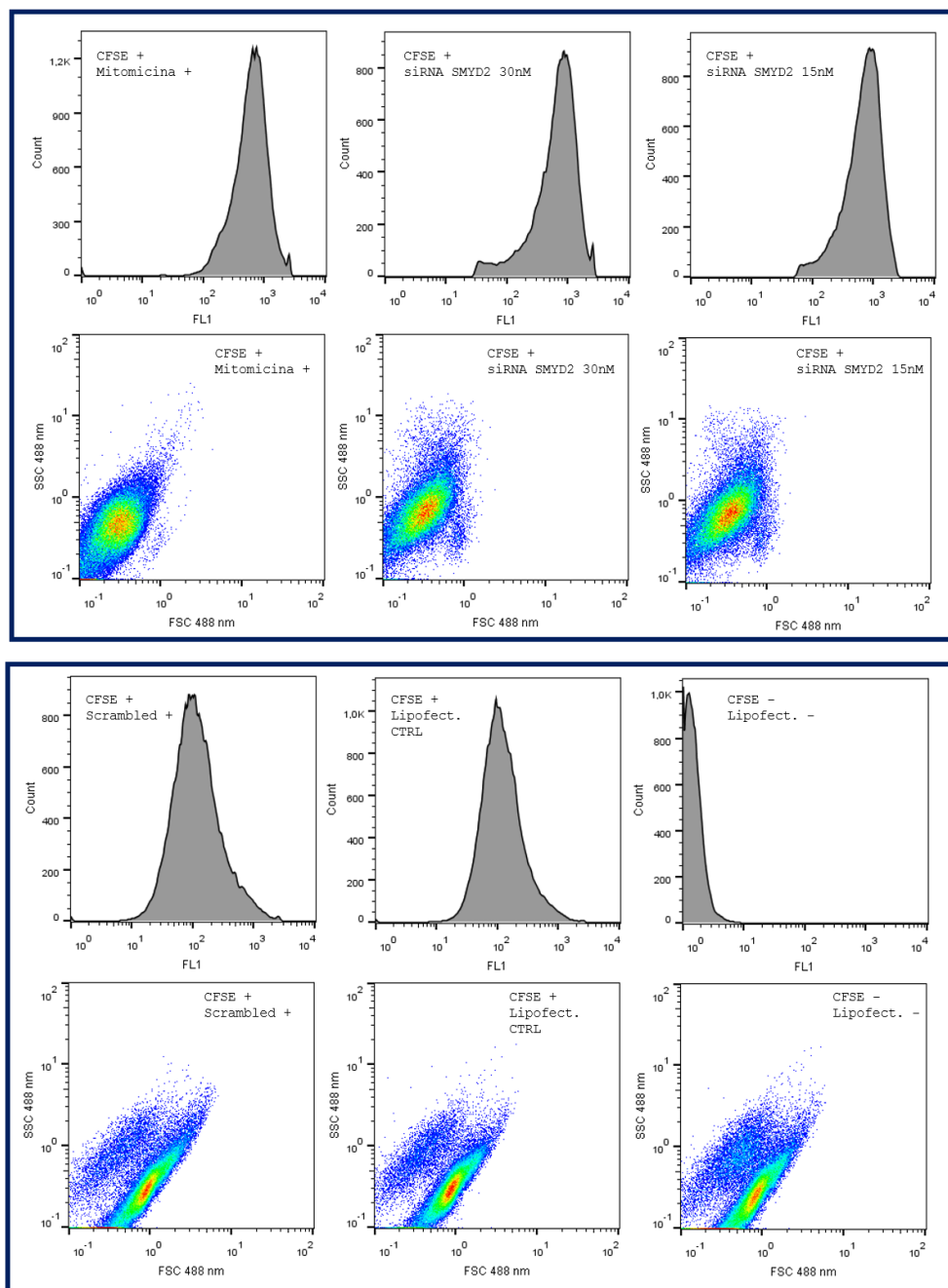


Figura 26A – Silenciamento de *SMYD2* com siRNA reduz a taxa de proliferação celular em linhagem Nalm-6. Os gráficos em preto e branco mostram os histogramas gerados a partir da leitura no citômetro de fluxo com detector FLI (sinal de CFSE). Os gráficos de dispersão foram gerados a partir dos sinais dos detectores SSC e FCS para verificar homogeneidade da amostra em termos de tamanho e granulosidade. Legenda: CFSE + ou - : células incubadas com ou sem reagente CFSE, respectivamente; mitomicina +: células incubadas com mitomicina (os demais poços não receberam o reagente); siRNA SMYD2 30nM: células incubadas com siRNA contra SMYD2 na concentração final de 30nM; siRNA SMYD2 15nM: células incubadas com siRNA contra SMYD2 na concentração final de 15nM; siRNA scrambled +: células incubadas com siRNA controle negativo na concentração final de 30nM; Lipofectamina CTRL: células foram incubadas apenas com CFSE e lipofectamina; CFSE - / Lipofectamina - : células incubadas sem CFSE e sem lipofectamina.

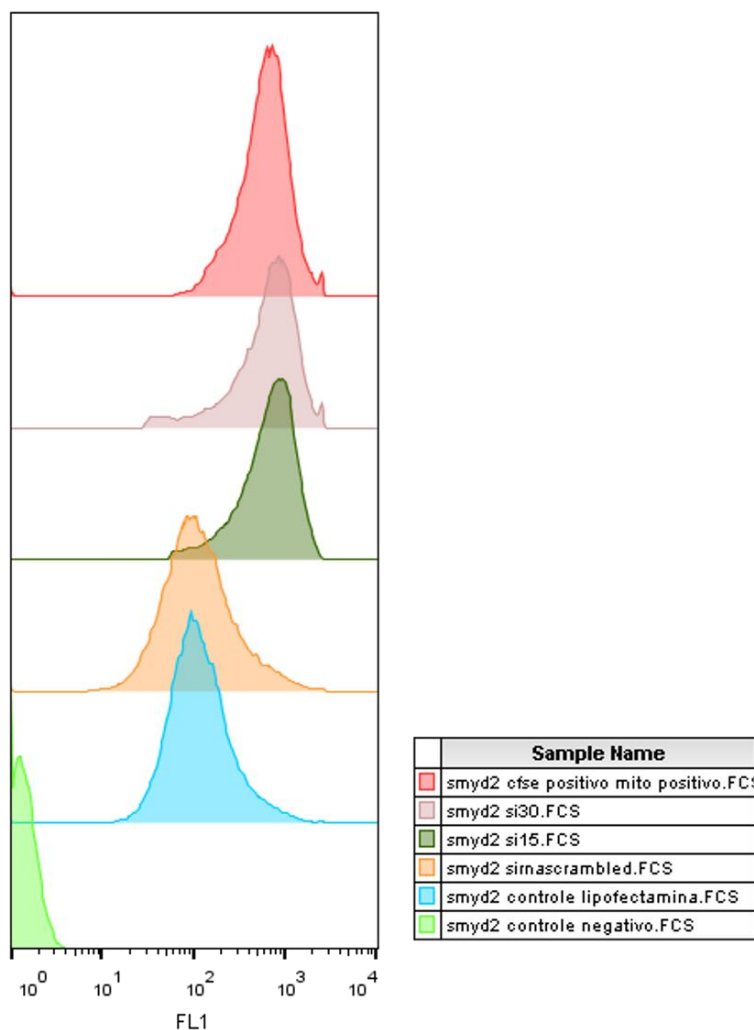


Figura 26B – Silenciamento de *SMYD2* com siRNA reduz a taxa de proliferação celular em linhagem Nalm-6. Fusão dos histogramas da figura 25A. Legenda: CFSE positivo mito positivo: células incubadas com CFSE e mitomicina; smyd2 si30: células incubadas com CFSE e siRNA SMYD2 30nM; smyd2 si15: células incubadas com CFSE e siRNA SMYD2 15nM; smyd2 sirnascrambled: células incubadas com CFSE siRNA controle negativo na concentração final de 30nM; smyd2 controle lipofectamina: células incubadas apenas com CFSE e lipofectamina; smyd2 controle negativo: células incubadas sem CFSE e sem lipofectamina.

O gráfico da **figura 27** expressa os valores de fluorescência em FL1 nos picos de maiores frequências para as 6 situações testadas. Quanto maior o nível de fluorescência por célula menor a quantidade de divisões sofridas pelas células e, portanto, menor a taxa de proliferação celular.

Tabela 22 – Valores absolutos de fluorescência em FLI no pico de concentração de células e mediana de fluorescência em FLI

Amostra	Valor de FLI no pico de fluorescência	Mediana da fluorescência em FLI
Controle Lipofectamina Mitomicina positiva	626	607
SMYD2 siRNA 30nM	835	695
SMYD2 siRNA 15nM	831	706
siRNA Scrambled 30nM	83,5	106
Controle Lipofectamina Mitomicina negativa	93,1	109
Controle CFSE negativo	1,4	1

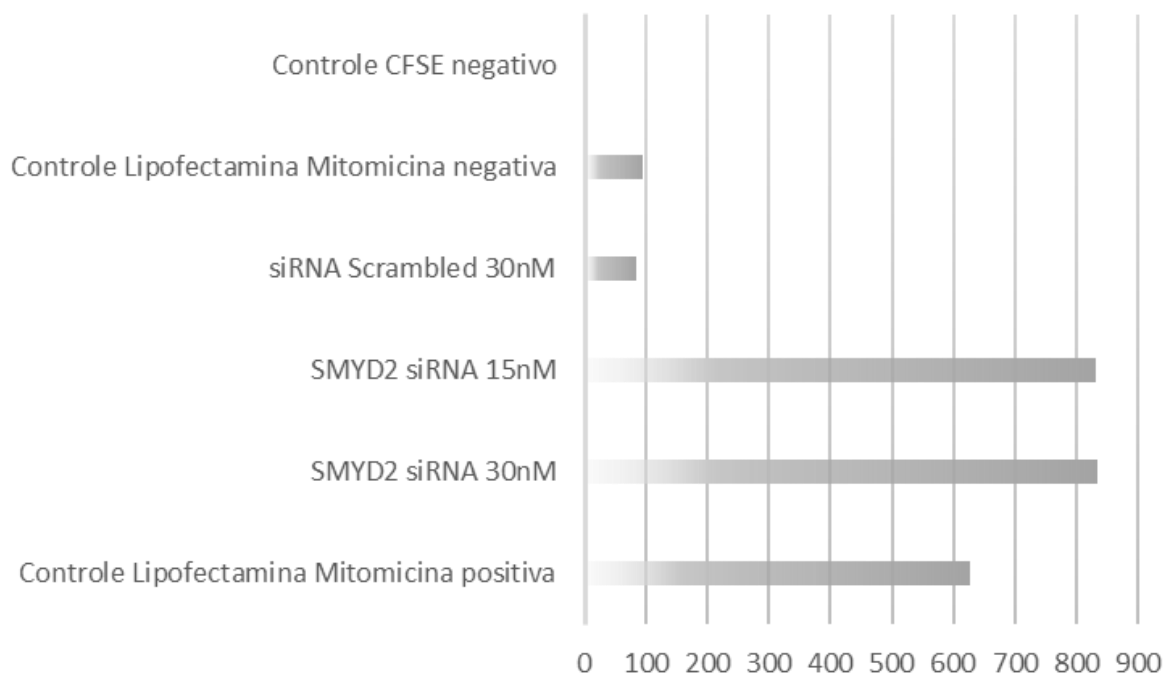


Figura 27 – Representação gráfica dos valores relativos de fluorescência detectável correspondente ao CFSE no ponto de maior frequência do histograma gerado na aquisição com detector FL1 (488nM)

Em resumo, através do ensaio com CFSE, observou-se que houve redução significativa da taxa de proliferação celular após silenciamento efetivo de *SMYD2* com siRNA.

5. DISCUSSÃO

O estudo inicial partiu da observação clínico-laboratorial de supostos genes-candidatos a exercerem algum papel na leucemogênese ou na determinação prognóstica dos pacientes. Em um segundo momento, a partir da seleção dos melhores candidatos, partiu-se para a fase funcional do estudo.

A análise estatística dos dados clínicos dos 83 pacientes que compuseram o estudo mostrou que a distribuição de frequências das variáveis estudadas, a saber: gênero, idade, leucometria ao diagnóstico, imunofenotipagem, distribuição por grupos de risco, achados de translocações cromossômicas recorrentes e resposta indutória não divergiram do que é classicamente descrito na literatura (Pui, Pei et al. 2010; Pui, Carroll et al. 2011). No entanto, a taxa de sobrevida global na instituição sede deste estudo (71,1% em 3 anos), no entanto, quando comparada às alcançadas pelos centros de tratamento mais avançados no mundo, certamente, ficam aquém do desejado. O Estudo 15 do St. Jude Children's Hospital, por exemplo conseguiu alcançar taxas de sobrevida global em 4 anos de cerca de 90% em um grupo não selecionado (Pui and Evans 2006).

De forma geral, no entanto, considerou-se neste estudo que as características epidemiológicas e a resposta inicial ao tratamento são condizentes com a literatura e semelhantes àquelas obtidas por outros centros brasileiros de tratamento oncológico infantil. Essa coorte, portanto, pode ser considerada como adequada para as comparações à que se propõe o estudo.

A comparação entre o grupo de amostras leucêmicas e controle não neoplásico mostrou que grande parte dos genes da família SETD e SMYD apresentavam-se hiperexpressos em LLA. Esse resultado, apesar de não ter sido gerado a partir do mesmo método, é compatível com aqueles descritos por Haferlach *et al.* (2010), que também descreveram hiperexpressão dos genes *SMYD2*, *SMYD5*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4* e *SETMAR*, quando compararam amostras de LLA precursora B da infância com mononucleares de sangue periférico (Haferlach, Kohlmann et al. 2010). A concordância com dados obtidos a partir de microarranjos, tendo como base de comparação grupos de amostras semelhantes reforça a confiabilidade dos achados do presente estudo e diminuem as chances das mesmas terem ocorrido meramente ao acaso ou por viés de amostragem.

Um achado especialmente intrigante foi a alta taxa de correlação entre os níveis de expressão dos genes que se mostraram diferencialmente expressos em leucemias.

Recentemente Noh *et al.* (2014) verificaram, em linhagens de câncer de pulmão, que o tratamento com paclitaxel induz a reexpressão da proteína p53 e diminui a expressão de *SETDB1*, uma metiltransferases de lisinas com atividade H3K9me, que participa do processo de compactação da cromatina durante a diferenciação, desenvolvimento e morte celular (Noh, Kim et al. 2014). A presença da marca epigenética de H3K9me está, em geral, relacionada com silenciamento transcricional (Tachibana, Matsumura et al. 2008). Além disso, os autores demonstraram que a transfecção de TP53 é capaz de inibir a atividade do promotor de *SETDB1*. No mesmo estudo, verificou-se ainda que p53 se liga ao promotor de *SETDB1*, induzindo H3K9me₃ que foi, em parte, atribuída a interação dessa proteína com a metiltransferase *SUV39H1*. Os autores concluíram que a atividade do complexo p53-Suv39H1, induzida pelo paclitaxel, é responsável pelo aumento da atividade H3K9me₃ na região codificadora de *SETDB1* e que esse aumento da metilação de resíduos de lisina seria capaz de reduzir a atividade do promotor, levando a uma menor expressão desse gene (Noh, Kim et al. 2014).

Apesar de constituir uma evidência ainda incipiente, o estudo mostra que, além da já descrita interação proteína-proteína que existe com algumas metiltransferases de lisinas entre si ou com outras proteínas não-metiltransferases ou com metiltransferases de DNA, pode haver também o controle transcricional em nível da atividade do promotor de um gene codificador de uma metiltransferase regulada por outra metiltransferase de proteína. Dessa forma, talvez a correlação encontrada em nossas amostras possa refletir a existência de um regulador transcricional comum ou ainda de uma regulação coordenada em cadeia de várias metiltransferases de proteínas.

Apesar dos poucos dados na literatura sobre a função fisiológica de *SMYD5*, é interessante ressaltar o possível papel dessa metiltransferase de lisinas no desencadeamento de respostas inflamatórias, tendo em vista o evidente papel desses processos na carcinogênese de uma maneira geral (Chen, Balakrishnan et al. 2010). Estudo de Stender *et al.* (2012) identificaram *SMYD5* como um regulador negativo de genes de resposta inflamatória, em especial daqueles responsivos a *TLR4* (Toll-like receptor 4), após estímulo com KLA (Kdo2 lipid A). Além disso, os autores descreveram também a função de H4K20me₃ de *SMYD5* nos promotores de genes responsivos à *TRL4* (Stender, Pascual et al. 2012). Ainda não existem, entretanto, relatos de função direta desse gene na carcinogênese.

SETD2, através de sua atividade H3K36me₃ associada com RNA polimerase II hiperfosforilada, está envolvida na alongação transcricional (Zhu, He et al. 2014). Um efeito

supressor tumoral já parece estar bem descrito por vários estudos, em especial, em carcinomas renais de células claras (Duns, van den Berg et al. 2010), câncer de mama (Newbold and Mokbel 2010) e gliomas de alto grau (Fontebasso, Schwartzentruber et al. 2013). Além disso, recentemente, Mar *et al.* (2014) identificaram, através de sequenciamento genômico de alta performance, uma frequência aumentada de mutações somáticas de genes reguladores epigenéticos, dentre eles *SETD2*, em sua maioria do tipo perda de função em frameshift ou mutações non-sense, em amostras de LLA imunofenótipo B de crianças (Mar, Bullinger et al. 2014). Além disso, os autores descreveram uma frequência ainda maior de mutações nesses genes reguladores epigenéticos nas amostras de recaída de LLA-B (Mar, Bullinger et al. 2014). Não há, entretanto, descrição na literatura sobre uma possível explicação para a relação entre o achado de tais mutações e a presença de hiperexpressão de *SETD2* nas amostras leucêmicas descritas em nosso estudo e concordante com estudo de Haferlach *et al.* (2010) (Haferlach, Kohlmann et al. 2010).

SETD3 é uma H3K4 e H3K36 metiltransferase, que em geral está associada com ativação transcricional, abundantemente expressa em tecido muscular. Esse gene está envolvido na diferenciação celular do músculo e, quando hiperexpressa, ativa a transcrição de genes como miogenina, creatina cinase muscular e fator miogênico 6 (Eom, Kim et al. 2011). Em linfomas de células B periféricas esse gene está envolvido na translocação com o locus da cadeia leve lambda de imunoglobulinas. No contexto dessa translocação, o mRNA truncado de *SETD3* encontra-se com o domínio SET ausente e a proteína quimérica resultante parece ter potencial oncogênico (Chen, Yan et al. 2013).

SETD4 é um gene ainda muito pouco estudado. Neste estudo mostrou-se hiperexpresso nas amostras de leucemia e, além disso, diretamente relacionado a piores taxas de sobrevida em nossa coorte. O primeiro estudo de caracterização deste gene, realizado por Faria *et al.* (2013), demonstrou que o gene *SETD4* encontra-se hiperexpresso em amostras triplo negativas de carcinomas de mama e que seu silenciamento interfere na expressão de ciclina D1, reduzindo a proliferação por inibição do ciclo celular na transição entre G1/S (Faria, Correa et al. 2013). Em outro estudo, Li *et al.* (2014) demonstraram que o silenciamento de *SETD4* por RNAi foi capaz de aumentar a sensibilidade de células HepG2 ao sorafenib, uma molécula inibidora de atividade cinase de tirosina, raf e serina/treonina, utilizada para o tratamento de carcinomas hepatocelular e de células renais (Li, Wang et al. 2014).

Um dos desdobramentos do presente estudo consiste no detalhamento dos achados encontrados para esse gene e dados preliminares apontam que, de forma bastante consistente, *SETD4*, à semelhança do que ocorre com *SMYD2*, também tem seu nível de expressão reduzido após o tratamento indutório de LLA (dados não mostrados). Caso seja encontrado algum significado biológico para o aumento de expressão de *SETD4* em LLA, talvez essa possa se tornar uma justificativa ao uso do inibidor de cinase soresfinib também nesse tipo de câncer.

SETMAR, também conhecido como Metnase, consiste em uma proteína com dois domínios funcionais, um domínio SET com atividade metiltransferase H3K36 e outro com atividade de transposase. Essa proteína participa do processo de reparo de quebras de dupla fita de DNA em terminações juncionais não-homólogas (NHEJ, do inglês non-homologous end-joining) através da sua interação com a DNA ligase IV (Williamson, Rasila et al. 2008; Wray, Williamson et al. 2010).

Estudos mostram que a Metnase aumenta a decatenação mediada pela topoisomerase II α (topoII α). Esse processo ocorre durante a replicação do DNA e, em última instância, impede que as cromátides irmãs se rompam durante a anáfase. Os inibidores de topoII α impedem o processo de decatenação e causam a interrupção do ciclo celular durante a mitose (Williamson, Rasila et al. 2008; Wray, Williamson et al. 2009; Wray, Williamson et al. 2009).

Em linhagem de câncer de mama, a redução da expressão de Metnase levou a um aumento significativo do período de parada no *checkpoint* de decatenação durante a metáfase, em um efeito semelhante ao causado pelos inibidores de topoisomerase (Wray, Williamson et al. 2009).

Wray *et al.* (2009) demonstraram, em linhagem de leucemia mielóide aguda, que a metnase permite a proliferação desenfreada das células mesmo na presença de inibidores de topoII α . O nível aumentado de expressão de metnase, portanto, seria preditor de quimiorresistência aos inibidores de topoII α neste tipo celular e poderia ser utilizado como alvo para sensibilização das células aos quimioterápicos dessa classe (Wray, Williamson et al. 2009).

Em nosso estudo, o nível de expressão relativa aumentado de *SETMAR* /Metnase nas amostras de leucemia em relação às amostras não-neoplásicas pode ser um indício de um possível papel desse gene no processo carcinogênico ou ser decorrente, simplesmente, de uma maior taxa replicativa, própria desse tipo celular.

Wray *et al.* (2009) mostraram em células de câncer de mama que a hiperexpressão de Metnase era capaz de induzir resistência não apenas aos clássicos inibidores de topoiIIα da classe das epipodofilotoxinas (etoposide e teniposide), como também aos antracíclicos (Wray, Williamson *et al.* 2009). Em corroboração com esses dados, Williamson *et al.* (2012) demonstraram que o antibiótico ciprofloxacino é capaz de inibir a clivagem do DNA induzida por Metnase, bem como de inibir o reparo de DNA dependente dessa enzima, aumentando, portanto, a sensibilidade de células cancerígenas a quimioterapia (Williamson, Damiani *et al.* 2012).

SMYD2, um dos membros da família “*SET and MYND (Myeloid, Nervy and DEAF-1) domain-containing protein*” (SMYD), possui, além das atividades metiltransferases H3K36 e H3K4, também a propriedade de metilar resíduos de lisina em proteínas não-histonas (Abu-Farha, Lambert *et al.* 2008). A proteína possui, assim como os outros membros da família SMYD um domínio SET que é separado em dois pelo domínio MYND, seguido de um domínio pós-SET rico em cisteína (Brown, Sims *et al.* 2006), conforme ilustra a **figura 28**.

O domínio SET possui um motivo GxG altamente conservado entre as metiltransferases de lisinas que constitui o sítio de ligação com o cosubstrato AdoMet. O domínio MYND, por sua vez, possui um motivo em dedos de zinco também altamente conservado que medeia as interações proteína-proteína. O domínio pós-SET ainda tem função pouco estudada (Wu, Cheung *et al.* 2011).

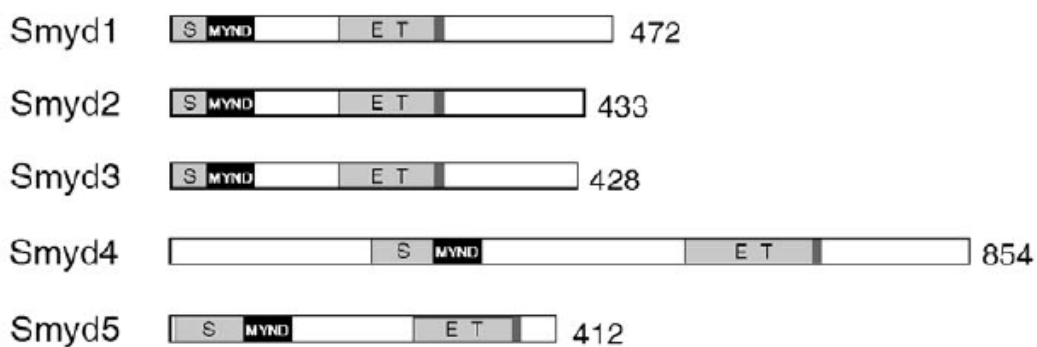


Figura 28 – Representação esquemática dos domínios conservados dos 5 membros da família SMYD. Em preto o domínio MYND, entremeando o domínio SET (cinza claro), seguido de um domínio pós-SET rico em cisteína (cinza escuro). Retirado de Brown *et al.* (2006) (Brown, Sims *et al.* 2006).

O RNAm de *SMYD2* em condições fisiológicas é altamente expresso nos tecidos cardíaco e cerebral, conforme mostram estudos de Northern-blot e hibridização *in situ*,

apesar de haver um nível de expressão basal também em outros órgãos, como fígado, rins, timo, ovário e testículos (Brown, Sims et al. 2006). A hiperexpressão da proteína Smyd2 através de vetor plasmidial transfectado em linhagem 293T levou ao acúmulo da proteína tanto no núcleo quanto no citoplasma (Brown, Sims et al. 2006).

Huang *et al.* (2006) observaram que a metilação mediada por SMYD2 na lisina 370 da proteína p53 era capaz de reprimir a apoptose p53-mediada (Huang, Perez-Burgos et al. 2006).

Cho *et al.* (2012) demonstraram SMYD2 é capaz de aumentar o nível de fosforilação de pRb (proteína do retinoblastoma) através da atividade metiltransferase na lisina 810 dessa proteína e, dessa forma, promover a progressão do ciclo celular em linhagens celulares de diversos tipos de tumor.

Komatsu *et al.* (2009) mostraram que a hiperexpressão de *SMYD2* se correlaciona com maiores taxas de proliferação celular, bem como a um pior prognóstico em pacientes com carcinoma esofágico de células escamosas (Komatsu, Imoto et al. 2009).

Assim, o achado de hiperexpressão de *SMYD2* nas amostras leucêmicas, quando comparadas às não neoplásicas, corrobora com a hipótese de um possível papel deste gene também na leucemogênese.

A observação de que os níveis de expressão de *SMYD2* se associam proporcionalmente ao risco de óbito dos pacientes, constitui um achado inédito em leucemias linfóides agudas e, de certa forma, também corrobora com os achados já descritos em carcinoma de esôfago (Komatsu, Imoto et al. 2009). Mais importante, quando analisada junto ao modelo multivariado, o nível de expressão de *SMYD2* se mantém como determinante de pior sobrevida, o que indica ser este um possível fator prognóstico independente em LLA da infância.

Ademais, o fato de o transcrito de *SMYD2* ser mais frequentemente hiperexpresso em pacientes com idade desfavorável e hiperleucocitose ao diagnóstico, também falam a favor do papel desse gene na determinação da agressividade da doença, à semelhança do que já foi demonstrado em câncer de esôfago (Komatsu, Imoto et al. 2009).

Os experimentos de WB para SMYD2, no entanto, mostraram não haver relação entre o nível de transcrito do gene e da proteína correspondente. Este resultado, no entanto, não reduz o impacto do achado descrito no estudo ao nível de RNAm, tendo em vista que, em mamíferos, o grau de correlação entre concentração de proteínas e RNAm é muito modesto (de Sousa Abreu, Penalva et al. 2009; Schwanhausser, Busse et al. 2011). Do ponto

de vista metodológico há que se considerar, por exemplo, a dependência do método de WB ao nível de degradação protéica na amostra e ao grau de eficiência de interação dos anticorpos contra a proteína alvo e normalizador.

Em relação aos processos biológicos intracelulares, sabe-se que a concentração intracelular de uma proteína depende, não apenas da taxa de transcrição do gene, como também da taxa de degradação do RNAm, da taxa de tradução deste RNAm em proteína, bem como da taxa de degradação protéica. Além disso, a concentração da proteína não necessariamente traduz o nível de atividade da mesma, face aos mecanismos de controle pós-traducionais já amplamente conhecidos (de Sousa Abreu, Penalva et al. 2009).

Através de experimentos com citometria de fluxo demonstramos que o silenciamento de *SMYD2* por RNAi foi capaz de diminuir a taxa de proliferação celular em linhagem de LLA, à semelhança do que já fora demonstrado em linhagens de neoplasias não-hematológicas (Cho, Hayami et al. 2012). Tal repercussão biológica pode ser explicada por diversos mecanismos já descritos na literatura.

Do ponto de vista da ação metiltransferase de lisinas em proteínas não-histônicas, a monometilação aberrante da K370 de p53 induzida pela hiperexpressão de Smyd2 poderia levar a uma redução da sua função pró-apoptótica, conforme demonstrado por Huang *et al.* (2006). Nesse estudo os autores demonstraram em linhagens de fibroblastos humanos que a redução das concentrações de Smyd2 por siRNA se correlacionaram com o aumento da expressão de p21 e mdm2, dois genes negativamente regulados por p53, efetores de vias que levam a progressão do ciclo celular. O mecanismo pelo qual Smyd2 reduziria a atividade pró-apoptótica de p53 não se daria por uma maior taxa de degradação protéica, mas sim pela redução da concentração de p53 associado aos promotores dos genes alvo, que seria determinada por p53K370me1 (Huang, Perez-Burgos et al. 2006).

No contexto das LLA da infância Marks *et al.* (1997) demonstraram que mutações inativadoras de p53 e hiperexpressão de mdm2 são mais frequentemente encontradas em pacientes com falha de terapia indutória ou com recaídas precoces após remissão completa (Marks, Kurz et al. 1997). Hof *et al.* (2011) mais recentemente demonstraram, em crianças com LLA em primeira recaída, que mutações e deleções de TP53 foram mais frequentemente encontradas naqueles mau respondedores a quimioterapia de resgate. Esses autores também verificaram que tais alterações mantinham-se como determinantes de pior sobrevida livre de evento e menor sobrevida global mesmo no modelo multivariado. Além disso, através de citometria de fluxo demonstraram também que as alterações de TP53 estavam associadas

com uma maior fração de células leucêmicas na fase S/G2-M do ciclo celular na recaída (Hof, Krentz et al. 2011).

Outro possível mecanismo que poderia explicar a menor taxa proliferativa em linhagem de leucemia após silenciamento de *SMYD2* seria a redução da metilação de pRb e, portanto, diminuição de sua fosforilação. Conforme demonstrado por Cho *et al.* (2012) através de ensaio de metiltransferase *in vitro*, Smyd2 metila lisina 810 de pRb e essa metilação foi responsável por aumentar a fosforilação de Ser 807/810 também *in vivo*. Além disso, demonstrou-se também que pRb metilado acelerou a atividade transcricional de E2F, efetor direto da progressão G1/S do ciclo celular, de forma semelhante ao que pode ser observado diretamente com o estado fosforilado desse supressor tumoral (Cho, Hayami et al. 2012).

Do ponto de vista genômico em LLA da infância sabe-se que deleções de 13q, a região cromossômica onde se localiza RB1, o gene que codifica pRb, determinam maior risco de recaídas (Moorman, Ensor et al. 2010). Entretanto, Schwab *et al.* (2013) verificaram que apenas 50% dos casos das LLA de células precursoras B com anormalidades detectáveis de 13q estavam associados com deleções de RB1 (Schwab, Chilton et al. 2013), demonstrando, talvez, que do ponto de vista de achado ao diagnóstico, a perda de função de pRb não seja tão importante nesse tipo de neoplasia.

Addeo *et al.* (2004) mostraram, porém, que após 48h de tratamento com glicocorticóide, os blastos provenientes de crianças com LLA apresentavam-se com frequência significativamente maior nas fases G0/G1 do ciclo celular. Esse efeito foi acompanhado por uma redução da taxa de fosforilação de pRb e foi mais associada a blastos de imunofenótipo B e a pacientes bons respondedores ao corticosteróide (Addeo, Casale et al. 2004). A metilação de pRb induzida por Smyd2 pode, assim, se contrapor ao efeito antiproliferativo de pRb não fosforilado e, com isso, reduzir o efeito antileucêmico da exposição ao corticóide. Esse raciocínio poderia explicar, por exemplo, porque a hiperexpressão de Smyd2 se correlacionou com pior sobrevida em nossa coorte, já que, sabidamente, a resposta ao glicocorticóide constitui fator prognóstico já bem determinado em LLA da infância.

Outra proteína não-histona que poderia ter sua atividade alterada no contexto de hipermetilação Smyd2-induzida seria HSP90 (heat shock protein 90), uma chaperona citossólica extremamente abundante, presente mesmo em situações de ausência de estresse, com importante papel na sobrevivência da célula (Young, Moarefi et al. 2001). Yufu *et al.*

(1992) verificaram que células de leucemia aguda produziam, constitutivamente, quantidades significativamente maiores de HSP90 quando comparadas a leucócitos de sangue periférico (Yufu, Nishimura et al. 1992). Abu-Farha *et al.* (2011) demonstraram através de experimentos de imunoprecipitação, seguidos de espectrometria de massa e ensaios de metiltransferase *in vitro*, que *SMYD2* metila HSP90 nas lisinas K209 e K615, presentes nos domínios de ligação nucleotídica e dimerização, respectivamente (Abu-Farha, Lanouette et al. 2011). As repercussões funcionais dessas modificações pós-traducionais ainda não foram elucidadas, no entanto, pelo menos do ponto de vista teórico, poderíamos aventar um possível papel na leucemogênese ou no comportamento biológico de tipos específicos de leucemia, já que sabidamente várias proteínas de transdução de sinal e oncogênicas, tais como Bcr-Abl, cKit, Flt3, são substratos de HSP90 (Young, Moarefi et al. 2001; Tavernier, Flandrin-Gresta et al. 2012). Taverneier *et al.* (2012) demonstraram que o inibidor seletivo de HSP90, 17-AAG, era capaz de induzir morte celular com uma eficiência muito maior em células de LLA Philadelphia-positivas (Ph⁺ ou Bcr-Abl⁺) quando comparadas àquelas provenientes de LLA B comum (Young, Moarefi et al. 2001; Tavernier, Flandrin-Gresta et al. 2012).

Assim, hipoteticamente, se *HSP90* tiver seu nível de atividade alterado por hipermetilação *Smyd2*-induzida e se essa alteração for determinante de um fenótipo celular determinado por hiperatividade de Bcr-Abl, Abl ou Flt3, talvez pudéssemos explicar parte da pior evolução dos pacientes com *SMYD2* hiperexpresso, tendo em vista a relação dessas tirosinas cinases na leucemogênese e na determinação prognóstica em LLA da infância (Stubbs and Armstrong 2007; Tavernier, Flandrin-Gresta et al. 2012).

Do ponto de vista de repercussão sobre a atividade metiltransferase de histonas, Abu-Farha *et al.* (2008) demonstraram, através de experimentos de clonagem, que a hiperexpressão de *SMYD2* acarretava em um aumento de expressão de 38 genes relacionados ao controle do ciclo celular e transcrição gênica, remodelamento cromatínico, dentre outras funções. Em especial os autores verificaram que a hiperexpressão de um dos genes, *TACC2*, era resultado da ligação de *SMYD2* à sua região promotora, local onde se verificou metilação de H3K4 (Abu-Farha, Lambert et al. 2008).

No contexto das LLA da infância, Kang *et al.* (2012) verificaram através de estudo de microarranjo em amostras de LLA de lactente, que a hiperexpressão de *TACC2* era mais frequente em pacientes com alto risco de recaída e óbito, mesmo quando a variável era ajustada pelo status de rearranjo de *MLL* e por idade (Kang, Wilson et al. 2012).

Através de busca ativa na lista de 42 genes que mostraram expressão diferencial após a hiperexpressão induzida de *SMYD2*, identificamos ainda que *MMP7* (Matrilisina 7), uma metaloproteinase de matriz, também se encontra hiper-regulada (Abu-Farha, Lambert et al. 2008; Yokoyama, Grunebach et al. 2008). Essa proteína, considerada um antígeno associado ao tumor, é extensamente hiperexpressa em carcinoma de células renais e atua nos processos de invasão e angiogênese induzida por células neoplásicas, através da sua ação de clivagem proteolítica de matriz extracelular e proteínas da membrana basal (Yokoyama, Grunebach et al. 2008).

No contexto leucêmico, Corveleyn *et al.* (2005) demonstraram que a fusão *E2A-CIZ*, produzida pela translocação $t(12;19)(p13;p13)$, é capaz de gerar uma proteína quimérica que se liga ao promotor de *MMP7* e desencadeia sua transativação. Esse mesmo fator de transcrição *E2A* também compõe outro transcrito fusional, *E2A-PBX1*, presente em cerca de 5% das LLA da infância e produzido pela $t(1;19)(q22;p13)$. Essa alteração citogenética era antigamente considerada como um fator de mau prognóstico em LLA da infância, no entanto, atualmente, com os esquemas mais intensivos de quimioterapia, acabou perdendo sua influência sobre os desfechos dos pacientes (Hunger, Fall et al. 1998). Apesar de não ter sido objeto do estudo de Abu-Farha *et al.* (2008), é possível que a ação metiltransferase de histona de *SMYD2* possa liberar a transcrição aberrante de *MMP7* também em LLA da infância e isso possa ter alguma influência sobre o curso da doença.

Esquemáticamente, podemos resumir os achados desse estudo conforme a **figura 29**.

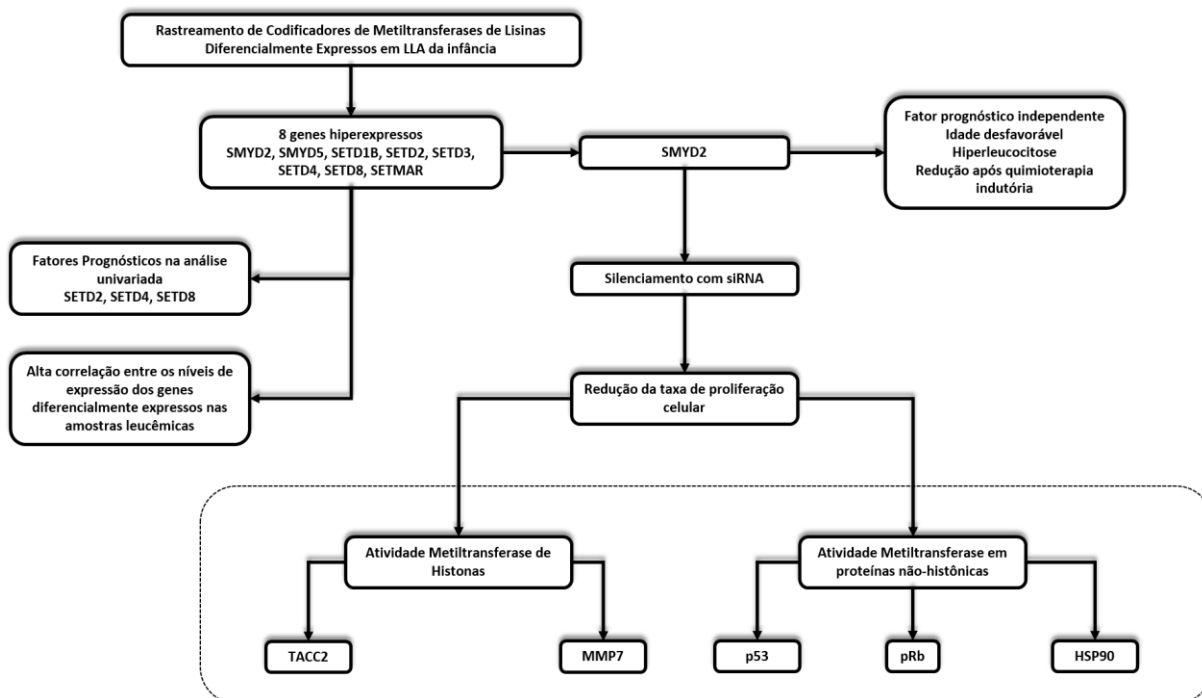


Figura 29 – Resumo esquemático dos principais achados do estudo. Na área pontilhada descrevem-se as possíveis causas, já relatadas na literatura, para a redução da taxa de proliferação celular após silenciamento de *SMYD2* com siRNA.

6. CONCLUSÕES

A partir dos achados obtidos experimentalmente e das informações já descritas na literatura pode-se concluir que:

1. A partir da premissa inicial de que alterações na atividade metiltransferase de *MLL*, geradas pela formação de proteínas quiméricas com a região 11q23, foi possível identificar maior nível de expressão de outros genes codificadores de metiltransferases de lisina em amostras de LLA da infância, quando comparadas às medulas não neoplásicas.
2. Os transcritos dos genes *SMYD2*, *SMYD5*, *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4* e *SETMAR* encontram-se hiperexpressos em amostras de LLA da infância ao diagnóstico.
3. O nível de expressão dos transcritos de *SMYD2*, *SETD2*, *SETD4* e *SETD8* estão proporcionalmente relacionados à pior sobrevida global em LLA da infância na análise univariada.
4. Pacientes com idade desfavorável e hiperleucocitose ao diagnóstico apresentam maior frequência de hiperexpressão do transcrito de *SMYD2*.
5. Pacientes com idade desfavorável apresentam maior frequência de hiperexpressão do transcrito de *SETD2*.
6. Hiperexpressão de *SETD8* foi significativamente mais frequente em pacientes com hiperleucocitose ao diagnóstico.
7. Na análise multivariada, hiperexpressão de *SMYD2* manteve-se como fator de mau prognóstico na coorte em questão.
8. Não há relação direta entre a expressão relativa de transcrito do gene *SMYD2* e a quantificação relativa da proteína *SMYD2* nas amostras estudadas.

9. O silenciamento de *SMYD2* por siRNA ocasionou redução da taxa de proliferação celular em linhagem de LLA, corroborando com os achados já descritos na literatura em linhagens de tumores sólidos.

7. PERSPECTIVAS

Os achados do estudo fornecem evidências que justificam a elaboração de várias outras investigações no campo da influência das metiltransferases de proteínas em LLA da infância. Por exemplo podemos citar:

1. Além de *SMYD2* outras 7 metiltransferases (*SMYD5*, *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4* e *SETMAR*) foram encontradas como diferencialmente expressas nas amostras leucêmicas e, portanto, podem ser alvos do aprofundamento do estudo.
2. As bases moleculares para a influência de *SMYD2* na proliferação celular ainda não estão consolidadas e, portanto, merecem ser alvo de maior detalhamento experimental.
3. A significativa correlação entre os níveis de expressão das várias metiltransferases de proteína nas amostras leucêmicas ainda não possui fundamento biológico descrito na literatura e, dessa forma, serão objeto de estudos futuros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Farha, M., J. P. Lambert, et al. (2008). "The tale of two domains: proteomics and genomics analysis of SMYD2, a new histone methyltransferase." Mol Cell Proteomics **7**(3): 560-572.
- Abu-Farha, M., S. Lanouette, et al. (2011). "Proteomic analyses of the SMYD family interactomes identify HSP90 as a novel target for SMYD2." J Mol Cell Biol **3**(5): 301-308.
- Addeo, R., F. Casale, et al. (2004). "Glucocorticoids induce G1 arrest of lymphoblastic cells through retinoblastoma protein Rb1 dephosphorylation in childhood acute lymphoblastic leukemia in vivo." Cancer Biol Ther **3**(5): 470-476.
- Albert, M. and K. Helin (2010). "Histone methyltransferases in cancer." Semin Cell Dev Biol **21**(2): 209-220.
- Argiropoulos, B. and R. K. Humphries (2007). "Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis." Oncogene **26**(47): 6766-6776.
- Barlesi, F., G. Giaccone, et al. (2007). "Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer." J Clin Oncol **25**(28): 4358-4364.
- Bernstein, B. E., T. S. Mikkelsen, et al. (2006). "A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells." Cell **125**(2): 315-326.
- Biancotto, C., G. Frige, et al. (2010). "Histone modification therapy of cancer." Adv Genet **70**: 341-386.
- Black, J. C., C. Van Rechem, et al. (2012). "Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact." Mol Cell **48**(4): 491-507.
- Bracken, A. P., D. Pasini, et al. (2003). "EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer." EMBO J **22**(20): 5323-5335.
- Brown, M. A., R. J. Sims, 3rd, et al. (2006). "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 **5**: 26.
- Bryder, D., D. J. Rossi, et al. (2006). "Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell." Am J Pathol **169**(2): 338-346.
- Bustin, S. A., V. Benes, et al. (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." Clin Chem **55**(4): 611-622.
- Cai, L., X. Ma, et al. (2014). "Aberrant histone methylation and the effect of Suv39H1 siRNA on gastric carcinoma." Oncol Rep.

- Campana, D. and E. Coustan-Smith (2012). "Measurements of treatment response in childhood acute leukemia." Korean J Hematol **47**(4): 245-254.
- Chen, L. S., K. Balakrishnan, et al. (2010). "Inflammation and survival pathways: chronic lymphocytic leukemia as a model system." Biochem Pharmacol **80**(12): 1936-1945.
- Chen, Z., C. T. Yan, et al. (2013). "The role of a newly identified SET domain-containing protein, SETD3, in oncogenesis." Haematologica **98**(5): 739-743.
- Cho, H. S., S. Hayami, et al. (2012). "RB1 methylation by SMYD2 enhances cell cycle progression through an increase of RB1 phosphorylation." Neoplasia **14**(6): 476-486.
- Clarke, M., P. Gaynon, et al. (2003). "CNS-directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: Childhood ALL Collaborative Group overview of 43 randomized trials." J Clin Oncol **21**(9): 1798-1809.
- Copeland, R. A., M. P. Moyer, et al. (2013). "Targeting genetic alterations in protein methyltransferases for personalized cancer therapeutics." Oncogene **32**(8): 939-946.
- de Oliveira, B. M., M. B. Viana, et al. (2004). "Clinical and laboratory evaluation of compliance in acute lymphoblastic leukaemia." Arch Dis Child **89**(8): 785-788.
- de Sousa Abreu, R., L. O. Penalva, et al. (2009). "Global signatures of protein and mRNA expression levels." Mol Biosyst **5**(12): 1512-1526.
- Duns, G., E. van den Berg, et al. (2010). "Histone methyltransferase gene SETD2 is a novel tumor suppressor gene in clear cell renal cell carcinoma." Cancer Res **70**(11): 4287-4291.
- Eom, G. H., K. B. Kim, et al. (2011). "Histone methyltransferase SETD3 regulates muscle differentiation." J Biol Chem **286**(40): 34733-34742.
- Faria, J. A., N. C. Correa, et al. (2013). "SET domain-containing Protein 4 (SETD4) is a Newly Identified Cytosolic and Nuclear Lysine Methyltransferase involved in Breast Cancer Cell Proliferation." J Cancer Sci Ther **5**(2): 58-65.
- Felix, C. A., M. R. Hosler, et al. (1995). "ALL-1 gene rearrangements in DNA topoisomerase II inhibitor-related leukemia in children." Blood **85**(11): 3250-3256.
- Fontebasso, A. M., J. Schwartzentruber, et al. (2013). "Mutations in SETD2 and genes affecting histone H3K36 methylation target hemispheric high-grade gliomas." Acta Neuropathol **125**(5): 659-669.
- Greer, E. L. and Y. Shi (2012). "Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance." Nat Rev Genet **13**(5): 343-357.
- Haferlach, T., A. Kohlmann, et al. (2010). "Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group." J Clin Oncol **28**(15): 2529-2537.

- Hamamoto, R., Y. Furukawa, et al. (2004). "SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells." Nat Cell Biol **6**(8): 731-740.
- Hamamoto, R., F. P. Silva, et al. (2006). "Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells." Cancer Sci **97**(2): 113-118.
- Hellemans, J., G. Mortier, et al. (2007). "qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data." Genome Biol **8**(2): R19.
- Herz, H. M., A. Garruss, et al. (2013). "SET for life: biochemical activities and biological functions of SET domain-containing proteins." Trends Biochem Sci **38**(12): 621-639.
- Hof, J., S. Krentz, et al. (2011). "Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia." J Clin Oncol **29**(23): 3185-3193.
- Huang, J., L. Perez-Burgos, et al. (2006). "Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation." Nature **444**(7119): 629-632.
- Hunger, S. P., M. Z. Fall, et al. (1998). "E2A-PBX1 chimeric transcript status at end of consolidation is not predictive of treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemias with a t(1;19)(q23;p13): a Pediatric Oncology Group study." Blood **91**(3): 1021-1028.
- Imbach, P. (2011). Acute Lymphoblastic Leukemia. P. Imbach. Berlin, Springer-Verlag: 5-20.
- Kang, H., C. S. Wilson, et al. (2012). "Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study." Blood **119**(8): 1872-1881.
- Kaushansky, K., M. A. Lichtman, et al. (2010). Williams Hematology, The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Kelly, K. M. and B. Lange (1997). "Oncologic emergencies." Pediatr Clin North Am **44**(4): 809-830.
- Komatsu, S., I. Imoto, et al. (2009). "Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous cell carcinoma." Carcinogenesis **30**(7): 1139-1146.
- Kondo, Y., L. Shen, et al. (2003). "Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer." Mol Cell Biol **23**(1): 206-215.
- Krivtsov, A. V., D. Twomey, et al. (2006). "Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9." Nature **442**(7104): 818-822.

- Kunizaki, M., R. Hamamoto, et al. (2007). "The lysine 831 of vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel target of methylation by SMYD3." Cancer Res **67**(22): 10759-10765.
- Lachner, M., R. J. O'Sullivan, et al. (2003). "An epigenetic road map for histone lysine methylation." J Cell Sci **116**(Pt 11): 2117-2124.
- Lauten, M., A. Moricke, et al. (2012). "Prediction of outcome by early bone marrow response in childhood acute lymphoblastic leukemia treated in the ALL-BFM 95 trial: differential effects in precursor B-cell and T-cell leukemia." Haematologica **97**(7): 1048-1056.
- Li, G. M., Y. G. Wang, et al. (2014). "RNAi screening with shRNAs against histone methylation-related genes reveals determinants of sorafenib sensitivity in hepatocellular carcinoma cells." Int J Clin Exp Pathol **7**(3): 1085-1092.
- Lohrum, M., H. G. Stunnenberg, et al. (2007). "The new frontier in cancer research: deciphering cancer epigenetics." Int J Biochem Cell Biol **39**(7-8): 1450-1461.
- Lu, Z., Y. Tian, et al. (2013). "Histone-lysine methyltransferase EHMT2 is involved in proliferation, apoptosis, cell invasion, and DNA methylation of human neuroblastoma cells." Anticancer Drugs **24**(5): 484-493.
- Mar, B. G., L. B. Bullinger, et al. (2014). "Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia." Nat Commun **5**: 3469.
- Margolin, J. F., C. P. Steuber, et al. (2006). Acute Lymphoblastic Leukemia. Principles and Practice of Pediatric Oncology. P. A. Pizzo and D. Poplack. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 538-590.
- Margolin, J. F., C. P. Steuber, et al. (2006). Acute Lymphoblastic Leukemia. Principles and Practice of Pediatric Oncology. P. A. Pizzo and D. G. Poplack. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 538-590.
- Marks, D. I., B. W. Kurz, et al. (1997). "Altered expression of p53 and mdm-2 proteins at diagnosis is associated with early treatment failure in childhood acute lymphoblastic leukemia." J Clin Oncol **15**(3): 1158-1162.
- Milne, T. A., S. D. Briggs, et al. (2002). "MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters." Mol Cell **10**(5): 1107-1117.
- Moorman, A. V., H. M. Ensor, et al. (2010). "Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial." Lancet Oncol **11**(5): 429-438.
- Muntean, A. G. and J. L. Hess (2012). "The pathogenesis of mixed-lineage leukemia." Annu Rev Pathol **7**: 283-301.

- Newbold, R. F. and K. Mokbel (2010). "Evidence for a tumour suppressor function of SETD2 in human breast cancer: a new hypothesis." *Anticancer Res* **30**(9): 3309-3311.
- Noh, H. J., K. A. Kim, et al. (2014). "p53 Down-regulates SETDB1 gene expression during paclitaxel induced-cell death." *Biochem Biophys Res Commun* **446**(1): 43-48.
- Parish, C. R. (2001). Use of CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Current Protocols in Immunology*. C. R. Parish and H. S. Warren, John Wiley & Sons.
- Park, Y. S., M. Y. Jin, et al. (2008). "The global histone modification pattern correlates with cancer recurrence and overall survival in gastric adenocarcinoma." *Ann Surg Oncol* **15**(7): 1968-1976.
- PennState. (2009). "DNA and Chromosomes." from <https://wikispaces.psu.edu/pages/viewpage.action?pageId=112527053&navigatingVersions=true>.
- Pui, C. H. (1997). "Acute lymphoblastic leukemia." *Pediatr Clin North Am* **44**(4): 831-846.
- Pui, C. H. (2006). "Central nervous system disease in acute lymphoblastic leukemia: prophylaxis and treatment." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 142-146.
- Pui, C. H. (2006). "Update on Pediatric ALL." *Clin Adv Hematol Oncol* **4**(12): 884-886.
- Pui, C. H., F. G. Behm, et al. (1994). "11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia." *J Clin Oncol* **12**(5): 909-915.
- Pui, C. H., D. Campana, et al. (2001). "Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives." *Lancet Oncol* **2**(10): 597-607.
- Pui, C. H., W. L. Carroll, et al. (2011). "Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update." *J Clin Oncol* **29**(5): 551-565.
- Pui, C. H. and W. E. Evans (2006). "Treatment of acute lymphoblastic leukemia." *N Engl J Med* **354**(2): 166-178.
- Pui, C. H., C. G. Mullighan, et al. (2012). "Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there?" *Blood* **120**(6): 1165-1174.
- Pui, C. H., D. Pei, et al. (2012). "Treatment outcomes in black and white children with cancer: results from the SEER database and St Jude Children's Research Hospital, 1992 through 2007." *J Clin Oncol* **30**(16): 2005-2012.
- Pui, C. H., D. Pei, et al. (2010). "Long-term results of St Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia." *Leukemia* **24**(2): 371-382.
- Pui, C. H., R. C. Ribeiro, et al. (1996). "Prognostic factors in the acute lymphoid and myeloid leukemias of infants." *Leukemia* **10**(6): 952-956.

- Richon, V. M., D. Johnston, et al. (2011). "Chemogenetic analysis of human protein methyltransferases." Chem Biol Drug Des **78**(2): 199-210.
- Saddic, L. A., L. E. West, et al. (2010). "Methylation of the retinoblastoma tumor suppressor by SMYD2." J Biol Chem **285**(48): 37733-37740.
- Schrappe, M. and M. Stanulla (2003). Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Current Clinical Oncology: Treatment of Acute Leukemias. C. H. Pui. Totowa, Humana Press Inc.: 87-104.
- Schwab, C. J., L. Chilton, et al. (2013). "Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: association with cytogenetics and clinical features." Haematologica **98**(7): 1081-1088.
- Schwanhausser, B., D. Busse, et al. (2011). "Global quantification of mammalian gene expression control." Nature **473**(7347): 337-342.
- Silva, F. P., R. Hamamoto, et al. (2008). "Enhanced methyltransferase activity of SMYD3 by the cleavage of its N-terminal region in human cancer cells." Oncogene **27**(19): 2686-2692.
- Stender, J. D., G. Pascual, et al. (2012). "Control of proinflammatory gene programs by regulated trimethylation and demethylation of histone H4K20." Mol Cell **48**(1): 28-38.
- Stubbs, M. C. and S. A. Armstrong (2007). "FLT3 as a therapeutic target in childhood acute leukemia." Curr Drug Targets **8**(6): 703-714.
- Tachibana, M., Y. Matsumura, et al. (2008). "G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription." EMBO J **27**(20): 2681-2690.
- Tachibana, M., K. Sugimoto, et al. (2002). "G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis." Genes Dev **16**(14): 1779-1791.
- Tavernier, E., P. Flandrin-Gresta, et al. (2012). "HSP90 inhibition results in apoptosis of Philadelphia acute lymphoblastic leukaemia cells: an attractive prospect of new targeted agents." J Cancer Res Clin Oncol **138**(10): 1753-1758.
- Wagner, T. and M. Jung (2012). "New lysine methyltransferase drug targets in cancer." Nat Biotechnol **30**(7): 622-623.
- Williamson, E. A., L. Damiani, et al. (2012). "Targeting the transposase domain of the DNA repair component Metnase to enhance chemotherapy." Cancer Res **72**(23): 6200-6208.
- Williamson, E. A., K. K. Rasila, et al. (2008). "The SET and transposase domain protein Metnase enhances chromosome decatenation: regulation by automethylation." Nucleic Acids Res **36**(18): 5822-5831.

- Wray, J., E. A. Williamson, et al. (2010). "The transposase domain protein Metnase/SETMAR suppresses chromosomal translocations." Cancer Genet Cytogenet **200**(2): 184-190.
- Wray, J., E. A. Williamson, et al. (2009). "Metnase mediates resistance to topoisomerase II inhibitors in breast cancer cells." PLoS One **4**(4): e5323.
- Wray, J., E. A. Williamson, et al. (2009). "Metnase mediates chromosome decatenation in acute leukemia cells." Blood **114**(9): 1852-1858.
- Wu, J., T. Cheung, et al. (2011). "Biochemical characterization of human SET and MYND domain-containing protein 2 methyltransferase." Biochemistry **50**(29): 6488-6497.
- Yokoyama, Y., F. Grunebach, et al. (2008). "Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells." Clin Cancer Res **14**(17): 5503-5511.
- Young, J. C., I. Moarefi, et al. (2001). "Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool." J Cell Biol **154**(2): 267-273.
- Yufu, Y., J. Nishimura, et al. (1992). "High constitutive expression of heat shock protein 90 alpha in human acute leukemia cells." Leuk Res **16**(6-7): 597-605.
- Zhu, X., F. He, et al. (2014). "Identification of functional cooperative mutations of SETD2 in human acute leukemia." Nat Genet **46**(3): 287-293.

ANEXO I

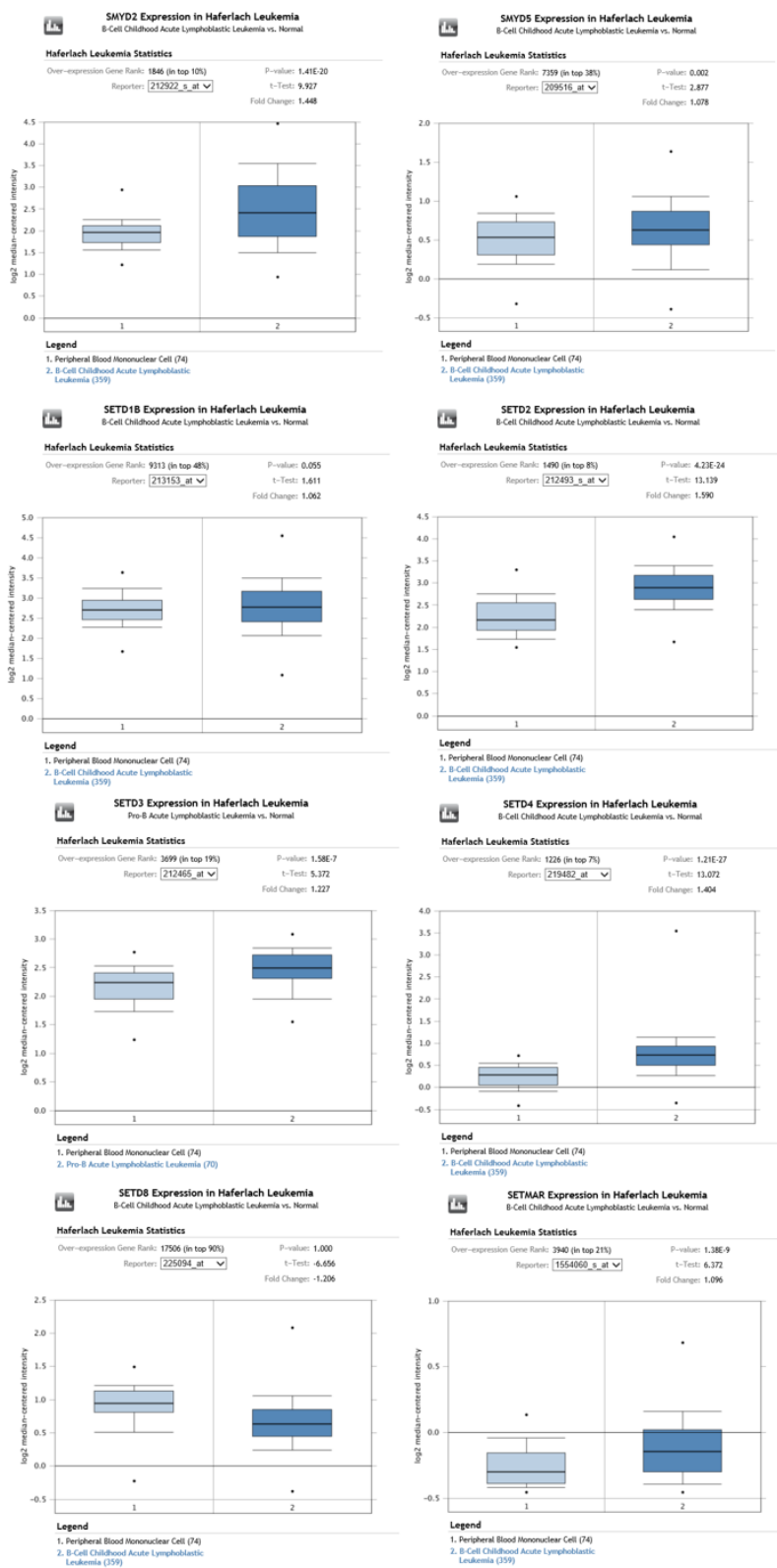


Figura 30 - Gráficos gerados a partir da pesquisa na plataforma Oncomine® com amostras do estudo microarray de Haferlach et al. (2010)

ANEXO II

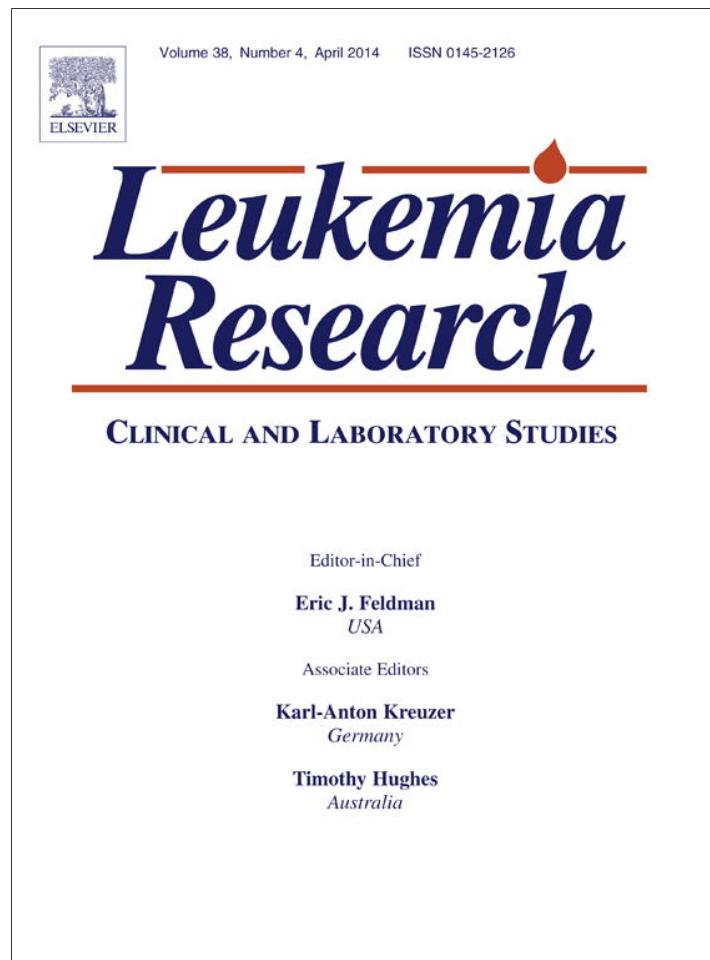
Tabela 23 - Valores brutos de CNRQ das 83 amostras de LLA e 8 controles não neoplásicos (CTRL1-8)

Amostra	SMYD2	SMYD5	SETD1B	SETD2	SETD3	SETD4	SETD8	SETMAR
20	7,5	5,11	4,39	45,63	6,82	12,55	3,82	15,72
30	127,25	54,97	17,36	347,39	54,39	133,24	18,82	160,11
33	6,98	8,47	1,94	11,58	3,78	6,71	1,27	20,35
35	118,28	22,38	12,02	259,27	41,27	106,17	16,42	27,8
36	41,55	9,63	6,95	135,62	16,46	26,2	6,6	26,2
46	2,75	6,02	2,26	1,42	1,99	0,9	1,36	9,7
49	1,15	1,89	3,11	0,56	1,03	0,32	0,46	6,46
50	2,17	5,04	2,69	1,1	2,64	3,06	1,39	9,42
54	10,51	15,7	5,62	37,86	17,06	52,86	2,77	46,35
58	8,3	7,28	1,45	1,92	1,4	0,69	1,37	12,41
59	4,64	2,55	0,99	0,88	1,31	0,86	1,65	2,92
60	5,34	2,3	0,96	0,72	1,01	0,39	1,12	2,41
62	3,66	4,99	1,42	0,94	1,37	0,81	1,19	10,25
66	2,56	2,91	2	1	1,54	1,25	0,53	4,74
67	3,19	1,75	3,24	1,08	0,8	0,36	0,8	2,37
69	5,22	6,63	2,58	1,33	0,77	0,61	1,67	6,57
70	4,63	2,51	1,1	0,78	1,48	0,51	0,85	2,85
72	1,77	2,08	1,76	0,77	0,86	1,02	1,11	2,33
76	6,08	5,54	2,16	37,89	2,53	12,12	4,2	7,39
CTRL1	1,39	2,58	1,97	1,17	3,59	1,66	1,37	2,06
86	1,57	3,65	1,62	0,86	1,29	1,66	1	3,76
87	1,64	4,4	0,82	0,43	0,76	0,38	0,58	4,32
88	2,52	2,86	0,78	0,64	1,93	0,78	0,77	4,21
89	3,7	8,24	1,61	1,17	5,3	3,06	1,37	7,13
90	4,2	6,27	2,27	19,93	3,59	12,57	2,86	13,82
95	11,57	5,9	2,26	3,74	4,01	2,92	2,22	8,25
96	1,86	0,82	0,76	0,23	0,49	0,18	0,38	0,76
98	2,15	3,92	1,95	1,27	2,84	2,86	1,34	5,62
100	1,97	3,5	1,8	0,98	3,05	1,78	0,61	9,85
103	4,68	5,53	3,58	2,45	3,88	3,35	1,39	8,75
104	5,03	2,84	1,91	1,02	1,49	0,49	0,76	4,34
105	8,41	10,87	3,94	29,97	5,89	9,12	2,64	59,38
108	4,43	3,34	1,14	0,8	1,76	1,44	0,83	5,62
110	292,8	64,11	14,31	602,38	96,68	247,52	28,63	207,37
114	7,86	10,16	4,69	4,21	5,9	7,17	2,55	21,73
119	8,4	2,63	1,12	0,67	1,09	0,83	1,01	3,88
123	7,77	4,45	2,52	1,95	3,54	1,41	2,02	14,34
126	3,27	5,33	4,03	2,52	3,88	6,81	1,95	14,56
127	2,4	4,14	2,82	2,43	3,26	4,59	1,71	11,6
128	2,25	2,37	1,77	0,63	0,97	0,58	0,48	3

136	13,71	9,06	6,71	83,44	15,25	37,63	11,08	29,74
144	0,57	1,8	1,21	0,88	0,96	3,91	0,52	2,57
146	4,5	9,89	2,26	7,54	7,78	27,63	2,19	12,63
147	10,02	8,22	4,52	30,36	6,49	67,93	2,5	38,81
149	1,66	10,52	2,32	2,52	5,94	9,71	2,08	7,04
151	0,66	1,65	0,85	0,47	1,35	3,5	0,39	7,94
156	4,05	6,83	4,11	6,74	6,11	13,08	2,3	12,77
160	0,29	1,27	1,19	0,47	0,47	0,66	0,34	1,34
168	2,28	1,63	0,67	0,48	0,47	0,75	0,32	3,48
170	0,58	1,91	0,81	0,56	1,05	1,87	0,47	1,76
186	8,2	1,89	0,89	0,57	1,45	4,5	0,6	2,83
192	5,48	4,88	2,33	9,55	5,6	21,14	2,97	23,42
CTRL2	0,7	0,66	1,35	0,6	0,77	0,18	1,13	0,58
CTRL3	0,25	0,29	0,43	0,26	0,28	0,28	0,6	0,27
CTRL4	2,46	1,46	2,5	22,11	2,6	5,45	3,07	2,21
196	0,96	1,78	1,27	1,01	0,82	1,12	0,53	3,04
197	2,86	1,47	0,62	0,68	0,78	0,86	0,61	1,72
CTRL5	0,26	0,71	0,83	0,32	0,23	0,18	0,32	0,35
209	56	6,3	7,43	14,59	23,16	42,33	14,49	38,5
211	19,68	2,46	1,8	7,83	5,75	6,3	2,91	9,68
215	54,93	13,17	5,84	15,01	14,25	24,04	8,91	38,37
216	0,94	0,6	0,53	0,36	0,96	0,62	0,22	1,6
219	7,55	4,18	2,42	5,27	2,41	6,55	6,03	12,03
244	8,23	4,54	2,52	3,32	13,35	28,12	2,51	19,62
CTRL6	1,16	0,76	0,53	0,46	0,7	0,98	0,45	0,88
247	3,41	4,25	2,07	2,85	10,84	14,13	1,68	15,37
249	14,8	11,3	4,21	6,84	29,83	31,44	3,39	29,67
254	13,28	4,73	2,03	3,84	6,84	9,51	5,05	12,77
256	10,01	6,82	2,56	8,03	18,7	7,97	6,84	29,24
257	5,36	5,27	2,73	3,8	3,11	26,42	1,95	18,93
259	2,24	2,82	1,93	1,04	2,32	8,55	0,57	5,87
264	17,04	2,27	2,85	5,15	6,37	14,47	2,88	12,71
268	20,99	8,99	8,75	56,41	8,24	22,86	1,64	33,41
270	3,34	1,78	0,87	0,46	1,99	2,38	0,74	3,6
277	7,81	1,91	1,26	1,69	2,96	5,5	1,27	10,44
282	14,41	21,25	5,97	57,53	9,01	26,22	6,24	70,84
283	217,96	58,45	15,67	696,81	128,5	453,2	44,9	392,79
CTRL7	1,92	1,49	0,97	1,04	1,6	2,48	0,99	1,64
CTRL8	2,85	1,71	0,81	1,64	2	5,06	2,48	2,82
292	3,66	14,68	7,32	65,83	16,28	35,36	4,5	35,57
298	69,86	42,89	14,81	255,55	52,43	202,3	9,9	134,8
299	22,67	16,68	9,84	136,13	21,49	41,67	6,73	30,53
305	15,93	21,44	6,74	97,25	12,96	86,76	3,53	55,05
309	26,87	17,47	11,96	170,5	36,03	85,26	4,98	187,74
310	1801,66	64,58	41,3	2013,54	182,42	577,13	72,4	341,64

311	211,83	63,53	60,01	1782,53	178,54	2295,43	56,38	378,8
315	30,03	17,1	10,61	124,77	27,9	194,76	7,79	178,97
316	39,89	9,19	14,54	141,43	16,08	34,19	4,63	18,98
322	1093,55	87,94	34,33	1547,17	311,42	2742,92	72,9	501,48
331	60,37	36,64	22,46	261,19	43,23	728,79	25,36	70,65
333	705,24	142,19	40,34	1104,07	238,37	531,42	54,46	229,47

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

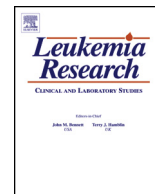
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Leukemia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/leukres

SMYD2 is highly expressed in pediatric acute lymphoblastic leukemia and constitutes a bad prognostic factor



Luis Henrique Toshihiro Sakamoto^{a,c,d}, Rosangela Vieira de Andrade^b,
Maria Sueli Soares Felipe^{b,c}, Andrea Barretto Motoyama^a, Fabio Pittella Silva^{a,*}

^a Laboratory of Molecular Pathology of Cancer, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

^b Laboratory of Genomic Sciences and Molecular Biotechnology, Catholic University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

^c Cell Biology Department, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

^d Jose Alencar Children's Hospital of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 October 2013

Received in revised form 19 January 2014

Accepted 28 January 2014

Available online 5 February 2014

Keywords:

SMYD2

Acute lymphoblastic leukemia

Childhood

Prognosis

Lysine methyltransferase

Gene expression

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood malignancy. Although several clinical characteristics can be associated with worse prognosis, more robust biological markers still remains uncovered. *SMYD2*, a member of SMYD protein family, regulates the activity of several proteins through methylation. In this study, we performed quantitative real time PCR to compare the expression of *SMYD2* in 83 pediatric ALL patients and non-neoplastic bone marrow samples (BMS). The study revealed that *SMYD2* expression is altered in ALL BMS and its high expression was correlated with a bad prognosis. Moreover, we also revealed that *SMYD2* expression level significantly decreases in patients that respond to chemotherapy treatment.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in childhood. Contemporary treatment protocols achieve high overall long-term survival rates, ranging from 70% to 80% in the developed countries, which is a direct result from the increased usage of risk-adapted treatment and improved supportive care [1–3]. Nonetheless there are still a significant number of patients that relapse and die. Leukemic drug resistance, pharmacokinetic and pharmacogenomic factors are possible causes for failure treatment in the last cases [1,4–7]. Additionally, late therapy-related sequelae make desirable to uncover malignant specific molecular patterns that could be used as targets in new treatments [8–10]. Survivors from childhood ALL have higher incidence of therapy-related late effects including: second neoplasms, chronic health conditions, endocrine and psychological dysfunction [11]. Genetic alterations detected by conventional cytogenetic and molecular analysis are able to distinguish biologically and clinically disease subtypes in a significant proportion of pediatric ALL [12,13]. In this group of patients, recurrent cytogenetic and molecular abnormal-

ities can be identified in 60–80% of cases and, for some alterations, as in ALL with *t(9;22)*, it is possible to use target directed therapy (imatinib mesylate) to overcome the leukemic drug resistance [14,15]. Nevertheless, it has become clear that aberrant patterns of gene expression are not only caused by genetic mutations in cancer, but also involve epigenetic changes [16,17].

Histone methylation has become one of the most studied epigenetic phenomena involved with developmental and differentiation processes. This biochemical reaction, catalyzed by histone methyltransferases (HMTs), has predominantly been found on arginine and lysine residues in the tails of histones H3 and H4 and has been implicated both in promotion as well as in inhibition of target gene transcription [18,19]. In recent years, misregulation of histone methylation due to altered expression of its coding genes has been associated not only with carcinogenesis, but also with cancer aggressiveness [20,21]. Modifications of histone methyltransferases gene expression have been described for several malignant diseases [22]. In acute leukemias, the H3K4 methyltransferase activity alteration of mixed-lineage leukemia (MLL) gene, produced by the recurrent chromosomal abnormality of 11q23 region, is one of the most studied alterations [23]. MLL rearrangements are more frequent in secondary therapy-related acute leukemias and infant ALL [24]. The latter represents a distinct subset of ALL with extremely poor therapy response, despite

* Corresponding author. Tel.: +55 61 3107 1998.

E-mail addresses: pittella@unb.br, pittsil@hotmail.com (F. Pittella Silva).

of chemotherapy dose intensification [25]. Despite a growing body of evidence for the role of MLL in leukemogenesis, very little is known about the involvement of other methyltransferases in ALL. *SMYD2* is a member of the *SMYD* family of histone-lysine methyltransferases. The *SMYD* protein family consists of five proteins (*SMYD1–5*) that are not fully characterized and are grouped based on the presence of two conserved domains (MYND and SET domains). Interest in the *SMYD* family of proteins has drastically grown because of recent reports indicating that *SMYD1*, -2, and -3 control gene expression through histone methylation [26–28]. Altered expression of members of the *SMYD* family has previously been demonstrated to be associated with solid tumors such as hepatocellular carcinoma, colorectal cancer and breast cancer [26,29,30]. *SMYD2* overexpression has been recently reported in several types of cancer including bladder carcinomas, primary tumor samples of esophageal squamous cell carcinoma and mammary gland cancer [31,32].

SMYD2 methylates H3K36 and, in cooperation with the Sin3A and HDAC1 histone deacetylase complex, functions as a transcriptional regulator [28]. It was also reported that *SMYD2* interaction with *HSP90 α* enhances its histone methyltransferase activity and specificity for H3K4 *in vitro* [33]. Key non-histone proteins have also been shown to be methylated by *SMYD2*. Regulation of p53 through monomethylation on its K370 by *SMYD2*, resulted on the repression of p53's transactivation activity [34]. The overexpression of *SMYD2* resulted in elevated p53 monomethylation suggesting that the aberrant activation of *SMYD2* may inhibit p53 from functioning and contribute to the pathogenesis of human cancers. In addition, *SMYD2* can also methylate RB1 and thus facilitate its phosphorylation and promote the cell cycle progression [35]. *SMYD2* may therefore play a critical role in carcinogenesis. However, no specific studies on *SMYD2* in leukemia have been presented to date.

Here we report that *SMYD2* expression is altered in acute lymphoblastic leukemia (ALL). Moreover, we observed, for the first time, that high expression of *SMYD2* in ALL patients correlates with classical clinical characteristics and indicates a bad prognostic factor. Our data should give new insights into the importance of *SMYD2* for leukemogenesis and contribute to the development of novel approaches for the diagnosis, prognosis and treatment of ALL patients.

2. Material and methods

2.1. Patient sample collection

Bone marrow aspirates were obtained from 83 pediatric ALL patients from a single institution (Jose Alencar Children's Hospital of Brasilia) at disease presentation between 2008 and 2010, as part of routine diagnosis and genetic analysis of leukemias. Patients with B-cell ALL were treated according to the Brazilian Cooperative Group for Treatment of Childhood Acute Lymphocytic Leukemia (GBTLI) protocol [36] and T-cell ALL with ALL-BFM-95 protocol [37]. We could obtain bone marrow samples from 15 of these patients on the 15th and 29th days of induction chemotherapy.

Eight bone marrow samples were collected from children with idiopathic thrombocytopenic purpura in which bone marrow examination was necessary for diagnostic investigation. These samples were used as non-neoplastic controls for relative expression calculation. A consultant hematologist examined Wright–Giemsa stained bone marrow smears to verify the percentage of blasts in the collected leukemic samples. All samples used in this study had more than 40% of blasts. Protocol and consent forms were approved by the Regional Ethics Committee of Federal

District, Brazil, and the patients and/or their guardians provided written informed consent. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

2.2. Clinical data collection

Clinical characteristics were obtained from medical records, encompassing: gender, age and WBC count in peripheral blood at ALL diagnosis, immunophenotyping of bone marrow blasts, cytogenetic alterations and bone marrow status at 15th and 29th days of chemotherapy. Patients were stratified as low or high-risk disease according to GBTLI-93 criteria. High-risk disease included children with less than 2 or more than 9 years of age and/or more than 50,000 WBC/mm³ in peripheral blood and/or central nervous system infiltration at ALL diagnosis.

2.3. RNA isolation, cDNA synthesis and qPCR

Bone marrow mononuclear cells (BMMC) were isolated by Ficoll density centrifugation. Total RNA was extracted from each sample using TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Single-stranded complementary DNA was generated from total RNA with reverse transcriptase and random primers, using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Reactions of qPCR were performed on a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) using TaqMan Gene Expression Assays according to the manufacturer's instructions (Hs00220210.m1, Cat. no. 4331182 for *SMYD2*; and Hs99999903.m1, Cat. no. 4331182 for ACTB; Life Technologies). The qPCR assays were carried out in a final volume of 10 μ L in 96-well plates. Each plate included triplicates of cDNA from bone marrow samples, multiple water blanks and triplicates of inter-run calibrators (a unique cDNA sample used for all PCR run plates). PCR was conducted with the following conditions: 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 40 s.

2.4. Statistical analysis

Biogazelle Qbase Plus 2.1 software was used for relative gene expression calculations. The qBase method was performed for relative mRNA expression analysis, using ACTB gene as reference target for input normalization. To perform the comparison between leukemic samples and non-neoplastic control group we calculated the CNRQ (Calibrated Normalized Relative Quantification) value of each sample using the geometric mean of all samples as reference. To calculate the differences between clinical groups, the values of *SMYD2* RQ (Relative Quantification) from leukemic samples were scaled by cDNA from the 8 control donors. SPSS 21.0 (Statistical Package for Social Science) was used for statistical analyses. Descriptive statistics were used to summarize study data. Statistical significance was defined as a two-tailed *p* value <0.05. Comparisons between clinical-demographic variables and gene expression profiles were performed using χ^2 test or Fisher's exact test. We used Student *t*-test for independent samples or paired-samples Student *t*-test to perform mean comparisons between distinct groups.

Survival curves were estimated using the Kaplan–Meier method. Survival data were censored for patients alive at the last observation. The log-rank test was used to compare survival outcomes. Univariate and multivariate Cox regression methods were used to evaluate the *SMYD2* expression level influence on the overall survival (OS).

Table 1
Clinical characteristics at diagnosis and post-induction chemotherapy.

Characteristic	n (%)
All	83
Gender	
Male	43 (51.8%)
Female	40 (48.2%)
Age	
<1 year	1 (1.2%)
1–9 years	53 (63.9%)
>10 years	29 (34.9%)
WBC (per μ L)	
<50 000	46 (57.4%)
>50 000	34 (42.5%)
Immunology	
Pro-B	3 (3.7%)
Pre-B/common	67 (81.7%)
T-ALL	12 (14.6%)
Risk group	
High	72 (86.7%)
Low	11 (13.3%)
Recurrent chromosomal translocation findings	
No findings	55 (66.3%)
t(12;21)	18 (21.7%)
t(1;19)	8 (9.6%)
t(9;22)	1 (1.2%)
t(4;11)	1 (1.2%)
Bone marrow status at D15 of therapy	
<5% blasts	52 (62.7%)
5–25% blasts	24 (28.9%)
>25% blasts	7 (8.4%)
Bone marrow status at D29 of therapy	
<5% blasts	77 (93.9%)
5–25% blasts	4 (4.9%)
>25% blasts	1 (1.2%)

3. Results

3.1. Patient characteristics and clinical predictors

The patient clinical characteristics are summarized in Table 1. Data were categorized by clinical relevant groups to allow comparisons between the study population and groups described in the literature [38–40]. There was no frequency difference between genders. The majority of our patients had favorable age (63.9%) and less than 50,000 WBC in the peripheral blood (57.4%) at diagnosis. The pre-B and common immunology was the most common leukemia phenotype. According to GBTLI-93 criteria, just 13.3% of our patients were classified among the low-risk group. The t(12;21) TEL-AML1 was the most common recurrent chromosomal finding (21.7%). Almost 94% of patients achieved bone marrow remission at the 29th day (D29) of treatment.

The 3-year overall survival (OS) was 66.6% for a follow-up time ranged from 30 to 50 months. The log-rank test demonstrated that there was significant difference in OS by age, WBC peripheral blood count, immunologic subtype, chromosomal finding, D29 chemotherapy bone marrow status and risk-based stratification, as can be seen in Fig. 1. In this cohort, gender and 15th day bone marrow involvement did not influence 3-year overall survival.

3.2. SMYD2 is highly expressed in leukemic samples

In order to investigate the SMYD2 expression pattern in ALL, we performed qPCR in 83 ALL cases comparing to eight non-malignant bone marrow samples. Quantification of mRNA expression after ACTB normalization demonstrated that levels of SMYD2 were significantly higher in leukemic samples than in non-malignant bone

marrow (95% CI = 2.545–28.759; $p = 0.000428$). In average, SMYD2 was 8.5 times more expressed in leukemic specimens as compared to the normal bone marrow controls (Fig. 2). In addition, we carried out data analysis for SMYD2 expression profiles in ALL datasets, available in the Oncomine microarray database. Corroborating with our data, SMYD2 overall expression was also markedly upregulated in a set of 87 childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia cases compared to six bone marrow normal samples (fold-change = 1.6; $p = 0.004$). [41]

3.3. SMYD2 high expression level is associated with a worse survival rate

The mRNA expression level of SMYD2 was analyzed for potential correlations with clinical characteristics of children with ALL. The univariate Cox regression analysis showed a significant correlation between the increase of SMYD2 expression level and a worse prognosis for those patients (HR = 2.311; 95% CI = 1.309–4.081; $p = 0.00388$). The multivariate Cox regression analysis also confirmed this observation. For the multivariate model, we examined the effects of six clinical prognostic predictors in the survival of patients and verified that age (Wald test: $\chi^2(1) = 5.5$, $p = 0.01$), chromosomal translocation findings (Wald test: $\chi^2(1) = 7.5$, $p = 0.006$), D29 chemotherapy bone marrow status (Wald test: $\chi^2(1) = 15.2$, $p < 0.001$) and SMYD2 expression level (Wald test: $\chi^2(1) = 5.2$, $p = 0.023$) still affected significantly the survival rate of ALL patients. The other parameters used in this model (WBC peripheral blood count and immunologic subtype) did not affect the hazard function ($p = 0.74$ and $p = 0.105$, respectively).

Next, we performed an analysis to compare the overall survival (OS) of patients with SMYD2 high and basal expression level. The SMYD2 relative expression level was normalized by ACTB and compared to non-malignant samples. The relative expression of SMYD2 was then categorized as high or basal according to the RQ value higher or lower than 4, respectively, based on the 75th percentile obtained for SMYD2 expression levels from non-neoplastic bone marrow samples. The log-rank test comparing 3 years OS showed that patients with high SMYD2 expression ($n = 46$) had a worse survival rate compared to those with basal expression ($n = 37$) (47.9% versus 79.3%, respectively; $p = 0.013$), as demonstrated in Fig. 3.

We also examined the correlation between SMYD2 expression levels and clinical characteristics that demonstrated prognostic significance at diagnosis in the statistical analysis of our population. The χ^2 test showed that SMYD2 transcript levels correlate with unfavorable age ($p = 0.021$) and higher WBC peripheral blood counts ($p = 0.023$) at diagnosis (Table 2).

Table 2
Clinical prognostic factors versus categorized SMYD2 expression levels.

		Basal expression	High expression	p-Value
Age	Favorable	29	24	0.021**
	Unfavorable	8	22	
Gender	Male	21	22	0.509
	Female	16	24	
Leukocyte number	<50,000	26	20	0.023**
	>50,000	10	24	
Risk group	Low	7	4	0.205
	High	30	42	
Immunology	B	34	38	0.363
	T	3	9	
Recurrent chromosomal abnormalities	Any translocation	16	12	0.110
	No translocation	21	34	

** Statistical analysis by χ^2 test.

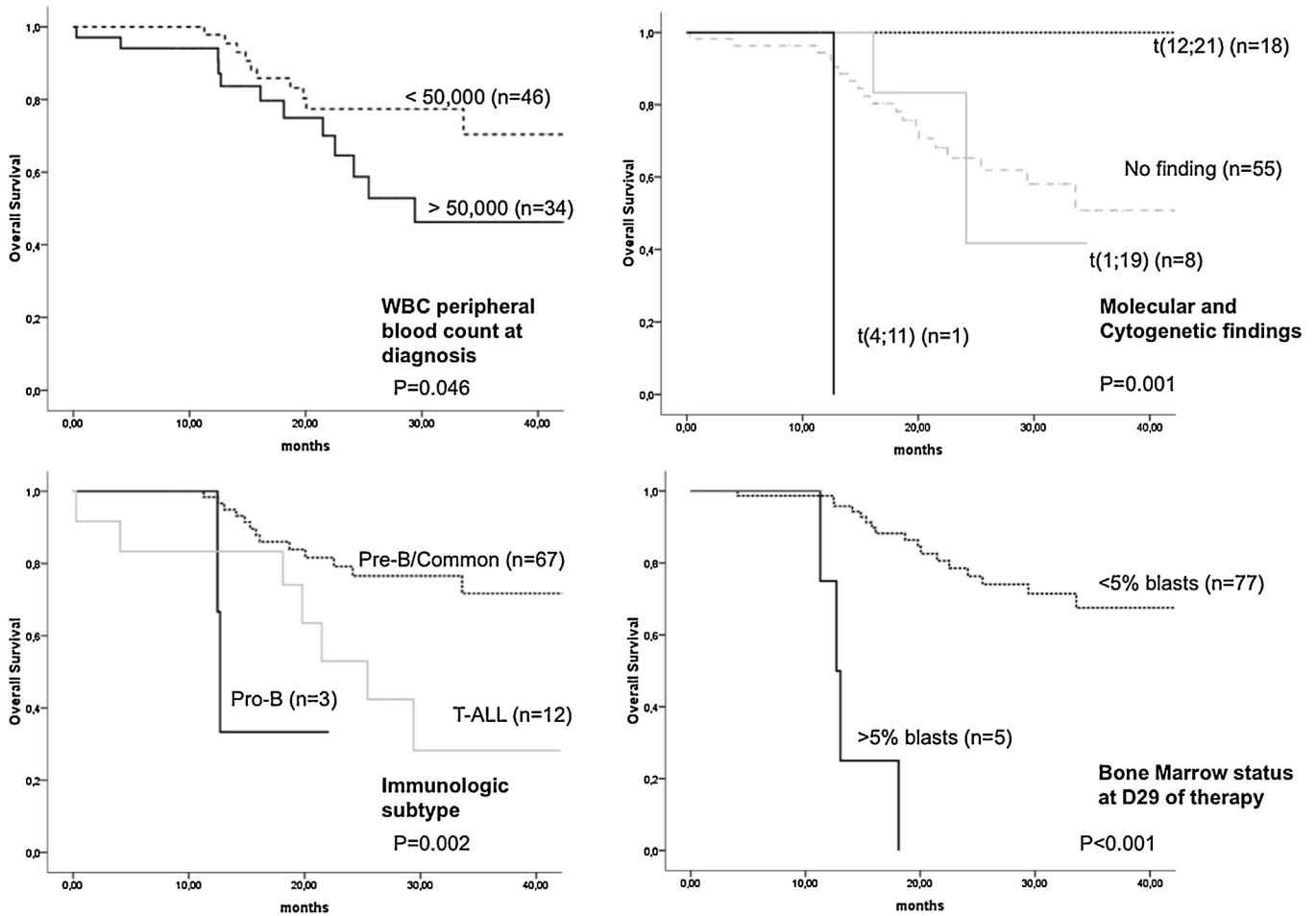


Fig. 1. Overall survival is influenced by classical prognostic factors in the present cohort. Kaplan–Meier curves according to WBC peripheral blood count at diagnosis, molecular and cytogenetic findings, immunologic subtype and bone marrow status at 29 day of induction chemotherapy.

3.4. SMYD2 mRNA expression significantly decreases on the 29th day of chemotherapy induction and can be related to leukemia burden

To verify if there is any relationship between SMYD2 expression level and leukemia burden, we performed qPCR in bone marrow samples of 15 patients from the original cohort. Samples were collected on the 15th and 29th days of induction chemotherapy. SMYD2 expression levels in these two occasions were compared with the values obtained for samples collected in the time of diagnosis, before chemotherapy treatment (Fig. 4A). Positively diagnosed patients were treated with weekly doses of vincristine and daunorubicin in addition to daily dexamethasone or prednisone, according to GBTLI-93 or ALL-BFM-95 protocol, respectively. It is expected that leukemia burden in the bone marrow of treated patients is lower than that observed in patients before receiving treatment. Therefore, if the ALL cells are responsible for SMYD2 overexpression in bone marrow samples observed at the time of diagnosis, we would expect a reduction of SMYD2 expression level following the induction therapy.

As shown in Fig. 4A, out of the 15 follow-up investigated patients, we noticed that 9 patients (cases no. 105, 114, 209, 244, 249, 268, 310, 315, 322, marked with an asterisks) had high expression of SMYD2 at the time of diagnosis (fold-change higher than 4) while 6 patients (cases nos. 93, 103, 126, 149, 170, 247) presented basal SMYD2 expression compared to non-neoplastic samples (fold-change lower than 4). Of these 9 patients, only 3 cases (nos. 249, 310, 322) had lower SMYD2 expression levels on the 15th day

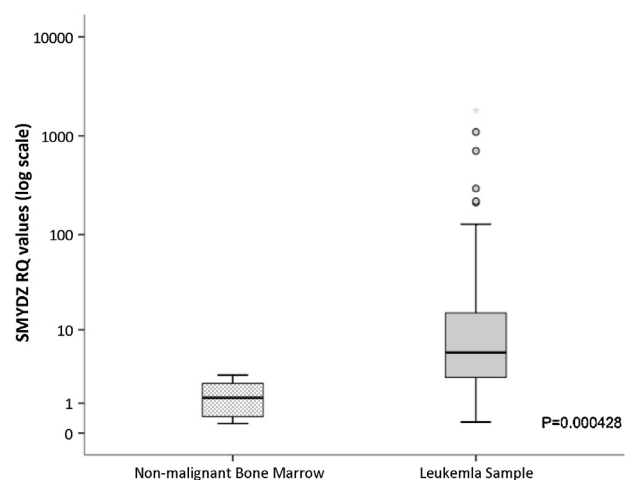


Fig. 2. SMYD2 mRNA expression in leukemic bone marrow samples is abnormally high when compared with non-neoplastic samples. Boxplot representation of SMYD2 mRNA expression quantification by qPCR. mRNA levels were measured in leukemic samples and non-malignant bone marrow. Y axis, RQ value for SMYD2 after ACTB normalization. X axis, sample type (n = 83 for leukemia samples and n = 8 for non-malignant bone marrow samples). Based on the log normal distribution of SMYD2 expression level, five samples represented by circles were defined as outliers according to outlier labeling rule.

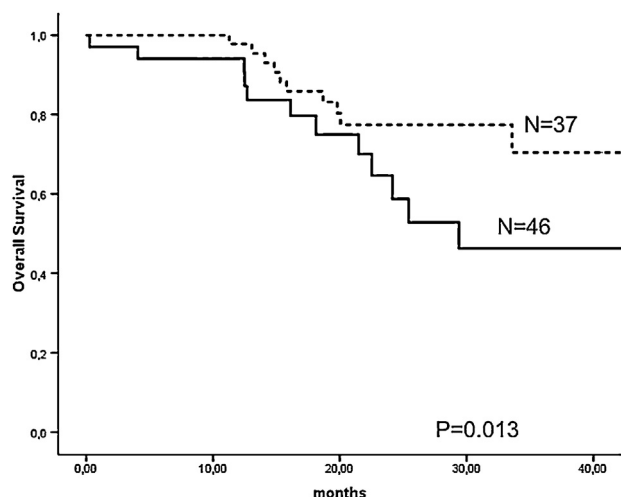


Fig. 3. *SMYD2* high expression level negatively influence OS in childhood ALL. Kaplan–Meier analysis demonstrating that 3-y OS for the highly expressed group ($n = 46$; solid line) was 47.9%, whereas the 3-y OS for the basal expression group ($n = 37$; broken line) was 79.3% ($p = 0.013$).

of chemotherapy induction compared to the expression at diagnosis. However, all 9 cases with high expression at diagnosis, presented significantly lower *SMYD2* expression on the 29th day of chemotherapy. In the 6 patients with basal *SMYD2* expression levels only one patient at 15th day (case no. 247) and another one at 29th day of treatment (case no 126) presented lower levels of expression compared to the expression at diagnosis.

As demonstrated in Fig. 4B, on the 15th day of induction, almost all selected bone marrow samples had more than 5% of leukemic cells, indicating a non-remission status of the disease. Interestingly, compared with diagnostic samples, the expression level of *SMYD2* remained high in the majority of samples. In contrast, on the 29th day of induction, 13 of 15 patients presented morphological remission with less than 5% of leukemic cells in bone marrow. *SMYD2* expression levels compared with pre-chemotherapy samples were significantly downregulated in 9 of the 13 patients that presented leukemia remission (Fig. 4A). Except for two cases, even those patients who presented higher expression levels of *SMYD2* on the 15th day compared to its level before treatment achieved a lower RQ value on the 29th day, evidencing an important correlation of *SMYD2* expression with disease remission (Fig. 4A).

Although Spearman analysis did not show correlation between leukemic bone marrow burden and *SMYD2* expression in the 15th day of induction ($R^2 = 0.3$; $p = 0.287$), the mRNA expression level of this methyltransferase seems to be correlated with blast cell percentage in the 29th day of treatment ($R^2 = 0.5$; $p = 0.05$) (Fig. 4C). Complete data are showed in Supplementary Table S1.

Paired-samples *t*-Student test comparing 15th and 29th day bone marrow samples using the diagnostic RQ value as reference, showed a statistically significant difference between *SMYD2* relative expressions in these two moments (0.12 vs. -0.59 ; 95% CI = 0.334–1.08; $p = 0.001$).

4. Discussion

Specific *SMYD2* expression levels in leukemias, especially in childhood ALL, have not been reported to date. In this work, we investigated *SMYD2* expression levels in bone marrow from leukemia patients and compared those to the levels obtained from non-leukemic donors. In addition, *SMYD2* expression levels were compared to clinical features of patients, to determine whether it could be used as a prognostic marker. Our cohort did not show significant differences in clinical and epidemiologic characteristics

with populations reported elsewhere [36]. There was no difference in occurrence in male (51.8%) and female (48.2%) patients; and most of the subjects were between the ages of 1 and 9 (63.9%). To date, age at diagnosis, WBC count and post-induction chemotherapy response remain as classical prognostic factors for childhood leukemia. Statistical analysis confirmed that these features are of prognostic value in our population as well. Although many studies have described the importance of aberrant protein methyltransferases activity in human cancers, the importance of *SMYD2* in carcinogenesis is not yet well-established in the literature. Komatsu et al. showed a frequent overexpression of *SMYD2* mRNA and protein in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) lines and, particularly, in the KYSE150 cells with 1q32–41.1 region amplification, which involves the coding chromosomal region of *SMYD2* gene [42]. Thus, it appears to be a direct relationship with *SMYD2* deregulation and cancer proliferation.

Cho et al. [31], demonstrated that *SMYD2* is overexpressed in bladder cancer comparing to nonneoplastic bladder tissues. They reported that, in addition to previously demonstrated p53 regulation by *SMYD2* methylation activity, *SMYD2* also plays a crucial role in the G1/S transition through methylation of Rb1 protein which enhances its Ser 807/811 phosphorylation both in vitro and in vivo, resulting in augmented *E2F* transcriptional activity and promotion of cell cycle progression. Moreover, the authors showed that *SMYD2* knockdown resulted in the suppression of cancer cell growth, which could be a rationale for the anticancer therapeutic use of *SMYD2*-specific inhibitors [32]. This relationship with cell growth stimulation may help to explain our observation that patients with *SMYD2* overexpression have a frequently higher WBC count. Our analysis also showed that abnormal expression of this lysine methyltransferase could contribute for a worse prognosis in childhood leukemia. More important, as demonstrated in survival analysis, the higher *SMYD2* expression level, the lower survival of ALL patients. Our findings are similar to what has been reported by Komatsu et al. for esophageal squamous cell carcinoma. In that study, *SMYD2* overexpressing tumors had a worse overall survival rate, and *SMYD2* positivity was independently associated with a worse outcome [42].

Other groups have previously reported that *SMYD2* expression could be used in conjunction with other genes to predict response to therapy in solid tumors. In 2010, Barros Filho et al., reported that the gene trio *MTSS1*, *RPL37* and *SMYD2* could potentially classify human breast cancer samples according to their responsiveness to neoadjuvant doxorubicin and cyclophosphamide therapy [32]. Although interesting, investigations involving expression of other genes are beyond the scope of the present work. Here, we also observed that *SMYD2* mRNA expression level significantly decreases in patients that respond to chemotherapy, especially reducing after the 29th day of treatment, when it is expected that more than 90% of patients do not present detectable leukemic cells in a morphologically and quantitatively recovered bone marrow.

Another interesting data is that almost all samples with *SMYD2* high expression at diagnosis gradually reduced its expression levels on the 15th and 29th day of chemotherapy. Although only a few cases had reduced expression of *SMYD2* on the 15th day of induction, all cases with *SMYD2* high expression at diagnosis presented significantly lower expression on the 29th day of chemotherapy induction which could be associated with disease remission. This observation suggests that *SMYD2* expression level is not a universal marker for the disease but maybe a very useful follow-up marker for those patients which presents higher *SMYD2* expression levels at diagnosis.

Although this series is sized limited to 15 patients from our cohort, our data is the first evidence in the literature that links deregulation in *SMYD2* expression with leukemia burden. In

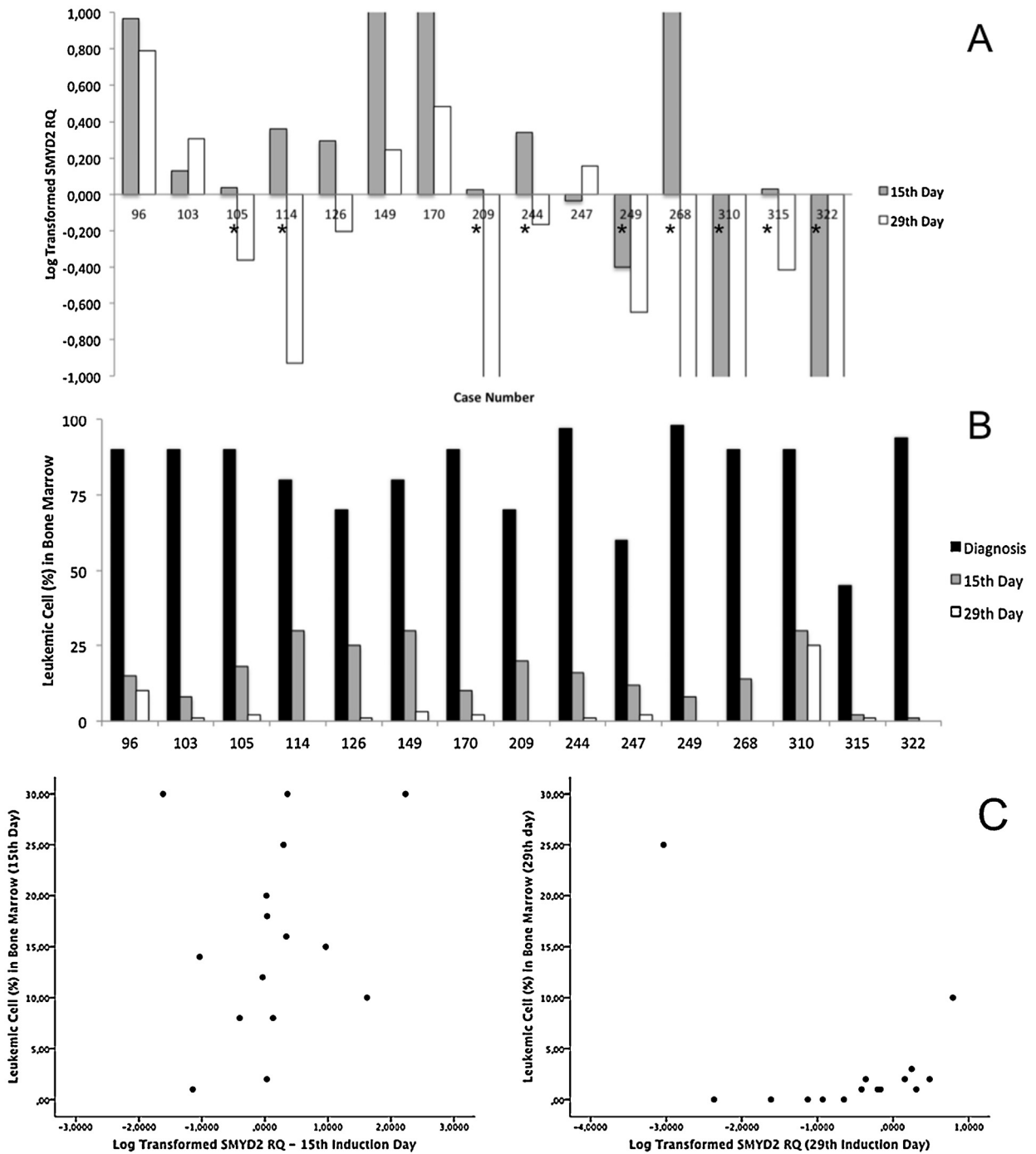


Fig. 4. Relationship between Bone Marrow (BM) leukemic burden and SMYD2 mRNA expression. (A) Log-transformed SMYD2 RQ values on 15th and 29th day of chemotherapy. Discontinued bars mean that values overlap the maximum or minimum values of the graph. Case numbers with asterisks markers (*) were classified as high SMYD2 expression level at diagnostic samples (fold-change higher than 4 compared with non-neoplastic samples) (B) comparison of BM leukemic cell percentage at diagnosis, 15th and 29th days of chemotherapy. BM leukemic cell percentages in diagnostic, 15th and 29th days of chemotherapy are plotted in absolute values. (C) Dispersion graphs with correlation between leukemic burden and SMYD2 expression level in bone marrow samples on 15th and 29th days of chemotherapy.

addition, there are still a considerable number of patients that in despite of not presenting a bad prognostic factor, relapse and die even with chemotherapy intensification and bone marrow grafting. Therefore, our results may help to develop novel prognostic strategies to better stratify ALL risk groups and orient patient treatment.

Taken together, our data represent the first comprehensive study of SMYD2 association to leukemogenesis and evidences its potential use as a prognostic marker in childhood ALL. Although more similar studies with a larger cohort are necessary, the aberrant higher expression of SMYD2 in the great majority of leukemia

cases provides an important evidence for the use of this target for the development of new antineoplastic therapies in childhood ALL.

Role of the funding source

Research Supporting Foundation of the Federal District (FAPDF grant number 0193000495/2009); National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq grant number 482869/2009-7).

Authors' contributions

L.H.T.S designed, performed and analyzed experiments, and contributed to writing the manuscript; R.V.A. and M.S.S.F. reviewed the manuscript; A.B.M. and F.P.S. designed the experiments and contributed to the writing of the manuscript.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to disclose.

Acknowledgments

The authors thank the team of pediatric hematology and oncology from Jose Alencar Children's Hospital of Brasilia: Dr Isis Maria Quezado Magalhaes, Jose Carlos Martins Cordoba, Raquel Alves Toscano, Paula Maria Allemand Azevedo, Estefania Rodrigues Bionjone and Lucelia Melgares for providing patient samples. The authors received financial support from the University of Brasilia UnB-DPP (Decanato de Pesquisa e Pós-graduação).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2014.01.013>.

References

- [1] Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29:551–65, official journal of the American Society of Clinical Oncology.
- [2] Stanulla M, Schrappe M. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in Hematology* 2009;46:52–63.
- [3] Greaves M. Childhood leukaemia. *BMJ* 2002;324:283–7.
- [4] Vrooman LM, Silverman LB. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Current Opinion in Pediatrics* 2009;21:1–8.
- [5] Cheok MH, Pottier N, Kager L, Evans WE. Pharmacogenetics in acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in Hematology* 2009;46:39–51.
- [6] Davidsen ML, Dalhoff K, Schmiegelow K. Pharmacogenetics influence treatment efficacy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2008;30:831–49.
- [7] Cunningham L, Aplenc R. Pharmacogenetics of acute lymphoblastic leukemia treatment response. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2007;8:2519–31.
- [8] Fulbright JM, Raman S, McClellan WS, August KJ. Late effects of childhood leukemia therapy. *Current Hematologic Malignancy Reports* 2011;6:195–205.
- [9] Ness KK, Armenian SH, Kadan-Lottick N, Gurney JG. Adverse effects of treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia: general overview and implications for long-term cardiac health. *Expert Review of Hematology* 2011;4:185–97.
- [10] Lee-Sherick AB, Linger RM, Gore L, Keating AK, Graham DK. Targeting paediatric acute lymphoblastic leukaemia: novel therapies currently in development. *British Journal of Haematology* 2010;151:295–311.
- [11] Robison LL. Late effects of acute lymphoblastic leukemia therapy in patients diagnosed at 0–20 years of age. In: *Hematology/the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*, 2011; 2011. p. 238–42.
- [12] Moorman AV. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Reviews* 2012;26:123–35.
- [13] Braoudaki M, Tzortzatou-Stathopoulou F. Clinical cytogenetics in pediatric acute leukemia: an update. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* 2012;12:230–7.
- [14] Fuster JL, Bermudez M, Galera A, Llinares ME, Calle D, Ortuno FJ. Imatinib mesylate in combination with chemotherapy in four children with de novo and advanced stage Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2007;92:1723–4.
- [15] Jones LK, Saha V. Philadelphia positive acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *British Journal of Haematology* 2005;130:489–500.
- [16] Wong NC, Ashley D, Chatterton Z, Parkinson Z, Parkinson-Bates M, Ng HK, Halembs MS, et al. A distinct DNA methylation signature defines pediatric pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics* 2012;7:535–41. Official Journal of the DNA Methylation Society.
- [17] Dunwell TL, Hesson LB, Pavlova T, Zabarovska V, Kashuba V, Catchpole D, et al. Epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics* 2009;4:185–93. Official Journal of the DNA Methylation Society.
- [18] Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics* 2012;13:343–57.
- [19] Black JC, Van Rechem C, Whetstone JR. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Molecular Cell* 2012;48:491–507.
- [20] Yoshimi A, Kurokawa M. Key roles of histone methyltransferase and demethylase in leukemogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* 2011;112:415–24.
- [21] Varier RA, Timmers HT. Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011;1815:75–89.
- [22] Tsang DP, Cheng AS. Epigenetic regulation of signaling pathways in cancer: role of the histone methyltransferase EZH2. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2011;26:19–27.
- [23] Dou Y, Hess JL. Mechanisms of transcriptional regulation by MLL and its disruption in acute leukemia. *International Journal of Hematology* 2008;87:10–8.
- [24] Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Greaves M. Molecular pathogenesis of MLL-associated leukemias. *International Journal of Hematology* 2005;82:9–20.
- [25] Luciani M, Rana I, Pansini V, Caniglia M, Coletti V, Maraschini A, et al. Infant leukaemia: clinical, biological and therapeutic advances. *Acta Paediatrica Supplement* 2006;95:47–51.
- [26] Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, et al. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nature Cell Biology* 2004;6:731–40.
- [27] Tan X, Rotllant J, Li H, De Deyne P, Du SJ. SmyD1, a histone methyltransferase, is required for myofibril organization and muscle contraction in zebrafish embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:2713–8.
- [28] Brown MA, Sims 3rd RJ, Gottlieb PD, Tucker PW. Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Molecular Cancer* 2006;5:26.
- [29] Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, Nishidate T, Katagiri T, Nakamura Y, et al. Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. *Cancer Science* 2006;97:113–8.
- [30] Silva FP, Hamamoto R, Kunizaki M, Tsuge M, Nakamura Y, Furukawa Y. Enhanced methyltransferase activity of SMYD3 by the cleavage of its N-terminal region in human cancer cells. *Oncogene* 2008;27:2686–92.
- [31] Cho HS, Hayami S, Toyokawa G, Maejima K, Yamane Y, Suzuki T, et al. RB1 methylation by SMYD2 enhances cell cycle progression through an increase of RB1 phosphorylation. *Neoplasia* 2012;14:476–86.
- [32] Barros Filho MC, Katayama ML, Brentani H, Abreu AP, Barbosa EM, Oliveira CT, et al. Gene trio signatures as molecular markers to predict response to doxorubicin cyclophosphamide neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2010;43:1225–31.
- [33] Abu-Farha M, Lanouette S, Elisma F, Tremblay V, Butson J, Figeys D, et al. Proteomic analyses of the SMYD family interactomes identify HSP90 as a novel target for SMYD2. *Journal of Molecular Cell Biology* 2011;3:301–8.
- [34] Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ, Sengupta R, Richter M, Dorsey JA, et al. Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature* 2006;444:629–32.
- [35] Wang L, Li L, Zhang H, Luo X, Dai J, Zhou S, et al. Structure of human SMYD2 protein reveals the basis of p53 tumor suppressor methylation. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:38725–37.
- [36] Brandalise S, Odone V, Pereira W, Andrea M, Zanichelli M, Aranega V. Treatment results of three consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols: GBTLI-80, GBTLI-82 and -85. *ALL Brazilian Group. Leukemia* 1993;7(Suppl 2):S142–5.
- [37] Stark B, Jeison M, Gobuzov R, Krug H, Glaser-Gabay L, Luria D, et al. Near haploid childhood acute lymphoblastic leukemia masked by hyperdiploid line: detection by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2001;128:108–13.
- [38] Kocak U, Gursel T, Kaya Z, Aral YZ, Albayrak M, Keskin EY, et al. ALL-BFM 95 treatment in Turkish children with acute lymphoblastic leukemia—experience of a single center. *Pediatric Hematology and Oncology* 2012;29:130–40.
- [39] Kamps WA, van der Pal-de Bruin KM, Veerman AJ, Fiocco M, Bierings M, Pieters R. Long-term results of Dutch Childhood Oncology Group studies for children with acute lymphoblastic leukemia from 1984 to 2004. *Leukemia* 2010;24:309–19.
- [40] Schrappe M. Evolution of BFM trials for childhood ALL. *Annals Hematology* 2004;83(Suppl 1):S121–3.
- [41] Andersson A, Ritz C, Lindgren D, Eden P, Lassen C, Heldrup J, et al. Microarray-based classification of a consecutive series of 121 childhood acute leukemias: prediction of leukemic and genetic subtype as well as of minimal residual disease status. *Leukemia* 2007;21:1198–203.
- [42] Komatsu S, Imoto I, Tsuda H, Kozaki KI, Muramatsu T, Shimada Y, et al. Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2009;30:1139–46.