

MARIANA BRACCIALLI DE LOYOLA

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE *SETD4* NA MODULAÇÃO DE VIAS PROLIFERATIVAS E  
PROGRESSÃO DA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA TIPO B (LLA-B)

BRASÍLIA

2025

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

MARIANA BRACCIALLI DE LOYOLA

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE *SETD4* NA MODULAÇÃO DE VIAS PROLIFERATIVAS E  
PROGRESSÃO DA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA TIPO B (LLA-B)

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

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pittella Silva

Brasília

2025

## RESUMO

A leucemia linfoide aguda de células B é a neoplasia mais incidente na população pediátrica. Apresenta elevada heterogeneidade molecular, e evidências crescentes indicam que mecanismos epigenéticos influenciam a proliferação e a resposta terapêutica. A metiltransferase SETD4 regula a metilação de lisinas em histonas e modula programas transpcionais associados à carcinogênese. Este trabalho tem como objetivo avaliar o papel biológico de *SETD4* em modelos celulares de LLA e investigar sua associação com proliferação celular e resposta ao Metotrexato (MTX).

Inicialmente, analisamos dados transcriptômicos das plataformas TCGA, cBioPortal e BloodSpot para examinar o padrão de expressão de *SETD4* e identificar vias enriquecidas em pacientes com alta e baixa expressão. Em seguida, conduzimos experimentos funcionais em duas linhagens de LLA-B: Nalm-6, de baixa expressão endógena de *SETD4*, e REH, cuja expressão é elevada. Na Nalm-6, induzimos a superexpressão de *SETD4* por meio de vetor de expressão; na REH, reduzimos a expressão do gene utilizando siRNA. Também desenvolvemos modelos iniciais utilizando CRISPR/Cas9 com vistas à geração futura de clones knockout. Avaliamos os efeitos dessas manipulações na proliferação celular e na sensibilidade ao MTX.

Nossas análises *in silico* demonstram que *SETD4* encontra-se superexpresso em um subconjunto de amostras de LLA-B, especialmente naquelas com a translocação t(12;21), e mostram que pacientes com alta expressão apresentam enriquecimento de vias proliferativas, incluindo E2F, G2/M checkpoint, MYC e reparo de DNA. Experimentalmente, observamos que a superexpressão de *SETD4* aumenta a proliferação de Nalm-6, enquanto o silenciamento reduz a proliferação de REH, confirmando um papel pró-proliferativo. Além disso, verificamos que células com níveis elevados de *SETD4* apresentam maior sensibilidade ao MTX, enquanto a redução da expressão diminui a resposta ao fármaco.

Esses resultados indicam que *SETD4* atua como regulador positivo da proliferação e da sensibilidade ao MTX em LLA-B, reforçando seu potencial como biomarcador e alvo molecular para investigações futuras.

**Palavras-chave:** Metiltransferase, Epigenética, Leucemia Linfoide Aguda.

## ABSTRACT

B cell Acute lymphoblastic leukemia (ALL-B) is the most frequent neoplasm in the pediatric population. It presents high molecular heterogeneity, and increasing evidence indicates that epigenetic mechanisms influence both proliferation and therapeutic response. The methyltransferase SETD4 regulates lysine methylation on histones and modulates transcriptional programs associated with carcinogenesis. This study aims to evaluate the biological role of *SETD4* in cellular models of ALL and investigate its association with cell proliferation and response to Methotrexate (MTX).

Initially, we analyzed transcriptomic data from the TCGA, cBioPortal and BloodSpot platforms to examine the expression pattern of *SETD4* and identify pathways enriched among patients with high and low expression. We then conducted functional experiments in two B-ALL cell lines: Nalm-6, which displays low endogenous *SETD4* expression, and REH, which exhibits high expression. In Nalm-6, we induced *SETD4* overexpression using an expression vector; in REH, we reduced gene expression using siRNA. We also developed initial CRISPR/Cas9 models for the future generation of knockout clones. We evaluated the effects of these manipulations on cell proliferation and MTX sensitivity.

Our in silico analyses demonstrate that *SETD4* is overexpressed in a subset of B-ALL samples, particularly those carrying the t(12;21) translocation, and show that high expression is associated with the enrichment of proliferative pathways, including E2F, G2/M checkpoint, MYC and DNA repair. Experimentally, we observed that *SETD4* overexpression increases proliferation in Nalm-6, whereas gene silencing reduces proliferation in REH, confirming a pro-proliferative role. Furthermore, we found that cells with elevated *SETD4* levels display greater sensitivity to MTX, while reduced expression decreases responsiveness to the drug.

These findings indicate that *SETD4* acts as a positive regulator of proliferation and MTX sensitivity in B-ALL, reinforcing its potential as a biomarker and molecular target for future investigations.

**Keywords:** Methyltransferase, Epigenetics, Acute Lymphoblastic Leukemia.

## **AGRADECIMENTOS**

O desenvolvimento deste trabalho foi repleto de desafios, ajustes de percurso e aprendizados inesperados. Sou imensamente grata às pessoas e instituições que me acompanharam ao longo desse processo, contribuindo direta ou indiretamente para que esta dissertação fosse concluída.

Agradeço à Universidade de Brasília, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio técnico e financeiro.

Agradeço ao professor Dr. Fábio Pittella Silva pela oportunidade, pela dedicação e pela paciência com que me orientou, bem como pelos ensinamentos compartilhados desde a iniciação científica.

Aos professores Dra. Izabela Bastos, Dr. Ricardo Camargo e Dra. Rosângela de Andrade, agradeço por gentilmente aceitarem compor a banca, pela leitura cuidadosa e pelas contribuições valiosas.

Registro meus sinceros agradecimentos à Ana Gualberto e à Brunna Santana pelos ensinamentos, pelo auxílio nos experimentos e na escrita, e pela parceria nos bons momentos e nos desafios do dia a dia.

Ao Alan, agradeço por me ensinar, com paciência e dedicação, as bases teóricas e experimentais que fundamentaram este trabalho.

À equipe do Laboratório de Patologia Molecular do Câncer, deixo meu agradecimento pelo apoio em todas as etapas, pelos cafés, pelas risadas e pelas conversas que tornaram o ambiente mais leve e acolhedor.

Agradeço profundamente à minha família, em especial à minha mãe, Maria Luiza, e ao meu irmão, Raphael, cujo amor, apoio e compreensão incondicionais me acompanharam por toda a trajetória.

Ao meu namorado, César, agradeço pelo amor, pela paciência e pelo apoio constante, especialmente na reta final.

E, por fim, aos meus amigos, que me acompanharam de perto ou de longe ao longo dos anos, sempre com carinho e afeto, deixo meu mais profundo agradecimento.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Representação esquemática da transferência do grupo metil para o grupo amino da lisina.
- Figura 2- Representação das quatro isoformas de *SETD4*.
- Figura 3- Mecanismo de ação de siRNA.
- Figura 4- Mecanismo de ação clássico de CRISPR/Cas9 para edição do tipo *knockout*.
- Figura 5- Delineamento experimental.
- Figura 6- Representação esquemática da geração de linhagens de mamífero com expressão estável de Cas9 utilizando lentivírus.
- Figura 7- Esquema experimental do ensaio de transdução lentiviral.
- Figura 8- Diluição seriada em placa de 96 poços para obtenção de clone único de célula com expressão estável de Cas9.
- Figura 9- Representação do gene *SETD4* evidenciando os locais de ligação dos sgRNAs.
- Figura 10- Vetor de expressão da variante 1 de *SETD4*.
- Figura 11- Expressão de *SETD4* em subtipos de LLA.
- Figura 12- Níveis de expressão de *SETD4* em amostras de LLA-B do estudo TARGET-ALL Phase II.
- Figura 13- Frequência de alterações no número de cópias do gene *SETD4* em LLA-B.
- Figura 14- Rede de coexpressão de *SETD4* gerada no GeneMANIA.
- Figura 15- Heatmap dos 50 genes diferencialmente expressos mais relevantes entre pacientes com baixa e alta expressão de *SETD4*.
- Figura 16- Análise de enriquecimento gênico (GSEA) entre pacientes com baixa e alta expressão de *SETD4*.
- Figura 17- Análise de enriquecimento de assinaturas MSigDB aplicada aos genes com expressão reduzida em pacientes com alta expressão de *SETD4*.
- Figura 18- Curva de sobrevida global de pacientes segundo expressão de *SETD4*.

Figura 19- Análise da expressão de *SETD4* por RT-qPCR em linhagens celulares de LLA-B.

Figura 20- Análise da expressão de *SETD4* em linhagens de LLA-B por *western blot*.

Figura 21- Expressão de Cas9 nas linhagens REH e RS 4;11.

Figura 22- Resultado representativo do sequenciamento Sanger.

Figura 23- Análise de edição e expressão de *SETD4* do clone 70.

Figura 24- Silenciamento de *SETD4* em REH com siRNA.

Figura 25- Superexpressão transiente de *SETD4* em linhagens 697 e Nalm-6.

Figura 26- Avaliação da proliferação celular em REH com silenciamento de *SETD4*.

Figura 27- Ensaio de proliferação em linhagem Nalm-6 com superexpressão de *SETD4*.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Sequências dos primers utilizados.

Tabela 2- Sequência de sgRNA utilizadas para transfecção em células Cas9 estáveis.

Tabela 3- Sequência de primers para sequenciamento Sanger.

Tabela 4- Correlação de Spearman entre dados de CNA e mRNA de *SETD4*.

Tabela 5- Correlação de Spearman entre dados de expressão a nível de mRNA de *SETD4* e seus genes correlacionados segundo o GeneMANIA em pacientes do estudo TARGET-Phase II.

Tabela 6- Correlação de Spearman entre expressão de *SETD4* (mRNA) e parâmetros clínicos de pacientes do estudo TARGET-ALL-Phase II.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- ACC – Carcinoma adrenocortical (do inglês adrenocortical carcinoma)
- BLCA – Carcinoma urotelial de bexiga (do inglês bladder urothelial carcinoma)
- COAD – Adenocarcinoma de cólon (do inglês colon adenocarcinoma)
- CNA – Alteração no número de cópias (do inglês copy number alteration)
- DEG – Genes diferencialmente expressos (do inglês differentially expressed genes)
- FISH – Hibridização fluorescente in situ
- HDAC – Deacetilases de histona (do inglês histone deacetylases)
- HMT – Metiltransferases de histonas (do inglês histone methyltransferases)
- KAT – Acetiltransferase de lisina (do inglês lysine acetyltransferases)
- KIRC – Carcinoma renal de células claras (do inglês kidney clear cell carcinoma)
- KMT – Metiltransferases de lisina (do inglês lysine methyltransferases)
- LMC – Leucemia mieloide crônica
- LMA – Leucemia mieloide aguda
- LLA – Leucemia linfoide aguda
- LLC – Leucemia linfoide crônica
- LIHC – Carcinoma hepatocelular (do inglês liver hepatocellular carcinoma)
- MRD – Doença residual mínima (do inglês minimal residual disease)
- NGS – Sequenciamento de nova geração
- OS – Sobrevida global (do inglês overall survival)
- READ – Adenocarcinoma retal (do inglês rectal adenocarcinoma)
- SD – Síndrome de Down
- SET – Suppressor of variegation, Enhancer of Zeste, Trithorax
- STAD – Adenocarcinoma gástrico (do inglês stomach adenocarcinoma)

SFB – Soro fetal bovino

UVM – Melanoma uveal

MTX – Metotrexato

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Subtipos de LLA .....	16
1.1.1 Fusão ETV6-RUNX1 .....	16
1.1.2 Fusão BCR-ABL1 (Cromossomo Filadélfia) .....	16
1.1.3 Fusão TCF3-PBX1 .....	16
1.1.4 BCR-ABL1- like (Ph-like) .....	17
1.1.5 Rearranjo DUX4 .....	17
1.1.6 Rearranjo MEF2D.....	18
1.1.7 Rearranjo de MLL.....	18
1.1.8 Rearranjo ZNF384.....	18
1.1.9 Hipoploidia e Hiperploidia.....	19
1.1.10 LLA associada a Síndrome de Down .....	19
1.2 Epigenética .....	19
1.2.1 Metilação do DNA.....	20
1.2.2 Acetilação de histonas.....	21
1.2.3 Metilação de histonas.....	21
1.2.4 Epigenética e LLA .....	23
1.3 Metiltransferase SETD4.....	25
1.4 Modulação da Expressão Gênica por Técnicas de Interferência Molecular	29
1.4.1 Small interfering RNA (siRNA) .....	29
1.4.2 CRISPR/Cas9.....	30
2 JUSTIFICATIVA .....	31
3 OBJETIVOS .....	32
3.1 Objetivos gerais .....	32
3.2 Objetivos específicos .....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
4.1 Delineamento experimental .....	32
4.2 Análise bioinformática exploratória em banco de dados públicos.....	33
4.2.1 Expressão gênica de SETD4 em leucemia linfoblástica aguda utilizando dados do banco BloodSpot .....	33
4.2.2 Número de cópias alteradas (CNA).....	33

4.2.3 Rede de coexpressão de <i>SETD4</i> .....	34
4.2.4 Enriquecimento gênico de vias e assinaturas genéticas .....	34
4.2.5 Curva de sobrevida global.....	35
4.3 Cultivo Celular .....	36
4.4 Extração de DNA.....	36
4.5 Extração de RNA e síntese de cDNA .....	36
4.6 PCR convencional e PCR quantitativa (qPCR).....	37
4.7 Estabelecimento de Linhagens de LLA com expressão estável e endógena de Cas9 .....	39
4.7.1 Produção de Lentivírus.....	39
4.7.2 Transdução lentiviral e seleção .....	40
4.7.3 Isolamento Clonal.....	42
4.8 Desenho de RNA guia (sgRNA) .....	43
4.9 Transfecção do sgRNA.....	44
4.10 Sequenciamento Sanger .....	44
4.11 Eletroporação de siRNA e vetor de superexpressão .....	45
4.12 Western blot.....	46
4.13 Ensaio de proliferação celular.....	47
4.14 MTT .....	47
5 RESULTADOS .....	48
5.1 Análise <i>in silico</i> do nível de expressão de <i>SETD4</i> em leucemia linfoblástica aguda.....	48
5.2 Análise de número de cópias alteradas e correlação com mRNA de <i>SETD4</i> .....	50
5.3 Rede de coexpressão de <i>SETD4</i> .....	51
5.4 Análise de expressão diferencial e assinaturas associadas à expressão de <i>SETD4</i> em LLA-B .....	53
5.5 Correlação entre expressão de <i>SETD4</i> e parâmetros clínicos .....	56
5.6 Níveis de expressão de <i>SETD4</i> em linhagens celulares de LLA-B .....	58
5.7 Estabelecimento de linhagens com expressão estável de Cas9 .....	59
5.8 Edição de linhagens .....	59
5.9 Silenciamento com siRNA .....	61
5.10 Superexpressão de <i>SETD4</i> .....	62
5.11 Proliferação celular .....	63

5.12 Resposta ao tratamento com metotrexato .....	67
6 DISCUSSÃO .....	68
7 CONCLUSÕES .....	73
8 REFERÊNCIAS .....	75

## 1 INTRODUÇÃO

As leucemias são neoplasias decorrentes da proliferação desordenada de células hematopoiéticas e correspondem a aproximadamente 28% das neoplasias infantis (Siegel et al., 2022). Dependendo da linhagem celular original, podem ser classificadas como linfoide ou mieloide. Além disso, o grau de diferenciação celular constitui um critério fundamental para a classificação da doença como aguda ou crônica, sendo que as leucemias agudas se originam de células imaturas ou pouco diferenciadas, enquanto as formas crônicas derivam de células com maior grau de maturação. Dessa forma, a doença pode ser classificada como leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoide crônica (LLC) ou leucemia linfoide aguda (LLA) (Bispo; Pinheiro; Kobetz, 2020).

Atualmente, a LLA é a neoplasia maligna mais comum na população pediátrica, constituindo cerca de 80% das leucemias. A doença tem origem em células precursoras de linfócitos, que podem ser da linhagem B (LLA-B) ou T (LLA-T), sendo LLA-B o subtipo mais prevalente (Lustosa De Sousa et al., 2015; Teachey; O'Connor, 2020). A doença se manifesta com a presença de mais de 20% de linfoblastos neoplásicos, comprometendo a hematopoiese normal e resultando em anemia, trombocitopenia e neutropenia (Puckett; Chan, 2025).

Nas últimas décadas, o tratamento de LLA avançou de forma significativa, passando de uma taxa de remissão de menos de 10% em 1960 para cerca de 90% atualmente (Bhojwani et al., 2019). Esse progresso se deve ao aprimoramento da estratificação de risco e implementação de protocolos de tratamento mais específicos para os subtipos moleculares, viabilizados pelos avanços nas áreas de citogenética e biologia molecular (Forrest; Geoerger; Janeway, 2018). O desenvolvimento de tecnologias como sequenciamento de nova geração (NGS), microarranjos hibridização fluorescente *in situ* (FISH), detecção de alteração de número de cópias e modificações epigenéticas, que permitiram a classificação de subtipos baseados em alterações cromossômicas (Shimony; Stahl; Stone, 2025).

Todavia, apesar das elevadas taxas de remissão, observa-se que cerca de 20% dos pacientes pediátricos de alto risco e 50% dos pacientes adultos não alcançam remissão duradoura com a primeira linha de tratamento, evidenciando a recidiva e a

resistência quimioterápica como importantes desafios clínicos (Schwartz; Muffly, 2024).

### 1.1 Subtipos de LLA

#### 1.1.1 *Fusão ETV6-RUNX1*

A fusão entre ETV6 (TEL) e RUNX1 (AML1) resulta da translocação t(12;21)(p13;q22) e está presente em 25% dos casos de LLA infantil (Montaño et al., 2020; Ryan et al., 2023). Trata-se da fusão de dois fatores de transcrição, contendo o N-terminal da primeira, que promove a ligação da DNA, e o domínio catalítico da segunda. É uma alteração que indica bom prognóstico e resposta satisfatória aos tratamentos. Entretanto, são observadas altas taxas de recaída e desenvolvimento de resistência aos tratamentos farmacológicos, sendo muitas vezes necessário o transplante de medula óssea (Montaño et al., 2020; Moorman et al., 2010). Sabe-se que a fusão ETV6-RUNX1 não é iniciadora do processo leucêmico, sendo necessário o envolvimento de outras alterações (Pui; Robison; Look, 2008).

#### 1.1.2 *Fusão BCR-ABL1 (Cromossomo Filadélfia)*

A translocação t(9;22)(q34; q11.2) gera a oncoproteína fusionada BCR-ABL1, uma quinase permanentemente ativa, que emite sinais de proliferação de forma ininterrupta. A incidência de Cromossomo Filadélfia (Ph+) em LLA é baixa em crianças e aumenta com a idade dos pacientes. A alteração está associada com prognóstico desfavorável (Ryan et al., 2023). No entanto, a introdução de inibidores de tirosina-quinase no tratamento aumentou significativamente a expectativa de vida dos pacientes (Abou Dalle et al., 2019; Pui et al., 2011).

#### 1.1.3 *Fusão TCF3-PBX1*

A translocação t(1;19)(q23;p13), que resulta na fusão TCF3-PBX1, está presente em cerca de 5% dos casos de LLA-B (Burmeister et al., 2023). O gene TCF3 codifica os fatores de transcrição E12 e E47, que atuam na maturação de células B. Já o gene PBX1 tem função reguladora e não está expresso em linfócitos.

A fusão resulta na ativação anormal de PBX1 e na expressão desregulada de genes (Kamps, 1997). Inicialmente descrita por Carroll e colaboradores em 1984 como um marcador de mau prognóstico, essa alteração foi, por muitos anos, associada a

desfechos clínicos desfavoráveis. No entanto, os avanços terapêuticos e a melhor estratificação de risco permitiram a reclassificação desse subtipo como de risco intermediário, especialmente em pacientes pediátricos, cujos desfechos têm melhorado significativamente nas últimas décadas (Burmeister et al., 2023; Carroll et al., 1984).

#### 1.1.4 *BCR-ABL1-like (Ph-like)*

O subtipo *Ph-like* apresenta perfil de expressão semelhante ao *Ph+*, embora não envolva a fusão *BCR-ABL1*. Este subtipo é o mais prevalente entre jovens adultos e confere prognóstico desfavorável (Iacobucci; Mullighan, 2017). Caracteriza-se por uma série de alterações, como rearranjo, mutações e alterações no número de cópias, que promovem a ativação de quinases ou sinalização de receptores de citocinas (Maese; Raetz, 2019).

A presença da fusão de genes da classe de *ABL1* pode conferir sensibilidade aos tratamentos com inibidores de tirosina-quinase, como imatinib e desatinib, comumente utilizados em casos de LLA *Ph+*. Além disso, o subtipo também engloba alterações que resultam em ativação da via JAK-STAT, como rearranjo de *CRLF2*, que é muito prevalente e frequentemente associado a mutações em JAK e à Síndrome de Down (SD). Também foram observadas alterações em outras quinases e receptores de citocinas que respondem de formas variadas aos tratamentos com inibidores de tirosina-quinase (Arber et al., 2016; Duffield; Mullighan; Borowitz, 2023).

#### 1.1.5 *Rearranjo DUX4*

O rearranjo *DUX4* (*DUX4r*) representa prognóstico favorável e está presente em até 7% dos casos de LLA-B pediátrico, sendo mais prevalente entre adolescentes e adultos (Hunger; Mullighan, 2015). Sua forma mais comum é fusão com *IGH*, que confere características oncogênicas para as células (Yasuda et al., 2016).

Na LLA-B, o rearranjo resulta na maior expressão de *DUX4-IGH*, que apresenta menor capacidade transcrecional quando comparado com *DUX4*, conferindo um padrão de expressão característico (Tanaka et al., 2018). Ainda, uma série de alterações estão associadas ao subtipo *DUX4r*, sendo a deleção ou alteração do gene

regulador hematopoietico *ERG* a mais prevalente e que parece desempenhar papel protetivo (Rehn et al., 2020).

#### 1.1.6 Rearranjo *MEF2D*

O rearranjo *MEF2D* (*MEF2Dr*) representa prognóstico desfavorável e é raro em adultos e crianças. *MEF2D* é um fator de transcrição envolvido na diferenciação de células B. A combinação mais frequente de *MEF2Dr* é com *BCL9*, um gene envolvido na auto renovação de células tronco e que desempenha importante papel no desenvolvimento e oncogênese. O rearranjo *MEF2Dr* resulta na desregulação de *MEF2D*, que pode levar ao aumento de expressão de *HDAC9* (Duffield; Mullighan; Borowitz, 2023; Gu et al., 2016).

#### 1.1.7 Rearranjo de *MLL*

O gene denominado *mixed-lineage leukemia* (*MLL*), também identificado como *KMT2A*, encontra-se localizado no cromossomo 11q23. A ocorrência de rearranjo é observada em aproximadamente 10% e 5% dos casos de LLA (*MLL-r-ALL*) em adultos e crianças, respectivamente (El Chaer; Keng; Ballen, 2020).

Os principais genes translocados são *AFF1*, *MLLT3* e *MLLT1*, os quais resultam na formação de proteínas quiméricas com atividade oncogênica (El Chaer; Keng; Ballen, 2020). A translocação mais prevalente entre crianças com menos de 1 ano é a t(4;11), que resulta na fusão *AFF1-MLLT1* e em prognóstico desfavorável (Iacobucci; Mullighan, 2017).

De forma geral, a LLA associada ao rearranjo *MLL* (*MLL-r-ALL*) exibe um perfil característico de expressão gênica, com elevada expressão de proteínas HOX e cofator MEIS1. Indivíduos portadores de *MLL-r-ALL* enfrentam piores prognósticos e maiores índices de envolvimento do sistema nervoso central. Além disso, o rearranjo confere resistência aos tratamentos com corticoides e L-asparaginase (El Chaer; Keng; Ballen, 2020; Marschalek, 2016).

#### 1.1.8 Rearranjo *ZNF384*

O rearranjo do fator de transcrição *ZNF384* (*ZNF384r*) é mais comum entre a população pediátrica e jovem, podendo ocorrer com cerca de 19 genes, incluindo reguladores de transcrição e modificadores de cromatina (Duffield; Mullighan; Borowitz, 2023; Iacobucci; Mullighan, 2017). Os parceiros de fusão mais comuns são *EP300*, *TCF3* e *TAF15*, que resultam em diferentes prognósticos. Prognósticos mais favoráveis podem ser observados em pacientes com fusão *ZNF384- EP300*, enquanto prognósticos desfavoráveis estão relacionados com a fusão *ZNF384- TCF3* (Zhu et al., 2023).

#### 1.1.9 *Hipoploidia e Hiperploidia*

A hiperploidia foi observada pela primeira vez em 1962 por Fritz Lampert. Está presente em 35% dos casos de LLA-B em crianças e indica prognóstico favorável. Manifesta-se inicialmente no cromossomo 21 e pode ser acompanhado por ganho nos cromossomos X, 14, 6, 18, 4, 17, e 10 (Haas; Borkhardt, 2022). Por outro lado, a hipoploidia ocorre em cerca de 7% dos casos de LLA-B e é indicativo de prognóstico desfavorável (Panuciak et al., 2023).

#### 1.1.10 *LLA associada a Síndrome de Down*

A SD é um fator de risco para o desenvolvimento de LLA em crianças, aumentando em até 20 vezes as chances de aparecimento da doença. Além disso, o prognóstico de LLA relacionada à SD é desfavorável (Rabin; Whitlock, 2009).

Os mecanismos relacionados com a trissomia do cromossomo 21 que promovem início e progressão da doença ainda são desconhecidos (Baruchel et al., 2023; Rabin; Whitlock, 2009). Entretanto, estudo com camundongos identificou que a triplicação da região 21q22 contribui para defeitos de maturação em células B e LLA-B com fusão BCR-ABL ou anormalidades em *CRLF2*, presente em 60% dos casos de SD-LLA. Ainda, foi possível observar que a triplicação resulta na supressão da trimetilação na lisina 27 da histona 3 (H3K27me3) em células B progenitoras e em LLA-B (Izraeli, 2010; Lane et al., 2014).

### 1.2 Epigenética

A epigenética é o campo de estudos que tem como enfoque alterações hereditárias que não afetam a sequência do DNA, mas a atividade e expressão de

genes (Holliday, 1987). Atualmente, os principais fatores epigenéticos descritos são a metilação de DNA e modificações pós-traducionais de histonas. Tais modificações alteram o padrão de expressão gênica das células e estão associadas ao desenvolvimento, progressão e metástase do câncer (Davalos; Esteller, 2023; Zhao et al., 2023).

O organismo adulto é formado por cerca de 200 tipos celulares distintos e aproximadamente 20 mil genes. Apesar das células apresentarem o mesmo material genético, suas identidades são definidas de acordo com o conjunto de genes ativados e reprimidos. A ativação e repressão dos genes depende da ligação de fatores de transcrição às regiões promotoras do DNA, bem como da disposição espacial da cromatina, que pode estar mais condensada (heterocromatina) ou menos condensada (euclomatina) (Liu et al., 2014; Morrison; Thakur, 2021).

A cromatina é a estrutura composta por nucleossomos, os quais consistem no enrolamento da dupla-hélice de DNA ao redor de octâmeros de histonas. Estes octâmeros são compostos por um tetrâmero de histonas H3-H4 e dois dímeros de histonas H2A-H2B, e são estabilizados por uma histona H1. As caudas amino-terminais de cada histona se projetam para fora do nucleossomo e estão sujeitas a várias modificações pós-traducionais (Sadakierska-Chudy; Kostrzewska; Filip, 2015).

### 1.2.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais estudada. O grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) é transferido do S-adenosil-L-metionina (SAM) para a posição C5 do resíduo de citosina, formando 5-metilcitosina (5mC) (Sadakierska-Chudy; Kostrzewska; Filip, 2015). A transferência do grupo metil é realizada por DNA metiltransferases (DNMT) em regiões com grande concentração de CpG (Citosina-fosfato-Guanina), denominadas ilhas CpG (Nishiyama; Nakanishi, 2021). A metilação *de novo* ocorre pela ação de DNMT3A, DNMT3B, e DNMT3L, já a manutenção da metilação após a replicação é garantida pela enzima DNMT1 (Mattei; Bailly; Meissner, 2022).

A hipermetilação do DNA está relacionada principalmente com processos de repressão da expressão, como *imprinting*, silenciamento de sequências repetitivas e silenciamento do cromossomo X. Todavia, metilação de DNA em corpos de genes

pode desencadear efeito oposto, indicando que a função da modificação varia de acordo com o contexto (Li; Tollefson, 2021).

### *1.2.2 Acetilação de histonas*

A acetilação de histonas consiste na adição de grupo acetil à porção  $\epsilon$ -amino de resíduos de lisina em histona. Ocorre pela ação de enzimas acetiltransferases de lisina (KAT, do inglês *lysine acetyltransferases*), que usam como cofator a acetilcoenzima A (Acetil-coA) (Shvedunova; Akhtar, 2022). A acetilação de resíduos de lisina em histonas altera a estrutura da cromatina e promove o recrutamento de fatores de transcrição, levando à ativação de genes, porém esta relação ainda é objeto de discussão (Allfrey; Faulkner; Mirsky, 1964; Morgan; Shilatifard, 2020).

A presença de histona H3 lisina 27 acetilada (H3K27ac) está relacionada com o nível de interação *enhancer-promotor* e expressão de oncogenes em células B, indicando possível envolvimento deste fator epigenético no desenvolvimento de câncer (Sungalee et al., 2021). Ainda, mutações no domínio acetiltransferase de CREBBP e EP3000 resultam na diminuição de H3K27ac e desregulação da sinalização celular, refletindo em piores prognósticos em neoplasias de células B (Huang et al., 2021).

Além disso, enzimas que promovem a deacetilação de histonas, as deacetilases de histona (HDAC, do inglês *histone deacetylases*), parecem estar envolvidas nos processos de oncogênese (Shanmugam; Rakshit; Sarkar, 2021). Nos últimos anos, diversos inibidores de HDAC foram desenvolvidos e demonstraram ser eficazes no tratamento de neoplasias hematológicas, com aprovação pelas agências reguladoras dos EUA e da China para o tratamento de linfoma de células T, mieloma múltiplo e câncer de mama (Zhao et al., 2023).

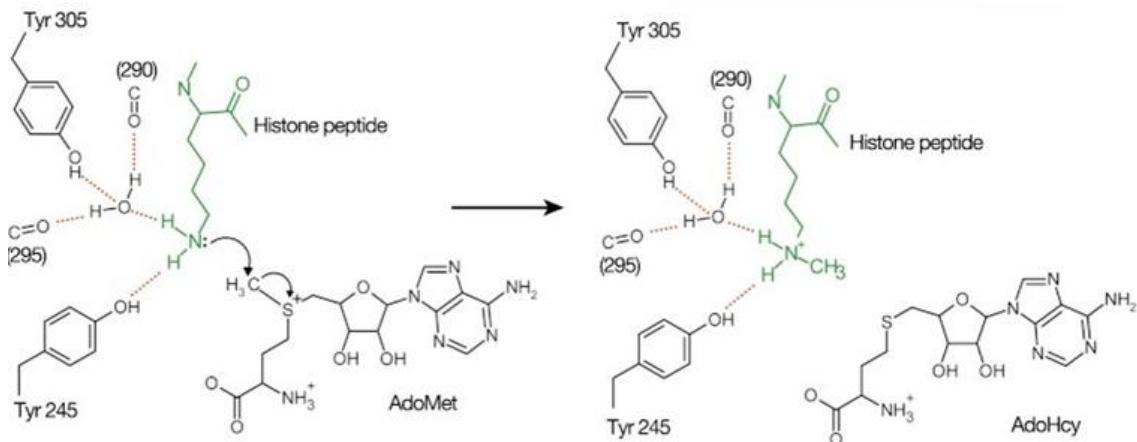
### *1.2.3 Metilação de histonas*

A metilação de histonas constitui um processo epigenético mediado por enzimas denominadas metiltransferases de histonas (HMTs, do inglês *histone methyltransferases*), responsáveis por catalisar a adição de grupamentos metil ( $-\text{CH}_3$ ) às caudas N-terminais de resíduos específicos de lisina e arginina. As enzimas que metilam resíduos de lisina são conhecidas como KMTs (*lysine methyltransferases*).

De maneira análoga à metilação do DNA, o cofator doador de grupo metil é o SAM (Ganesan et al., 2019). A Figura 1 esquematiza o mecanismo catalítico dessa reação, representando a transferência do grupo metil da SAM para um resíduo de lisina presente em um peptídeo de histona. Ressalta-se que, com exceção da enzima DOT1L, a maioria das HMTs apresenta um domínio catalítico SET (*Suppressor of variegation, Enhancer of Zeste, Trithorax*), altamente conservado e fundamental para sua função enzimática (Albert; Helin, 2010).

A metilação de resíduos de lisina em histonas está relacionada com processos como regulação do ciclo celular, divisão celular, proliferação, sobrevida e estabilidade (Barghout; Machado; Barsyte-Lovejoy, 2022). Além disso, a mono-, di- e trimetilação de histonas podem gerar tanto a repressão quanto a indução da expressão gênica, dependendo do contexto celular existente. Normalmente, a trimetilação de H3K4, H3K36 e H3K79 está associada à ativação transcripcional, já a trimetilação H3K9, H3K27 e H4K20 se relaciona com a repressão da transcrição (Li et al., 2022). Por outro lado, a metilação de resíduos de arginina em histonas interfere na biogênese de RNA, processamento, *splicing*, organização da cromatina e expressão gênica (Wu et al., 2021).

Dada a estreita relação entre KMTs, os processos de expressão gênica e ciclo celular, não é surpreendente que mutações e alteração da função das enzimas estejam envolvidas no desenvolvimento e progressão de neoplasias. As KMTs que catalisam H3K36me2 (NSD1, NSD2, NSD3 e ASH1L) desempenham papel oncogênico em diversos tipos de câncer (Husmann; Gozani, 2019). Por exemplo, NSD1, NSD2, ASH1L e DOT1L estão associadas ao desenvolvimento de leucemias, enquanto que NSD3, ASH1L e SETD4 estão relacionadas ao câncer de mama, dentre outros (Bennett et al., 2017; Faria et al., 2013a; Liu et al., 2014; Nuñez et al., 2024; Oyer et al., 2014; Stein et al., 2018; Zhu et al., 2016). Por outro lado, as KMTs também podem exercer função protetora no contexto de oncogênese. A perda de função de SETD2, resulta em diminuição de H3K36me3 e está associada a um amplo espectro de malignidades, incluindo leucemia linfoblástica aguda e crônica (Husmann; Gozani, 2019; Parker et al., 2016; Zhu et al., 2014).



**Figura 1.** Representação esquemática da transferência do grupo metil da S-adenosilmetionina (AdoMet) para o grupo amino da lisina presente no peptídeo de histona. A reação ocorre no sítio catalítico de HMTs, com a liberação de S-adenosil-homocisteína (AdoHcy) como produto. Retirado de Xiao et al. (2003).

Nos últimos anos, houve significativo avanço no desenvolvimento de inibidores direcionados a diferentes tipos de HMTs, que representam a terceira geração de medicamentos com capacidade de modular informações epigenéticas (Marzochi et al., 2023). O inibidor de DOT1L, Pinometostat, demonstrou um perfil de tolerabilidade satisfatório em um estudo clínico de fase I envolvendo pacientes com leucemia aguda avançada (Stein et al., 2018). Além disso, o inibidor AS-99 de ASH1L induziu apoptose e diferenciação celular, bloqueou a proliferação celular, reduziu a expressão de genes alvo da fusão MLL, diminuiu a dimetilação de H3K36 e minimizou a carga leucêmica em modelos *in vivo* e *in vitro* de leucemia com rearranjo MLL (Rogawski et al., 2021).

#### 1.2.4 Epigenética e LLA

Apesar dos avanços na classificação de subtipos moleculares de LLA, cerca de 20% dos casos de LLA-B não pertencem a nenhum dos subtipos descritos (Pui et al., 2015). Neste contexto, modificações epigenéticas, como a metilação do DNA e as modificações de histonas, passaram a integrar estudos voltados à compreensão da patogênese da leucemia linfoblástica aguda, à estratificação prognóstica e à identificação de marcadores de recaída (Xu et al., 2021). O desenvolvimento hematopoiético normal depende da rígida coordenação da metilação do DNA e modificações de histonas, que podem estar desregulados durante o desenvolvimento leucêmico (Nordlund; Syvänen, 2018).

A análise do metiloma em células leucêmicas revela um padrão recorrente de hipermetilação do DNA em ilhas CpG, sugerindo que alterações epigenéticas específicas estão associadas à leucemogênese. Além disso, diferentes assinaturas de metilação têm sido observadas entre os subtipos moleculares de LLA, reforçando o papel do componente epigenético como potencial biomarcador diagnóstico e prognóstico (Figueroa et al., 2013; Nordlund et al., 2013, 2015; Nordlund; Syvänen, 2018).

Estudos têm demonstrado que determinados perfis epigenéticos no momento do diagnóstico podem estar associados ao risco de recaída. Por exemplo, em LLA infantil com translocações  $t(4;11)$  e  $t(11;19)$  apresentam acentuada hipermetilação promotora, ao passo que casos com  $t(9;11)$  ou MLL do tipo selvagem exibiam perfis mais próximos à medula normal. Nesses casos, o grau de hipermetilação foi correlacionado à maior probabilidade de recidiva (Stumpel et al., 2009).

Além disso, a classificação epigenética baseada nos níveis de metilação de ilhas CpG tem se mostrado preditiva: pacientes com níveis baixos de metilação global apresentaram pior prognóstico e maior risco de recaída, independentemente da carga de doença residual mínima (MRD) (Borssén et al., 2016).

Alterações dinâmicas no padrão epigenético de histonas podem contribuir para a transformação maligna de precursores hematopoiéticos normais em células leucêmicas. No entanto, em comparação à metilação do DNA, as modificações químicas em histonas ainda são menos estudadas na LLA.

Modificações pós-traducionais de histonas estão envolvidas em processos fundamentais como transcrição gênica, remodelamento de cromatina e reparo do DNA e, potencialmente, no desenvolvimento da LLA (Janczar et al., 2017; Xu et al., 2021). Entre as KMTs mais frequentemente alteradas na LLA estão KMT2A, NSD2, SETD2 e KMT2D, cujas mutações pontuais, embora recorrentes, não definem subtipos específicos da doença. Por outro lado, a fusão do gene KMT2A, mais comumente com AF4 por meio da translocação  $t(4;11)(q21;q23)$ , caracteriza o subtipo MLL-rearranjado (MLL-r-ALL), um modelo evidente de leucemia impulsionada por desregulação epigenética (Andersson et al., 2015; Xu et al., 2021).

De acordo com Sonnemann et al. (2012), as células leucêmicas de pacientes com LLA apresentam aumento da atividade de HDACs, em comparação às células da medula óssea normal (Sonnemann et al., 2012). A acetiltransferase CREBBP tem como alvo o resíduo H3K18 e apresenta mutações ou deleções em aproximadamente 18% dos casos de LLA-B recidivada, com destaque para a LLA de alto grau de hiperdiploidia (Mar et al., 2014; Paulsson et al., 2015). Paralelamente, diversas HDACs (incluindo HDAC1, HDAC2, HDAC4 e HDAC11) estão altamente expressas em células leucêmicas em comparação à medula óssea normal, e sua expressão tem sido associada a fatores prognósticos desfavoráveis (Amin et al., 2023; Moreno et al., 2010; Stubbs et al., 2015).

No contexto da metilação de histonas, a enzima KMT2A atua como metiltransferase de H3K4, marca geralmente associada à ativação transcripcional (Meyer et al., 2023; Ogino; Dou, 2024). No entanto, estudos recentes sugerem que a metilação de H3K79, promovida por DOT1L, está mais fortemente associada ao perfil epigenético da LLA com rearranjo em KMT2A (Yi; Ge, 2022). A inibição farmacológica de DOT1L tem se mostrado capaz de suprimir a expressão de genes-alvo críticos da KMT2A-AF4 (Chen; Armstrong, 2015; Daigle et al., 2013). Outras KMTs envolvidas na patogênese da LLA incluem NSD2 e SETD2 (ambas H3K36-metiltransferases), sendo que mutações em SETD2 são observadas em até 12% dos casos de LLA-B, com maior frequência em subtipos como *MLL1*-re e *ETV6-RUNX1*, especialmente nos casos de recaída (Mar et al., 2014). Mutações no gene EZH2, associado à metilação de H3K27, são mais raras (cerca de 1,3%) e parecem estar enriquecidas em casos de LLA hipodiplóide (Mullighan et al., 2009; Schäfer et al., 2016).

Apesar de ser uma linha de investigação promissora, as variações no padrão de metilação entre pacientes, por si só, ainda não são suficientes para predizer de forma robusta os desfechos clínicos e a ocorrência de recaídas, sendo necessárias mais investigações (Gabriel et al., 2015).

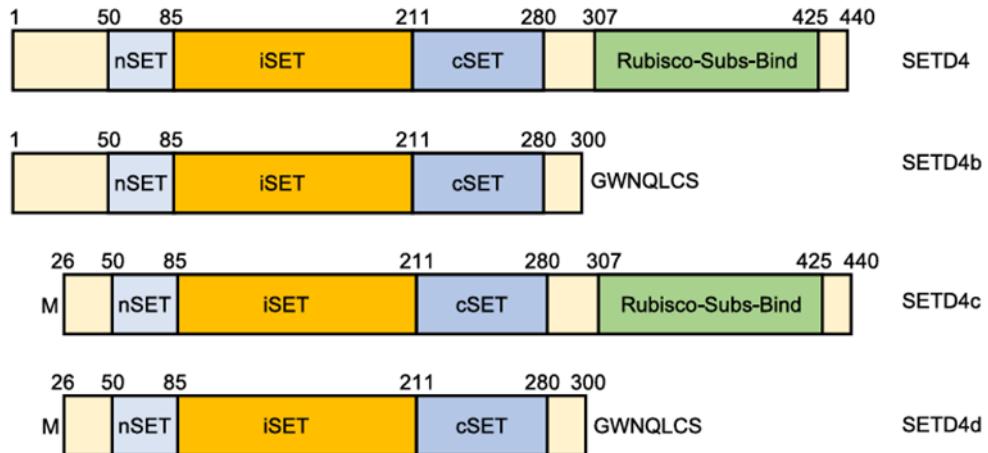
### 1.3 Metiltransferase SETD4

O gene *SETD4* codifica uma das 57 metiltransferases pertencentes à família Su(var)3–9–enhancer of zeste–trithorax (SET) e está localizado no cromossomo 21 (Petrossian; Clarke, 2011). O gene apresenta variantes transpcionais decorrentes de

*splicing* alternativo. A principal delas, correspondente ao transcrito variante 1 (GenBank: NM\_017438.5) codifica uma proteína de 440 aminoácidos. Devido ao *splicing* alternativo, outros quatro transcritos de *SETD4* foram descritos. Esses transcritos dão origem a três isoformas da proteína SETD4, todas contendo o domínio SET: a isoforma SETD4b, com 307 aminoácidos, codificada pelo transcrito variante 2 (GenBank: NM\_001007259.3); a isoforma SETD4c, com 416 aminoácidos, codificada pelo transcrito variante 3 (GenBank: NM\_001286752.2); e a isoforma SETD4d, com 283 aminoácidos, codificada pelo transcrito variante 5 (GenBank: NM\_001007261.3). Por outro lado, o transcrito variante 4 (GenBank: NR\_040087.3) é classificado como um RNA não codificante (Figura 2) (Wang; Shen, 2022).

A semelhança de SETD4 com as metiltransferases SETD3 e SETD6, aliada à sua conservação entre diferentes espécies, evidencia a importância de se investigar SETD4 em diversos contextos celulares (Wang et al., 2022; Wang; Shen, 2022). Além disso, a localização subcelular altamente variável de SETD4, observada tanto no núcleo quanto no citoplasma de células humanas e de *Artemia parthenogenetica*, devido à sua presença nuclear acentuada em células quiescentes (cancerígenas e não cancerígenas), bem como em células tumorais proliferativas, sugere uma diversidade funcional significativa atribuída à proteína (Dai et al., 2017; Wang et al., 2022; Xing et al., 2021; Ye et al., 2019).

Estudos demonstram que o gene *SETD4* atua na manutenção da quiescência celular e na regeneração tecidual, especialmente por meio da regulação de populações de células-tronco e progenitoras, aspecto relevante no contexto de câncer. A expressão de *SETD4* foi associada ao bloqueio do ciclo celular em modelos como os embriões em diapausa de *A. parthenogenetica* e células-tronco quiescentes em tecidos murinos, como pâncreas, endotélio vascular, coração e medula óssea (Dai et al., 2017; Feng et al., 2020; Liao et al., 2021; Tian et al., 2021; Xing et al., 2021). Ainda, a deleção de *Setd4* em camundongos demonstrou favorecer a recuperação do nicho hematopoiético após lesão induzida por radiação, indicando que SETD4 pode modular a resposta regenerativa em diferentes sistemas (Feng et al., 2020).



**Figura 2.** Representação das quatro isoformas de *SETD4*. Todas apresentam domínio SET e somente duas isoformas possuem o domínio Rubisco-Subs-Bind. Retirado de Wang e Shen (2022). O domínio SET é o domínio catalítico, enquanto que o domínio Rubisco-subs-bind permite a ligação entre a enzima e o substrato.

Apesar da ausência de avaliações sistemáticas ou proteômicas abrangentes, evidências pontuais têm identificado potenciais substratos de *SETD4* (Wang; Shen, 2022). Em diferentes modelos celulares, *SETD4* demonstrou atividade metiltransferase sobre a histona H4 na lisina 20 (H4K20me3), especialmente em células-tronco tumorais quiescentes de câncer de mama, sugerindo seu papel na manutenção da dormência celular (Dai et al., 2017). No entanto, esse efeito parece depender do tipo celular e do contexto biológico, já que em alguns modelos, como macrófagos derivados de medula óssea, a metilação de H4K20 não foi detectada. Além disso, estudos em células-tronco mesenquimais revelaram que *SETD4* pode catalisar mono- e dimetilações em outras histonas, como H3K4, H3K36 e H3K79 (Dai et al., 2017; Liao et al., 2021).

Mais recentemente, foi identificado um substrato não-histona de *SETD4*: a proteína KU70, que apresentou redução de metilação com o *knockout* de *SETD4*. A metilação de KU70 na lisina 570 promove sua dissociação de KU80 e translocação do núcleo ao citoplasma, onde atua como supressor da apoptose. Esse processo parece depender da metilação nuclear prévia de KU70, que permite sua posterior acetilação citoplasmática (Wang et al., 2022).

A crescente produção de evidências tem revelado que a atividade de SETD4 não se restringe à regulação da quiescência e regeneração tecidual em contextos fisiológicos. Em diversos tipos de câncer, SETD4 tem sido associado a fenótipos como proliferação celular exacerbada, resistência terapêutica e regulação tumoral, indicando seu possível papel oncogênico (Liao et al., 2021; Wang; Shen, 2022). Estudos iniciais relataram a associação entre a superexpressão de *SETD4* e o câncer de mama receptor de estrogênio-positivo, ainda que baseada em número limitado de linhagens celulares e amostras tumorais (Faria et al., 2013a). Além disso, experimentos *in vitro* identificaram que o silenciamento de *SETD4* aumenta a sensibilidade ao sorafenibe em células de carcinoma hepatocelular (Li et al., 2014).

Fusões envolvendo *SETD4* com parceiros gênicos como *TMPRSS2*, *ERG*, *FTCD*, *KIAA1958* e *B4GALT6* foram identificadas em tumores de próstata, mama, ovário e pulmão, reforçando seu potencial papel na instabilidade genômica associada à tumorigênese (Wang; Shen, 2022). No plano funcional, SETD4 também atua como regulador de vias críticas para o desenvolvimento tumoral, incluindo as vias do *checkpoint G2/M*, do fuso mitótico, da quiescência celular e da evasão imune (Zhong et al., 2025). Adicionalmente, a metilação da proteína KU70 por SETD4 promove sua translocação ao citoplasma e confere resistência à apoptose, favorecendo a sobrevivência de células tumorais (Wang et al., 2022).

Dados públicos dos consórcios TCGA e GTEx revelam que *SETD4* encontra-se superexpresso em diversos tipos de câncer, incluindo carcinoma de bexiga (BLCA), adenocarcinoma de cólon (COAD), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSC) e adenocarcinoma gástrico (STAD) (Zhong et al., 2025). Contudo, o impacto dessa superexpressão no comportamento tumoral é heterogêneo e parece ser dependente do contexto celular. Níveis elevados de *SETD4* estão associados a pior prognóstico em neoplasias como carcinoma adrenocortical (ACC), hepatocelular (LIHC), renal de células claras (KIRC) e melanoma uveal (UVM). Em contraste, em tumores como o câncer retal (READ) e o adenocarcinoma de próstata, a superexpressão de *SETD4* tem sido relacionada a desfechos clínicos mais favoráveis (Wang et al., 2023; Zhong et al., 2025).

Dessa forma, o aprofundamento das investigações por meio da modulação da expressão de *SETD4* é essencial para avaliar seus efeitos biológicos e compreender

seu papel funcional no contexto neoplásico, bem como para determinar criteriosamente o potencial de *SETD4* como biomarcador diagnóstico e prognóstico, além de sua viabilidade como alvo terapêutico promissor no tratamento do câncer.

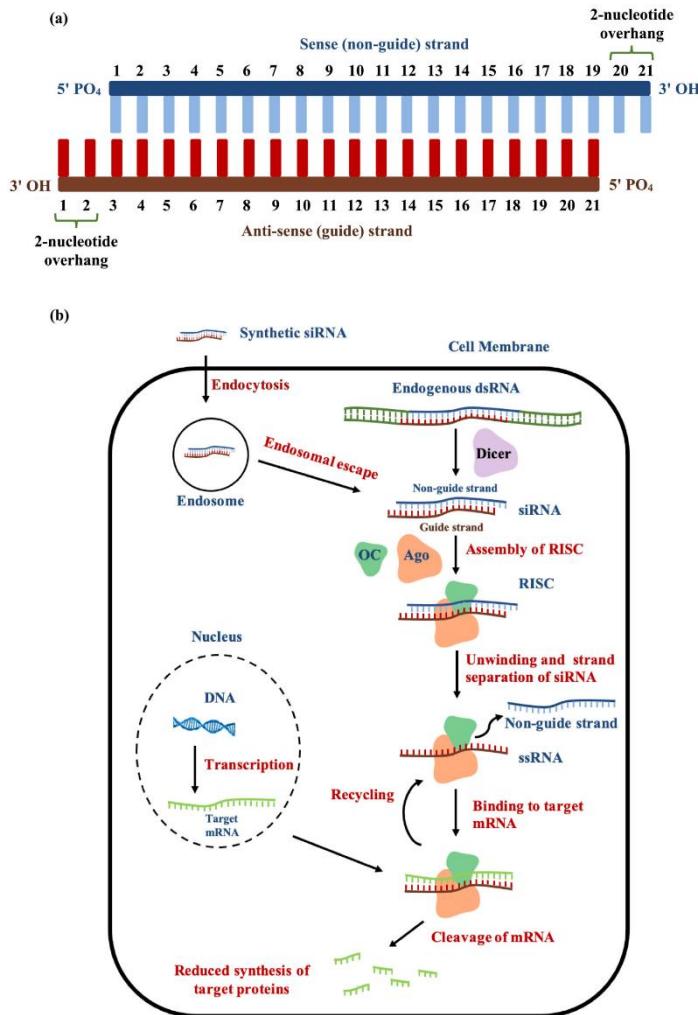
#### 1.4 Modulação da Expressão Gênica por Técnicas de Interferência Molecular

As neoplasias resultam da desregulação de múltiplas vias e processos biológicos, frequentemente desencadeadas por alterações em genes específicos (Hanahan, 2022). Neste contexto, a capacidade de silenciar ou editar genes de maneira precisa e controlada permite investigar essas alterações e seus efeitos funcionais de forma mais rigorosa e menos especulativa (Sánchez-Rivera; Jacks, 2015a).

As duas principais técnicas utilizadas atualmente são as baseadas em small interfering RNA (siRNA) e no sistema CRISPR/Cas9 (Boettcher; McManus, 2015). A primeira promove o silenciamento gênico transitório por meio da degradação de mRNA, enquanto a segunda permite deleções, inserções e substituições permanentes no genoma através da indução de mutações em sequências-alvo específicas (Doudna, 2020). Ambas as abordagens têm sido amplamente empregadas em estudos funcionais para elucidar o papel de genes específicos em processos patológicos e identificar novos alvos terapêuticos.

##### 1.4.1 *Small interfering RNA (siRNA)*

O siRNA é uma classe de moléculas de RNA dupla-fita com aproximadamente 20 a 25 nucleotídeos, capaz de promover a regulação gênica pós-transcricional. Trata-se de uma tecnologia baseada em um mecanismo natural de defesa constituído por RNA de interferência (RNAi) (Setten; Rossi; Han, 2019). O siRNA é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) e sua fita antissenso do siRNA guia o complexo até o mRNA por meio de pareamento de bases complementares (Snead et al., 2013). Esse reconhecimento resulta na degradação do mRNA pela proteína Argonauta-2 e no silenciamento transiente (Figura 3) (Hu et al., 2020).



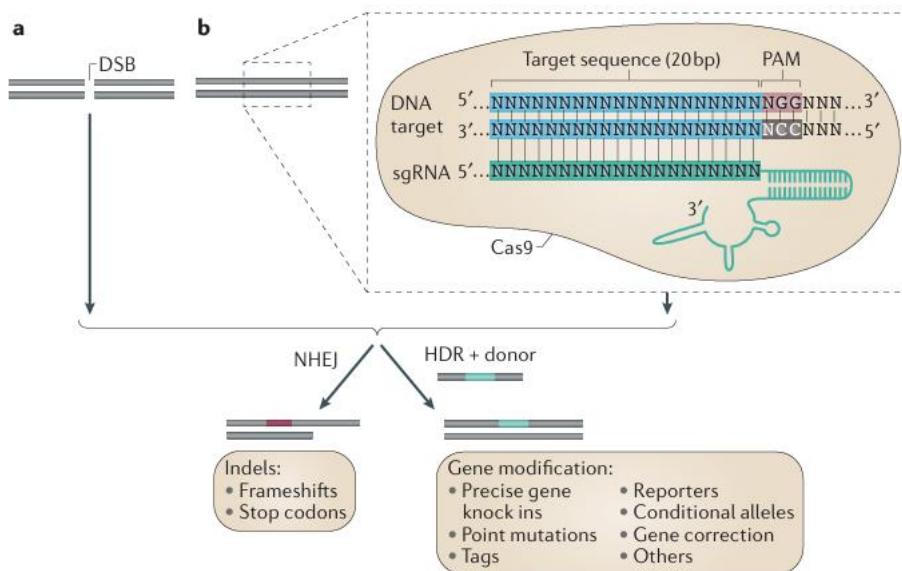
**Figura 3.** Mecanismo de ação de siRNA. Retirado de Ranasinghe et al. (2023).

#### 1.4.2 CRISPR/Cas9

O sistema CRISPR/Cas9 deriva de um processo imune adaptativo presente em bactérias e arqueas, cuja função é reconhecer e degradar material genético exógeno. A tecnologia se baseia em dois componentes: a proteína Cas9, endonuclease com capacidade de clivar DNA dupla-fita e um RNA-guia (gRNA), que possui cerca de 20 nucleotídeos e direciona a Cas9 para o sítio de clivagem através da complementariedade de bases (Doudna; Charpentier, 2014).

Uma vez que a Riboproteína reconhece o motivo PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), NGG para Cas9 de *S. pyogenes*, ocorre o pareamento do gRNA com o DNA alvo e a quebra de dupla-fita através dos domínios catalíticos RuvC e HNH. A quebra é seguida pelo mecanismo endógeno de reparo da célula, predominantemente por meio de união de extremidades não homólogas (NHEJ), que frequentemente resulta

em mutações de inativação gênica, ou menos frequente pelo reparo dirigido por homologia (HDR) na presença de um DNA alvo com extremidades homólogas às regiões flanqueadoras ao sítio de clivagem (Figura 4) (Wang; La Russa; Qi, 2016).



**Figura 4.** Mecanismo clássico de CRISPR/Cas9 para edição do tipo *knockout*. Figura retirada de (Sánchez-Rivera; Jacks, 2015)..

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços significativos no tratamento de LLA nas últimas décadas e das elevadas taxas de remissão alcançadas, a doença permanece como uma importante causa de morte entre crianças e adolescentes. Nesse contexto, a expressão aumentada de *SETD4* em LLA e sua correlação negativa com a sobrevida reforçam a importância de investigar o papel funcional desse gene na neoplasia.

O desenvolvimento de modelos celulares com baixa e alta expressão de *SETD4* possibilita a investigação precisa do papel dessa enzima na leucemogênese, contribuindo para a elucidação de seus mecanismos moleculares e sua relevância biológica. Este enfoque pode fornecer subsídios importantes para a identificação de potenciais biomarcadores terapêuticos e prognósticos, oferecendo uma base sólida para futuras estratégias de intervenção na LLA-B pediátrica.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar a expressão e a funcionalidade de *SETD4* na LLA por meio de análises *in silico* e de modelos celulares com diferentes níveis de expressão do gene.

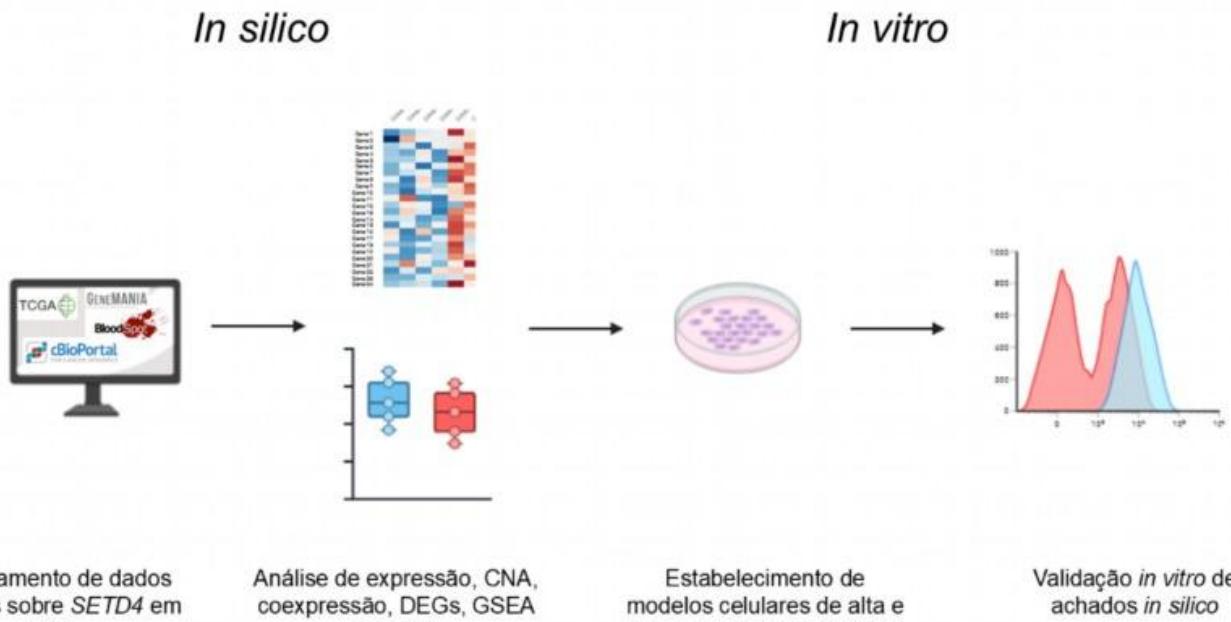
#### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar análises *in silico* dos níveis de expressão de *SETD4*, alterações no número de cópias gênicas, correlações com outros genes e enriquecimento de vias biológicas associadas.
- Avaliar a proliferação celular em modelos de LLA com expressão alta e baixa de *SETD4*.
- Investigar a resposta ao tratamento com metotrexato em modelos de LLA com diferentes níveis de expressão de *SETD4*.

### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 Delineamento experimental

Para facilitar a compreensão das próximas seções, a Figura 5 apresenta um resumo do delineamento experimental utilizado neste trabalho. De forma geral, o estudo foi conduzido em duas etapas: (i) uma etapa *in silico*, com o objetivo de analisar



a distribuição de *SETD4* em amostras leucêmicas e identificar sua relevância biológica e vias enriquecidas; e (ii) uma etapa experimental, em que foram gerados modelos celulares com alta e baixa expressão de *SETD4*, possibilitando a validação *in vitro* dos achados *in silico*.

**Figura 5.** Resumo do delineamento experimental dividido em duas partes: *in silico* e *in vitro*.

## 4.2 Análise bioinformática exploratória em banco de dados públicos

### 4.2.1 Expressão gênica de *SETD4* em leucemia linfooblástica aguda utilizando dados do banco BloodSpot

Os dados de expressão gênica de *SETD4* foram obtidos a partir do estudo “Leukemia MILE” (Microarray Innovations in Leukemia, GSE13159), disponível na base de dados BloodSpot (<https://www.fobinf.com/>). As expressões foram registradas como valores de intensidade em escala logarítmica ( $\log_2$ ), referentes a dois conjuntos de sondas da plataforma Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array: 219482\_at e 213989\_x\_at. O conjunto de dados incluiu amostras de medula óssea não neoplásicas, bem como amostras de leucemia linfooblástica aguda (LLA), estratificadas de acordo com a linhagem celular: LLA-B LLA-T e por subtipo citogenético t(12;21) e t(1;19).

A normalidade das distribuições foi avaliada previamente à aplicação dos testes de hipótese. Para os grupos com distribuição normal, utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via. Nos casos em que a distribuição não foi normal, aplicou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Para todas as análises adotou-se o nível de 5% ( $p < 0,05$ ) como critério de significância estatística.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad prism 8.0.

### 4.2.2 Número de cópias alteradas (CNA)

As análises de número de cópias alteradas (Copy Number Alterations – CNA) foram realizadas a partir dos dados do estudo TARGET (2018), disponibilizados pela plataforma cBioPortal (<https://www.cbioportal.org>), que apresenta amostras enriquecidas para recaída. Foram selecionadas as amostras de leucemia linfoblástica aguda (LLA) tipo B, contemplando os valores de CNA processados com base no algoritmo GISTIC e os níveis de expressão de mRNA correspondentes (Mermel et al., 2011).

Para investigar a correspondência entre alterações genômicas e expressão gênica, os valores de CNA foram correlacionados com os níveis de mRNA para os genes de interesse. A associação foi testada por meio do coeficiente de correlação de Spearman.

As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas no software Prism GraphPad prism 8.0, adotando-se nível de significância de  $p < 0,05$ .

#### *4.2.3 Rede de coexpressão de SETD4*

Para explorar potenciais interações moleculares de *SETD4*, foi realizada uma triagem inicial no banco GeneMANIA (<https://genemania.org/>), a partir da qual foram selecionados 10 genes com maior grau de coexpressão com *SETD4*. Em seguida, examinou-se o padrão de coexpressão entre *SETD4* e esses genes em amostras do estudo Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments for Acute Lymphoblastic Leukemia - Phase 2 (TARGET-ALL-Phase II), empregando o teste de Spearman para mensurar a força das correlações.

#### *4.2.4 Enriquecimento gênico de vias e assinaturas genéticas*

As amostras selecionadas para a análise de enriquecimento gênico foram obtidas do estudo TARGET-ALL-Phase II, publicizadas no banco de dados The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) e estão disponíveis para consulta no portal <https://www.cancer.gov/tcga>. Os dados de RNA-seq disponíveis foram obtidos por meio da plataforma Illumina com pipeline STAR Gene Counts.

Foram selecionadas amostras de medula óssea leucêmica de 43 pacientes que atenderam aos critérios de doença primária leucemia linfoblástica aguda (CID 10 – C91.0). Para pacientes com múltiplas amostras (porções A e B), foi selecionada

apenas a porção A. Para pacientes com apenas uma amostra, esta foi incluída independentemente da porção. A expressão de *SETD4* foi normalizada e quantificada em TPM (Transcripts Per Million).

Os pacientes foram classificados em grupos baseados nos quartis de expressão de *SETD4*: grupo baixo (Q1): 25% dos pacientes com menor expressão (n=12), grupo médio (Q2-Q3): 50% dos pacientes com expressão intermediária (excluídos da análise diferencial) e grupo alto (Q4): 25% dos pacientes com maior expressão (n=11). Apenas os grupos extremos (Q1 e Q4) foram utilizados para as análises subsequentes.

A análise de expressão diferencial foi conduzida com o DESeq2, comparando os grupos *SETD4* alto e baixo. Genes com FDR < 0,05 foram considerados diferencialmente expressos. A GSEA, realizada com o fgsea, utilizou os conjuntos de genes Hallmark (MSigDB). Vias com FDR < 0,05 foram consideradas significativas, com NES > 0 indicando enriquecimento em *SETD4* alto e NES < 0 em *SETD4* baixo.

Em seguida, para identificar as assinaturas moleculares significativamente super-representadas, realizamos a Análise de Enriquecimento por Super-Representação (ORA). O pacote clusterProfiler (R) foi utilizado para esta análise. A lista de genes de interesse foi composta pelos genes que apresentaram expressão diferencial significativa e estavam downregulados no grupo *SETD4* Alto (P ajustado < 0,05). O ORA foi executado para análise de assinaturas de câncer da coleção Hallmark (H) do MSigDB.

#### 4.2.5 Curva de sobrevida global

A associação entre a expressão de *SETD4* e a sobrevida de pacientes com LLA-B (n=43) do estudo TARGET-ALL Phase II foi avaliada pela divisão dos pacientes em quartis de expressão de *SETD4*, sendo o primeiro quartil (n=11) correspondente aos indivíduos com alta expressão e o último quartil (n=12) aos indivíduos com baixa expressão do gene.

A análise de sobrevida foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 8.0. Para cada grupo, foram construídas curvas de Kaplan-Meier considerando o tempo de seguimento em dias e a ocorrência de óbito como evento. A comparação entre os

grupos foi realizada pelo teste Log-rank (Mantel-Cox), e o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

#### 4.3 Cultivo Celular

As linhagens celulares de LLA-B REH, RS4;11, Nalm-6 e 697 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute; Gibco), preparado com bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina; Gibco). As células foram mantidas em meio RPMI completo, a 37 °C, em estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> e o meio foi trocado conforme a necessidade.

#### 4.4 Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi realizada utilizando um protocolo alternativo baseado em Proteinase K (New England Biolabs, #P81025). Inicialmente, os pellets celulares foram ressuspensos em 50 µL de água Milli-Q livre de nucleases e submetidos a aquecimento a 95 °C por 10 minutos, com o objetivo de promover a lise celular inicial. Em seguida, as amostras foram rapidamente resfriadas a –80 °C por 20 minutos, e posteriormente descongeladas à temperatura ambiente. Após esse processo, foram adicionados 30 µg de Proteinase K por amostra, com incubação a 56 °C por 30 minutos para digestão de proteínas. A inativação da enzima foi realizada com novo aquecimento a 95 °C por 10 minutos. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g por 1 minuto, e o sobrenadante contendo o DNA foi cuidadosamente coletado. O material extraído foi armazenado a –20 °C até sua utilização.

#### 4.5 Extração de RNA e síntese de cDNA

A obtenção do RNA total das linhagens celulares foi realizada utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), conforme as especificações do fabricante. Inicialmente, o TRIzol foi adicionado diretamente às células para promover a lise e, em seguida, foi acrescentado clorofórmio para permitir a separação das fases. A fração aquosa, rica em RNA, foi cuidadosamente coletada e submetida à precipitação com isopropanol absoluto. O precipitado formado foi lavado com etanol a 75%, seco e posteriormente

dissolvido em água isenta de RNase. As amostras foram armazenadas em –80 °C até a realização das análises.

A qualidade e integridade do RNA extraído foram avaliadas por dois métodos complementares: eletroforese em gel de agarose a 1%, observando-se a presença das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal, ou por meio de análise automatizada no equipamento Agilent TapeStation. Apenas os extratos considerados íntegros por pelo menos um dos métodos foram utilizados nas etapas subsequentes.

Para eliminar possíveis traços de DNA genômico, o RNA foi tratado com o kit DNase I (Sigma-Aldrich), conforme o protocolo recomendado. A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA tratado, utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

#### 4.6 PCR convencional e PCR quantitativa (qPCR)

A PCR convencional foi realizada com 50-100 ng/µL de DNA genômico, com o kit GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase (Promega). As reações foram conduzidas em termociclador, seguindo o seguinte programa: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 ou 60 °C por 30 segundos, e extensão a 72 °C por 30 segundos. Ao final dos ciclos, foi realizada uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, sob uma voltagem de 100 V, para visualização dos fragmentos de interesse. Essa PCR teve como finalidade confirmar a presença do genes Cas9 nas linhagens celulares selecionadas para as etapas subsequentes do estudo. Ainda, foi utilizada para amplificar a região de *SETD4* para identificação de mutações geradas pelo sistema de CRISPR/Cas9 (Tabela 1).

Para os ensaios de qPCR, foi utilizado o kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) em conjunto com o equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O cDNA, previamente obtido das linhagens celulares REH, RS4;11, Nalm-6 e 697, foi distribuído em triplicata em placas de 96 poços, com 1 µL de amostra diluída em 9 µL da mistura de reação (*Master Mix*) por poço. A expressão do gene *SETD4* (Invitrogen) foi avaliada e analisada relativamente a expressão dos genes de referência *ACTB*, *B2M* e *TBP*, conforme indicado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Sequências dos primers.

<b>Gene</b>	<b>Sequência</b>	<b>Orientação</b>	<b>Aplicação</b>
<i>ACTB</i>	5`-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3`	Forward	PCR e qPCR
	5`-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3`	Reverse	
<i>B2M</i>	5`-TGCTGTCTCCATGTTGATGTATCT-3`	Forward	PCR e qPCR
	5`-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3`	Reverse	
<i>Cas9</i>	5`-CTGCAGACAGTGAAGGTGGT-3`	Forward	PCR e qPCR
	5`-TCGGCCTTGGTCAGATTGTC-3`	Reverse	
<i>SETD4</i>	5`-GCTGAGGCACGAGAATCACT-3`	Forward	PCR
	5`-TGTCAGCATGTTCCACCACT-3`	Reverse	
<i>SETD4</i>	5`-TCACCACGGACACAGTGATT-3`	Forward	qPCR
	5`-TTGGGAAGAAGGTTCACCAAC-3`	Reverse	
<i>TBP</i>	5`-TGACACTGGAAAACAATGCA-3`	Forward	PCR e qPCR
	5`-GGTCCTTTCACCAAGCAAGCT-3`	Reverse	

Ensaios de eficiência foram realizados por meio de curvas de diluição seriada (1:2 a 1:64), atendendo aos critérios estabelecidos pelas diretrizes MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*), com eficiências aceitáveis entre 90% e 110% (Bustin et al., 2009). A diluição de 1:8, que apresentou melhor desempenho dentro desse intervalo, foi utilizada para os experimentos de quantificação da expressão gênica.

A quantificação relativa da expressão do mRNA do gene *SETD4* nas quatro linhagens celulares foi realizada utilizando o método comparativo  $\Delta\Delta CT$ . Inicialmente, os valores de CT obtidos para o gene alvo em cada amostra foram normalizados em relação à média dos valores de CT dos genes endógenos, resultando nos respectivos  $\Delta CTs$ . Em seguida, os valores de  $\Delta\Delta CT$  foram calculados a partir da comparação entre os  $\Delta CTs$  das amostras e o  $\Delta CT$  da amostra de referência.

Como estratégia de normalização, foram utilizados dois genes constitutivos: TBP e B2M. A média geométrica dos valores de CT desses dois genes foi empregada para garantir maior robustez na correção da variabilidade entre as amostras. A expressão relativa do gene alvo foi então determinada com base no cálculo de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os resultados foram organizados e analisados utilizando o software GraphPad Prism 8.0.

#### 4.7 Estabelecimento de Linhagens de LLA com expressão estável e endógena de Cas9

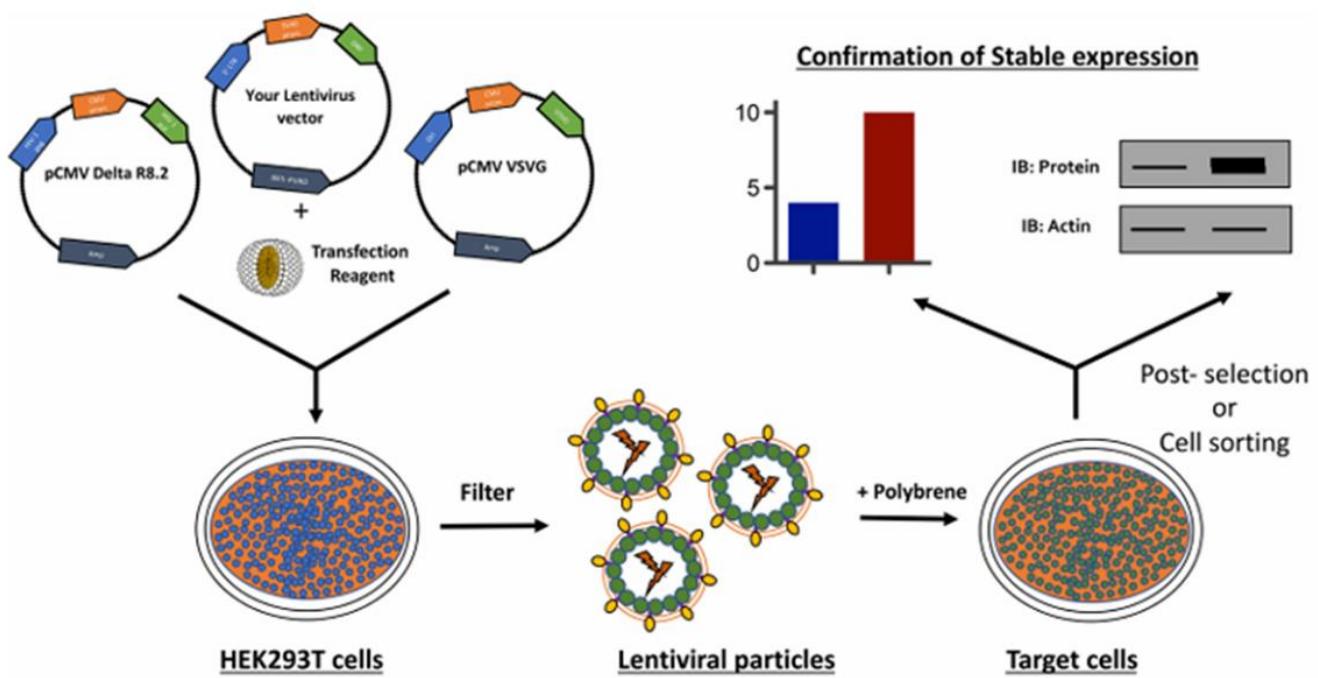
##### 4.7.1 *Produção de Lentivírus*

Para garantir a expressão estável da endonuclease Cas9 na linhagem celular selecionada, foi empregado um sistema de transdução lentiviral, utilizando plasmídeos já padronizados e previamente disponíveis no Laboratório de Patologia Molecular do Câncer, com base em protocolos estabelecidos.

A produção dos lentivírus foi realizada por meio da cotransfecção de três plasmídeos em células HEK293T:

1. Plasmídeo de transferência contendo o gene Cas9, responsável por sua integração no genoma da célula-alvo;
2. Plasmídeo pCMV-ΔR8.2, que fornece os elementos necessários para o empacotamento do vírus;
3. Plasmídeo pCMV-VSVG, responsável pela expressão da glicoproteína de envelope viral.

Os três plasmídeos, em proporções equimolares, foram combinados e diluídos em meio Opti-MEM (Invitrogen), seguidos da adição de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Após incubação por 20 minutos à temperatura ambiente, a mistura foi aplicada às células HEK293T, com incubação de 4 a 6 horas (Figura 6). Ao final desse período, o meio contendo os reagentes de transfecção foi descartado, sendo substituído por DMEM completo. O sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado em intervalos de 24, 48 e 72 horas, e os vírus foram concentrados utilizando o protocolo do kit *4×Lentivirus Concentrator Solution*. O produto foi armazenado a –80 °C até sua

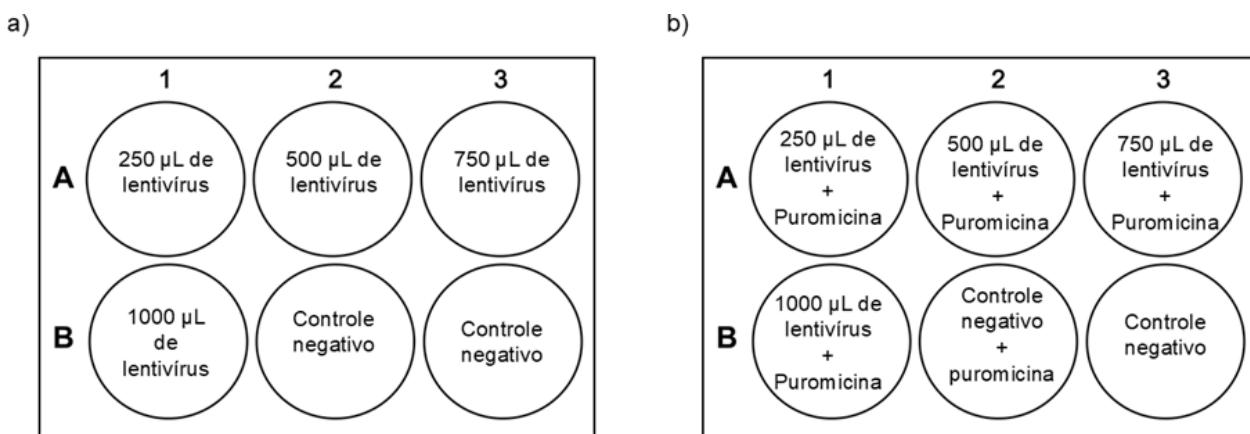


utilização.

**Figura 6.** Representação esquemática da geração de linhagens de mamífero com expressão estável de Cas9 utilizando lentivírus. Retirado de Tandon et al. (2018).

#### 4.7.2 Transdução lentiviral e seleção

A etapa de transdução lentiviral foi realizada com o objetivo de gerar populações celulares estáveis com expressão da endonuclease Cas9. Para isso, o concentrado viral foi diluído em diferentes proporções em meio de cultura completo suplementado com polibreno (final de 8 µg/mL) a fim de determinar a diluição com maior eficiência de infecção. Em cada poço de uma placa de 6 poços, foram adicionados 1 mL da diluição viral e 300.000 células em suspensão, completando o volume com meio RPMI completo. Dois poços foram mantidos como controle negativo, sem adição de vírus; um deles foi posteriormente exposto ao antibiótico para validação da eficiência do processo de seleção (Figura 7 a).



**Figura 7.** Esquema experimental do ensaio de transdução lentiviral realizado em placa de 6 poços. (a) Células plaqueadas com diferentes diluições do concentrado viral. (b) Células transduzidas e controles submetidos à seleção com puromicina após 48 h. Figura elaborada pelo autor.

As células foram incubadas por 48 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o meio foi substituído por meio fresco contendo puromicina, iniciando-se a eliminação das células não transduzidas. O processo foi monitorado diariamente, garantindo que os poços controle com antibiótico apresentassem morte celular progressiva. A troca do meio contendo antibiótico foi realizada a cada 2 ou 3 dias, assegurando a manutenção da concentração eficaz. A puromicina (Sigma, código P7255) foi utilizada como agente seletivo, na concentração de 1 µg/mL, definida previamente em curvas de toxicidade (Figura 7 b).

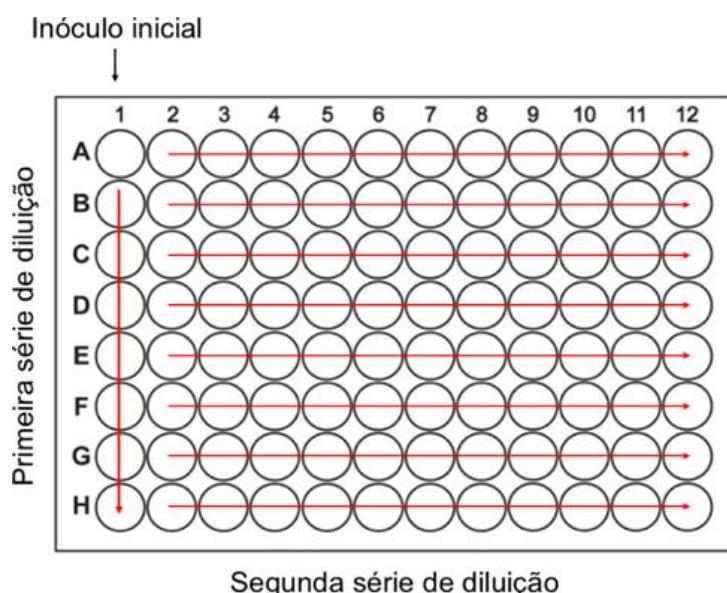
A seleção foi considerada completa quando as células dos poços controle foram eliminadas por completo. As populações transduzidas sobrevidentes foram então

expandidas, e a população com maior expressão de Cas9 foi selecionada para subsequente isolamento de clones monoclonais.

#### 4.7.3 Isolamento Clonal

Para o isolamento de populações monoclonais a partir das células transduzidas, foi adotado um método baseado em diluição seriada dupla, com o objetivo de individualizar células em poços de uma placa de 96 poços. O processo teve início com a semeadura de aproximadamente  $4 \times 10^3$  células no poço A1, seguida por diluições sucessivas na orientação vertical e, posteriormente, horizontal, utilizando uma proporção de 1:2 em cada etapa. Essa estratégia favorece a obtenção de cerca de dez clones únicos por placa, conforme previamente observado em protocolos similares (Figura 8). A expressão estável da Cas9 nos clones isolados foi inicialmente verificada por PCR convencional e, posteriormente, confirmada por western blot, garantindo a seleção de clones com integração funcional do gene.

Durante esse processo, recomenda-se o uso de meio condicionado, proveniente de culturas com 50 a 60% de confluência, pois esse meio contém fatores tróficos importantes que favorecem a sobrevivência e proliferação de células clonais isoladas. Após coleta, o meio deve ser filtrado com membrana PES de 0,45 µm para remoção de resíduos celulares. Esse meio condicionado pode ser diluído em meio completo



fresco na proporção de 1:1, com concentração final de 20% de soro fetal bovino (SFB), proporcionando um ambiente mais favorável para o crescimento das células recém-plaqueadas.

**Figura 8.** Ilustração da organização da placa de 96 poços utilizada no procedimento de diluição em matriz seriada. Figura elaborada pelo autor.

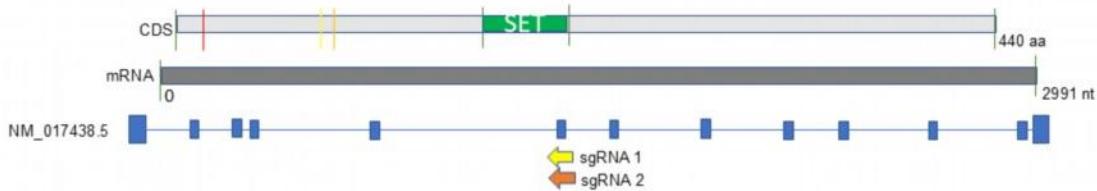
#### 4.8 Desenho de RNA guia (sgRNA)

Os sgRNAs foram desenhados com auxílio da plataforma CHOP-CHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>), priorizando guias com alta eficiência de corte e baixa probabilidade de efeitos off-target (Labun et al., 2019). Os critérios utilizados para seleção incluíram: alta pontuação de eficiência (score preditivo), ausência de regiões repetitivas, localização em regiões conservadas e proximidade do início do gene (região 5'), com o objetivo de maximizar a chance de *knockout* completo. Dois sgRNAs distintos, direcionados ao exon 6 do gene, foram selecionados com o objetivo de maximizar a eficiência do corte e garantir a interrupção da sequência codificadora (Tabela 2; Figura 9). Ambos foram validados quanto à especificidade por meio das ferramentas *IDT CRISPR-Cas9 Guide RNA Design Checker* (<https://www.idtdna.com>) e *Tefor Infrastructure* (<https://crispor.tefor.net/>), que permitiram a exclusão de guias com potenciais sítios off-target relevantes.

Para os experimentos, foi adotado o sistema de RNA guia em duas partes, utilizando crRNAs sintéticos específicos e tracrRNAs conjugados a um fluoróforo com emissão em 488 nm, ambos adquiridos da Integrated DNA Technologies (IDT). A marcação fluorescente do tracrRNA permitiu o rastreamento das células transfectadas por citometria de fluxo ou análise óptica, facilitando a triagem das populações editadas. A formação do duplex funcional crRNA:tracrRNA foi realizada por hibridização térmica, com diluição e mistura dos RNAs, aquecimento a 95 °C por 2 minutos e resfriamento à temperatura ambiente.

**Tabela 2.** Sequência de sgRNA utilizadas para transfecção em células Cas9 estáveis.

Sequência	Localização	Orientação	GC(%)
5`-AGTGATTGAAAGCTACTTAG-3`	chr21:36048321	Negativa	40
5`-TACAGTGATTGAAAGCTACTT-3`	chr21:36048323	Negativa	40



**Figura 9.** Ilustração esquemática do gene *SETD4* evidenciando os locais de ligação das guias CRISPR/Cas9 desenhadas para promover a deleção gênica, posicionadas no exon 6.

#### 4.9 Transfecção do sgRNA

A introdução dos sgRNAs específicos para o gene *SETD4* foi realizada por meio de transfecção lipídica, utilizando linhagens previamente modificadas para expressão estável da endonuclease Cas9. A transfecção foi conduzida conforme as instruções do protocolo do fabricante específico para transfecção de células Cas9-estáveis com TrueGuide™ Synthetic gRNA, utilizando o reagente Lipofectamine™ RNAiMAX™ (Invitrogen) em placas de 6 poços

Após a transfecção, foram implementadas duas abordagens complementares para o isolamento clonal de células editadas. Inicialmente, foi utilizado o protocolo de diluição seriada em placas de 96 poços, conforme descrito e esquematizado na Figura 8, visando o isolamento de células únicas. Alternativamente, foi empregado o sistema automatizado Hana™ Single Cell Dispenser (Bio-Techne®), que permite a deposição de células individuais por poço, otimizando a obtenção de clones monoclonais. Ambas as estratégias possibilitaram a seleção de clones independentes, que posteriormente foram submetidos à triagem para confirmação da edição do alvo.

#### 4.10 Sequenciamento Sanger

A confirmação do *knockout* gênico de *SETD4* foi realizada por meio de sequenciamento Sanger. Primeiro, o DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo alternativo previamente descrito e foi realizada PCR convencional (sequência dos primers na Tabela 2). Os primers específicos para sequenciamento da região alvo encontram-se listados na Tabela 3. Em determinados casos, os produtos amplificados foram submetidos à purificação a partir de gel de agarose, empregando o kit GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich), conforme as orientações do fabricante.

**Tabela 3.** Sequência de primers para sequenciamento Sanger.

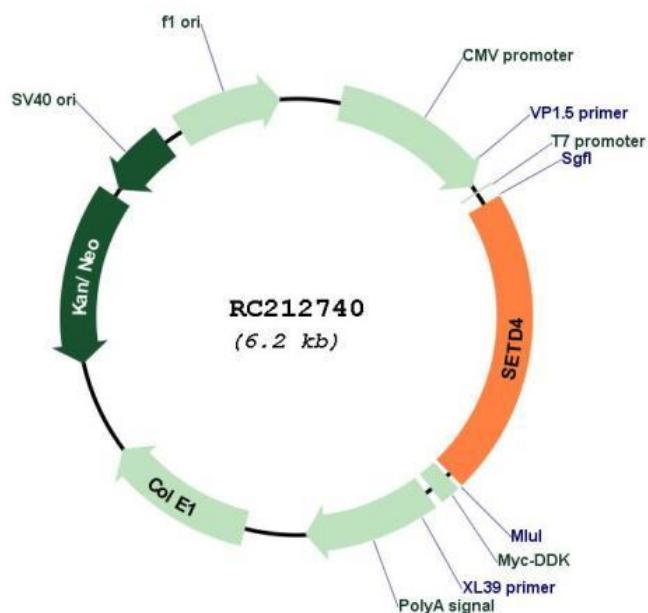
Gene	Sequência	Orientação
SETD4	5'-GGAGGGAGGGCAAACCTTCT-3'	Forward
SETD4	5'-GGCTCATTGGTGGCTTTGG-3'	Reverse

Os fragmentos obtidos foram enviados para prestadores de serviço de sequenciamento Sanger, e os dados brutos gerados foram analisados utilizando o software Geneious Prime, o que permitiu avaliar a presença de inserções, deleções ou mutações pontuais decorrentes da edição gênica. Todos os oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento foram sintetizados pela empresa Exxtend.

#### 4.11 Eletroporação de siRNA e vetor de superexpressão

Com o objetivo de gerar o silenciamento de *SETD4*, foram utilizadas as sequências 5'- GGA AUA CGG AUU UGU UU dTdT CU-3' (fita sense) e 5'-AAA CAA AUC CGU AUU CCdTdT-3' (fita antisense).

Para a superexpressão, foi utilizado o plasmídeo *SETD4* (NM\_017438) Human Tagged ORF Clone (Origene® RC212740) (Figura 10).



**Figura 10.** Vetor de expressão da variante 1 de *SETD4*. Retirado de OriGene (<https://www.origene.com/rc212740-setd4-nm-017438-human-tagged-orf-clone>).

As sequências foram introduzidas nas linhagens celulares por meio de eletroporação, utilizando o tampão 1SM, previamente descrito (Chicaybam et al., 2017). Para os ensaios,  $1 \times 10^6$  células foram ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  do tampão e transferidas para cubetas estéreis de 0,2 cm (Sigma-Aldrich® electroporation cuvettes). A eletroporação foi realizada imediatamente no sistema Nucleofector® II (Lonza®), utilizando o programa X-001. Foram utilizados 50nM de siRNA e 1ug do vetor de expressão.

Após a eletroporação, as células foram imediatamente ressuspensas em 2 mL de meio RPMI pré-aquecido, suplementado com 10% de SFB e cultivadas em placas de 6 poços nas condições estabelecidas para cultivo. A expressão de *SETD4* foi avaliada por meio de RT-qPCR em 24h e 48h.

#### 4.12 Western blot

Para a extração de proteína, as células foram lisadas com tampão RIPA suplementado com inibidores de protease, visando preservar a integridade das amostras. Para cada poço de gel, foram utilizados 35  $\mu\text{g}$  de proteína total.

Os extratos proteicos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), utilizando um gel composto por uma fase concentradora a 4% e uma fase separadora a 10%, operando sob voltagem constante de 110 V. Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (0,22  $\mu\text{m}$ ) por meio do método de transferência úmida (*wet transfer*), conduzido a 24 V *overnight*.

Concluída a transferência, a membrana foi bloqueada em PBST contendo 5% de leite desnatado em pó, para prevenir ligações inespecíficas. Em seguida, foram realizadas lavagens com PBST e a membrana foi incubada *overnight* à 4°C sob agitação com os anticorpos primários: anti-FLAG monoclonal M2 (Merk, F1804-200G), anti SETD4 (Santa Cruz Biotechnology, sc-83750) e anti- $\beta$ -actina (Abcam, clone AC-15), todos diluídos na proporção de 1:500, 1:500 e 1:1.000, respectivamente.

Após lavagens com PBST, foi feita a incubação com o anticorpo secundário anti-mouse conjugado à HRP, diluído na solução bloqueadora a 2%. As diluições utilizadas foram 1:10.000 para detecção do epítopo FLAG e SETD4 e 1:15.000 para β-actina, com incubação por 1 hora à temperatura ambiente.

A revelação das bandas foi realizada por quimioluminescência, utilizando o reagente Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore), e as imagens foram capturadas com o sistema Amersham™ Imager 600 (GE Life Sciences).

#### 4.13 Ensaio de proliferação celular

A taxa de proliferação celular após o silenciamento e superexpressão de *SETD4* foi avaliada por meio do kit CellTrace™ CFSE Cell Proliferation (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante, ligeiramente adaptadas para as condições laboratoriais.

Brevemente, as células tratadas ( $10^6$ ) foram ressuspensas em 1 mL de PBS e incubadas em 4µM de CFSE à 37 °C, por 10 minutos, protegidas da luz. Em seguida, foram adicionados 5 mL de meio de cultivo completo, e as células foram incubadas por 5 minutos nas condições anteriores.

Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBS, plaqueadas e cultivadas em meio completo à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24h, 48h e 72h. Ao final de cada tempo, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho BD LSRIFortessa™ Cell Analyzer.

O experimento foi realizado em triplicata técnica. As análises de dados e geração de gráficos foram feitas nos programas FlowJo™ V.10.9 e GraphPad Prism 8.0.

#### 4.14 MTT

A sensibilidade ao metotrexato (MTX) das linhagens com alta e baixa expressão de *SETD4* foi avaliada pelo ensaio de MTT. Primeiramente, 40 mil células transfectadas e seus controles foram semeadas em placas de 96 poços em 100 µL de meio completo com 20 nM, 60 nM, e 100 nM de MTX diluído em NaOH. As células foram incubadas por 48h.

Ao término do período de tratamento, foram adicionados 10 µL de solução de MTT (5mg/mL) em cada poço e as placas foram incubadas por 4h a 37 °C. Em seguida, as

placas foram centrifugadas a 1000xg por 10 minutos e o meio foi cuidadosamente retirado. Os cristais de formazana foram diluídos em 100 µL de DMSO e a absorbância foi medida em leitor de microplacas à 570 nm.

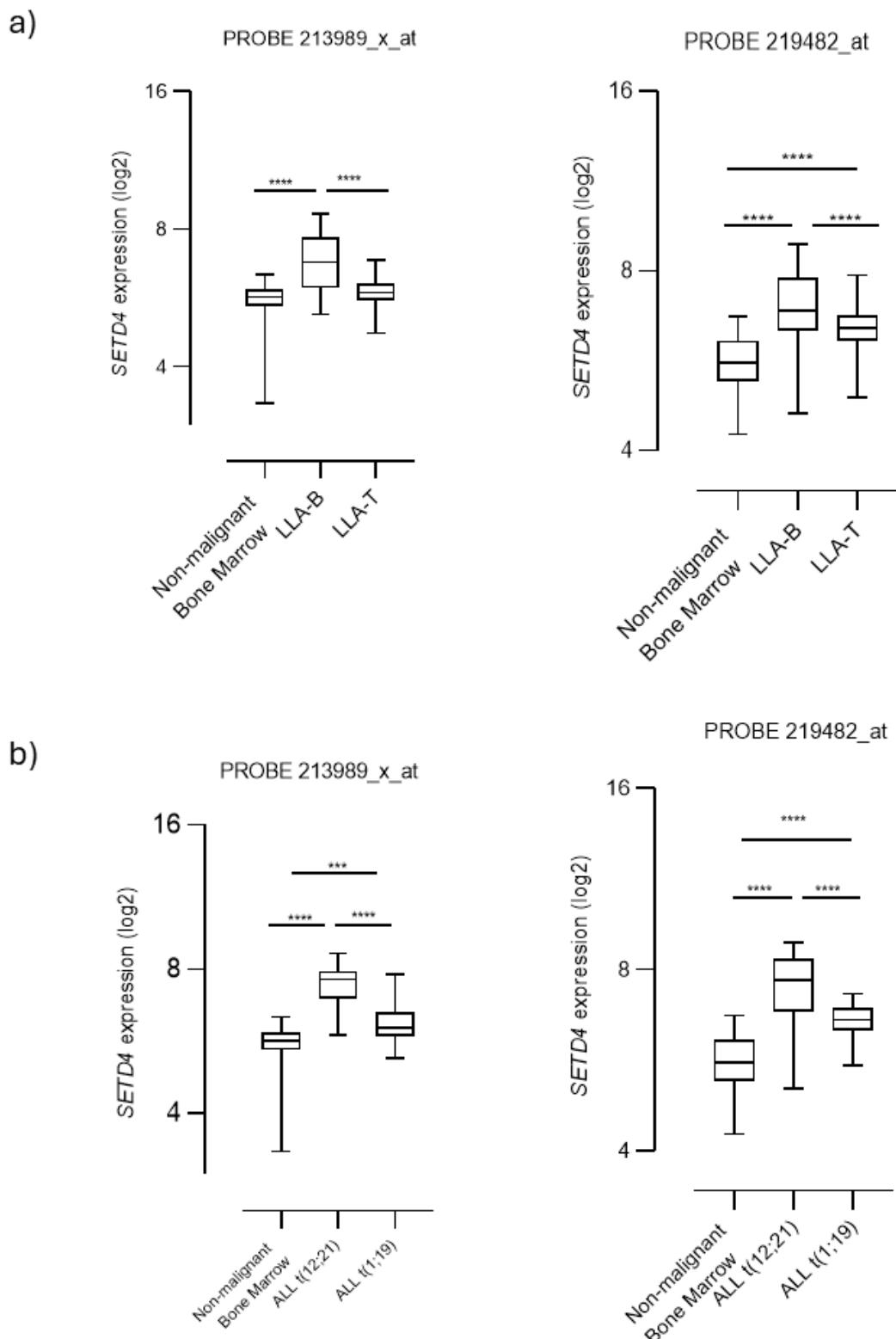
As análises foram feitas com cinco replicatas técnicas e as análises estatísticas e gráficos foram gerados no GraphPad Prism 8.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise *in silico* do nível de expressão de *SETD4* em leucemia linfooblástica aguda

A expressão do gene *SETD4* em amostras leucêmicas foi avaliada por meio de dados públicos de expressão de mRNA disponibilizados na plataforma BloodSpot (<https://www.bloodspot.eu/>). Além de conter dados de perfis transcriptômicos de diferentes subtipos de LLA, possui, como controle, amostras de medula óssea saudável, permitindo uma análise comparativa relevante entre tecidos normais e malignos.

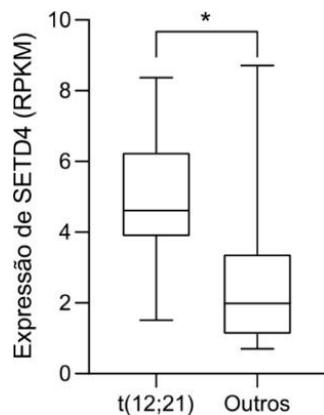
Neste estudo, foi realizada uma análise comparativa dos níveis de mRNA de *SETD4* em amostras de LLA-B, LLA-T e amostras normais, bem como entre os subtipos citogenéticos t(12;21) e t(1;19). Os resultados demonstraram que *SETD4* apresenta hiperexpressão em amostras leucêmicas em relação ao tecido normal, com níveis particularmente elevados nas amostras de LLA-B ( $p < 0,0001$ ) (Figura 11 a) sendo essa expressão ainda mais acentuada nos casos com a translocação t(12;21) ( $p < 0,0001$ ), fusão ETV6-RUNX1, presente na linhagem REH selecionada para experimentos (Figura 11 b).



**Figura 11.** Expressão de *SETD4* em subtipos de LLA. (a) Nível de expressão de *SETD4* em LLA-T (n=173), LLA-B (n=105) e medula óssea não leucêmica (n=72). Observa-se hiperexpressão de *SETD4* em amostras leucêmicas em relação ao tecido normal (\*\*\*\*p < 0,0001; teste de Kruskal-Wallis), com níveis

mais elevados em LLA-B. (b) Expressão de *SETD4* de acordo com os subtipos citogenéticos t(12;21) (n=57) e t(1;19) (n=36), com aumento acentuado nos casos com t(12;21) (\*\*\*\*p < 0,0001; teste de Kruskal-Wallis).

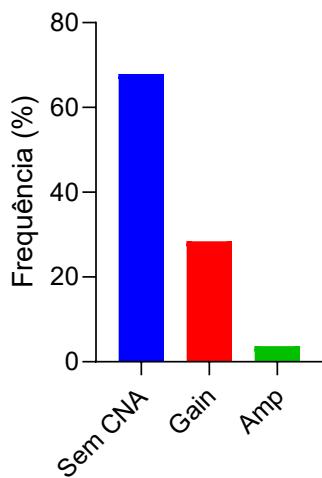
A fim de investigar o padrão de expressão de *SETD4* na coorte que será utilizada nas análises subsequentes, os níveis de expressão do gene foram avaliados em amostras de LLA-B do estudo TARGET-ALL Phase II. Nessa análise, os casos com a translocação t(12;21) apresentaram expressão significativamente maior de *SETD4* em comparação com os demais subtipos citogenéticos, confirmando os achados observados na plataforma BloodSpot (Figura 12).



**Figura 12.** Níveis de expressão de *SETD4* em amostras de LLA-B do estudo TARGET-ALL-Phase II. Observou-se expressão significativamente maior de *SETD4* nos casos com t(12;21) (n=8) em comparação com os demais subtipos (Outros) (n = 13) (\*p < 0,05, teste de Mann-Whitney). Dados retirados de cBioPortal.

## 5.2 Análise de número de cópias alteradas e correlação com mRNA de *SETD4*

Os dados de CNA e de expressão de mRNA foram obtidos no cBioPortal, estudo TARGET-ALL-Phase II (2018). Entre os eventos de ganho, a amplificação de baixo nível (Gain), foi a mais frequente (28,4%), enquanto a de alto nível (Amp), foi o menos frequente (3,7%). Não foram observadas deleções de nenhum tipo (Figura 13).



**Figura 13.** Frequência de alterações no número de cópias do gene *SETD4* na leucemia linfóide aguda de células B (n = 81). Amp – ganho alto de cópias e Gain – ganho baixo de cópias. Dados obtidos em cBioPortal.

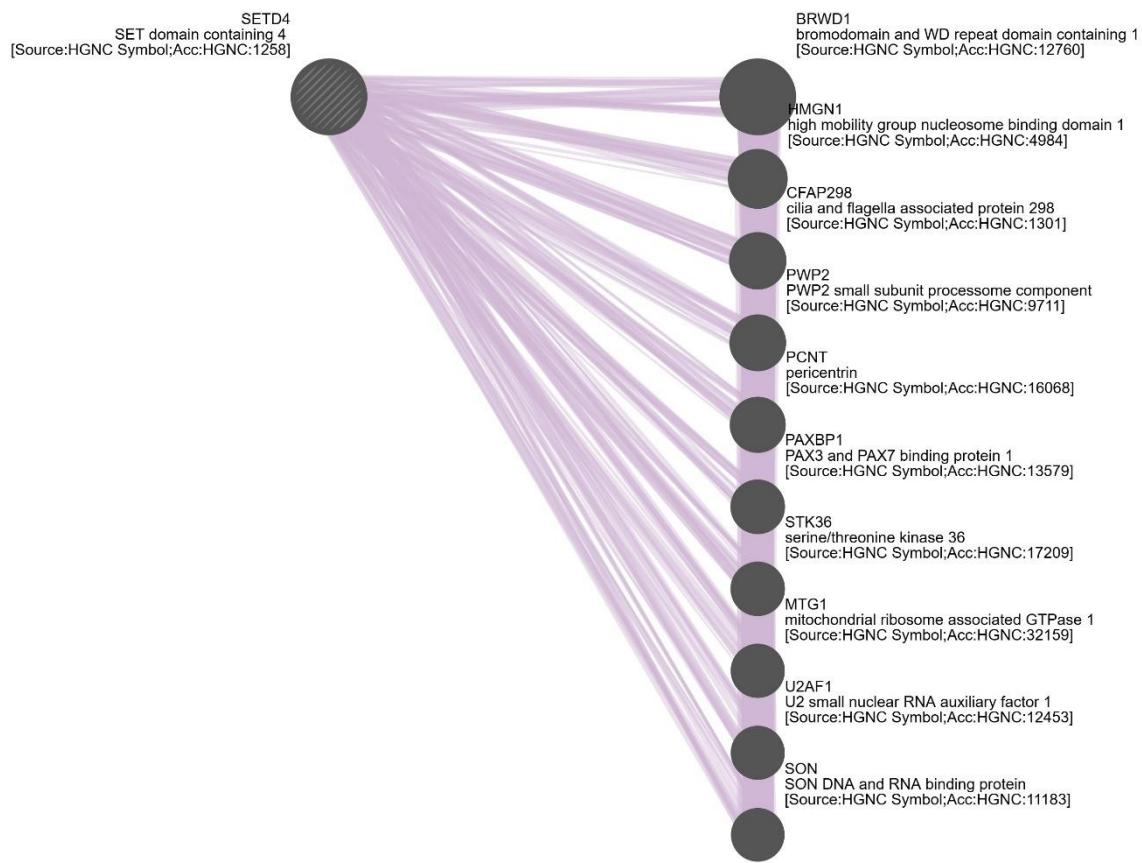
Embora 32,1% dos casos apresentem ganho de número de cópias e exibam níveis aumentados de mRNA, não foi detectada correlação estatisticamente significativa entre a expressão gênica e o nível de CNA na coorte analisada (Tabela 4). Esse achado sugere que o aumento de expressão de *SETD4* não decorre primariamente de alterações estruturais no DNA, apontando para um possível controle epigenético ou transcripcional.

**Tabela 4.** Correlação de Spearman entre dados de CNA e mRNA de *SETD4*.

Gene	Pacientes	Correlação (r)	Valor de P
<i>SETD4</i>	81	0,208	0,062

### 5.3 Rede de coexpressão de *SETD4*

A análise realizada no GeneMANIA permitiu identificar os 10 genes com maior correlação de expressão com *SETD4* (Figura 14).



**Figura 14.** Rede de coexpressão de *SETD4*. Figura gerada no GeneMANIA.

A fim de avaliar se as correlações se reproduzem a nível de expressão no contexto leucêmico, foram incluídos apenas os genes com dados de expressão disponíveis em todas as 81 amostras de LLA-B do estudo TARGET-ALL-Phase II (2018), cruzando os dados disponíveis de 8 dos 10 genes identificados no GeneMANIA e *SETD4*. A correlação entre os níveis de expressão foi avaliada por meio do coeficiente de Spearman (Tabela 5).

Todas as correlações identificadas apresentaram significância estatística com p-valor < 0,001, indicando associações robustas entre os padrões de expressão. O gene *PAXBP1* apresentou a correlação mais forte ( $r = 0,6457$ ;  $p < 0,0001$ ), seguido por *BRWD1* ( $r = 0,5493$ ;  $p < 0,0001$ ) e *HMGN1* ( $r = 0,5105$ ;  $p < 0,0001$ ). Estes três genes demonstraram correlações de magnitude moderada a forte, sugerindo possível corregulação ou participação em vias biológicas relacionadas.

**Tabela 5.** Correlação de Spearman entre *SETD4* e seus genes correlacionados em amostras de pacientes do estudo TARGET-ALL-Phase II (2018). Os genes de correlação moderada a forte estão destacados em vermelho.

Gene	Correlação (r)	p-valor	Significância
<i>BRWD1</i>	0,5493	<0,0001	****
<i>HMGN1</i>	0,5105	<0,0001	****
<i>CFAP298</i>	0,4687	<0,0001	****
<i>PCNT</i>	0,3661	0,0008	***
<i>PAXBP1</i>	0,6457	<0,0001	****
<i>STK36</i>	0,4727	<0,0001	****
<i>MTG1</i>	0,4595	<0,0001	****
<i>SON</i>	0,4922	<0,0001	****

De forma interessante, todos os três genes mais correlacionados com *SETD4* estão localizados no cromossomo 21 e atuam em processos epigenéticos ou de remodelamento de cromatina, o que reforça a hipótese de que *SETD4* participa de redes regulatórias envolvidas na identidade e proliferação de células B (Diao et al., 2012; Mandal et al., 2018; Wei et al., 2015; Wu et al., 2024; Page et al., 2022; Page et al., 2023).

#### 5.4 Análise de expressão diferencial e assinaturas associadas à expressão de *SETD4* em LLA-B

A análise de expressão diferencial entre os grupos com alta e baixa expressão de *SETD4* evidenciou contrastes no perfil transcripcional entre os grupos. A Figura 15

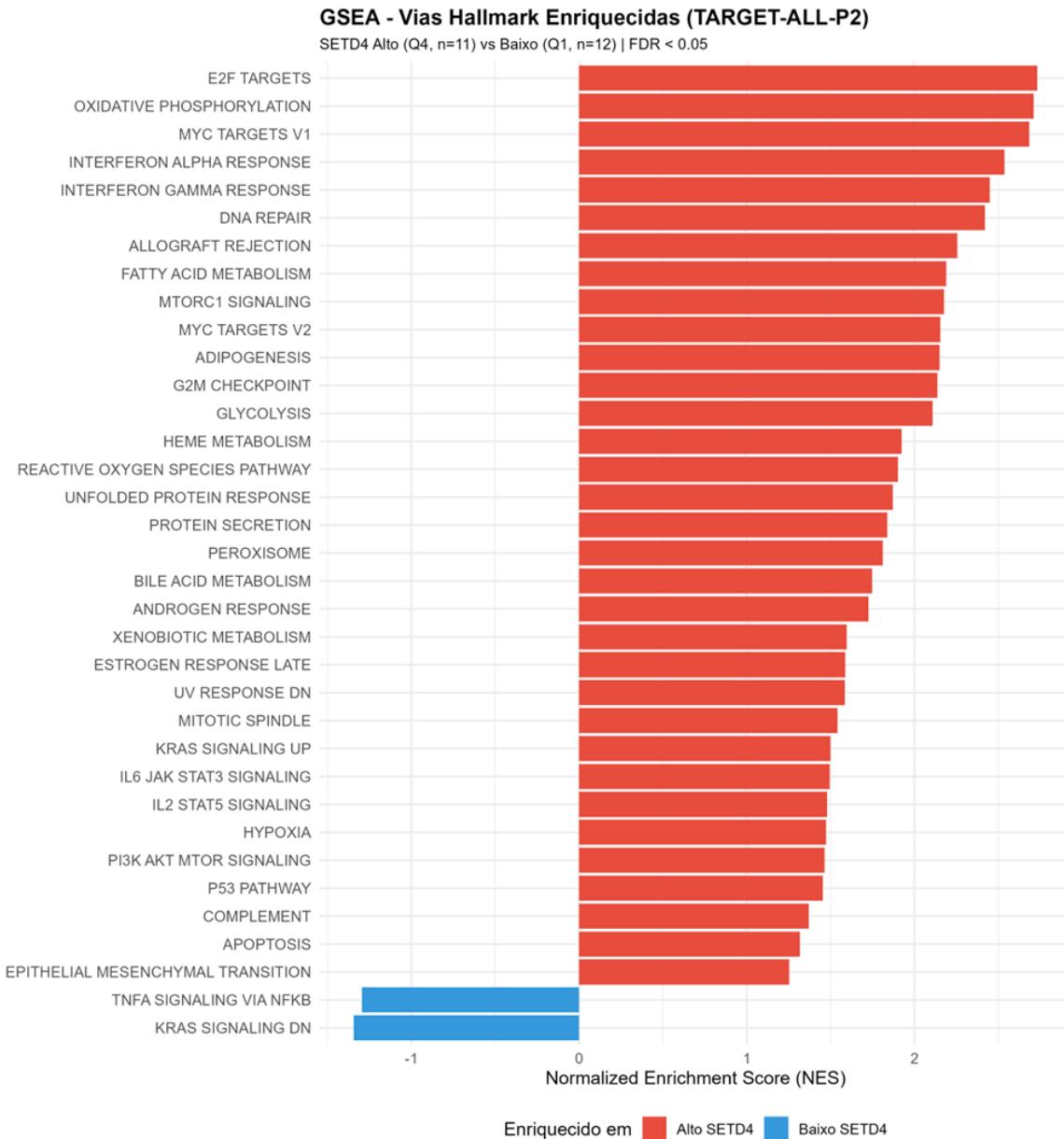
apresenta os 50 principais genes diferencialmente expressos ( $FDR < 0.05$ ), destacando padrões distintos de regulação gênica associados aos níveis de *SETD4*.

Ainda, os dados de expressão diferencial dos dois grupos foram submetidos à análise de enriquecimento de vias (GSEA), indicando que o grupo de alta expressão de *SETD4* apresenta medula óssea com padrão proliferativo (Figura 16). O enriquecimento das vias E2F, oxidação proliferativa e resposta ao interferon alfa se destacam com NES  $>2$ . Entre as vias classicamente associadas ao comportamento neoplásico, destacaram-se MYC, G2M checkpoint, glicólise, metabolismo de ácidos graxos, reparo de DNA, P53, apoptose e transição epitelio-mesenquimal *KRAS signaling Up*.



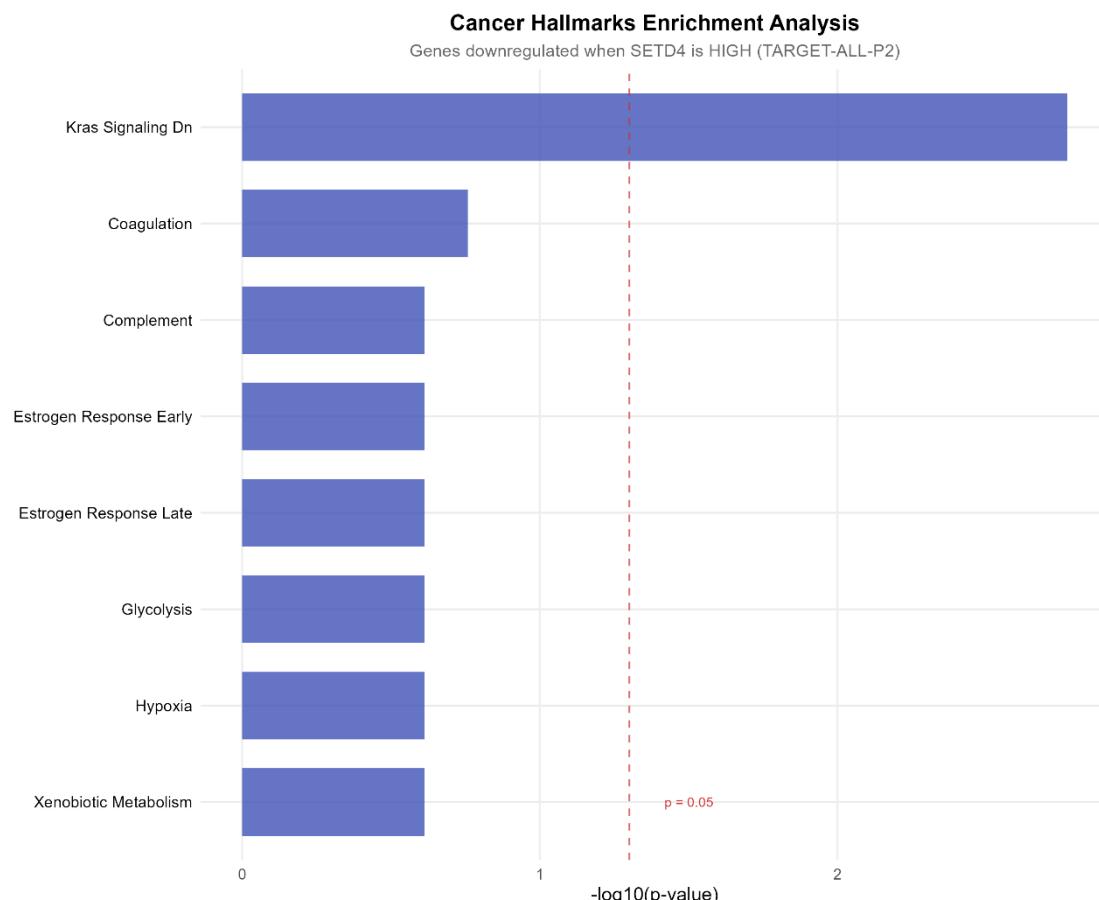
**Figura 15.** Heatmap dos 50 genes mais diferencialmente expressos entre pacientes com baixa (n= 12) e alta (n=11) expressão de *SETD4*. A análise foi realizada a partir de dados de RNA-seq utilizando o

método DESeq2. As intensidades de cor representam os níveis de expressão gênica normalizados, variando de azul (baixa expressão) a vermelho (alta expressão). Imagem gerada no R 4.3.1.



**Figura 16.** Análise de enriquecimento gênico (GSEA) entre pacientes com baixa e alta expressão de *SETD4*. A análise foi conduzida utilizando todos os genes expressos obtidos por RNA-seq, ranqueados de acordo com o valor de  $\log_2(fold\ change)$ . O enriquecimento foi avaliado em relação às coleções de assinaturas gênicas Hallmark do MSigDB. As vias mais enriquecidas no grupo com alta expressão de *SETD4* estão associadas a processos proliferativos, enquanto o grupo com baixa expressão apresentou enriquecimento em vias relacionadas a diferenciação e resposta imune.

Em seguida, os genes com expressão reduzida no grupo com altos níveis de *SETD4* foram submetidos à análise de enriquecimento utilizando a coleção hallmark MSigDB. Os resultados indicaram enriquecimento de genes associados a KRAS negativamente regulada (KRAS signaling DN), corroborando com os dados da análise GSEA, que mostra enriquecimento da mesma via em amostras com baixa expressão de *SETD4* (Figura 16 e 17).



**Figura 17.** Análise de enriquecimento de assinaturas MSigDB aplicada aos genes com expressão reduzida em pacientes com alta expressão de *SETD4*. Observou-se o enriquecimento da assinatura KRAS Signaling DN entre os genes *downregulated*, indicando que pacientes com *SETD4* elevado apresentam um padrão transcripcional compatível com maior atividade da via KRAS.

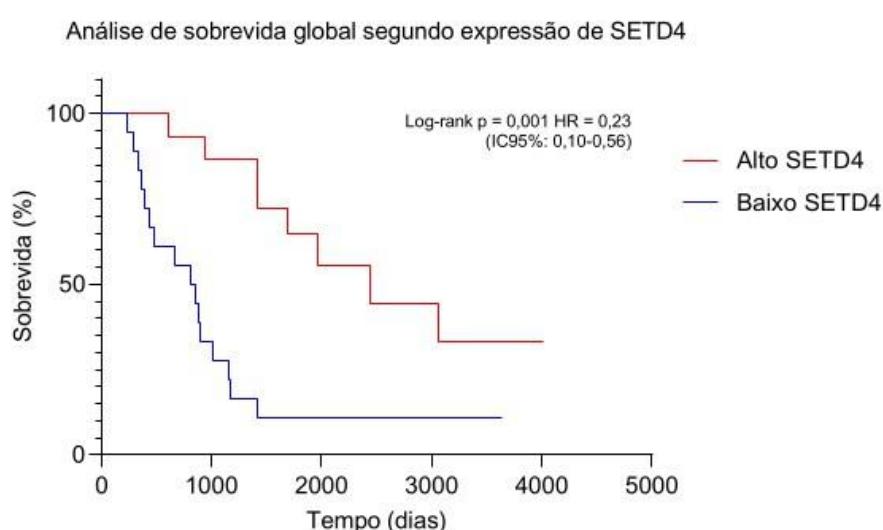
### 5.5 Correlação entre expressão de *SETD4* e parâmetros clínicos

A correlação entre a expressão de *SETD4* e variáveis clínicas, como contagem de blastos na medula óssea nos dias 8, 15 e 29 do tratamento e contagem de leucócitos

no sangue periférico estão resumidas na tabela 6. Não foram observadas correlações significativas entre esses parâmetros clínicos e a expressão do gene.

**Tabela 6.** Correlação de Spearman entre mRNA de *SETD4* e parâmetros clínicos de pacientes do estudo TARGET-ALL-Phase II

Parâmetro clínico	N	Correlação (r)	p-valor	Significância
Blastos na medula óssea dia 8	81	0,03207	0,7790	ns
Blastos na medula óssea dia 15	59	-0,03147	0,8129	ns
Blastos na medula óssea dia 29	59	-0,03691	0,7814	ns
Contagem de leucócitos no sangue periférico	81	-0,02066	0,8547	ns

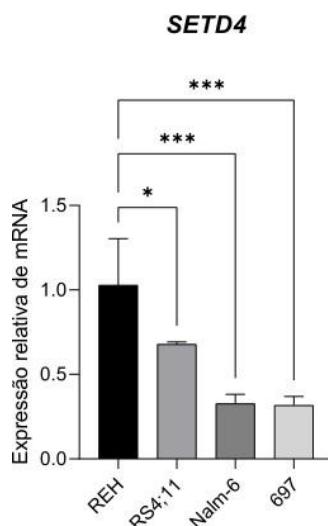


Por outro lado, a análise de sobrevida global (OS) indicou que os pacientes com expressão mais elevada de *SETD4* (Q4) apresentam maior sobrevida em relação ao grupo de menor expressão (Q1) (mediana de 81 vs 27,5 meses; HR = 0,23; IC95%: 0,10-0,56; p = 0,001, log-rank test). A alta expressão de *SETD4* foi associada a uma redução de 77% no risco de morte (Figura 18).

**Figura 18.** OS segundo expressão de *SETD4*. Pacientes com alta expressão apresentaram sobrevida mediana de 81 meses em comparação a 27,5 meses no grupo de baixa expressão (HR = 0,23; IC95%: 0,10–0,56;  $p = 0,001$ ; teste log-rank). HR: Hazard Ratio; IC95%: Intervalo de Confiança de 95%.

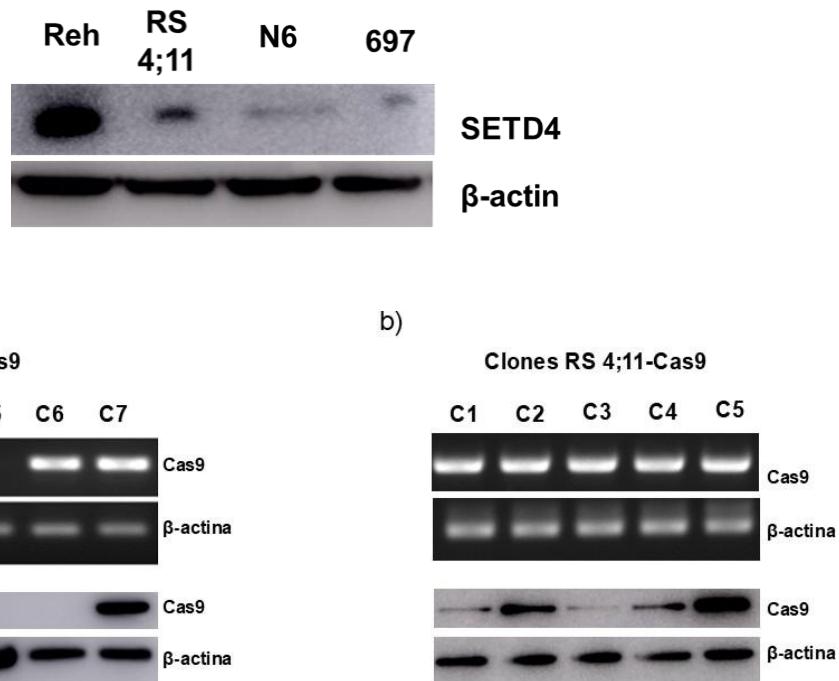
## 5.6 Níveis de expressão de *SETD4* em linhagens celulares de LLA-B

Na etapa de experimentos *in vitro*, a expressão de *SETD4* foi avaliada em quatro linhagens de leucemia linfoide aguda de células B (RS 4;11, REH, Nalm-6 e 697) utilizando a técnica de RT-qPCR. A análise revelou que a linhagem REH apresentou os níveis mais elevados de transcritos de *SETD4* em relação às demais, seguida por RS4;11, sendo assim definidas como modelos experimentais para as análises posteriores (Figura 19).



**Figura 19.** Expressão relativa de *SETD4* em diferentes condições experimentais. Os dados representam média ± EPM de três replicatas experimentais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Ainda, o nível de expressão de *SETD4* também foi analisado nas mesmas linhagens a nível proteico qualitativo pela técnica de *western blot*, corroborando com os dados obtidos por RT-qPCR (Figura 20).



**Figura 20.** Análise da expressão de SETD4 em linhagens de LLA-B por western blot.

### 5.7 Estabelecimento de linhagens com expressão estável de Cas9

As linhagens REH e RS 4;11 foram submetidas à transdução lentiviral com o objetivo de gerar clones de células únicas com expressão estável de Cas9. Foram obtidos sete clones da linhagem REH e cinco clones da linhagem RS 4;11. Dentre estes, apenas três clones de REH e todos os clones da RS 4;11 apresentaram expressão de Cas9 em nível proteico (Figura 21).

**Figura 21.** Avaliação da inserção genômica e expressão proteica de Cas9 nas linhagens REH (a) e RS4;11 (b). Figura representativa de PCR genômico e western blot.

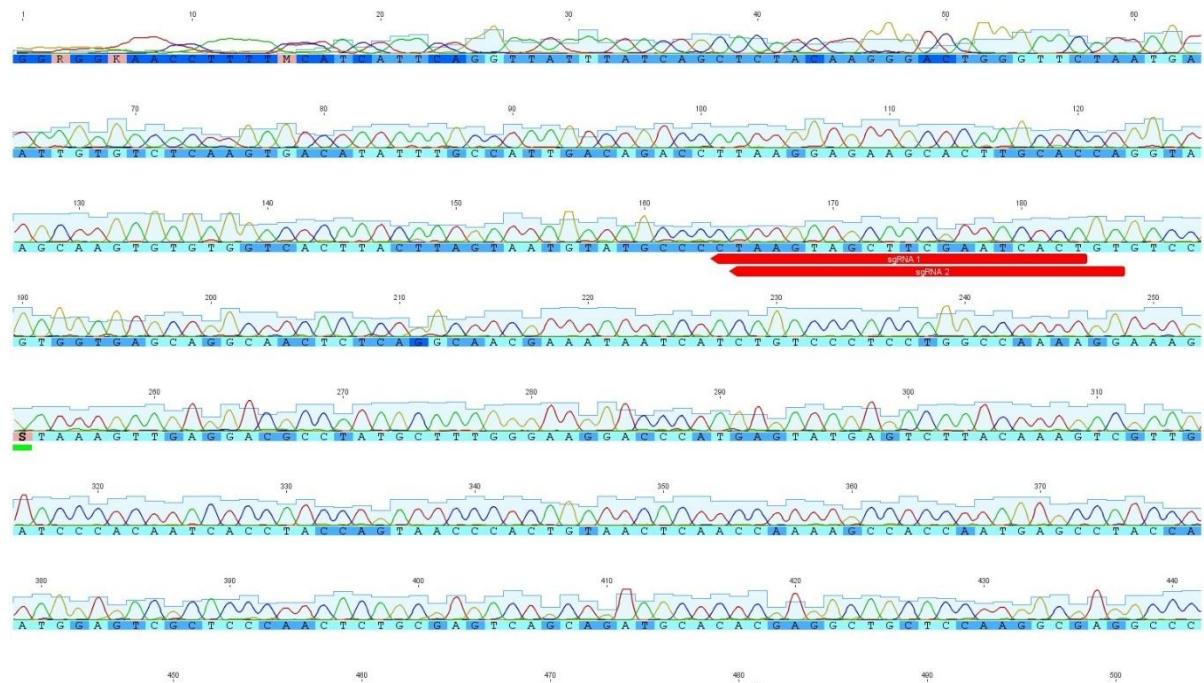
Considerando os resultados de expressão e a ausência de contaminação por *mycoplasma*, foram selecionados o clone 4 da REH e o clone 5 da RS 4;11 para a realização do *knockout* gênico e para os experimentos funcionais subsequentes.

### 5.8 Edição de linhagens

Com o objetivo de promover o *knockout* de *SETD4*, as células com expressão estável de Cas9 (REH clone 4 e RS4;11 clone 5) foram transfectadas com duas sequencias distintas de sgRNA (Figura 22). Ao todo, foram gerados 200 clones únicos

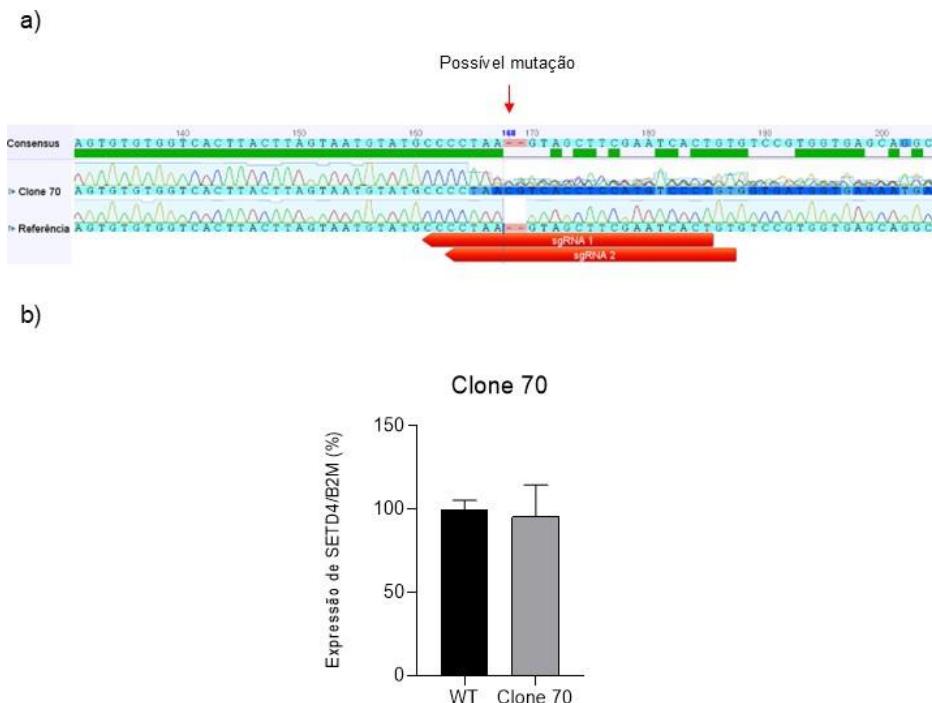
de REH e 6 clones únicos RS4;11. Todos foram enviados para sequenciamento Sanger, porém, até o presente momento, não foram gerados exemplares *knockout*.

A Figura 22 apresenta os resultados obtidos, sendo que as setas vermelhas indicam a localização dos sgRNAs utilizados. Considerando que o sistema empregado foi baseado na endonuclease SpCas9, as mutações são esperadas na região situada aproximadamente três pares de bases a montante da sequência PAM (NGG). Nesse caso específico, como os sgRNAs estão orientados na fita negativa do DNA, a leitura da sequência no esquema apresentado deve ser interpretada com o seu complementar, de modo que o PAM e o ponto de clivagem correspondem à fita oposta.



**Figura 22.** Resultado representativo do sequenciamento Sanger. As setas vermelhas indicam as regiões correspondentes aos sgRNAs. Os fragmentos sequenciados apresentavam 558 pb, com leitura nítida e confiável a partir de cerca de 30 pb após o início e até aproximadamente 20 pb antes do término. Figura sequenciamento Sanger gerado no Geneious versão 8.

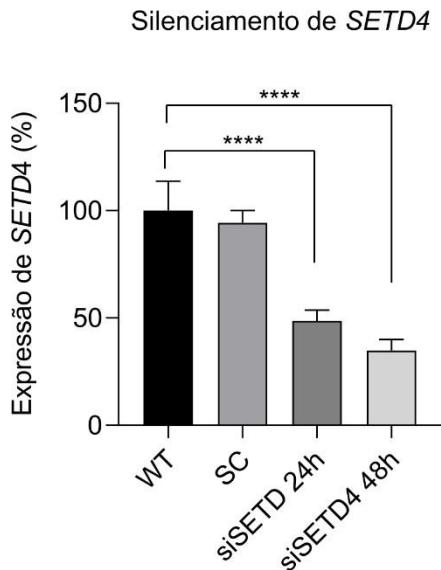
Apesar dos resultados negativos para *knockout*, observou-se, no clone número 70 da linhagem REH, um indicativo de edição em fita única, evidenciado por uma clara perturbação na região alvo, que não foi observada no sequenciamento reverso. No entanto, essa alteração não resultou em redução da expressão do gene e o clone foi descartado (Figura 23).



**Figura 23.** Análise de edição e expressão de *SETD4* do clone 70. (a) Resultado do sequenciamento Sanger evidenciando uma perturbação na sequência-alvo, localizada logo após três nucleotídeos do motivo PAM. Figura gerada no Geneious versão 8. (b) Análise por RT-qPCR da expressão de *SETD4*, demonstrando ausência de redução nos níveis de transcritos em comparação ao controle. Ausência de redução significativa nos níveis de transcritos.

### 5.9 Silenciamento com siRNA

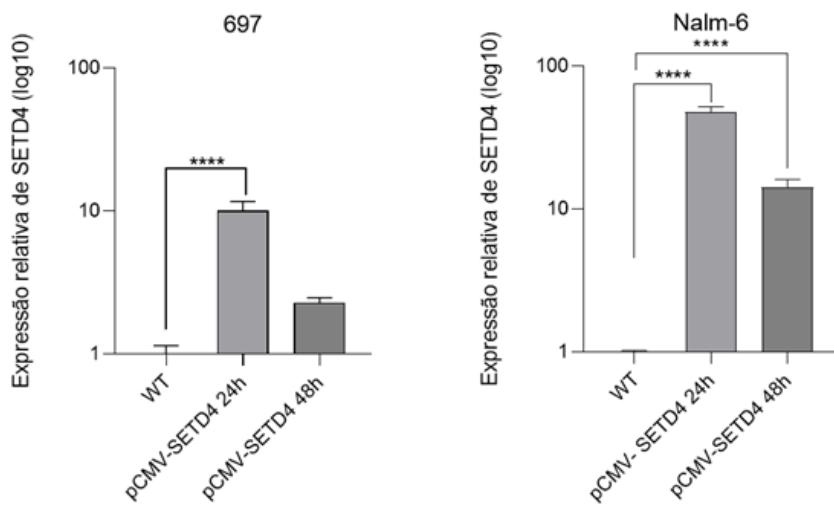
Como alternativa à abordagem de edição gênica por CRISPR/Cas9 para investigar a funcionalidade de *SETD4* no contexto leucêmico, a linhagem celular REH foi submetida à transfeção com siRNA específico para o gene. Na concentração de 50 nM, observou-se uma redução significativa na expressão de *SETD4*, correspondendo a 51,34% de silenciamento após 24 horas e 65,14% após 48 horas de incubação (Figura 24). A abordagem com siRNA mostrou-se eficiente e será utilizada para os ensaios funcionais subsequentes.



**Figura 24.** Silenciamento de *SETD4* em REH com siRNA. A expressão relativa de *SETD4* foi avaliada por RT-qPCR após 24 h e 48 h da transfecção com siRNA (50 nM). Houve redução significativa na expressão de *SETD4* em ambos os tempos. (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett- WT vs. si*SETD4* 24h, \*\*\*p < 0,0001; WT vs. si*SETD4* 48h, \*\*\*\*p < 0,0001; WT vs. SC, ns). Dados apresentados como média ± EPM.

### 5.10 Superexpressão de *SETD4*

Como abordagem complementar, foi realizada a superexpressão transiente de *SETD4* nas linhagens 697 e Nalm-6 mediante transfecção com vetor pCMV-*SETD4*. A análise por qRT-PCR revelou aumento significativo nos níveis de mRNA de *SETD4* em 24 horas pós-transfecção, com fold-change de  $10,07 \pm 0,81$  (697) e  $47,98 \pm 1,87$  (Nalm-6) em relação aos controles WT. Em 48 horas, observou-se redução dos níveis de expressão para  $2,27 \pm 0,10$  (697) e  $14,20 \pm 0,94$  (Nalm-6). Com exceção de 697 ( $p=0,1509$ ), a expressão em 48h ainda foi significativamente elevada em comparação aos controles ( $p<0,001$ ) (Figura 25). Notavelmente, a linhagem Nalm-6 apresentou eficiência de expressão cinco vezes superior à linhagem 697, sugerindo diferenças na susceptibilidade à introdução de DNA exógeno entre as linhagens ou responsividade ao promotor CMV.



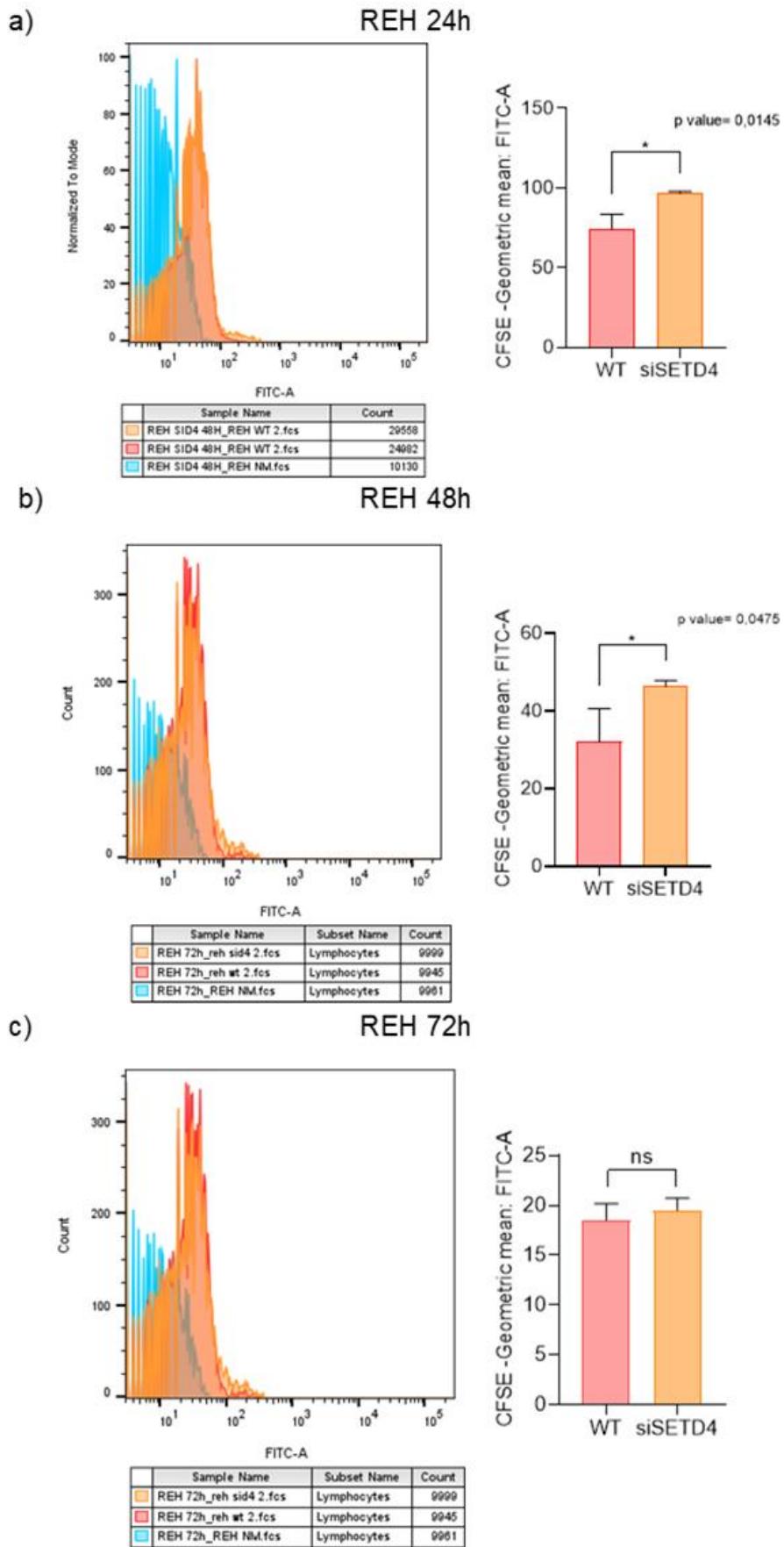
**Figura 25.** Superexpressão transiente de *SETD4* em linhagens 697 e Nalm-6. Expressão relativa de mRNA de *SETD4* por RT-qPCR em 24h e 48h pós-transfecção, normalizada por *B2M* (método 2<sup>A</sup>-ΔΔCT). Dados apresentados em escala log<sub>10</sub>. Barras: média ± EPM (n=4). A expressão atingiu pico em 24h (697: 10,07 ± 0,81x; Nalm-6: 47,98 ± 1,87x) com declínio em 48h (697: 2,27 ± 0,10x; Nalm-6: 14,20 ± 0,94x), permanecendo elevada versus WT. O teste estatístico utilizado foi ANOVA + Dunnett.

### 5.11 Proliferação celular

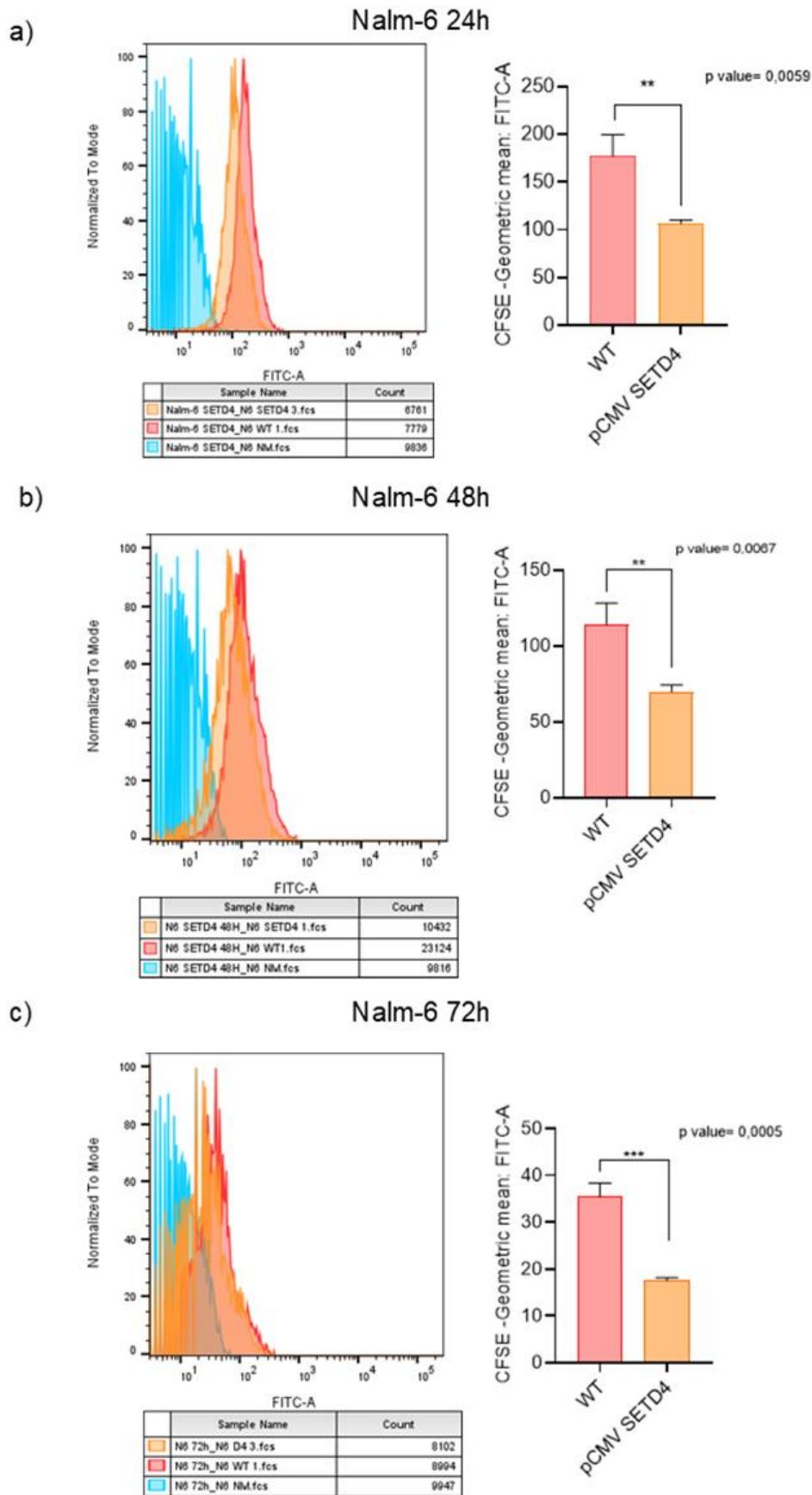
Os efeitos do silenciamento e da superexpressão de *SETD4*, obtidos por meio da transfecção com siRNA e com o vetor de expressão, respectivamente, foram avaliados nas linhagens REH e Nalm-6. O objetivo foi validar experimentalmente os achados *in silico*, que apontaram enriquecimento de vias associadas à proliferação celular (Figura 16).

A avaliação experimental da proliferação celular foi realizada de marcação com CFSE, acompanhada nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a transfecção.

Como resultado, o silenciamento de *SETD4* na linhagem REH promoveu uma discreta redução na proliferação celular nos tempos de 24 e 48 horas, retornando a níveis semelhantes ao controle WT em 72 horas (Figura 26). Em contraste, a superexpressão de *SETD4* na linhagem Nalm-6 resultou em aumento da proliferação celular em todos os tempos analisados (Figura 27).



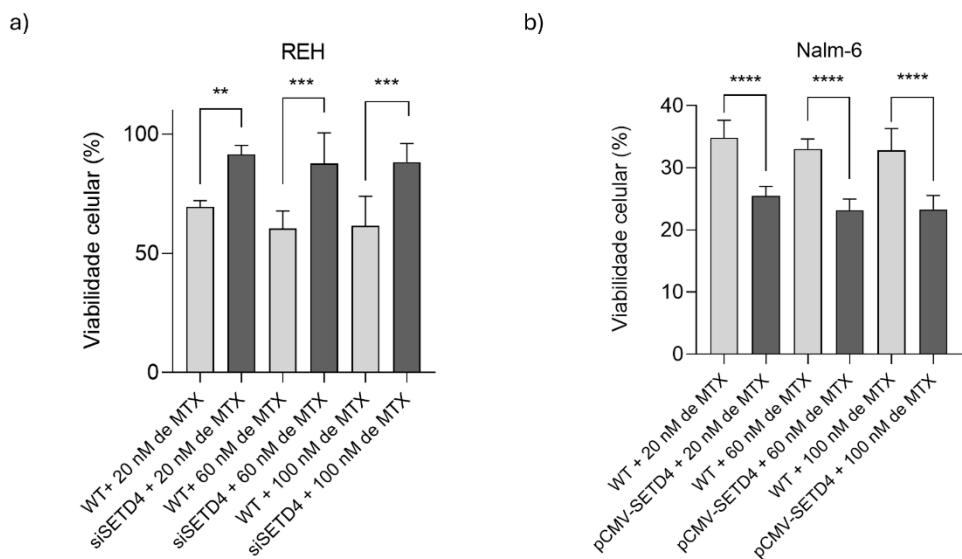
**Figura 26.** Avaliação da proliferação celular em REH com silenciamento de *SETD4*. Células REH transfectadas com o vetor de expressão pCMV-*SETD4* foram marcadas com CFSE e analisadas por citometria de fluxo nos tempos de 24 h (a), 48 h (b) e 72 h (c) após a transfeção. A maior da intensidade média de fluorescência (FITC-A) ao longo do tempo em comparação ao controle reflete a diminuição da proliferação celular. Observou-se intensidade significativamente maior do sinal de CFSE em relação ao grupo controle (WT) em 24h e 48h, indicando menor taxa proliferativa nas células com silenciamento de *SETD4*. Os dados são apresentados como média ± EPM de três experimentos independentes. Teste t de Student não pareado;  $p = 0,0145$  (24h),  $p = 0,0475$  (48h) e  $p = ns$  (72h); \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura 27.** Ensaio de proliferação em linhagem Nalm-6 com superexpressão de *SETD4*. Células Nalm-6 transfectadas com o vetor de expressão pCMV-*SETD4* foram marcadas com CFSE e analisadas por citometria de fluxo nos tempos de 24 h (a), 48 h (b) e 72 h (c) após a transfeção. A diminuição da intensidade média de fluorescência (FITC-A) ao longo do tempo reflete o aumento da proliferação celular. Observou-se redução significativa do sinal de CFSE em relação ao grupo controle (WT) em todos os tempos avaliados, indicando maior taxa proliferativa nas células superexpressando *SETD4*. Os dados resultam da média geométrica de três experimentos independentes. Teste t de Student não pareado;  $p = 0,0059$  (24h),  $p = 0,0087$  (48h) e  $p = 0,0005$  (72h); \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.12 Resposta ao tratamento com metotrexato

O metotrexato (MTX) é um antimetabólico empregado no tratamento da LLA-B. Seu mecanismo de ação consiste na inibição da enzima dihidrofolato redutase, impedindo a síntese de material genético e, consequentemente, a proliferação celular. Sua atuação ocorre principalmente sobre células em intensa proliferação e a resistência ao tratamento está relacionada com a ativação da via TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B, que está enriquecida nas amostras com baixa expressão de *SETD4* (Figura 16). Diante disso, as linhagens REH silenciada e Nalm-6 com superexpressão de *SETD4* foram expostas ao MTX afim de investigar possíveis alterações na sensibilidade ao fármaco quando comparadas às respectivas linhagens controle (Figura 28 a e b).



**Figura 28. Sensibilidade ao metotrexato (MTX) em linhagens REH e Nalm-6 com modulação de *SETD4*.** (a) Viabilidade celular relativa das células REH silenciadas para *SETD4* (si*SETD4*) após tratamento com MTX (20, 60 e 100 nM), normalizadas aos respectivos controles não tratados. (b) Viabilidade celular relativa das células Nalm-6 com superexpressão de *SETD4* (pCMV-*SETD4*) submetidas aos mesmos tratamentos, normalizadas aos respectivos controles não tratados.

Os dados representam média ± desvio padrão (SD), n = 5. A significância foi avaliada por ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Foram observadas diferenças significativas na resposta ao MTX em ambas as condições testadas. A linhagem REH silenciada apresentou maior resistência em todas as concentrações testadas, enquanto a linhagem Nalm-6 com superexpressão revelou maior sensibilidade. Todavia, as faixas de concentração utilizadas não permitiram observar diferença de resposta entre as doses do fármaco (Figura 27 a e b).

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram o possível envolvimento de *SETD4* na LLA-B. Os elevados níveis de expressão de *SETD4* em amostras leucêmicas quando comparadas à medula óssea saudável, com superexpressão particularmente acentuada em casos de LLA-B, reforçam evidências clínicas anteriores, que apontam a superexpressão de *SETD4* como uma característica recorrente em amostras de LLA-B pediátrica, destacando a consistência deste padrão de expressão (Telles et al., 2023) (Figura 11 a). A expressão elevada de *SETD4* observada na LLA-B em relação à LLA-T sugere que este gene pode desempenhar papéis distintos ou apresentar relevância diferencial conforme a linhagem celular envolvida na transformação leucêmica. Todavia, a ausência de pacientes pediátricos com LLA-T com dados clínicos e biológicos completos não permitiu a análise mais detalhada deste achado.

A expressão ainda mais elevada de *SETD4* no subtipo citogenético t(12;21) que resulta na fusão gênica ETV6-RUNX1 é particularmente notável (Figura 11 b e 12). Essa alteração está presente em aproximadamente 25% dos casos de LLA-B e está associada a um prognóstico clínico favorável (Montaño et al., 2020; Ryan et al., 2023). Essa tendência também foi observada em modelos celulares de leucemia, sendo a linhagem REH, portadora da translocação t(12;21), aquela que apresenta os níveis mais elevados de expressão de *SETD4* (Figura 19). Dessa forma, a REH constitui um modelo relevante para investigações funcionais sobre o papel biológico de *SETD4* no contexto da leucemia linfooblástica aguda.

Sabe-se que a proteína de fusão ETV6-RUNX1 atua como um fator de transcrição aberrante, capaz de se ligar aos alvos de RUNX1 e, consequentemente, modular a expressão gênica (Polak et al., 2019; Torrano et al., 2011). Sendo assim, é possível que *SETD4* seja um alvo direto ou indireto deste oncogene de fusão, ou que sua expressão seja modulada por alterações epigenéticas secundárias características deste subtipo leucêmico.

Todavia, a expressão elevada de *SETD4* não constitui uma regra entre os pacientes portadores da translocação t(12;21), tampouco representa uma exclusividade desse subtipo molecular, afinal a linhagem RS4;11 também possui níveis elevados de *SETD4* e ausência da translocação (Figura 19). Estudos recentes revelaram uma heterogeneidade transcriptômica significativa dentro do subtipo ETV6-RUNX1, com a identificação de dois grupos moleculares distintos (Li et al., 2025). Um desses grupos apresenta um perfil farmacológico mais favorável, caracterizado por maior sensibilidade a tiopurinas e corticosteroides, além de maior expressão de genes associados à progressão do ciclo celular (Li et al., 2025). Interessantemente, as vias relacionadas ao ciclo celular, como E2F, MYC e G2M, encontraram-se significativamente enriquecidas no grupo de maior expressão de *SETD4* no presente estudo.

Embora *SETD4* não tenha sido incluído entre os marcadores avaliados por Li et al. (2025) para distinção desses subtipos, a convergência entre os perfis transpcionais torna possível a hipótese de que sua expressão possa estar enriquecida no subtipo de melhor prognóstico, o que se relacionaria com a associação entre alta expressão de *SETD4* e maior OS identificada neste trabalho (Figura 18).

Os dados de OS obtidos neste estudo divergem dos resultados previamente descritos, os quais apontaram níveis elevados de *SETD4* como indicadores de menor OS (Telles et al., 2023). No entanto, essas divergências devem ser interpretadas com cautela, considerando que os cortes utilizados para definir grupos de expressão foram distintos entre os estudos. Além disso, os protocolos de tratamento empregados nos diferentes estudos apresentam características e taxas de sobrevida significativamente distintas, refletindo adaptações às realidades locais, o que pode contribuir para a variação nos resultados observados.

Os pacientes do estudo TARGET-ALL-Phase II foram tratados conforme os protocolos AALL0232 e AALL0331 do Children's Oncology Group (COG) para alto e médio risco, respectivamente (Larsen et al., 2016); Maloney et al., 2020). Por outro lado, os pacientes da coorte do estudo de Telles (2023) foram tratados de acordo com o estudo GBTLI-99 (Brandalise et al., 2010). Apesar das fases de indução entre os protocolos serem muito semelhantes, existe uma diferença fundamental, que pode explicar a diferença entre os dois grupos: a etapa de manutenção dos protocolos AALL0232 e AALL0331 é superior em tempo, sendo o tempo mínimo de 24 meses e o máximo de 36 meses, enquanto o grupo GBTLI conta com 18 meses de manutenção. Essa maior duração promove uma exposição prolongada à 6-mercaptopurina, resultando em uma dose cumulativa de 2-6 vezes maior do que o protocolo GBTLI. A 6-MP bloqueia a síntese de purinas e causa incorporação de análogos no DNA, impedindo a proliferação de células em divisão, característica marcante das células com alta expressão de *SETD4*.

Recentemente, um estudo demonstrou que a ativação da via de sinalização TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B está associada à resistência ao metotrexato (MTX) em pacientes com LLA (Canevarolo; Cury; Yunes, 2023). Corroborando esses achados, o presente trabalho indica que esta via de sinalização se encontra significativamente enriquecida em pacientes com baixa expressão de *SETD4*, os quais apresentaram menor sobrevida global.

Curiosamente, os protocolos AALL0232 e AALL0331 preconizam doses semanais inferiores de MTX ( $20 \text{ mg/m}^2$ ), enquanto o protocolo brasileiro GBTLI utiliza doses semanais superiores ( $25 \text{ mg/m}^2$ ) (Larsen et al., 2016); Maloney et al., 2020). Esta diferença posológica de 25% na dose semanal de MTX pode representar uma explicação plausível para a disparidade observada nas taxas de sobrevida entre os pacientes da coorte de Telles (2023) e aqueles do presente estudo.

Uma hipótese é que doses mais elevadas de MTX possam superar, ao menos parcialmente, a resistência mediada pela via TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B em pacientes com baixa expressão de *SETD4*, resultando em melhores desfechos clínicos. Os dados experimentais preliminares deste trabalho apoiam essa hipótese, demonstrando que a maior expressão de *SETD4* está associada ao aumento da sensibilidade do MTX,

enquanto o silenciamento do gene promove maior resistência ao fármaco (Figura 28 a e b).

O enriquecimento das vias E2F, MYC, G2M checkpoint e sinalização de KRAS em pacientes com alta expressão de *SETD4* indica evidente padrão proliferativo (Venkateswaran; Conacci-Sorrell, 2017; Liu et al., 2025; Oshi et al., 2021; Ma et al., 2025). Tais achados corroboram com os dados de Telles et al (2023), que observou relação positiva entre os níveis de *SETD4* e a carga leucêmica.

A associação entre *SETD4* e proliferação celular já havia sido descrita em câncer de mama, porém não constavam evidências experimentais desse papel na leucemia (Faria et al., 2013). Embora os achados clínicos de Telles et al. (2023) e as análises *in silico* do presente trabalho indiquem uma relação entre *SETD4* e a proliferação celular em contextos leucêmicos, até então não era possível determinar se o gene atuava como indutor direto desse processo ou se sua expressão representava apenas uma consequência de outras alterações moleculares. Todavia, os ensaios de proliferação realizados neste estudo, envolvendo o silenciamento de *SETD4* na linhagem de alta expressão (REH) e a superexpressão do gene em uma linhagem de baixa expressão (Nalm-6), indicaram que *SETD4* exerce um papel ativo e direto na promoção da proliferação celular em leucemia (Figuras 26 e 27).

Ao mesmo tempo que a maior proliferação celular pode indicar uma doença mais agressiva, pode sugerir também maior sensibilidade à quimioterapia, uma vez que os agentes quimioterápicos empregados no tratamento de LLA atuam predominantemente em processos fundamentais do ciclo celular, especialmente na síntese de DNA e na progressão mitótica. Nesse contexto, blastos leucêmicos em estado de divisão celular ativa apresentam maior vulnerabilidade à indução de apoptose mediada por quimioterapia, uma vez que estas células encontram-se metabolicamente mais ativas e, consequentemente, mais suscetíveis aos efeitos citotóxicos dos fármacos (Ling et al., 2023).

Além dos aspectos funcionais relacionados à proliferação celular, *SETD4* também mostrou associação com fatores genéticos relacionados ao cromossomo 21, cujo envolvimento na LLA-B é amplamente estabelecido (Fonatsch, 2010). Atualmente, sabe-se que tanto a SD, caracterizada pela trissomia do cromossomo 21, quanto a

iAMP21, constituem fatores de predisposição para a doença e marcadores de alto risco (Gao et al., 2023). Considerando a relevância dos genes localizados nesse cromossomo para a leucemogênese, diversos genes mapeados nessa região, como *RUNX1*, *ERG*, *ETS2* e *HMGN1*, têm sido extensivamente estudados e apresentam importância clínica e prognóstica (Sood; Kamikubo; Liu, 2017; Zhang et al., 2016; Fu et al., 2017; Page et al., 2023).

Interessantemente, o gene *SETD4* também se localiza no cromossomo 21, e sua expressão apresentou correlação positiva com *HMGN1* (Tabela 5). Em LLA, a superexpressão de *HMGN1* demonstrou favorecer o reparo de DNA, uma via enriquecida no grupo de *SETD4* alto (NES > 2; Figura 16) (Page et al., 2022). Essa atividade está associada à formação da fusão *P2RY8:CRLF2*. Ademais, a presença de *P2RY8:CRLF2* e a alta expressão de *HMGN1* coincidem com a ativação das vias JAK/STAT, aumento da expressão de *MYC* e redução da trimetilação da histona H3K27 (Page et al., 2023). A ativação significativa da via *MYC* foi observada entre os pacientes com alta expressão de *SETD4* (NES > 2; Figura 16).

Os demais genes que apresentaram forte correlação positiva de expressão com *SETD4* também estão localizados no cromossomo 21 (Tabela 5). Esses achados indicam que, mesmo em uma coorte de LLA-B com número reduzido de pacientes portadores de iAMP21 (2,5%), a ativação coordenada de genes desta região cromossômica pode desempenhar um papel relevante na patogênese da doença.

Embora a marca epigenética associada a *SETD4* ainda não esteja completamente elucidada, evidências sugerem que esta proteína possa catalisar a trimetilação de H4K20, uma modificação histônica geralmente relacionada à repressão gênica (Li et al., 2022; Dai et al., 2017). Na análise dos 50 principais genes diferencialmente expressos (DEGs), observou-se uma redução na expressão de diversos genes no grupo com alta expressão de *SETD4*, o que está em concordância com a possível atuação repressora dessa enzima.

De forma interessante, entre os genes com expressão reduzida em pacientes com níveis elevados de *SETD4*, identificou-se enriquecimento da via KRAS *downregulated* (KRAS DN) (Figuras 15 e 17). Esse achado é consistente com a análise de GSEA,

que demonstrou enriquecimento da via KRAS DN entre os pacientes com baixa expressão de *SETD4* (Figura 16).

Esses resultados sugerem uma relação funcional entre *SETD4* e a via KRAS, possivelmente associada a mecanismos proliferativos. No entanto, ainda não é possível determinar se *SETD4* atua como modulador da via KRAS ou se sua expressão é, ao contrário, regulada por ela. Estudos futuros de superexpressão e silenciamento de *SETD4* serão fundamentais para elucidar a natureza dessa relação e seus efeitos sobre a sinalização mediada por KRAS.

Dessa forma, as análises de expressão gênica, enriquecimento de vias e proliferação celular indicam o envolvimento de *SETD4* na LLA, evidenciando sua participação em processos fundamentais para a proliferação e o desenvolvimento neoplásico. Estudos futuros envolvendo o *knockout* do gene por meio da tecnologia CRISPR/Cas9, bem como ensaios de apoptose e ciclo celular, serão essenciais para caracterizar de maneira mais aprofundada o papel funcional de *SETD4* na leucemia.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para o entendimento do papel de *SETD4* no contexto da LLA-B, integrando análises *in silico*, dados clínicos e experimentos em modelos celulares. De forma geral, as evidências indicam que *SETD4* participaativamente da regulação da proliferação celular e pode estar envolvido em mecanismos genéticos associados à progressão e heterogeneidade citogenética da doença.

As principais conclusões deste estudo são:

- *SETD4* encontra-se superexpresso em amostras de LLA quando comparadas a amostras não leucêmicas.
- A superexpressão de *SETD4* é mais acentuada no subtipo B em relação ao subtipo T da doença.
- Níveis elevados de *SETD4* foram observados em amostras pertencentes ao subtipo citogenético t(12;21), tanto em amostras de pacientes quanto em linhagens celulares.

- Alterações no número de cópias revelaram que amplificações de *SETD4* são frequentes em LLA-B (32,1%), enquanto deleções não foram detectadas na coorte analisada.
- A expressão de *SETD4* correlaciona-se positivamente com genes localizados no cromossomo 21, como *BRWD1*, *HMGN1* e *PAXBP1*, sugerindo corregulação gênica nessa região.
- Pacientes com alta expressão de *SETD4* apresentaram enriquecimento de vias associadas à proliferação celular, incluindo E2F targets, MYC targets e G2M checkpoint.
- Observou-se, ainda, que a superexpressão de *SETD4* está associado à repressão de genes reguladores negativos da via KRAS, indicando possível ativação indireta dessa via proliferativa.
- A superexpressão de *SETD4* se correlacionou com maior sobrevida na coorte analisada.
- A superexpressão de *SETD4* em células Nalm-6 promoveu aumento da taxa de proliferação celular, confirmando experimentalmente seu papel pró-proliferativo.
- O silenciamento de *SETD4* em células REH resultou em redução da proliferação celular, corroborando a função direta de *SETD4* na manutenção do crescimento celular leucêmico.
- O silenciamento de *SETD4* em células REH resultou em redução da proliferação celular, corroborando a função direta de *SETD4* na manutenção do crescimento celular leucêmico.
- Os níveis de *SETD4* estão diretamente relacionados com a sensibilidade ao tratamento com MTX.

Desta forma, os resultados obtidos evidenciam a relevância da regulação epigenética na leucemia e apontam o *SETD4* como um potencial marcador prognóstico e alvo terapêutico. Estudos adicionais são necessários para esclarecer de forma mais abrangente seu papel funcional e impacto biológico.

## 8 PERSPECTIVAS

Este trabalho proporcionou uma análise inicial do papel de *SETD4* na LLA-B. Como próximos passos, propõe-se o desenvolvimento de um modelo *knockout* para *SETD4* por meio do sistema CRISPR/Cas9, permitindo uma investigação mais robusta sobre sua função biológica. Além disso, serão conduzidos ensaios funcionais adicionais, incluindo análises de apoptose e ciclo celular, a fim de aprofundar a compreensão dos mecanismos regulados por *SETD4*.

Adicionalmente, está previsto o RNA-seq das linhagens modificadas para identificar perfis de expressão diferencial e possíveis assinaturas moleculares associadas ao gene.

Por fim, torna-se essencial ampliar a avaliação de *SETD4* no contexto clínico, bem como compará-lo entre diferentes subtipos citogenéticos de LLA, visando compreender se seu papel é conservado, dependente do contexto biológico ou específico de determinados subgrupos.

## 9 REFERÊNCIAS

ABOU DALLE, Iman *et al.* Treatment of Philadelphia Chromosome Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. **Current treatment options in oncology**, v. 20, n. 1, p. 4, 24 jan. 2019.

ALBERT, Mareike; HELIN, Kristian. Histone methyltransferases in cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, The Cellular and Developmental Program Connecting the Centrosome and Cilium and Epigenetics - mechanisms and disease. v. 21, n. 2, p. 209–220, 1 abr. 2010.

ALLFREY, V. G.; FAULKNER, R.; MIRSKY, A. E. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS\*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 51, n. 5, p. 786–794, maio 1964.

AMIN, Sk Abdul *et al.* Are inhibitors of histone deacetylase 8 (HDAC8) effective in hematological cancers especially acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL)? **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 258, p. 115594, 5 out. 2023.

ANDERSSON, Anna K. *et al.* The landscape of somatic mutations in Infant MLL rearranged acute lymphoblastic leukemias. **Nature genetics**, v. 47, n. 4, p. 330–337, abr. 2015.

ARBER, Daniel A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 19 maio 2016.

BARGHOUT, Samir H.; MACHADO, Raquel Arminda Carvalho; BARSYTE-LOVEJOY, Dalia. Chemical biology and pharmacology of histone lysine methylation inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1865, n. 6, p. 194840, 1 ago. 2022.

BARUCHEL, André et al. Down syndrome and leukemia: from basic mechanisms to clinical advances. **Haematologica**, v. 108, n. 10, p. 2570–2581, 13 jul. 2023.

BENNETT, Richard L. et al. The Role of Nuclear Receptor-Binding SET Domain Family Histone Lysine Methyltransferases in Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 6, p. a026708, jun. 2017.

BOETTCHER, Michael; McMANUS, Michael T. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN or CRISPR. **Molecular cell**, v. 58, n. 4, p. 575–585, 21 maio 2015.

BORSSÉN, Magnus et al. DNA Methylation Adds Prognostic Value to Minimal Residual Disease Status in Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 63, n. 7, p. 1185–1192, 2016.

BRANDALISE, Silvia R. et al. Benefits of the intermittent use of 6-mercaptopurine and methotrexate in maintenance treatment for low-risk acute lymphoblastic leukemia in children: randomized trial from the Brazilian Childhood Cooperative Group--protocol ALL-99. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 11, p. 1911–1918, 10 abr. 2010.

BURMEISTER, Thomas et al. Molecular characterization of TCF3::PBX1 chromosomal breakpoints in acute lymphoblastic leukemia and their use for measurable residual disease assessment. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 15167, 13 set. 2023.

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, abr. 2009.

CANEVAROLO, Rafael Renatino; CURY, Nathalia Moreno; YUNES, José Andrés. The Expression and Activation of the NF-κB Pathway Correlate with Methotrexate Resistance and Cell Proliferation in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Genes**, v. 14, n. 10, p. 1880, out. 2023.

CARROLL, Andrew J. et al. Pre-B Cell Leukemia Associated With Chromosome Translocation 1; 19. **Blood**, v. 63, n. 3, p. 721–724, 1 mar. 1984.

CHEN, Chun-Wei; ARMSTRONG, Scott A. Targeting DOT1L and HOX Gene Expression in MLL-Rearranged Leukemia and Beyond. **Experimental hematology**, v. 43, n. 8, p. 673–684, ago. 2015.

CHICAYBAM, Leonardo *et al.* An Efficient Electroporation Protocol for the Genetic Modification of Mammalian Cells. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, p. 99, 23 jan. 2017.

DAI, Li *et al.* SETD4 Regulates Cell Quiescence and Catalyzes the Trimethylation of H4K20 during Diapause Formation in Artemia. **Molecular and Cellular Biology**, v. 37, n. 7, p. e00453-16, 17 mar. 2017.

DAIGLE, Scott R. *et al.* Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 1017–1025, 8 ago. 2013.

DAVALOS, Veronica; ESTELLER, Manel. Cancer epigenetics in clinical practice. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 4, p. 376–424, 2023.

DIAO, Yarui *et al.* Pax3/7BP Is a Pax7- and Pax3-Binding Protein that Regulates the Proliferation of Muscle Precursor Cells by an Epigenetic Mechanism. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 2, p. 231–241, 3 ago. 2012.

DOUDNA, Jennifer A. The promise and challenge of therapeutic genome editing. **Nature**, v. 578, n. 7794, p. 229–236, fev. 2020.

DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science (New York, N.Y.)**, v. 346, n. 6213, p. 1258096, 28 nov. 2014.

DUFFIELD, Amy S.; MULLIGHAN, Charles G.; BOROWITZ, Michael J. International Consensus Classification of Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 482, n. 1, p. 11–26, jan. 2023.

EL CHAER, Firas; KENG, Michael; BALLEN, Karen K. MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 15, n. 2, p. 83–89, abr. 2020.

FARIA, Jerusa Araújo Quintão Arantes *et al.* SET domain-containing Protein 4 (SETD4) is a Newly Identified Cytosolic and Nuclear Lysine Methyltransferase involved in Breast Cancer Cell Proliferation. **Journal of cancer science & therapy**, v. 5, n. 2, p. 58–65, 21 jan. 2013a.

FARIA, Jerusa Araújo Quintão Arantes *et al.* SET domain-containing Protein 4 (SETD4) is a Newly Identified Cytosolic and Nuclear Lysine Methyltransferase involved in Breast Cancer Cell Proliferation. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 5, n. 2, p. 58–65, 21 jan. 2013b.

FENG, Xing *et al.* Deletion of mouse Setd4 promotes the recovery of hematopoietic failure. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 107, n. 4, p. 779–792, 15 jul. 2020.

FIGUEROA, Maria E. *et al.* Integrated genetic and epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 7, p. 3099–3111, jul. 2013.

FONATSCH, Christa. The role of chromosome 21 in hematology and oncology. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 49, n. 6, p. 497–508, 2010.

FU, Lin *et al.* High expression of ETS2 predicts poor prognosis in acute myeloid leukemia and may guide treatment decisions. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, p. 159, 19 jul. 2017.

GABRIEL, Alem S. *et al.* Epigenetic landscape correlates with genetic subtype but does not predict outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Epigenetics**, v. 10, n. 8, p. 717–726, 3 ago. 2015.

GANESAN, A. *et al.* The timeline of epigenetic drug discovery: from reality to dreams. **Clinical Epigenetics**, v. 11, p. 174, 2 dez. 2019.

GAO, Qingsong *et al.* The genomic landscape of acute lymphoblastic leukemia with intrachromosomal amplification of chromosome 21. **Blood**, v. 142, n. 8, p. 711–723, 24 ago. 2023.

GU, Zhaohui *et al.* Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 13331, 8 nov. 2016.

HAAS, Oskar A.; BORKHARDT, Arndt. Hyperdiploidy: the longest known, most prevalent, and most enigmatic form of acute lymphoblastic leukemia in children. **Leukemia**, v. 36, n. 12, p. 2769–2783, dez. 2022.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.

HOLLIDAY, R. The inheritance of epigenetic defects. **Science (New York, N.Y.)**, v. 238, n. 4824, p. 163–170, 9 out. 1987.

HU, Bo *et al.* Therapeutic siRNA: state of the art. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 101, 19 jun. 2020.

HUANG, Yao-Hui *et al.* CREBBP/EP300 mutations promoted tumor progression in diffuse large B-cell lymphoma through altering tumor-associated macrophage polarization via FBXW7-NOTCH-CCL2/CSF1 axis. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, p. 10, 11 jan. 2021.

HUNGER, Stephen P.; MULLIGHAN, Charles G. Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. **Blood**, v. 125, n. 26, p. 3977–3987, 25 jun. 2015.

HUSMANN, Dylan; GOZANI, Or. Histone lysine methyltransferases in biology and disease. **Nature structural & molecular biology**, v. 26, n. 10, p. 880–889, out. 2019.

IACOBucci, Ilaria; MULLIGHAN, Charles G. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 9, p. 975–983, 20 mar. 2017.

- IZRAELI, Shai. Similar yet different. **Blood**, v. 116, n. 7, p. 1019–1020, 19 ago. 2010.
- JANCZAR, Szymon *et al.* The Role of Histone Protein Modifications and Mutations in Histone Modifiers in Pediatric B-Cell Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancers**, v. 9, n. 1, p. 2, 3 jan. 2017.
- KAMPS, M. P. E2A-Pbx1 Induces Growth, Blocks Differentiation, and Interacts with Other Homeodomain Proteins Regulating Normal Differentiation. In: RAUSCHER, Frank J.; VOGT, Peter K. (Orgs.). **Chromosomal Translocations and Oncogenic Transcription Factors**. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer, 1997. p. 25–43.
- LABUN, Kornel *et al.* CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W171, 20 maio 2019.
- LANE, Andrew A. *et al.* Triplication of a 21q22 region contributes to B cell transformation through HMGN1 overexpression and loss of histone H3 Lys27 trimethylation. **Nature Genetics**, v. 46, n. 6, p. 618–623, jun. 2014.
- LARSEN, Eric C. *et al.* Dexamethasone and High-Dose Methotrexate Improve Outcome for Children and Young Adults With High-Risk B-Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From Children's Oncology Group Study AALL0232. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 20, p. 2380–2388, 10 jul. 2016.
- LI, Guang-Ming *et al.* RNAi screening with shRNAs against histone methylation-related genes reveals determinants of sorafenib sensitivity in hepatocellular carcinoma cells. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 3, p. 1085–1092, 2014.
- LI, Shizhao; TOLLEFSBOL, Trygve O. DNA methylation methods: global DNA methylation and methylomic analyses. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 187, p. 28–43, mar. 2021.
- LI, Yanjing *et al.* The engagement of histone lysine methyltransferases with nucleosomes: structural basis, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. **Protein & Cell**, v. 14, n. 3, p. 165–179, 27 jul. 2022.
- LI, Zhenhua *et al.* Molecular and pharmacological heterogeneity of ETV6::RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. **Nature Communications**, v. 16, n. 1, p. 1153, 29 jan. 2025.
- LIAO, Xiaomin *et al.* SETD4 in the Proliferation, Migration, Angiogenesis, Myogenic Differentiation and Genomic Methylation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 17, n. 4, p. 1374–1389, ago. 2021.
- LING, Victoria Y. *et al.* Targeting cell cycle and apoptosis to overcome chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 37, n. 1, p. 143–153, jan. 2023.
- LIU, Lanxin *et al.* Genetic alterations of histone lysine methyltransferases and their significance in breast cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 4, p. 2466–2482, 11 dez. 2014.

LIU, Ying *et al.* E2F transcription factor 1 as a potential prognostic biomarker and promotes tumor proliferation in skin cutaneous melanoma. **Pathology - Research and Practice**, v. 269, p. 155875, maio 2025.

MA, Qinglong *et al.* The roles of KRAS in cancer metabolism, tumor microenvironment and clinical therapy. **Molecular Cancer**, v. 24, n. 1, p. 14, 13 jan. 2025.

MAESE, Luke; RAETZ, Elizabeth A. Can Ph-like ALL be effectively targeted? **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 32, n. 4, p. 101096, dez. 2019.

MALONEY, Kelly W. *et al.* Outcome in Children With Standard-Risk B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of Children's Oncology Group Trial AALL0331. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 6, p. 602–612, 20 fev. 2020.

MANDAL, Malay *et al.* BRWD1 orchestrates epigenetic landscape of late B lymphopoiesis. **Nature Communications**, v. 9, p. 3888, 24 set. 2018.

MAR, Brenton G. *et al.* Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Nature communications**, v. 5, p. 3469, 24 mar. 2014.

MARSCHALEK, Rolf. Systematic Classification of Mixed-Lineage Leukemia Fusion Partners Predicts Additional Cancer Pathways. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 36, n. 2, p. 85–100, mar. 2016.

MARZOCHI, Ludimila Leite *et al.* Use of histone methyltransferase inhibitors in cancer treatment: A systematic review. **European Journal of Pharmacology**, v. 944, p. 175590, 5 abr. 2023.

MATTEI, Alexandra L.; BAILLY, Nina; MEISSNER, Alexander. DNA methylation: a historical perspective. **Trends in Genetics**, v. 38, n. 7, p. 676–707, jul. 2022.

MERMEL, Craig H. *et al.* GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. **Genome Biology**, v. 12, n. 4, p. R41, 2011.

MEYER, C. *et al.* The KMT2A recombinome of acute leukemias in 2023. **Leukemia**, v. 37, n. 5, p. 988–1005, 2023.

MONTAÑO, Adrián *et al.* ETV6/RUNX1 Fusion Gene Abrogation Decreases the Oncogenicity of Tumour Cells in a Preclinical Model of Acute Lymphoblastic Leukaemia. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 215, 15 jan. 2020.

MOORMAN, Anthony V. *et al.* Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. **The Lancet. Oncology**, v. 11, n. 5, p. 429–438, maio 2010.

MORENO, Daniel Antunes *et al.* research paper: Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute

lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 150, n. 6, p. 665–673, 2010.

MORGAN, Marc A. J.; SHILATIFARD, Ali. Reevaluating the roles of histone-modifying enzymes and their associated chromatin modifications in transcriptional regulation. **Nature Genetics**, v. 52, n. 12, p. 1271–1281, dez. 2020.

MORRISON, Olivia; THAKUR, Jitendra. Molecular Complexes at Euchromatin, Heterochromatin and Centromeric Chromatin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6922, 28 jun. 2021.

MULLIGHAN, Charles G. et al. Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 5, p. 470–480, 29 jan. 2009.

NISHIYAMA, Atsuya; NAKANISHI, Makoto. Navigating the DNA methylation landscape of cancer. **Trends in Genetics**, v. 37, n. 11, p. 1012–1027, nov. 2021.

NORDLUND, Jessica et al. Genome-wide signatures of differential DNA methylation in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Genome Biology**, v. 14, n. 9, p. r105, 2013.

NORDLUND, Jessica et al. DNA methylation-based subtype prediction for pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Clinical Epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 11, 2015.

NORDLUND, Jessica; SYVÄNEN, Ann-Christine. Epigenetics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Seminars in Cancer Biology**, v. 51, p. 129–138, ago. 2018.

NUÑEZ, Yanara et al. NSD3 in Cancer: Unraveling Methyltransferase-Dependent and Isoform-Specific Functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, p. 944, 12 jan. 2024.

OGINO, Jayme; DOU, Yali. Histone methyltransferase KMT2A: Developmental regulation to oncogenic transformation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 300, n. 10, p. 107791, 18 set. 2024.

OSHI, Masanori et al. G2M checkpoint pathway alone is associated with drug response and survival among cell proliferation-related pathways in pancreatic cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 11, n. 6, p. 3070–3084, 15 jun. 2021.

OYER, J. A. et al. Point mutation E1099K in MMSET/NSD2 enhances its methyltranferase activity and leads to altered global chromatin methylation in lymphoid malignancies. **Leukemia**, v. 28, n. 1, p. 198–201, jan. 2014.

PAGE, Elyse C. et al. HMGN1 plays a significant role in CRLF2 driven Down Syndrome leukemia and provides a potential therapeutic target in this high-risk cohort. **Oncogene**, v. 41, n. 6, p. 797–808, fev. 2022.

PAGE, Elyse C. et al. Gain of chromosome 21 increases the propensity for P2RY8: :CRLF2 acute lymphoblastic leukemia via increased HMGN1 expression. **Frontiers in Oncology**, v. 13, p. 1177871, 6 jul. 2023.

- PANUCIAK, Kinga *et al.* Overview on Aneuploidy in Childhood B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, p. 8764, 15 maio 2023.
- PARKER, H. *et al.* Genomic disruption of the histone methyltransferase SETD2 in chronic lymphocytic leukaemia. **Leukemia**, v. 30, n. 11, p. 2179–2186, nov. 2016.
- PAULSSON, Kajsa *et al.* The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. **Nature Genetics**, v. 47, n. 6, p. 672–676, jun. 2015.
- PETROSSIAN, Tanya C.; CLARKE, Steven G. Uncovering the Human Methyltransferasome. **Molecular & Cellular Proteomics : MCP**, v. 10, n. 1, p. M110.000976, jan. 2011.
- POLAK, Roel *et al.* Autophagy inhibition as a potential future targeted therapy for ETV6-RUNX1-driven B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 104, n. 4, p. 738–748, abr. 2019.
- PUI, Ching-Hon *et al.* Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 551–565, 10 fev. 2011.
- PUI, Ching-Hon *et al.* Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 27, p. 2938–2948, 20 set. 2015.
- PUI, Ching-Hon; ROBISON, Leslie L.; LOOK, A. Thomas. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 371, n. 9617, p. 1030–1043, 22 mar. 2008.
- RABIN, Karen R.; WHITLOCK, James A. Malignancy in Children with Trisomy 21. **The oncologist**, v. 14, n. 2, p. 164–173, fev. 2009.
- REHN, Jacqueline A. *et al.* DUX Hunting—Clinical Features and Diagnostic Challenges Associated with DUX4-Rearranged Leukaemia. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 2815, 30 set. 2020.
- ROGAWSKI, David S. *et al.* Discovery of first-in-class inhibitors of ASH1L histone methyltransferase with anti-leukemic activity. **Nature Communications**, v. 12, p. 2792, 14 maio 2021.
- RYAN, Sarra L. *et al.* Whole genome sequencing provides comprehensive genetic testing in childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Leukemia**, v. 37, n. 3, p. 518–528, mar. 2023.
- SADAKIERSKA-CHUDY, Anna; KOSTRZEWA, Richard M.; FILIP, Małgorzata. A Comprehensive View of the Epigenetic Landscape Part I: DNA Methylation, Passive and Active DNA Demethylation Pathways and Histone Variants. **Neurotoxicity Research**, v. 27, n. 1, p. 84–97, 2015.

- SÁNCHEZ-RIVERA, Francisco J.; JACKS, Tyler. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. **Nature reviews. Cancer**, v. 15, n. 7, p. 387–395, jul. 2015a.
- SÁNCHEZ-RIVERA, Francisco J.; JACKS, Tyler. Applications of the CRISPR–Cas9 system in cancer biology. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 7, p. 387–393, jul. 2015b.
- SCHÄFER, Vivien *et al.* EZH2 mutations and promoter hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, n. 7, p. 1641–1650, 1 jul. 2016.
- SETTEN, Ryan L.; ROSSI, John J.; HAN, Si-ping. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 6, p. 421–446, jun. 2019.
- SHANMUGAM, Geetha; RAKSHIT, Sudeshna; SARKAR, Koustav. HDAC inhibitors: Targets for tumor therapy, immune modulation and lung diseases. **Translational Oncology**, v. 16, p. 101312, 16 dez. 2021.
- SHVEDUNOVA, Maria; AKHTAR, Asifa. Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 5, p. 329–349, maio 2022.
- SNEAD, Nicholas M. *et al.* Molecular basis for improved gene silencing by Dicer substrate interfering RNA compared with other siRNA variants. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 12, p. 6209–6221, jul. 2013.
- SONNEMANN, Jürgen *et al.* Increased activity of histone deacetylases in childhood acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia: support for histone deacetylase inhibitors as antileukaemic agents. **British Journal of Haematology**, v. 158, n. 5, p. 664–666, set. 2012.
- SOOD, Raman; KAMIKUBO, Yasuhiko; LIU, Paul. Role of RUNX1 in hematological malignancies. **Blood**, v. 129, n. 15, p. 2070–2082, 13 abr. 2017.
- STEIN, Eytan M. *et al.* The DOT1L inhibitor pinometostat reduces H3K79 methylation and has modest clinical activity in adult acute leukemia. **Blood**, v. 131, n. 24, p. 2661–2669, 14 jun. 2018.
- STUBBS, Matthew C. *et al.* Selective Inhibition of HDAC1 and HDAC2 as a Potential Therapeutic Option for B-ALL. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 21, n. 10, p. 2348–2358, 15 maio 2015.
- STUMPEL, Dominique J. P. M. *et al.* Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options. **Blood**, v. 114, n. 27, p. 5490–5498, 24 dez. 2009.

SUNGALEE, Stephanie *et al.* Histone acetylation dynamics modulates chromatin conformation and allele-specific interactions at oncogenic loci. **Nature Genetics**, v. 53, n. 5, p. 650–662, maio 2021.

TANAKA, Yosuke *et al.* Transcriptional activities of DUX4 fusions in B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 103, n. 11, p. e522–e526, nov. 2018.

TANDON, Neha *et al.* Generation of Stable Expression Mammalian Cell Lines Using Lentivirus. **Bio-protocol**, v. 8, n. 21, p. e3073, 5 nov. 2018.

TELLES, Luis Augusto Muniz *et al.* Abstract 4758: SETD4 transcription levels correlates with leukemic burden and SMYD2 transcription in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Research**, v. 83, n. 7\_Supplement, p. 4758, 4 abr. 2023.

TIAN, Jin-Ze *et al.* SETD4-expressing cells contribute to pancreatic development and response to cerulein induced pancreatitis injury. **Scientific Reports**, v. 11, p. 12614, 15 jun. 2021.

TORRANO, Veronica *et al.* ETV6-RUNX1 promotes survival of early B lineage progenitor cells via a dysregulated erythropoietin receptor. **Blood**, v. 118, n. 18, p. 4910–4918, 3 nov. 2011.

VENKATESWARAN, Niranjan; CONACCI-SORRELL, Maralice. MYC leads the way. **Small GTPases**, v. 11, n. 2, p. 86–94, 25 nov. 2017.

WANG, Chong *et al.* SETD4 inhibits prostate cancer development by promoting H3K27me3-mediated NUPR1 transcriptional repression and cell cycle arrest. **Cancer Letters**, v. 579, p. 216464, 28 nov. 2023.

WANG, Haifeng; LA RUSSA, Marie; QI, Lei S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 227–264, 2 jun. 2016.

WANG, Yuan *et al.* SETD4-mediated KU70 methylation suppresses apoptosis. **Cell Reports**, v. 39, n. 6, p. 110794, maio 2022.

WANG, Yuan; SHEN, Zhiyuan. Unmasking the mammalian SET domain-containing protein 4. **NAR Cancer**, v. 4, n. 3, p. zcac021, 13 jul. 2022.

WEI, Feng *et al.* High-mobility group nucleosome-binding protein 1 is a novel clinical biomarker in non-small cell lung cancer. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 36, n. 12, p. 9405–9410, dez. 2015.

WU, Qin *et al.* Protein arginine methylation: from enigmatic functions to therapeutic targeting. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 7, p. 509–530, jul. 2021.

WU, Xianli *et al.* HMGN1 loss sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. **Scientific Reports**, v. 14, p. 10386, 6 maio 2024.

XIAO, Bing *et al.* Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. **Nature**, v. 421, n. 6923, p. 652–656, fev. 2003.

- XING, Sheng *et al.* Setd4 controlled quiescent c-Kit+ cells contribute to cardiac neovascularization of capillaries beyond activation. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 11603, 2 jun. 2021.
- XU, Huan *et al.* Genetic and Epigenetic Targeting Therapy for Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 3349, 29 nov. 2021.
- YASUDA, Takahiko *et al.* Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. **Nature Genetics**, v. 48, n. 5, p. 569–574, maio 2016.
- YE, Sen *et al.* SET Domain-Containing Protein 4 Epigenetically Controls Breast Cancer Stem Cell Quiescence. **Cancer Research**, v. 79, n. 18, p. 4729–4743, 15 set. 2019.
- YI, Yan; GE, Shenglei. Targeting the histone H3 lysine 79 methyltransferase DOT1L in MLL-rearranged leukemias. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, p. 35, 24 mar. 2022.
- ZHANG, Jinghui *et al.* Deregulation of DUX4 and ERG in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Nature genetics**, v. 48, n. 12, p. 1481–1489, dez. 2016.
- ZHAO, Ailin *et al.* Epigenetic regulation in hematopoiesis and its implications in the targeted therapy of hematologic malignancies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 71, 17 fev. 2023.
- ZHONG, Yuyun *et al.* Identification of SETD4 as an Onco-Immunological Biomarker Encompassing the Tumor Microenvironment, Prognoses, and Therapeutic Responses in Various Human Cancers. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 13, n. 1, p. e70126, 16 jan. 2025.
- ZHU, Li *et al.* ASH1L Links Histone H3 Lysine 36 di-methylation to MLL Leukemia. **Cancer discovery**, v. 6, n. 7, p. 770–783, jul. 2016.
- ZHU, Liwen *et al.* ZNF384-Related Fusion Genes in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Control : Journal of the Moffitt Cancer Center**, v. 30, p. 10732748231182787, 12 jun. 2023.
- ZHU, Xiaofan *et al.* Identification of functional cooperative mutations of SETD2 in human acute leukemia. **Nature Genetics**, v. 46, n. 3, p. 287–293, mar. 2014.