



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

MARTHA SILVA ESTRÊLA

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE
METILTRANSFERASES PROTEICAS NO CÂNCER COLORRETAL

Brasília

2014

MARTHA SILVA ESTRÊLA

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE
METILTRANSFERASES PROTEICAS NO CÂNCER COLORRETAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pittella Silva

Brasília

2014

MARTHA SILVA ESTRÊLA

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE
METILTRANSFERASES PROTEICAS NO CÂNCER COLORRETAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Pittella Silva (Presidente)

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa (Membro Efetivo)

Prof. Dr. João Batista de Sousa (Membro Efetivo)

Prof^ª. Dr^ª. Andrea Barretto Motoyama (Membro Suplente)

Ao Prof. Dr. Cezar Martins de Sá (*in memoriam*),
que me encaminhou no universo da pesquisa
científica, viveu com amor indescritível o fascínio
pela ciência e deixa saudades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, pela oportunidade.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Fábio Pittella Silva, pela confiança, orientação, ensinamento e principalmente pela paciência.

À Prof^a. Dr^a. Andrea Barretto Motoyama, ao Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira, à Dr^a. Doralina do Amaral Rabello Ramos, ao Dr. João Nunes de Matos Neto, e ao Dr. Luís Henrique Toshihiro Sakamoto. Para mim, vocês são um poço sem fim de conhecimento. Muito obrigada por todo suporte dado, pelas as dúvidas sanadas e sugestões oferecidas. Obrigada também pelos ensinamentos extra-acadêmicos e pelas portas abertas que permitiram que eu concluísse esse trabalho. Vocês todos tem um peso muito grande na minha formação acadêmica, profissional e pessoal, estejam certos disso.

À toda equipe da Coloproctologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), pelo total apoio e parceria no que envolveu a coleta de amostras clínicas. A organização e liderança da equipe de vocês foram sensacionais e fundamentais para que eu pudesse desenvolver o meu trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Molecular do Câncer (PMC), por me auxiliarem em tudo o que precisei, sempre ajudando a pensar fora da caixa quando algum imprevisto ou problema acontecia durante meus experimentos (e não foram poucos).

À minha enorme família, dos Anjos e das Estrelas, pelo amor e incentivo em todas as etapas da minha vida. Especialmente aos meus queridos avós, Bela e Bonifácio, que me fazem sentir capaz de ganhar o mundo!

À família de perto, pai, mãe, Tati e Serginho, por acreditarem em mim, pela (infinita) paciência, pela confiança depositada, carinho e amor incondicional. Sem dúvidas não concluiria mais uma fase sem o suporte de vocês, que são minha base e

meus exemplos de fé, conduta, perseverança e conquista. Amo vocês. Vocês são a melhor parte de mim.

Às amigas que são mais chegadas que irmãs: Adriana, Hadassa, Nathália e Rebeca. Estamos juntas desde a infância e agora temos mais essa conquista para comemorar! Muito obrigada pelo apoio, compreensão, suporte e palavras de incentivo.

Às amigas que entraram em minha vida em 2007, junto com a Biologia: Clara, Karenina, Lígia e Rafaela. Vivemos juntas e de perto a fase da Graduação e Pós-Graduação, e vocês foram mais do que fundamentais para os momentos acadêmicos e fases de dilema. Sem vocês não teria sido como foi.

Aos *PMC Friends* Carolina, Luana, Luciana, Maíra e Rubens. Só nós sabemos o que passamos e o quanto conversamos nesse momento juntos. Vocês foram o meu apoio e inspiração (do que fazer e do que não fazer, a propósito) durante o Mestrado. Um agradecimento especial ao Rubens, por segurar a barra final do Mestrado comigo. #tamojunto.

Às mulheres e homens vítimas do câncer colorretal que, anonimamente, tornaram este trabalho possível. Obrigada pelo apoio acadêmico, científico e pela cordialidade, mesmo em um momento tão delicado de suas vidas. Agradeço por ter conhecido pessoas que apoiaram meu trabalho da forma que nenhuma outra poderia apoiar: com esperança. Cada conversa que tivemos me edificou como ser humano, talvez vocês nem tenham ideia disso. Obrigada. E dias melhores virão, nós chegamos a essa conclusão.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens e o segundo entre as mulheres em todo o mundo. O rastreamento regular pode prevenir muitos casos de CCR e resultar na detecção e diagnóstico precoce, quando pode ser altamente curável. Vários fatores de risco tem sido identificados na gênese do CCR, porém nenhum de forma isolada explica completamente a carcinogênese do cólon e reto. O CCR se desenvolve ao longo de décadas e consiste em uma série de alterações genéticas e epigenéticas que conduzem à transformação maligna. Algumas das alterações genéticas já descritas relacionadas com a carcinogênese colorretal envolvem os genes *KRAS*, *p53* e elementos da via de sinalização TGF- β , como *TGFBR2* e *SMAD4*. Alterações epigenéticas tem se mostrado cada vez mais relevantes na gênese de vários tumores, e tem como característica básica não causar modificações na sequência do DNA, mas sim promover expressão seletiva dos genes dependente do nível do empacotamento do DNA. A metilação de histonas é um dos principais e mais estudados eventos epigenéticos. SETD e NSD são famílias de metiltransferases composta por 10 e 3 genes, respectivamente, que codificam proteínas com domínio SET. Este domínio está envolvido na metilação de resíduos de lisina em histonas e proteínas não-histonas. Até o momento, pouco se sabe sobre a relação de genes das famílias SETD e NSD com a carcinogênese colorretal. No presente estudo foi realizada a avaliação de expressão relativa de todos os genes das famílias SETD e NSD em amostras de tecidos tumorais e normais de pacientes portadores de CCR através de técnica de PCR em tempo real. O perfil de expressão comparativa dessas famílias de genes foi correlacionado com as informações clínico-patológicas de maior relevância prognóstica, disponíveis dos pacientes. Notamos que os genes *SETD1A* e *SETD6* encontram-se significativamente superexpressos nas amostras tumorais de pacientes com até 60 anos quando comparadas às amostras tumorais de pacientes acima de 60 anos. Esses dois genes também apresentaram expressão correlacionada nesse grupo avaliado. Quando analisamos apenas as amostras tumorais de pacientes com invasão perineural não evidenciada, comparadas às amostras tumorais de pacientes com invasão perineural evidenciada, observamos superexpressão do gene *NSD3*. Em análise pareada de amostras de tecidos normal e tumoral verificamos a hipossupressão dos genes *SETD2* e *SETD8* nas amostras tumorais. Esses dois genes também possuem expressão correlacionada nesses tecidos. Desta forma, nossos dados sugerem *NSD3* como um possível marcador molecular de melhor prognóstico para pacientes diagnosticados com CCR, além de *SETD2* e *SETD8* como um possível alvo molecular para o diagnóstico do CCR.

Palavras-chave: Câncer colorretal, expressão gênica, família NSD, família SETD.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer among men and the second among women worldwide. Regular screening can prevent many cases of CRC and result in early detection and diagnosis, as can be highly curable. Several risk factors have been identified in the genesis of CRC, but none alone explains the carcinogenesis in colon and rectum. CRC develops over decades and consists of a series of genetic and epigenetic alterations that lead to malignant transformation. Some of these genetic changes related to colorectal carcinogenesis involves *KRAS*, *p53* and signaling pathway components of the TGF- β as *TGFBR2* and *SMAD4*. Epigenetic changes have been shown to be increasingly important in the genesis of many tumor types, and its basic characteristic is not cause changes in the DNA sequence but also induce selective gene expression dependent on DNA packaging level. Histone methylation is one of the leading and most studied epigenetic events. SETD and NSD methyltransferase families are composed of 10 and 3 genes, respectively, encoding proteins with SET domain. This domain is involved in methylation of lysine residues on histones and non-histone proteins. So far, little is known about the relation of SETD and NSD genes with colorectal carcinogenesis. In this study we evaluated relative expression of all genes of SETD and NSD families in samples of normal tissue and tumor tissue of patients with CRC through real time PCR. The comparative expression profile of these gene families was correlated with clinical and pathological information of greater prognostic relevance available from patients. Here we show that *SETD1A* and *SETD6* genes are significantly overexpressed in tumor samples from patients younger than 60 years when compared to tumor samples from patients over 60 years. These two genes also showed correlated expression in this evaluated group. When we analyzed only tumor samples from patients without perineural invasion, compared to tumor samples from patients with perineural invasion, we observed overexpression of *NSD3* gene. In paired analysis of normal tissue samples and tumor tissues samples we verified low expression of *SETD2* and *SETD8* genes in tumor samples. These two genes also have correlated expression in these tissues. Thus, our data suggested *NSD3* as a possible molecular marker of better prognostic for patients diagnosed with CRC, and *SETD2* and *SETD8* as a possible molecular target for the diagnostic of CRC.

Keywords: Colorectal cancer, gene expression, NSD family, SETD family.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. As oito capacidades adquiridas do câncer propostas por Hanahan e Weinberg em 2011.	8
Figura 2. Modelo esquemático da organização estrutural do nucleossomo.	13
Figura 3. Modelo esquemático de alteração estrutural na cromatina por modificações epigenéticas.	15
Figura 4. Captação de fragmentos de amostras clínicas.	31
Figura 5. Avaliação da integridade do RNA extraído de linhagens celulares e amostras clínicas.	34
Figura 6. Análise dos cDNAs sintetizados a partir do RNA extraído de amostras clínicas.	36
Figura 7. Curva de padronização por qPCR de alguns dos ensaios adquiridos.	38
Figura 8. Δ CT dos genes das famílias SETD e NSD em linhagem celular de câncer colorretal.	44
Figura 9. Expressão relativa do <i>SETD2</i> em amostras pareadas de câncer colorretal.	45
Figura 10. Expressão relativa do <i>SETD8</i> em amostras pareadas de câncer colorretal.	46
Figura 11. Correlação de expressão entre <i>SETD2</i> e <i>SETD8</i> em amostras clínicas pareadas.	47
Figura 12. Expressão relativa de <i>SETD1A</i> , <i>SETD1B</i> , <i>SETD3</i> , <i>SETD4</i> , <i>SETD5</i> , <i>SETD6</i> , <i>SETD7</i> e <i>SETMAR</i> em amostras pareadas de câncer colorretal.	48
Figura 13. Expressão relativa de <i>NSD1</i> , <i>NSD2</i> e <i>NSD3</i> em amostras pareadas de câncer colorretal.	49
Figura 14. Expressão relativa de <i>SETD1A</i> , <i>SETD1B</i> , <i>SETD2</i> , <i>SETD3</i> , <i>SETD4</i> , <i>SETD5</i> , <i>SETD6</i> , <i>SETD7</i> , <i>SETD8</i> e <i>SETMAR</i> e sexo dos pacientes.	50
Figura 15. Expressão relativa de <i>NSD1</i> , <i>NSD2</i> e <i>NSD3</i> e sexo dos pacientes.	51

Figura 16. Expressão relativa do <i>SETD1A</i> e idade dos pacientes.....	52
Figura 17. Expressão relativa do <i>SETD6</i> e idade dos pacientes.....	53
Figura 18. Correlação de expressão entre <i>SETD1A</i> e <i>SETD6</i> em pacientes com idade menos avançada (até 60 anos).	54
Figura 19. Expressão relativa de <i>SETD1B</i> , <i>SETD2</i> , <i>SETD3</i> , <i>SETD4</i> , <i>SETD5</i> , <i>SETD7</i> , <i>SETD8</i> e <i>SETMAR</i> e idade dos pacientes.....	55
Figura 20. Expressão relativa de <i>NSD1</i> , <i>NSD2</i> e <i>NSD3</i> e idade dos pacientes.....	56
Figura 21. Expressão relativa de <i>SETD1A</i> , <i>SETD1B</i> , <i>SETD2</i> , <i>SETD3</i> , <i>SETD4</i> , <i>SETD5</i> , <i>SETD6</i> e <i>SETD8</i> e extensão microscópica do tumor.	57
Figura 22. Expressão relativa de <i>NSD1</i> , <i>NSD2</i> e <i>NSD3</i> e extensão microscópica do tumor.....	58
Figura 23. Expressão relativa de <i>NSD3</i> e invasão perineural.....	59
Figura 24. Expressão relativa de <i>SETD1A</i> , <i>SETD1B</i> , <i>SETD2</i> , <i>SETD3</i> , <i>SETD4</i> , <i>SETD5</i> , <i>SETD6</i> , <i>SETD7</i> , <i>SETD8</i> e <i>SETMAR</i> e invasão perineural.	60
Figura 25. Expressão relativa de <i>NSD1</i> e <i>NSD2</i> e invasão perineural.....	61
Figura 26. Expressão relativa de <i>SETD1A</i> , <i>SETD1B</i> , <i>SETD2</i> , <i>SETD3</i> , <i>SETD4</i> , <i>SETD5</i> , <i>SETD6</i> , <i>SETD7</i> , <i>SETD8</i> e <i>SETMAR</i> e linfonodos acometidos.....	62
Figura 27. Expressão relativa de <i>NSD1</i> , <i>NSD2</i> e <i>NSD3</i> e linfonodos acometidos.....	63
Figura 28. Expressão relativa de <i>SETD1A</i> , <i>SETD1B</i> , <i>SETD2</i> , <i>SETD3</i> , <i>SETD4</i> , <i>SETD5</i> , <i>SETD6</i> , <i>SETD7</i> , <i>SETD8</i> e <i>SETMAR</i> e estadiamento.	65
Figura 29. Expressão relativa de <i>NSD1</i> , <i>NSD2</i> e <i>NSD3</i> e estadiamento.....	65
Figura 30. Expressão relativa de <i>SETD1A</i> , <i>SETD1B</i> , <i>SETD2</i> , <i>SETD3</i> , <i>SETD4</i> , <i>SETD5</i> , <i>SETD6</i> , <i>SETD7</i> , <i>SETD8</i> e <i>SETMAR</i> e instabilidade microssatélite.....	66
Figura 31. Expressão relativa de <i>NSD1</i> , <i>NSD2</i> e <i>NSD3</i> e instabilidade microssatélite..	67

Figura 32. Análise de presença global das proteínas SETD1A e NSD3 em amostras de
câncer colorretal..... 68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Estadiamento TNM do câncer colorretal.	3
Tabela 2. Agrupamento por estádios anatômicos do CCR.....	4
Tabela 3. Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de carcinomas do cólon e do reto.	5
Tabela 4. Elementos de um laudo de ressecção de câncer colorretal.	7
Tabela 5. Visão geral dos fatores de risco e prevenção do CCR.....	11
Tabela 6. Modificações pós-traducionais das caudas das histonas.....	14
Tabela 7. Mudanças globais na metilação de histonas em vários tipos de câncer.	18
Tabela 8. Metiltransferases cujos substratos alternativos são proteínas não-histonas....	19
Tabela 9. <i>Mix</i> para reação de PCR.....	35
Tabela 10. Sequência dos <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> para amplificação do gene da <i>β-actina</i>	35
Tabela 11. Ensaios adquiridos para análise da expressão gênica por qPCR.....	37
Tabela 12. Idade, sexo e estadiamento do câncer colorretal dos pacientes.....	41
Tabela 13. Avaliação da invasão angiolinfática e perineural e de linfonodos acometidos.....	42
Tabela 14. Avaliação da extensão microscópica do tumor em 9 pacientes.	43
Tabela 15. Alterações histológicas associadas à instabilidade microsatélite.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrometro
18S	RNA ribossomal da subunidade menor do ribossomo
28S	RNA ribossomal da subunidade maior do ribossomo
∞	Infinito
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	Complexo promotor da anáfase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BRAF	Proto-oncogene B-Raf
CCR	Câncer colorretal
cDNA	DNA complementar
CH ₃	Metil
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
CpG	Dinucleotídeo formado por uma citosina unida por ligação fosfato à uma guanina
CT	<i>Cycle threshold</i>
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase I	Desoxiribonuclease I
DOT1L	Metiltransferase de histona H3K79 tipo-DOT1
DZNep	3-Deazaneplanocin A
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EZH2	<i>Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit</i>
FAP	Polipose adenomatosa familiar
FS	Faculdade de Ciências da Saúde
GLP	<i>Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1</i>
H	Histidina
H1	Histona H1
H2A	Histona H2A
H2B	Histona H2B

H3	Histona H3
H4	Histona H4
HCl	Ácido clorídrico
HDAC	Deacetilase de histona
HDAC1	<i>Histone deacetylase 1</i>
HDAC2	<i>Histone deacetylase 2</i>
HDAC3	<i>Histone deacetylase 3</i>
HMTase	Metiltransferase de histona
HNPCC	Câncer colorretal hereditário não polipoide
HUB	Hospital Universitário de Brasília
INCA	Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva
K	Lisina
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
KRAS	Homólogo do oncogene viral do sarcoma de reto v-Ri-ras2 Kirsten
L	Litro
LB	Meio Luria-Bertani
LMA	Leucemia mieloide aguda
me1	Monometilação
me2	Dimetilação
me2a	Dimetilação assimétrica
me2s	Dimetilação simétrica
me3	Trimetilação
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MLH1	Homólogo 1 de mutL
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MSI-H	Altos níveis de instabilidade microsatélite
MYPT1	<i>Protein phosphatase 1, regulatory subunit 12A</i>
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
Nanog	<i>Nanog homeobox</i>
NF-kB	Fator nuclear kappa B

nm	Nanômetro
NSD1	<i>Nuclear receptor binding SET domain protein 1</i>
NSD2	<i>Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1</i>
NSD3	<i>Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1</i>
NUP98	<i>Nucleoporin 98kDa</i>
p53	Tumor protein p53
PBS	Tampão trifosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PRMT	Metiltransferase de arginina
qPCR	PCR em tempo real
QR	Quantificação relativa
R	Arginina
RB1	Retinoblastoma 1
RelA	V-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
Sall1	Spalt-like transcription factor 1
Sall4	Spalt-like transcription factor 4
SAM	s-adenosilmetionina
SETD1A	<i>SET domain containing 1A</i>
SETD1B	<i>SET domain containing 1B</i>
SETD2	<i>SET domain containing 2</i>
SETD3	<i>SET domain containing 3</i>
SETD4	<i>SET domain containing 4</i>
SETD5	<i>SET domain containing 5</i>
SETD6	<i>SET domain containing 6</i>
SETD7	<i>SET domain containing (lysine methyltransferase) 7</i>
SETD8	<i>SET domain containing (lysine methyltransferase) 8</i>
SETMAR	<i>SET domain and mariner transposase fusion gene</i>
SMAD4	Proteína homóloga mãe contra decapentaplégico 4

SMYD3	SET and MYND domain containing 3
SUV39H1	Suppressor of variegation 3-9 homolog 1
t(4;14)	Translocação cromossômica entre os cromossomos 4 e 14
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TAF-10	<i>TATA binding protein associated factor</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGFBR2	Receptor 2 de TGF- β
TGF- β	Fator transformador do crescimento β
U	Unidade internacional
UCB	Universidade Católica de Brasília
UnB	Universidade de Brasília
UV	Ultravioleta
V	Volts
WHSC1	<i>Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1</i>
WHSC1L1	<i>Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1</i>
Δ CT	Diferença entre o CT médio do gene alvo normatizado e o CT médio de um gene endógeno
$\Delta\Delta$ CT	Δ CT da amostra de interesse calibrado com o Δ CT de uma amostra controle

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O CÂNCER COLORRETAL.....	1
1.1.1. EPIDEMIOLOGIA.....	1
1.1.2. DETECÇÃO PRECOCE E DIAGNÓSTICO.....	1
1.1.3. ESTADIAMENTO.....	2
1.1.4. CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E LAUDO HISTOPATOLÓGICO	4
1.1.5. CARCINOGENESE E O CÂNCER COLORRETAL.....	7
1.2. ALTERAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS EM HISTONAS E EPIGENÉTICA.....	11
1.2.1. METILTRANSFERASES DE HISTONA	16
1.3. FAMÍLIA SETD	19
1.4. FAMÍLIA NSD	23
1.5. JUSTIFICATIVA	24
1.6. OBJETIVOS.....	25
1.6.1. OBJETIVO GERAL.....	25
1.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1. CULTIVO CELULAR	27
2.1.1. DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS	28
2.1.2. PASSAGEM DE CÉLULAS	28
2.2. SELEÇÃO DE PACIENTES.....	29
2.2.1. CRITÉRIO DE INCLUSÃO PARA O GRUPO DE ESTUDO	29

2.2.2.	CRITÉRIO DE EXCLUSÃO PARA O GRUPO DE ESTUDO	30
2.3.	COLETA DE AMOSTRAS FRESCAS NORMAIS E TUMORAIS DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM CÂNCER COLORRETAL	30
2.4.	COLETA DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM CÂNCER COLORRETAL.....	31
2.5.	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	32
2.5.1.	QUANTIFICAÇÃO DE RNA TOTAL	33
2.5.2.	ANÁLISE QUALITATIVA EM GEL DE AGAROSE	33
2.6.	SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR	34
2.7.	ANÁLISE DA QUALIDADE DA SÍNTESE DE CDNA	35
2.7.1.	PCR SEMI-QUANTITATIVO.....	35
2.7.2.	ANÁLISE QUALITATIVA EM GEL DE AGAROSE	36
2.8.	PCR EM TEMPO REAL	37
2.9.	ANÁLISES DOS DADOS GERADOS PELO PCR EM TEMPO REAL.....	39
2.10.	PESQUISA EM BANCO DE DADOS <i>ON-LINE</i> DE IMUNOHISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS.	39
2.11.	ASPECTOS ÉTICOS	40
3.	RESULTADOS.....	41
3.1.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES	41
3.2.	EXPRESSÃO GÊNICA DOS COMPONENTES DAS FAMÍLIAS SETD E NSD EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER COLORRETAL.....	44
3.3.	PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS FAMÍLIAS SETD E NSD NO CÂNCER COLORRETAL.....	45
3.3.1.	AMOSTRAS NORMAIS <i>VERSUS</i> AMOSTRAS TUMORAIS.....	45
3.3.1.1.	EXPRESSÃO COMPARATIVA DE <i>SETD2</i> E <i>SETD8</i> NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DE TECIDOS TUMORAIS QUANDO PAREADAS ÀS AMOSTRAS DE TECIDOS NORMAIS.....	45
3.3.1.2.	CORRELAÇÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES <i>SETD2</i> E <i>SETD8</i> NAS AMOSTRAS DE TECIDOS TUMORAIS	46

3.3.1.3.	EXPRESSÃO COMPARATIVA DOS DEMAIS MEMBROS DA FAMÍLIA SETD E FAMÍLIA NSD NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DE TECIDOS TUMORAIS QUANDO PAREADAS ÀS AMOSTRAS DE TECIDOS NORMAIS	47
3.3.2.	SEXO.....	49
3.3.3.	IDADE	51
3.3.3.1.	SETD1A E SETD6 ESTÃO SUPEREXPRESSOS NAS AMOSTRAS DE TECIDOS TUMORAIS DE PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL DE IDADE ATÉ 60 ANOS.....	51
3.3.3.2.	CORRELAÇÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES SETD1A E SETD6 NAS AMOSTRAS DE TECIDOS TUMORAIS DE PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL DE IDADE ATÉ 60 ANOS.....	53
3.3.3.3.	EXPRESSÃO COMPARATIVA DOS DEMAIS MEMBROS DA FAMÍLIA SETD E FAMÍLIA NSD NAS AMOSTRAS DE TECIDOS TUMORAIS DE PACIENTES AGRUPADOS POR IDADE.....	54
3.3.4.	EXTENSÃO MICROSCÓPICA.....	56
3.3.5.	INVASÃO PERINEURAL	58
3.3.5.1.	NSD3 ESTÁ SUPEREXPRESSO NAS AMOSTRAS DE TECIDOS TUMORAIS DE PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL QUE APRESENTAM INVASÃO PERINEURAL NÃO EVIDENCIADA	58
3.3.5.2.	EXPRESSÃO GÊNICA COMPARATIVA DA FAMÍLIA SETD E DOS DEMAIS MEMBROS DA FAMÍLIA NSD NAS AMOSTRAS DE TECIDOS TUMORAIS DE PACIENTES AGRUPADOS DE ACORDO COM INVASÃO PERINEURAL.....	59
3.3.6.	LINFONODOS ACOMETIDOS	61
3.3.7.	ESTADIAMENTO.....	63
3.3.8.	INSTABILIDADE MICROSSATÉLITE.....	65
3.4.	VISÃO GLOBAL DA PRESENÇA DAS PROTEÍNAS SETD1A E NSD3 EM AMOSTRAS DE TECIDOS DE CÂNCER COLORRETAL	67
4.	DISCUSSÃO.....	69
5.	CONCLUSÃO	74
6.	PERSPECTIVAS.....	75

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
8. APÊNDICES	88

1. INTRODUÇÃO

1.1. O CÂNCER COLORRETAL

1.1.1. EPIDEMIOLOGIA

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens (746.000 casos, 10% do total) e o segundo entre as mulheres (614.000 casos, 9,2% do total) em todo o mundo (FERLAY et al., 2013).

A taxa de incidência é mais alta é na Austrália e Nova Zelândia, Europa e América do Norte, com as menores taxas na África e região centro-sul da Ásia (JEMAL et al., 2011).

Tem-se observado uma mudança no padrão da incidência de CCR. O aumento da incidência do CCR em áreas historicamente de baixo risco pode ser reflexo da combinação de vários fatores, incluindo mudanças nos padrões alimentares, obesidade e aumento da prevalência de tabagismo (CENTER; JEMAL; WARD, 2009; CENTER et al., 2009).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), estimam-se 15.070 novos casos de CCR em homens e 17.530 em mulheres para o ano de 2014 (INCA, 2014). No ano de 2011 o Brasil apresentou 14.016 casos de mortes relacionadas ao CCR, sendo 6.818 homens e 7.198 mulheres (SIM, 2011).

1.1.2. DETECÇÃO PRECOCE E DIAGNÓSTICO

A sobrevida de pacientes com CCR em 5 anos está entre 50% e 60% (VERDECCHIA et al., 2007) e é maior nos estágios iniciais (75% - 90%) do que nos estágios avançados (<15%) (CICCOLALLO et al., 2005). Muitos casos de CCR são detectados a partir da presença de sinais ou sintomas, que normalmente aparecem em fases mais avançadas. A maioria das pessoas com câncer colorretal nos estágios iniciais não apresentam sintomas da doença. Assim, o rastreamento e triagem regular de CCR é uma das armas mais poderosas para prevenção deste tipo de câncer (CARROLL; SEAMAN; HALLORAN, 2014). O rastreamento regular pode prevenir muitos casos de câncer colorretal por encontrar e remover certos tipos de pólipos antes que eles tenham

a chance de se transformar em câncer. O rastreamento também pode resultar na detecção precoce do CCR, quando pode ser altamente curável (LEVIN et al., 2008; WICKHAM; LASSERE, 2007).

Vários testes são utilizados para detectar o câncer colorretal (DOUBENI et al., 2013; LEVIN et al., 2008; REX et al., 2009). A tecnologia atual se divide em duas grandes categorias: testes estruturais (como colonoscopia, sigmoidoscopia flexível, colonografia por tomografia computadorizada) e testes de fezes ou baseado em fezes (como sangue oculto nas fezes e DNA e mRNA fecal) (BURT, 2000).

O CCR é diagnosticado com base nos resultados da colonoscopia ou sigmoidoscopia com biópsia do tumor. A estratégia do tratamento é guiada de forma adequada ao estágio da doença. Os exames pré-tratamento de um câncer recém diagnosticado incluem exame físico, uma colonoscopia completa para excluir tumor metacrônico e tomografia computadorizada do tórax, abdômen e pélvis, para identificar doença metastática (CUNNINGHAM et al., 2010; MAUCHLEY et al., 2005).

1.1.3. ESTADIAMENTO

Em sequência ao estabelecimento do diagnóstico do CCR é realizado o estadiamento do tumor. O principal objetivo do estadiamento é definir a extensão local, regional e sistêmica da doença, fundando padrões de prognósticos e estratégias de tratamento (FUREY; JHAVERI, 2014; WICKHAM; LASSERE, 2007). O sistema de estadiamento mais utilizado no mundo é o sistema do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), fundamentado no conhecimento sobre a forma como o câncer se desenvolve e se espalha. O sistema de estadiamento TNM é baseado pela extensão do tumor (T), pelo grau de disseminação para os linfonodos (N) e pela presença de metástases (M). A categoria T descreve o tumor de origem (primário). A categoria N descreve se o câncer atingiu linfonodos próximos. A categoria M diz se há metástase à distância (EDGE SB et al., 2010).

Como cada tipo de câncer possui o seu próprio sistema de classificação, letras e números nem sempre possuem o mesmo significado para diferentes tipos de câncer. As definições do estadiamento do câncer colorretal se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Estadiamento TNM do câncer colorretal.

Tumor primário (T)	Descrição
TX	O tumor primário não pode ser acessado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelial ou invasão da lâmina própria
T1	Tumor invade a submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria
T3	Tumor invade através da muscular própria em direção aos tecidos pericólicas
T4a	Tumor penetra a superfície do peritônio visceral
T4b	Tumor invade diretamente ou é aderente a outros órgãos ou estruturas

Linfonodos regionais (N)	Descrição
NX	Linfonodos regionais não podem ser acessados
N0	Sem metástase nos linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 3 linfonodos regionais
N1a	Metástase em 1 linfonodo regional
N1b	Metástase em 2 a 3 linfonodos regionais
N1c	Depósito do tumor na subserosa, mesentério, tecidos pericólicas sem metástase nos linfonodos regionais
N2	Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais
N2a	Metástase em 4 a 6 linfonodos regionais
N2b	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais

Metástase distante (M)	Descrição
M0	Sem metástase distante
M1	Metástase distante
M1a	Metástase confinada a um órgão ou local
M1b	Metástase em mais de um órgão/local ou no peritônio

Adaptado de: AJCC 7ª edição (EDGE SB et al., 2010).

De acordo com a definição do estadiamento TNM pode-se, então, determinar diferentes estádios para o câncer colorretal, caracterizando grupos com diferentes prognósticos (Tabela 2).

Tabela 2. Agrupamento por estádios anatômicos do CCR.

Estádios	Descrição
0	Tis, N0, M0
I	T1-T2, N0, M0
IIA	T3, N0, M0
IIB	T4a, N0, M0
IIC	T4b, N0, M0
IIIA	T1-T2, N1, M0 ou T1, N2a, M0
IIIB	T3-T4a, N1, M0 ou T2-T3, N2a, M0 ou T1-T2, N2b, M0
IIIC	T4a, N2a, M0 ou T3-T4a, N2b, M0 ou T4b, N1-N2, M0
IVA	Qualquer T, Qualquer N, M1a
IVB	Qualquer T, Qualquer N, M1b

Adaptado de: AJCC 7^a edição (EDGE SB et al., 2010).

1.1.4. CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E LAUDO HISTOPATOLÓGICO

A grande maioria dos CCRs é proveniente do componente epitelial do colón e reto e são denominados adenocarcinomas. Os adenocarcinomas são classificados por grau histológico. Outros tipos histológicos de CCR são relativamente incomuns (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de carcinomas do cólon e do reto.

Classificação da Organização Mundial de Saúde de carcinomas do cólon e do reto.
Adenocarcinoma <i>in situ</i> /Displasia severa
Adenocarcinoma
Adenocarcinoma mucinoso (coloide) (>50% mucinoso)
Carcinoma com células em anel de sinete (>50% de células em anel de sinete)
Carcinoma de células escamosas (epidermóides)
Carcinoma adenoescamoso
Carcinoma de pequenas células (carcinomas <i>oat cell</i>)
Carcinoma medular
Carcinoma indiferenciado
Outros (por exemplo, carcinoma papilar)

Adaptado de: *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System* (HAMILTON S.R.; AALTONEN A.L., 2000).

Em geral, o grau histológico de diferenciação do CCR leva em conta o grau em que estão presentes as glândulas bem formadas. A inclusão de recursos como a citologia na estimativa do grau do câncer colorretal é variável. A formação de glândula está presente em maior ou menor grau em tumores bem diferenciados e moderadamente diferenciados, respectivamente. Em contraste, adenocarcinomas indiferenciados ou pouco diferenciados (tumores de alto grau) não formam estruturas glandulares bem definidas (COMPTON C.C., 2012). Muitos tumores produzem mucina, que podem permanecer no interior das células ou ser secretadas. Os tumores que produzem quantidades grandes de mucina extracelular são classificados como carcinomas mucinosos (GREEN et al., 1993; WEISS et al., 2011). Em alguns carcinomas que não formam glândulas, a mucina intracelular pode ser uma característica que desloca o núcleo das células tumorais para o lado. Quando $\geq 50\%$ do tumor é constituído por células desse tipo ele é classificado como carcinoma de células em anel de sinete. Eles respondem por apenas 1% a 2% de todos os CCRs (CONSORTI et al., 2000; NITSCHKE et al., 2013; WEISS et al., 2011). Alguns tipos de câncer, particularmente aqueles produzidos no cólon distal, contém áreas de diferenciação escamosa e são denominados carcinomas adenoescamosos (FRIZELLE et al., 2001). Esses tumores raros representam entre 0,05% e 0,2% de todas as neoplasias colorretais. Aproximadamente 10% dos

CCRs, especialmente tumores pouco diferenciados, contém focos de diferenciação neuroendócrina. Formar tumores não-glandulares com ampla diferenciação neuroendócrina, classificados como carcinomas de pequenas células, tem um pior prognóstico. O subtipo carcinoma medular é um tipo peculiar de câncer não-glandular (COMPTON C.C., 2012).

Conforme estabelecido pelo Colégio Americano de Patologia, um conjunto de informações mínimas deve constituir o laudo histopatológico de uma peça de um câncer colorretal, conforme explicita a Tabela 4 (WASHINGTON et al., 2009). A presença desses dados possibilita inferências futuras acerca dos fatores prognósticos e tomadas de decisão clínica sobre o quadro de um paciente.

Tabela 4. Elementos de um laudo de ressecção de câncer colorretal.

Laudo histopatológico	
Espécime	
Procedimento	
	Tamanho do espécime*
Local do tumor	
	Localização do tumor*
Tamanho do tumor	
Perfuração macroscópica do tumor	
	Mesorreto macroscopicamente intacto*
Tipo histológico	
Grau histológico	
	Características histológicas que sugerem instabilidade de microssatélite*
Extensão microscópica do tumor	
Margens cirúrgicas	
Efeito do tratamento	
Invasão vascular e linfática	
Invasão perineural	
Depósito tumoral	
	Tipo de pólipó em que o carcinoma invasivo surgiu*
Estágio histopatológico (pTNM)	
	Outros achados patológicos*
	Estudos auxiliares*

Adaptado de: *Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum* (WASHINGTON et al., 2009). *Elementos de dados procedidos por este símbolo não são requeridos. No entanto, estes elementos podem ser clinicamente importantes, mas ainda não são validados ou regularmente utilizados.

1.1.5. CARCINOGENESE E O CÂNCER COLORRETAL

No ano de 2000, Hanahan e Weinberg publicaram um grande e importante trabalho no campo da pesquisa em câncer, simplificando uma vasta literatura de 25 anos que abordava um amplo conhecimento e avanço sobre a origem e manutenção do câncer (HARRIS, 1991; HIROHASHI, 1998; LOEB, 1991; MINAMOTO, 1999; MOOLGAVKAR; KNUDSON, 1981; REED, 1999; WEINBERG, 1989; ZINGG,

1997). Nesse trabalho os autores propuseram uma teoria simplificada sobre o desenvolvimento da doença. Eles indicaram as principais características do câncer, que ficaram conhecidas como “*hallmarks* do câncer”. Os *hallmarks* do câncer são seis características biológicas adquiridas durante as várias etapas do desenvolvimento de tumores humanos: 1) manutenção da sinalização proliferativa, levando à proliferação crônica e desenfreada das células cancerígenas; 2) inibição de supressores de crescimento; 3) resistência à morte celular; 4) imortalidade replicativa; 5) indução da angiogênese, responsável pela nutrição do tumor e garantia da sua progressão e 6) ativação de invasão e metástase, que acontece em tumores malignos.

Estudos realizados após a publicação dos *hallmarks* do câncer permitiram que Hanahan e Weinberg, em 2011, adicionassem duas novas características na lista de caracterização do câncer proposta em 2000: 1) reprogramação do metabolismo energético e 2) escape do sistema imunológico. Além disso, também sugeriram possíveis características da neoplasia que facilitam a aquisição de todos os 8 *hallmarks* sugeridos: 1) instabilidade genômica e mutação e 2) inflamação promovida pelo tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011) (Figura 1).



Figura 1. As oito capacidades adquiridas do câncer propostas por Hanahan e Weinberg em 2011. Adaptado de: *Hallmarks of Cancer: The Next Generation* (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Os mecanismos subjacentes da patogênese colorretal permanecem sujeitos à extensa investigação no campo da biologia do câncer. O CCR tipicamente se desenvolve ao longo de décadas. É um processo de múltiplos passos, que consiste em uma série de alterações genéticas e epigenéticas que conduzem à transformação maligna, onde o epitélio glandular normal é transformado em adenocarcinoma (BARDHAN; LIU, 2013; BOS, 1989; BOS et al., 1987; VOGELSTEIN et al., 1988). Algumas das alterações já descritas relacionadas com a carcinogênese colorretal envolvem os genes *KRAS* (oncogene), *p53* (supressor tumoral) e elementos da via de sinalização TGF- β , como TGFBR2 e SMAD4. O estudo do envolvimento de *K-RAS* e *p53* no CCR está avançado e os produtos destes genes já passam por testes de fase clínica, como alvos terapêuticos para a doença (GRADY; MARKOWITZ, 2002; SUI et al., 2011; ZEESTRATEN et al., 2013). Após anos de estudos, se tornou claro que existem diferentes vias moleculares envolvidas no CCR, e que essas vias abarcam mutações genéticas e alterações epigenéticas (BARDHAN; LIU, 2013).

Os mecanismos moleculares que estão por trás do desenvolvimento desse câncer são clinicamente importantes porque eles estão relacionados com o prognóstico e resposta do paciente aos tratamentos (DE SOUSA E MELO et al., 2013; SADANANDAM et al., 2013). O câncer de cólon é geralmente iniciado por alterações nas vias de sinalização Wntless/Wnt e sua progressão é resultado do acúmulo de eventos sequenciais (PARK; KWAK, 2012; WANG et al., 1998). Adenomas displásicos são a forma mais comum de lesões precursoras de malignidade no CCR (JASS, 2007). Mutações que inativam o gene *APC* (regulador do ciclo celular) são os primeiros eventos de um processo em múltiplos passos para a formação do CCR e ocorre em 70% dos adenomas (KINZLER; VOGELSTEIN, 1996). A sequência adenoma-carcinoma também é promovida por mutações que ativam o oncogene *KRAS* e inativam o gene supressor tumoral *p53*, além de alterações genéticas resultantes da instabilidade cromossômica (FEARON, 2011; LENGAUER; KINZLER; VOGELSTEIN, 1997). Casos de CCR que possuem como lesões precursoras pólipos serrilhados envolvem características como metilação em ilhas CpG, mutações no oncogene *BRAF* e altos níveis de instabilidade microssatélite (MSI-H) como consequência da metilação do promotor do gene *MLH1* (gene de reparo do DNA) (HERMAN et al., 1998).

Formas hereditárias do CCR contribuem para 3%-5% de todos os CCRs, sendo um modelo altamente valioso para o estudo da patogênese do câncer colorretal

(JASPERSON et al., 2010). Nesta forma de câncer são inativados genes supressores tumorais ou genes de reparo do DNA. As duas formas mais comuns de CCR hereditário são: Câncer colorretal hereditário não polipoide (HNPCC) e polipose adenomatosa familiar (FAP) (GUTTMACHER et al., 2003). Ambas as síndromes são doenças autossômicas dominantes e seguem a patogênese molecular típica do CCR: cânceres associados à HNPCC apresentam sinais de deficiência no reparo de bases mal pareadas (*mismatch repair*) e conseqüentemente MSI-H enquanto que cânceres associados à polipose adenomatosa familiar segue a seqüência adenoma-carcinoma clássica (BOLAND; GOEL, 2010; ROY; LYNCH, 2003).

CCRs deficientes no reparo de bases mal pareadas são caracterizados pelo acúmulo de várias mutações de inserção ou deleção de microssatélites espalhados ao longo do genoma. Apesar da inativação de genes de reparo do DNA parecer acelerar em vez de iniciar a formação do CCR, o tempo exato da inativação destes genes ainda é incerto. O significado clínico do fenótipo MSI-H está relacionada com a identificação de pacientes e famílias afetadas pela síndrome de Lynch (BOLAND; GOEL, 2010; FEARON, 2011).

Dentre os vários fatores de risco para o CCR conhecidos (Tabela 5), destacam-se o histórico familiar de CCR, doenças inflamatórias no intestino, fumo, consumo excessivo de álcool, alto consumo de carne vermelha e processada, obesidade e diabetes (BRENNER; KLOOR; POX, 2014).

Tabela 5. Visão geral dos fatores de risco e prevenção do CCR.

	Risco
Fatores sociodemográficos	
Idade avançada	↑ ↑ ↑
Sexo masculino	↑ ↑
Fatores médicos	
Histórico familiar	↑ ↑
Doença inflamatória do intestino	↑ ↑
Diabetes	↑
Infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	(↑)
Outras infecções	(↑)
Terapia de reposição hormonal	↓
Aspirina	↓
Estatina	(↓)
Fatores relacionados ao estilo de vida	
Fumo	↑
Consumo excessivo de álcool	↑
Obesidade	↑
Atividade física	↓
Fatores de dieta	
Alto consumo de carne vermelha e processada	↑
Frutas e vegetais	(↓)
Fibras de cereal e grãos	(↓)
Peixe	(↓)
Produtos lácteos	(↓)

Adaptado de: *Colorectal cancer* (BRENNER; KLOOR; POX, 2014). Legenda: ↑ ↑ ↑ = muito forte aumento de risco; ↑ ↑ = forte aumento de risco; ↑ = moderado aumento de risco; ↓ ↓ = forte redução de risco; ↓ = moderada redução de risco. Parêntesis mostram associações prováveis, mas não totalmente estabelecidas.

1.2. ALTERAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS EM HISTONAS E EPIGENÉTICA

Durante as diferentes fases do ciclo celular, o ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico encontra-se em diferentes níveis de compactação no núcleo das células eucarióticas. Essa compactação ocorre com o auxílio de proteínas histonas e proteínas

não-histonas em um polímero dinâmico chamado cromatina (JENUWEIN; ALLIS, 2001). Processos de desenvolvimento requerem o estabelecimento e manutenção de expressão gênica. A atividade de um gene é dependente tanto do repertório de fatores de transcrição disponível quanto do local de empacotamento do DNA na cromatina (THOMPSON; TRAVERS, 2008). A cromatina possui regiões altamente condensadas, denominadas heterocromatinas e regiões menos condensadas, denominadas eucromatinas. As heterocromatinas são pobres em genes expostos à maquinaria de transcrição e, portanto, estão transcricionalmente silenciadas. As eucromatinas são ricas em genes expostos à maquinaria de transcrição e, portanto, mais facilmente transcritas (HUISINGA; BROWER-TOLAND; ELGIN, 2006). As proteínas envolvidas na regulação da estrutura da cromatina podem, portanto, funcionar como determinantes importantes de processos do desenvolvimento (THOMPSON; TRAVERS, 2008).

A cromatina pode apresentar diferentes níveis de compactação graças às suas unidades principais: os nucleossomos. O nucleossomo é a unidade básica de um cromossomo eucarioto, consistindo em 146 pares de base de DNA enovelados em torno de um núcleo constituído por um octâmero de proteínas conhecidas como histonas. As proteínas histonas (H3, H4, H2A, H2B e H1) são altamente conservadas e o octâmero de histonas consiste em um tetrâmero de H3-H4, dois dímeros de H2A-H2B e a histona H1 atua como estabilizadora da estrutura (JENUWEIN; ALLIS, 2001; LUGER et al., 1997) (Figura 2). As histonas são constituídas por um domínio globular e uma porção N-terminal mais flexível e carregada, e são proteínas que apresentam caráter básico. A porção N-terminal das histonas é denominada “cauda da histona” e se projeta para fora do nucleossomo. O domínio N-terminal das histonas que constituem o octâmero está sujeito a modificações químicas, como a acetilação, metilação e fosforilação de alguns de seus resíduos (CHEUNG; ALLIS; SASSONE-CORSI, 2000; JENUWEIN; ALLIS, 2001).

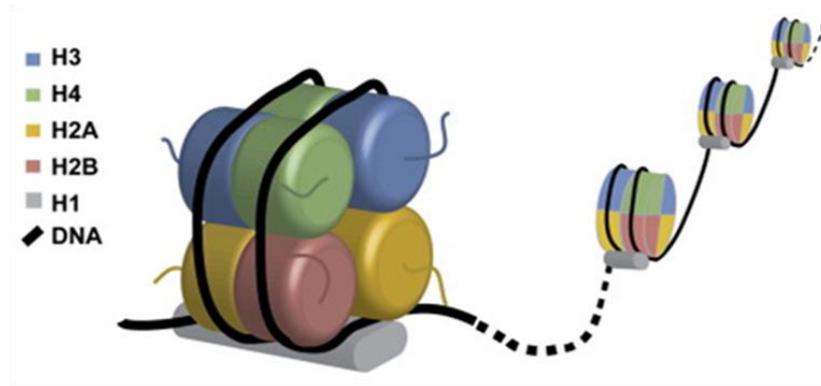


Figura 2. Modelo esquemático da organização estrutural do nucleossomo. As proteínas histonas são representadas por H3, H4, H2A, H2B e H1. Em preto, tem-se o DNA. Adaptado de: *Histone Modifications and Chromatin Remodeling during Bacterial Infections* (HAMON; COSSART, 2008).

Às modificações herdáveis durante a divisão celular que não implicam em mudança na sequência primária do DNA dá-se o nome de epigenética. A epigenética envolve mecanismos que atuam na mudança da acessibilidade da cromatina para regulação transcricional por meio de modificações estruturais do DNA e modificações ou rearranjos dos nucleossomos (FEINBERG, 2001; TANG; HO, 2007; WOLFFE; GUSCHIN, 2000). Várias classes e níveis de modificações epigenéticas de histona já foram descritas (GREER; SHI, 2012; MARTIN; ZHANG, 2005) (Tabela 6).

Tabela 6. Modificações pós-traducionais das caudas das histonas.

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

Adaptado de: *Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy* (DAWSON; KOUZARIDES, 2012). Legenda: me1, monometilação; me2, dimetilação; me3, trimetilação; me2s, dimetilação simétrica; me2a, dimetilação assimétrica; Cit, citrulina.

Na década de 1960, Allfrey e colaboradores (1964) sugeriram ser possível realizar modificações em histonas após o término de suas traduções, inserindo grupos acetil e metil à cadeia polipeptídica. Por meio de cristalografia do nucleossomo, Luger e colaboradores (1997) demonstraram que alterando a estrutura das histonas, a estrutura da cromatina também era alterada. Atualmente sabe-se que alterações pós-traducionais nas porções N-terminais das caudas das histonas resultam em modificações complexas, alterando as interações não-covalentes dentro e entre os nucleossomos. A estrutura da cromatina é afetada com essas alterações, o que pode gerar como resultado a ativação ou repressão da transcrição gênica em determinada região do genoma, tudo isso através da exposição ou ocultação dos locais de ancoragem da maquinaria de transcrição ou da modificação dos locais de reconhecimento pela mesma maquinaria (Figura 3). Esta regulação epigenética é dependente do tipo de modificação química, do nível desta

modificação e do sítio da histona onde ocorrerá a modificação. Esta regulação, portanto, é conhecida como “Código das Histonas” (STRAHL; ALLIS, 2000).

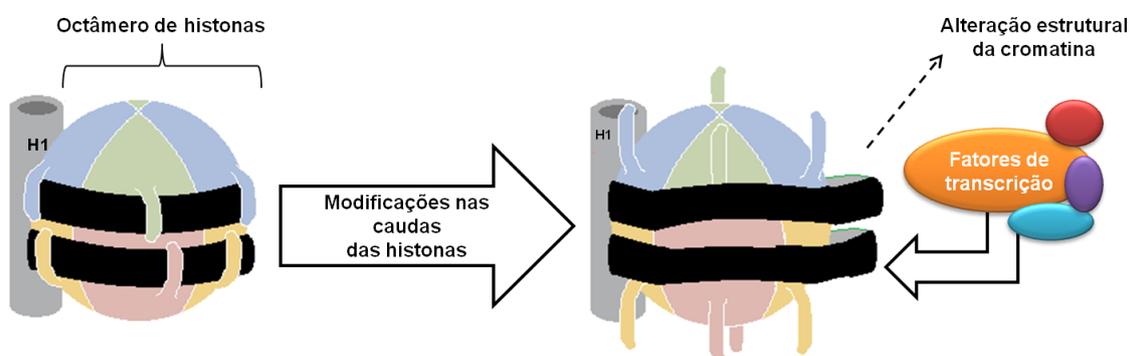


Figura 3. Modelo esquemático de alteração estrutural na cromatina por modificações epigenéticas. Alguns processos que ocorrem na porção N-terminal das histonas podem desencadear o livre acesso do material genético para a maquinaria transcricional. Adaptado de Genética: um enfoque conceitual (PIERCE B.A., 2012).

Alterações genéticas e epigenéticas podem desencadear a aparição de funções gênicas aberrantes e mudança na expressão gênica e estabilidade do genoma, características principais do câncer (PELTOMÄKI, 2012; VARIER; TIMMERS, 2011). O conjunto de modificações epigenéticas é denominado “epigenoma” e prevê um mecanismo para a diversidade celular, regulando a informação genética que pode ser acessada pela maquinaria celular (EGGER et al., 2004; SHARMA; KELLY; JONES, 2010).

Em contraste com ocorrências genéticas, alterações epigenéticas na cromatina são bioquimicamente reversíveis. Em face de diversos estímulos, mecanismos epigenéticos podem ser alterados, sendo observados como uma capacidade flexível e adaptativa do genoma (BACCARELLI; BOLLATI, 2009). Por serem reversíveis, alterações epigenéticas são um potencial alvo terapêutico de silenciamento, com possibilidade de reversão do dano pós-traducional (EGGER et al., 2004; LOPEZ et al., 2009; SZYF, 2009; VARIER; TIMMERS, 2011).

As informações transmitidas através das modificações epigenéticas podem apresentar papel crítico na regulação de processos que envolvem o DNA, tais como reparo, replicação e transcrição. Assim sendo, padrões de expressão anormais ou alterações genômicas em reguladores da cromatina podem desencadear resultados

profundos e levar à indução e manutenção de vários tipos de cânceres (ALBERT; HELIN, 2010; FOG; JENSEN; LUND, 2007; LOPEZ et al., 2009; PORTELA; ESTELLER, 2010; SHARMA; KELLY; JONES, 2010; WOLFFE; GUSCHIN, 2000).

Histonas deacetilases (HDACs) são as proteínas mais extensivamente caracterizadas entre as enzimas de modificação de histonas que desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento do CCR. Múltiplas HDACs classe I estão upreguladas em um subconjunto de CCR, incluindo HDAC1 em 36,4%, HDAC2 em 57,9% e HDAC3 em 72,9% das espécies de CCR, e alta expressão de HDAC foi mostrada estar associada com a redução da sobrevida de pacientes com CCR. A expressão nuclear de HDAC2 foi observada em 81,9% dos carcinomas colorretal, 62,1% dos adenomas colorretais e 53,1% dos tecidos normais, respectivamente (ASHKTORAB et al., 2009; ISHIHAMA et al., 2007).

1.2.1. METILTRANSFERASES DE HISTONA

O estabelecimento de um padrão apropriado de metilação de histona não é crucial somente para o desenvolvimento normal e metilação, mas também está intimamente associado com a iniciação e desenvolvimento tumoral. Por exemplo, o gene codificador da metiltransferase de histona EZH2 é frequentemente encontrado superexpresso em tumores sólidos, incluindo CCR (BRACKEN; HELIN, 2009; OUGOLKOV; BILIM; BILLADEAU, 2008). Níveis altos do gene codificador de outra metiltransferase, o *SUV39H1*, foram encontrados em 54 de 219 amostras de pacientes com CCR analisadas (TIWARI et al., 2008). De forma geral, estudos apontam que a expressão e função alteradas de metiltransferases de histonas são características do câncer, incluindo CCR.

Na porção N-terminal das histonas ocorre a metilação de resíduos básicos como lisinas (K), argininas (R) e histidinas (H). As lisinas podem ser monometiladas (Kme1), dimetiladas (Kme2) ou trimetiladas (Kme3), enquanto as argininas podem ser monometiladas (Rme1), simetricamente dimetiladas (Rme2s) ou assimetricamente dimetiladas (Rme2a). A metilação de histidinas é aparentemente rara e ainda não foi totalmente caracterizada, mas já foi reportado que este aminoácido pode ser monometilado (Hme1) (GREER; SHI, 2012). Os diferentes níveis e complexidades das metilações as fornecem um potencial regulatório de grande importância uma vez que

cada evento tem um efeito específico na estrutura da cromatina e na interação de proteínas regulatórias com a cromatina (MARTIN; ZHANG, 2005). A adição de grupos de metil (CH₃) a resíduos de histonas é catalisada por enzimas denominadas metiltransferases de histonas (*Histone Methyltransferase* – HMTase, em inglês). Esta reação catalítica é realizada através da transferência de grupos metil advindos de doadores s-adenosilmetionina (SAM). É possível dividir as HMTases em três grandes grupos: 1) proteínas que possuem o domínio SET e 2) proteínas DOT1-like, ambas metilando resíduos de lisina; e 3) família de metiltransferases de arginina (*Arginine N-Methyltransferase* – PRMT, em inglês), descrita como principal responsável pela metilação de argininas (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

De maneira geral, a metilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me), H3K36me e H3K79me está relacionada com a ativação gênica, enquanto a di- e trimetilação em H3K9, H3K27 e H4K20 estão relacionadas ao silenciamento gênico (HUANG et al., 2010). Além do processo de expressão gênica, a metilação de resíduos de lisina também foi associada a processos relacionados à cromatina, como replicação, recombinação e reparo do DNA (LENNARTSSON; EKWALL, 2009; ZHANG; WEN; SHI, 2012).

Diversos trabalhos mostraram evidências que sugerem a associação entre carcinogênese e metilação aberrante de histonas (ALBERT; HELIN, 2010; CROSS, 2012; KOOISTRA; HELIN, 2012; VARIER; TIMMERS, 2011). Estudos pioneiros nesta área mostraram que mudanças gerais nos níveis de metilação das histonas estão relacionadas com o aumento da recorrência de câncer e com a baixa sobrevida de vida dos pacientes (GREER; SHI, 2012) (Tabela 7).

Tabela 7. Mudanças globais na metilação de histonas em vários tipos de câncer.

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

Adaptado de: *Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance* (GREER; SHI, 2012).

Sabe-se que muitas HMTases que metilam lisinas possuem um domínio denominado SET, que está relacionado a função metiltransferase de histona. Porém, foi demonstrado que, embora algumas proteínas contenham o domínio SET, elas também podem modificar proteínas não-histonas. Como exemplo tem-se a metiltransferase SETD7, capaz de exercer metilação em proteínas como p53 e TAF-10 (*TATA binding protein associated factor*), dentre outras (Tabela 8) (CHUIKOV et al., 2004; KOUSKOUTI et al., 2004)

Tabela 8. Metiltransferases cujos substratos alternativos são proteínas não-histonas.

Metiltransferase	Substrato	
	Histona	Não-histona
G9a/EHMT2	H3K9me2	P53, G9a, C/EBPb, Reptin, RARa, DNMT1
NSD1	H3K36me2	NFkB
SMYD2	H3K36me2	p53, RB
SMYD3	H3K4me2/me3	VEGFR
	H4K20me3	
	H4K5	
SET8	H4K20me1	p53
SET7/9	H3K4me1	P53, TAF7, TAF10, ERa, AR, DNMT1, NFkB, PCAF, RB, E2F1, STAT3, Tat

Adaptado de: *Lysine methylation: beyond histones* (ZHANG; WEN; SHI, 2012).

Com o atual conhecimento sobre quais são os substratos associados ou não à cromatina, tem-se um importante desafio pela frente: compreender os mecanismos pelos quais essas enzimas executam suas funções biológicas (GREER; SHI, 2012).

1.3. FAMÍLIA SETD

O domínio SET está presente em famílias de proteínas que metilam resíduos de lisinas em histonas. Originalmente este domínio foi identificado como um domínio compartilhado por três proteínas de *Drosophila melanogaster* envolvidas em processos epigenéticos: supressor de variegação [*suppressor of variegation* - Su(var)3-9 -, em inglês], potenciador de zeste [*enhancer of zeste* - E(z) -, em inglês] e tritorax (*trithorax*, em inglês) – formando com as iniciais dessas proteínas o acrônimo SET (QIAN; ZHOU, 2006). Esse domínio catalisa a adição de grupos metil à resíduos de aminoácidos, principalmente na lisina 4 da histona H3 (ZHANG et al., 2002).

Os 10 genes constituintes da família SETD de metiltransferases codificam proteínas homônimas que possuem o domínio conservado SET. São eles: *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6*, *SETD7*, *SETD8* e *SETMAR*.

O gene *SETD1A* (*SET domain containing 1A*) está localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p11.2). Este gene codifica proteína que faz parte de um complexo de metiltransferases de histona e suas ações enzimáticas são a mono, di, e trimetilação da lisina 4 da histona H3 (LEE; SKALNIK, 2005). Em um experimento *in vivo*, utilizando como modelo camundongos, foi demonstrado que o silenciamento gênico de *SETD1A* resulta no desaparecimento da lesão tumoral de células de câncer colorretal inoculadas nos animais (SALZ et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que o tratamento com inibidor de glutamina foi citotóxico para células de câncer de mama. A hiporregulação de 20 genes levou ao quadro de citotoxicidade deste componente nas células. Esta hiporregulação ocorreu por conta dos baixos níveis de metilação da lisina 4 da histona H3 nos *loci* desses genes, decorrente da hipoexpressão do gene *SETD1A* (SIMPSON et al., 2012). Assim, temos em *SETD1A* um possível oncogene, cuja terapia para o câncer pode investir como um novo alvo.

O gene *SETD1B* (*SET domain containing 1B*) está localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q24.31). Este gene codifica proteína que faz parte de um complexo de metiltransferases de histona e sua ação enzimática é a trimetilação da lisina 4 da histona H3 (LEE et al., 2007). Na carcinogênese de câncer de pulmão foi demonstrado que *SETD1B* está mais expresso no câncer de pulmão do tipo pequenas células e não-pequenas células, tanto em linhagens celulares quanto em amostras de tecidos tumorais (RODRIGUEZ-PAREDES et al., 2014). Quando células câncer de pulmão são tratadas com o inibidor global de metilação de histona 3-Deazaneplanocin A (DZNep), *SETD1B* é hiporregulado. Sabe-se que DZNep degrada a metiltransferase *EZH2*, cuja atividade é a trimetilação da lisina 27 da histona H3, e recentemente foi demonstrado também a degradação da proteína que trimetila a lisina 4 da histona H3, diretamente relacionada à atividade do gene *SETD1B* (LEE; KIM, 2013). Além disso, foi visto em modelo de melanoma em *zebrafish* que a metilação da lisina 9 da histona H3 causada pela hiperexpressão do *SET1B* acelera de forma significativa a formação do melanoma no *zebrafish*. Neste modelo, portanto, *SET1B* foi estabelecido como um oncogene (CEOL et al., 2011). Não há relatos do envolvimento do *SETD1B* no CCR.

O gene *SETD2* (*SET domain containing 2*) está localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p21.31). Este gene codifica proteína cuja atividade enzimática é a metilação da lisina 36 da histona H3. Esta metilação está associada à conformação de ativação da cromatina (SUN, 2005). Essa proteína contém um domínio de ativação

transcricional que tem sido achado associado com a hiperfosforilação da RNA polimerase II (ZHANG; HAVERSAT; MAGER, 2013). *SETD2* tem sido relatado como um gene supressor tumoral. Esta linha está ganhando cada vez mais aceitação pois, além de mutações neste gene terem sido associadas ao desenvolvimento câncer renal, observou-se maior expressão deste gene em tecidos normais quando comparado aos tecidos tumorais de pacientes com câncer de mama (AL SARAQBI et al., 2009; BUCK et al., 2013; GOSSAGE et al., 2014; NEWBOLD; MOKBEL, 2010; SIMON et al., 2014). Não há relatos do envolvimento do *SETD2* com o CCR.

O gene *SETD3* (*SET domain containing 3*) está localizado no braço longo do cromossomo 14 (14q32.2). Este gene codifica proteína cuja atividade enzimática é a metilação da lisina 36 da histona H3. Foi indicada uma possível relação entre esta proteína e a morte celular por apoptose e regulação no ciclo celular, já que a sua hiperexpressão diminui a viabilidade celular e ativa a caspase-3 (KIM et al., 2011). Em 2013 a relação deste gene com a carcinogênese foi estudada e notou-se superexpressão do RNA mensageiro (mRNA) truncado com perda do domínio SET em linfomas, indicando uma possível ação de *SETD3* como supressor tumoral (CHEN et al., 2013). Não há relatos do envolvimento do *SETD3* no CCR.

O gene *SETD4* (*SET domain containing 4*) está localizado no braço longo do cromossomo 21 (21q22.13) (HATTORI et al., 2000; SUN et al., 2008). A atividade enzimática da proteína codificada por este gene ainda não foi estabelecida. Porém, em 2013, foi demonstrado que este gene se encontra hiperexpresso em amostras clínicas de pacientes com câncer de mama triplo negativo (FARIA et al., 2013). Não há relatos do envolvimento do *SETD4* no CCR.

O gene *SETD5* (*SET domain containing 5*) está localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p25.3) (MUZNY et al., 2006; SUN et al., 2008). A atividade enzimática da proteína codificada por este gene ainda não foi estabelecida, assim como o seu papel na carcinogênese. Não há relatos do envolvimento do *SETD5* no CCR.

O gene *SETD6* (*SET domain containing 6*) está localizado no braço longo do cromossomo 16 (16q21) (SUN et al., 2008). Este gene codifica proteína cuja atividade enzimática é a monometilação da lisina 7 na histona H2A variante AZ (H2AZ). Especula-se que este gene esteja envolvido com a diferenciação celular, pois foi mostrado que a depleção do mesmo gene levou à diferenciação das células tronco

embrionárias de camundongos (BINDA et al., 2013, p. 6). Todavia, este gene ainda não possui papel estabelecido na carcinogênese. Não há relatos do envolvimento do *SETD6* no CCR.

O gene *SETD7* [*SET domain containing (lysine methyltransferase) 7*] está localizado no braço longo do cromossomo 4 (4q28). Este gene codifica proteína cuja atividade enzimática é a monometilação da lisina 4 da histona H3. Esta enzima também possui capacidade de metilar substratos não-histonas (DEL RIZZO; TRIEVEL, 2011; WANG et al., 2001). A depleção de *SETD7* em cultura de células aumenta os níveis de proteína NF-κB e recupera parcialmente a proliferação celular (HU et al., 2013). Em células tumorais foi visto que *SETD7* atua sob MYPT1, o que reduz os níveis da proteína RB1 fosforilada, diminuindo assim a taxa de proliferação celular (CHO et al., 2011). Foi revelada a participação de *SETD7* na carcinogênese da mama, dado que esta enzima metila diretamente o receptor de estrógeno (SUBRAMANIAN et al., 2008). Não há relatos do envolvimento de *SETD7* no CCR.

O gene *SETD8* [*SET domain containing (lysine methyltransferase) 8*] está localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q24.31). Este gene codifica proteína cuja atividade enzimática é a monometilação da lisina 20 da histona H4. Sabe-se que *SETD8* pode atuar tanto na ativação quanto repressão gênica, apontando para o seu papel central na modulação da RNA polimerase II (KAPOOR-VAZIRANI; VERTINO, 2014). Foi visto que *SETD8* está envolvido no ciclo celular. Porém, a regulação da H4K20me1 durante as diferentes fases do ciclo celular é necessária para a progressão adequada, e não a enzima *SETD8* por si. Como a H4K20me1 é regulada e como funciona para promover a progressão do ciclo celular são questões ainda em aberto. Tal como acontece com outras enzimas modificadoras de histonas, outros substratos além da H4 podem ser metilados por *SETD8* e podem funcionar nessas vias do ciclo celular (WU; RICE, 2011). Portanto, ainda é necessário continuar identificando esses substratos e avaliar sua metilação mediada por *SETD8* no ciclo celular para que se proponha a função celular de *SETD8*. Não há relatos do envolvimento do *SETD8* no CCR.

O gene *SETMAR* (*SET domain and mariner transposase fusion gene*) está localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p26.1). Este gene codifica proteína cuja atividade enzimática de sua porção N-terminal é a metilação da lisina 4 da histona H3. Nessa mesma proteína há outra porção fundamental, C-terminal, que contém um

domínio transposase (BECK et al., 2011; WILLIAMSON et al., 2008). *SETMAR* foi associado à carcinogênese da leucemia mielóide aguda, por perder o checkpoint de decatenação em células tratadas com inibidores da proteína topo II alfa (responsável direta pelo processo de desenrolamento das cromátides irmãs durante o processo de mitose). Assim, as células que perdem esse checkpoint tem suas cromátides irmãs presas no fuso mitótico, o que pode gerar células com fusões gênicas anômalas, deleções, dentre outros efeitos, e que seguem no ciclo celular (WRAY et al., 2009b). Foi mostrado que em câncer de mama o silenciamento de *SETMAR* permite a recuperação da sensibilidade das células tumorais a um quimioterápico cujo principal alvo é a topo II alfa, denominado doxorubicina (WRAY et al., 2009a). Não há relatos no envolvimento de *SETMAR* no CCR.

1.4. FAMÍLIA NSD

A família de metiltransferases NSD também é constituída por genes que codificam proteínas com domínio SET. Os genes constituintes desta família são: *NSD1*, *NSD2* (ou *WHSC1*) e *NSD3* (ou *WHSC1L1*).

O gene *NSD1* (*nuclear receptor binding SET domain protein 1*) está localizado no braço longo do cromossomo 5 (5q35). Este gene codifica proteína cujas principais atividades enzimáticas são a mono e dimetilação da lisina 36 da histona H3 e a metilação da lisina 20 da histona H4 (RAYASAM, 2003). *NSD1* também metila proteínas não-histona como a p65 do NF- κ B. NF- κ B é inativado através da mono e dimetilação das lisinas 218 e 221 (LU et al., 2010). Esta proteína contém vários motivos na sua região C-terminal que são fundamentais para suas funções propostas na sinalização e regulação da cromatina (HUANG et al., 1998). Camundongos deficientes em *NSD1* exibem um fenótipo embrionário letal (RAYASAM, 2003). Aproximadamente 5% de todas as leucemias mielóides agudas (LMA) em pacientes humanos abrigam uma translocação no cromossomo 5 do gene *NSD1* (WANG et al., 2007). O mesmo gene foi encontrado translocado em câncer de mama (ZHAO et al., 2009). As proteínas de fusão geradas pela translocação de *NSD1* se comportam como oncogenes em LMA, mas a inativação de *NSD1* em neuroblastomas se comporta como um supressor tumoral (BERDASCO et al., 2009). Não há relatos do envolvimento do gene *NSD1* com o CCR.

O gene *NSD2* (também conhecido como *WHSC1 - Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1*) está localizado no braço curto do cromossomo 4 (4p16.3). A proteína codificada por este gene possui como principal ação enzimática a dimetilação da lisina 36 da histona H3 (MIRABELLA et al., 2014). Já foi visto que *NSD2* está significativamente upregulado em tecidos de vários cânceres, quando comparados aos seus tecidos normais correspondentes. *NSD2* está envolvido com a carcinogênese humana através da regulação da via Wnt e foi reportado como responsável pela distribuição da H3K36me3 ao longo da eucromatina por associação aos fatores de transcrição Sall1, Sall4 e Nanog em células-tronco embrionárias (NIMURA et al., 2009; TOYOKAWA et al., 2011). *NSD2* está envolvido no mieloma múltiplo com a translocação t(4;14), desempenhando um papel crítico na regulação do ciclo celular no mieloma (BRITO et al., 2009). Embora seja possível que *NSD2* esteja envolvido em tumores sólidos, o mecanismo detalhado descrevendo como a regulação desse gene contribui para a carcinogênese humana ainda é incerto. *NSD2* se encontra superexpresso em câncer colorretal (TOYOKAWA et al., 2011).

O gene *NSD3* (também conhecido como *WHSC1L1 - Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1*) está localizado no braço curto do cromossomo 8 (8p11.2). A proteína codificada por este gene possui como principal ação enzimática a dimetilação da lisina 36 da histona H3 (LI et al., 2009). *NSD3* já foi relacionado com a carcinogênese humana, e o número de transcritos desse gene se encontra significativamente elevado em vários cânceres humanos. Análises de imunohistoquímica de câncer de bexiga, pulmão e fígado confirmaram a superexpressão de *NSD3* (KANG et al., 2013). *NSD3* também se encontra amplificado em linhagens celulares de câncer de mama e carcinomas primários da mama, regulando o ciclo celular e a invasão dessas células (ANGRAND et al.)

1.5. JUSTIFICATIVA

O câncer ganha relevância pelo perfil epidemiológico que vem apresentando no Brasil e no mundo, e o câncer colorretal está entre os três tipos de cânceres mais comuns que acometem homens e mulheres. A busca de conhecimento e informação sobre a situação desta doença é fundamental para o estabelecimento de prioridades e alocação de recursos de forma direcionada para modificação positiva deste cenário na

população brasileira e mundial. Além disso, os mecanismos moleculares precisos envolvidos na tumorigênese colorretal permanecem desconhecidos.

Avanços no entendimento molecular do câncer colorretal podem vir a adicionar informações relevantes para a exploração e desenvolvimento de estratégias inovadoras na intervenção farmacológica, bem como para o diagnóstico e prognóstico mais preciso e efetivo da doença.

As evidências do envolvimento do gene *SMYD3*, codificador de metiltransferase, na proliferação dos cânceres de mama, hepatocelular e colorretal (HAMAMOTO et al., 2004, 2006) nos levaram a investigar a expressão de outras metiltransferases proteicas na carcinogênese colorretal. O estudo de expressão gênica nos possibilita analisar o perfil de diversos genes em uma mesma amostra. Neste sentido a utilização de amostras clínicas para esta análise de expressão se torna ferramenta imprescindível e preciosa para correlacionar dados moleculares e clínicos, e a análise comparativa focalizada em um grupo específico de genes pode vir a ser de grande valor na determinação de mecanismos que levam à tumorigênese colorretal.

Desta forma, o presente trabalho se propôs a analisar o perfil de expressão gênica de diferentes metiltransferases proteicas no câncer colorretal, utilizando, para tanto, amostras de tecidos normais e de tecidos tumorais oriundas de pacientes diagnosticados com a doença.

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de metiltransferases proteicas na carcinogênese colorretal e estabelecer o perfil de expressão dos genes putativos codificadores dessas enzimas em amostras clínicas obtidas de pacientes diagnosticados com câncer colorretal.

1.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o padrão de expressão dos genes putativos codificadores de metiltransferase proteicas de lisina, utilizando amostras clínicas normais e tumorais de pacientes com câncer colorretal;

- Correlacionar a expressão gênica com características clínicas de cada paciente;
- Sugerir potenciais alvos moleculares para intervenção terapêutica no câncer colorretal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CULTIVO CELULAR

Para avaliação primária da expressão dos genes propostos neste trabalho, foi utilizada a linhagem celular de câncer colorretal humano HCT116, fornecidas pelo Dr. José Raimundo Corrêa – Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. Além desta linhagem tumorigênica foi utilizada como controle a linhagem celular embrionária de rim humano HEK-293, cedida pela Dr^a. Galina Gulis – Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

A célula HEK-293 foi cultivada com meio DMEM (Gibco – Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA) e a célula HCT116 foi cultivada com meio RPMI (Gibco – Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA). Às preparações dos meios foram adicionados 5mM de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, EUA) e com o auxílio de pHmetro o pH dos meios foi ajustados para 7,2 com HCl (VETEC – Rio de Janeiro, RJ, Brasil) concentrado. Os meios foram esterilizados por filtração através de filtro com membrana filtrante em nitrato de celulose com poros de 0,22µm (Millipore - Billerica, MA, EUA), em condições estéreis. Após a esterilização, os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (Gibco – Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA), 100.000U/L de penicilina (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, EUA) e 100mg/L de estreptomicina (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, EUA). Antes dos meios de cultura serem utilizados, foi feito um teste para saber se estes estavam ou não livres de contaminação. O teste consistia em dispensar 1mL do meio de cultura recém preparado e filtrado em um tubo de ensaio contendo 5mL de meio LB (quantidade de água destilada suficiente para 10g/L de triptona, 10g/L de NaCl, 5g/L e 5g/L de extrato de levedura), que era então tampado com algodão e encaminhado para um *shaker* rotativo orbital a 250rpm e 37°C e vistoriado após 24, 48 e 72 horas. Caso o meio LB continuasse com aparência translúcida, decorridas as 72 horas, não apresentando aspecto turvo característico de contaminação, os meios de cultura investigados estariam aptos para uso. Todas as células utilizadas neste estudo eram aderentes e foram cultivadas em placas de cultura de 10cm de diâmetro e mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

A linhagem celular HCT116 (ATCC[®] CCL-247[™]) foi estabelecida a partir do cólon de humano. Ela é do tipo epitelial e foi coletada de indivíduo adulto do gênero masculino. HCT116 foi caracterizada como carcinoma colorretal. A linhagem celular HEK-293 (ATCC[®] CRL-1573[™]) foi estabelecida a partir do rim de feto humano é do tipo epitelial.

2.1.1. DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS

A linhagem celular HEK-293 estava previamente aliquotada em criotubo e conservada em nitrogênio líquido. Para ser reavivada, dando início à cultura, foi retirada do nitrogênio líquido e levada imediatamente para o banho-maria a 37°C, onde permaneceu até total liquefação da solução. O conteúdo do criotubo foi transferido para tubo cônico de 15mL e, gota a gota, foram acrescentados 5mL de meio DMEM em cada tubo. O tubo foi levado à centrifuga em temperatura ambiente por 5 minutos a 1500rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi aspirado, o *pellet* foi ressuspensão em 5mL de meio DMEM e o conteúdo foi colocado em uma placa de cultura de 10cm de diâmetro e encaminhado para estufa úmida.

A linhagem celular HCT116 foi cedida já em cultura, em garrafa de cultura de 25cm², e encaminhada para estufa úmida.

2.1.2. PASSAGEM DE CÉLULAS

Para a passagem das células os meios de cultura foram aspirados das placas, e as mesmas foram lavada com 5mL PBS 1X (137mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄ – pH 7,4). O PBS 1X foi, então, aspirado das placas e adicionou-se 2mL tripsina 0,25% em EDTA. As células foram incubadas em estufa úmida com tripsina 0,25% a 37°C por 1 minuto ou até que tivessem se soltado da placa, conforme acompanhado em microscópio óptico invertido. Para retardar o efeito da tripsina sob as células, foram adicionados à cada placa 8mL dos respectivos meios de cultura. As células foram ressuspensas, transferidas para um tubo cônico de 15mL e centrifugadas em temperatura ambiente a 2000rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram aspirados e os *pellets* ressuspensos em 10mL dos respectivos meios de cultura.

Após este procedimento, transferiu-se a quantidade desejada de células para as placas de cultura, que tiveram seu volume completado para 10mL, com o meio de cultura adequado, e as células foram encaminhadas para estufa úmida. As passagens de células foram realizadas a fim de atingir-se uma confluência e quantidade de placas adequadas para que fossem realizadas as extrações de RNA das linhagens celulares.

2.2. SELEÇÃO DE PACIENTES

As amostras utilizadas foram provenientes de pacientes atendidos pelo Serviço de Coloproctologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) que foram submetidos a tratamento cirúrgico do cólon para retirada de tumor. Os pacientes foram selecionados e as amostras foram coletadas a partir do primeiro semestre de 2012 até o primeiro semestre de 2014. Pacientes de qualquer gênero e idade puderam participar do estudo.

Antecedendo a coleta, um dia antes do procedimento cirúrgico, todos os pacientes envolvidos nesta pesquisa foram visitados e esclarecidos sobre o tipo de estudo que seria feito com as amostras coletadas, além de terem recebido uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) nesta mesma ocasião (Apêndice A).

2.2.1. CRITÉRIO DE INCLUSÃO PARA O GRUPO DE ESTUDO

- Pacientes com diagnóstico histopatológico de adenoma ou adenocarcinoma de cólon;
- Pacientes atendidos inicialmente pelo Serviço de Coloproctologia do HUB ou encaminhados ao mesmo com diagnóstico de adenoma ou adenocarcinoma de cólon ou reto;
- Pacientes em concordância com a pesquisa e que assinaram as duas vias do TCLE.

2.2.2. CRITÉRIO DE EXCLUSÃO PARA O GRUPO DE ESTUDO

- Pacientes com câncer localizado em região cuja coleta de fragmentos prejudicaria a análise histopatológica da peça cirúrgica pelo Serviço de Patologia Clínica do HUB;
- Pacientes que, por qualquer motivo, não estiveram em concordância com a pesquisa e que recusaram assinar qualquer uma das vias do TCLE.

2.3. COLETA DE AMOSTRAS FRESCAS NORMAIS E TUMORAIS DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM CÂNCER COLORRETAL

Após tratamento cirúrgico foram removidos do mesmo paciente fragmentos de aproximadamente 1cm de extensão do tumor. Na extremidade oposta a esses fragmentos tumorais foram removidos fragmentos de aproximadamente 1cm de extensão da mucosa intestinal. A coleta ideal consistia em três fragmentos tumorais e três fragmentos normais. Todavia, por motivos de preservação da peça para análise anatomopatológica de rotina do Hospital, houve coletas de no máximo um fragmento de tecido tumoral e um fragmento de tecido normal de cada paciente. Todos os fragmentos foram coletados por profissional médico qualificado, afim de não danificar a peça cirúrgica como um todo, que seguiria posteriormente para procedimento padrão do Setor de Anatomia Patológica do HUB.

Cada fragmento era cortado longitudinalmente gerando duas partes espelhadas. Uma parte seguia para imediato procedimento de congelamento em nitrogênio líquido e destinava-se para o Laboratório de Patologia Molecular do Câncer (FS/UnB) e a outra parte seguia para imediato procedimento de conservação de em solução de preservação (formaldeído) e destinava-se para a área de Anatomia Patológica do HUB ou para o Laboratório de Patologia da Universidade de Brasília, sob os cuidados do Dr. Florêncio Figueiredo Cavalcante Neto, a fim de que fossem gerados laudos relatando a presença de tumor ou não nos fragmentos encaminhados (Figura 4). Somente amostras tumorais que apresentaram pelo menos 90% de malignidade e amostras normais que apresentaram 0% de malignidade foram utilizadas neste trabalho. A análise patológica para determinação da porcentagem de malignidade nas amostras coletadas foi realizada por microscopia óptica em cortes representativos da amostra.

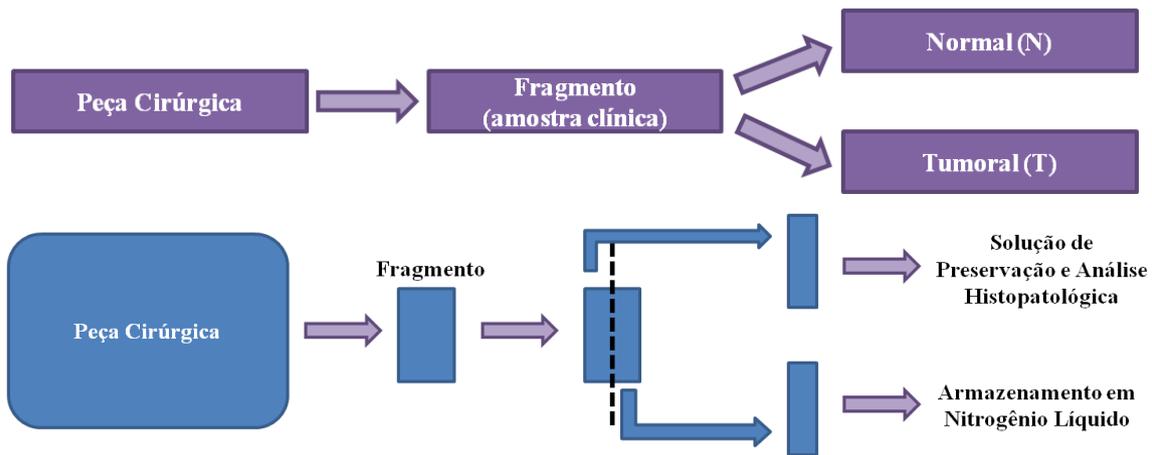


Figura 4. Captação de fragmentos de amostras clínicas. Esquema representativo da coleta das amostras clínicas utilizadas no presente trabalho. Após remoção da peça cirúrgica eram captados pelo menos um fragmento tumoral e um fragmento não tumoral do mesmo paciente.

Também nos foram cedidas pela Dr^a. Rosângela Vieira de Andrade – Universidade Católica de Brasília (UCB) – amostras de tecidos normais e tumorais de pacientes diagnosticados com CCR, que obedeciam ao mesmo padrão proposto para as amostras coletadas pela nossa equipe.

2.4. COLETA DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM CÂNCER COLORRETAL

Os dados clínicos dos pacientes diagnosticados com câncer colorretal foram coletados através de seus prontuários clínicos do Hospital Universitário de Brasília. Os prontuários foram acessados no momento de realização da cirurgia e após o lançamento do laudo da análise histopatológica da peça cirúrgica, realizado pela área de Anatomia Patológica do próprio Hospital Universitário de Brasília.

Foram coletados dados referentes ao gênero do paciente, idade, grau histológico da peça cirúrgica, extensão microscópica, invasão angiolinfática, invasão perineural, linfonodos acometidos, estadiamento e alterações histológicas associadas à instabilidade microssatélite.

2.5. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

A extração de RNA total das células em cultura foi realizada com o reagente TRIzol[®] (Invitrogen – Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA). O meio de cultura das placas de cultura para células aderentes de 10cm de diâmetro foi removido e as mesmas foram lavadas por duas vezes com 5mL de PBS 1X gelado. Mantidas em gelo, adicionou-se 1mL de TRIzol[®] e raspou-se as células do fundo da placa com o auxílio de espalhadores de células para placas de petri (TPP - Trasadingen, Suíça). Após soltas, as células foram lisadas através de movimentos *up-down* com o auxílio de pipeta p1000 e transferidas para microtubos de 1,5mL livres de ribonucleases (RNase Free), onde o processo de extração de RNA por TRIzol[®] foi seguido conforme orientações do fabricante. Na etapa em que se formava precipitado de RNA, quando este era muito pequeno ou invisível, utilizou-se 3µg de glicogênio livre de RNases (Invitrogen – Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA) e a centrifugação para precipitação do RNA foi feita novamente, seguida pelos passos subsequentes do protocolo do fabricante. Os *pellets*, compostos por RNA, obtidos foram ressuspensos em água miliQ RNase Free em volumes que variaram de 30µL a 50µL, dependendo do tamanho do *pellet*.

As amostras clínicas de pacientes, armazenadas em nitrogênio líquido, foram rapidamente retiradas dos criotubos e postas em tubos de ensaio fornados e preparados livres de RNases contendo 1mL de TRIzol[®]. O fragmento submerso em TRIzol[®] era então macerado com o auxílio do equipamento ULTRA-TURRAX[®] modelo T10B (IKA – EUA), sendo o tubo de ensaio mantido por todo o tempo em recipiente com gelo, para evitar a degradação do RNA pelo calor gerado pela rotação da sonda do equipamento. Após a maceração completa da amostra, o protocolo de extração pelo método TRIzol[®] foi seguido conforme orientações do fabricante. Assim como nas linhagens celulares, utilizou-se 3µg de glicogênio quando o precipitado de RNA era muito pequeno ou invisível, a centrifugação para precipitação do RNA era feita novamente e as etapas seguintes do protocolo do fabricante eram seguidas. Os *pellets*, compostos por RNA, obtidos foram ressuspensos em água miliQ RNase Free em volumes que variaram de 20µL a 70µL, dependendo do tamanho do *pellet*.

2.5.1. QUANTIFICAÇÃO DE RNA TOTAL

A quantificação e o grau de pureza dos RNAs totais extraídos foram determinados por espectrometria, utilizando-se o aparelho NanoVue Plus™ (GE Healthcare - Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) com o intuito de, posteriormente, permitir uma síntese eficiente de DNA complementar. A quantificação foi realizada no comprimento de onda de 260nm e expressa em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O grau de contaminação por componentes orgânicos foi verificado por meio da razão entre os comprimentos de onda 260nm e 230nm. O grau de contaminação por proteínas foi verificado por meio da razão entre os comprimentos de onda 260nm e 280nm. Razões entre 1,5 e 1,9 foram consideradas adequadas. Neste estudo utilizamos RNAs extraídos em concentrações que variaram de 0,39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 4,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e com índice de pureza que variaram de 1,5 a 1,9. Após quantificação dos RNAs, foi aliqotado 1 μg de cada amostra em eppendorfs de 250 μL para posterior análise qualitativa do material. Os RNAs, incluindo as alíquotas de 1 μg , foram imediatamente armazenados a -80°C .

2.5.2. ANÁLISE QUALITATIVA EM GEL DE AGAROSE

Para verificar a integridade do RNA extraído das linhagens celulares e das amostras clínicas, as alíquotas contendo 1 μg de RNA total foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. O gel de agarose foi preparado na concentração de 1%. Assim, para cada 100mL de TAE 1X (40mM de Tris base, 20mM de ácido acético glacial e 1mM de EDTA pH = 8,0), adicionou-se 1g de agarose e brometo de etídio a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como agente intercalante de bases, a fim de evidenciar a presença de amplicon quando submetido à luz UV. Às amostras de RNA foram adicionadas água miliQ RNase Free suficiente para completar o volume final de 10 μL . Às estes 10 μL foram adicionados 2 μL de tampão de amostra azul de bromofenol 5X (Glicerol 50%, Azul de Bromofenol 0,20% e TAE 2,5X).

A cuba de eletroforese foi preenchida por TAE 1X até a linha de enchimento, cobrindo todo o gel de agarose. As amostras foram aplicadas nos poços e a migração das mesmas, do polo negativo para o polo positivo, foi favorecida por uma corrente de 100V durante 30 minutos, aplicada em cuba de eletroforese horizontal. Após a corrida o gel foi analisado em fotodocumentador para visualização da presença de RNA ribossomal. A garantia da qualidade do material extraído foi evidenciada pela presença

de duas bandas nítidas de RNA ribossomal, uma correspondente à unidade mais pesada (28S) e uma correspondente à unidade mais leve (18S), sendo que a razão de referência entre as duas é de 2:1 (Figura 5).

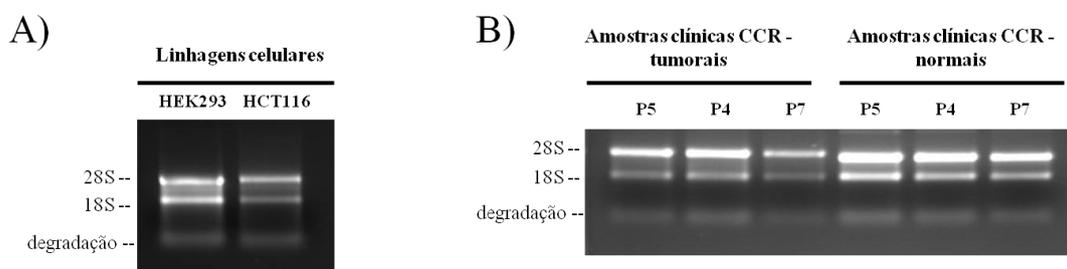


Figura 5. Avaliação da integridade do RNA extraído de linhagens celulares e amostras clínicas. Eletroforese do RNA extraído de linhagens celulares (A) e amostras clínicas (B). P5, P4 e P7: pacientes. Gel de agarose 1% com brometo de etídio.

Quando a pureza - aferida pela quantificação do RNA - e a qualidade - verificada pela eletroforese em gel de agarose - das amostras não eram adequadas, o RNA era reprecipitado com 2 μ g de glicogênio e o processo seguia a partir da etapa de centrifugação para precipitação do RNA, conforme protocolo do fabricante do TRIzol[®]. Então, após o RNA repurificado ser ressuspenso em água miliQ RNase Free, sua quantificação e pureza era avaliadas novamente utilizando o espectrofotômetro NanoVue[™] e 1 μ g do RNA era separado para posterior avaliação de integridade em gel de agarose 1%.

2.6. SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR

Após a extração de RNA total das linhagens celulares e das amostras clínicas, 2 μ g de cada RNA foram tratadas com DNase I (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, EUA), de acordo com protocolo do fabricante, a fim de eliminar qualquer resíduo de DNA genômico. Imediatamente após este tratamento, o RNA foi utilizado para síntese de cDNAs com o auxílio do kit de transcrição reversa de cDNA *The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

2.7. ANÁLISE DA QUALIDADE DA SÍNTESE DE CDNA

2.7.1. PCR SEMI-QUANTITATIVO

Para avaliar a qualidade dos cDNAs sintetizados, estes foram utilizados em PCR semi-quantitativa para amplificação do gene da *β-actina*. A composição do *mix* para reação de PCR encontra-se na Tabela 9 e a sequência dos *primers foward* e *reverse* da *β-actina* encontra-se na Tabela 10. O *primer* de *β-actina* foi desenhado utilizando o *software* Primer-BLAST do site NCBI.

Tabela 9. *Mix* para reação de PCR.

Reagentes	1 reação
Tampão RT 10X (200mM Tris-HCl pH 8,4, 500mM KCl)	1,25μL
MgCl ₂ (25mM)	1,25μL
dNTPs (10mM)	0,2μL
<i>Primer Foward</i> (10pM)	0,6μL
<i>Primer Reverse</i> (10pM)	0,6μL
Taq DNA Polimerase (5U/mL)	0,1μL
H2O miliQ	7,2μL
Total	11,5uL

Tabela 10. Sequência dos *primers foward* e *reverse* para amplificação do gene da *β-actina*.

Gene	Primer (5' → 3')	
	Foward	Reverse
<i>β-actina</i>	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

Os reagentes descritos na Tabela 9 foram adicionados em um único eppendorf de 1,5mL de acordo com o número de reações que seriam feitas, sempre com uma margem de erro de 10% sobre o volume de pipetagem. Em seguida, foram dispensados 11,5μL do *mix* em cada eppendorf de 250μL que seguiria para PCR. Às reação que serviriam como controle positivo, foram adicionados 0,5μL de cDNA de alta qualidade previamente conhecido e utilizado (provenientes de linhagem de câncer de mama MCF7). Às reações que serviriam como controle de qualidade dos cDNAs sintetizados a

partir de linhagens celulares e amostras clínicas pertinentes a este estudo foram adicionados 0,5µL dos cDNAs em questão. Às reações que serviriam como controle negativo foram adicionados apenas 12µL de mix e não foi adicionado nenhum cDNA. Os eppendorfs de 250µL, contendo 12µL de reação cada, foram levados para o termociclador e a amplificação foi realizada conforme o programa descrito a seguir:

94°C – 2 minutos
44°C – 30 segundos }
60°C – 30 segundos } 30
72°C – 30 segundos }
72°C – 1 minuto
4°C - ∞

2.7.2. ANÁLISE QUALITATIVA EM GEL DE AGAROSE

O produto final da PCR foi analisado qualitativamente em gel de agarose. Aos 12µL de produto final da PCR foram adicionados 2µL de tampão de carregamento azul de bromofenol 6X (Invitrogen – Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal de eletroforese a 90V por 1 hora e 30 minutos.

Ao final da corrida, o gel foi analisado em fotodocumentador sob luz UV e observou-se a presença ou ausência de *amplicons*, bem como se estes apresentavam o tamanho esperado referente ao gene da *β-actina* ou possuíam contaminações aparentes (Figura 6). Caso fosse obtido um resultado de qualidade nesta análise, os cDNAs eram assumidos como aptos a serem utilizados em PCR em tempo real.

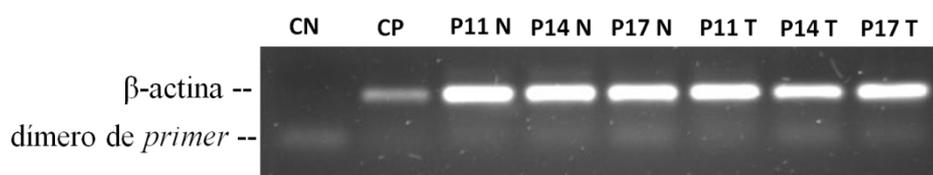


Figura 6. Análise dos cDNAs sintetizados a partir do RNA extraído de amostras clínicas. Eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio. cDNAs sintetizados a partir do RNA extraído de amostras clínicas. CN = controle negativo; CP = controle positivo; P = paciente; N = amostra normal e T = amostra tumoral.

2.8. PCR EM TEMPO REAL

Para a análise da expressão dos genes *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6*, *SETD7*, *SETD8*, *SETMAR*, *NSD1*, *NSD2* e *NSD3*, as amostras clínicas foram submetidas à técnica de PCR em tempo real (qPCR). O desenho e a construção dos iniciadores e das sondas para tais genes e para o gene constitutivo *β -actina* foram feitos por meio do serviço *Assay by Design* fornecido pelo fabricante para ensaios com o sistema Taqman® (Applied Biosystems - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA) (Tabela 11).

Tabela 11. Ensaio adquiridos para análise da expressão gênica por qPCR.

Gene	Ensaio
<i>SETD1A</i>	Hs00322315_m1
<i>SETD1B</i>	Hs00902716_m1
<i>SETD2</i>	Hs01014784_m1
<i>SETD3</i>	Hs01119427_m1
<i>SETD4</i>	Hs00213731_m1
<i>SETD5</i>	Hs00216962_m1
<i>SETD6</i>	Hs00227507_m1
<i>SETD7</i>	Hs00363902_m1
<i>SETD8</i>	Hs00360662_s1
<i>SETMAR</i>	Hs00538177_m1
<i>NSD1</i>	Hs00328315_m1
<i>NSD2</i>	Hs00370212_m1
<i>NSD3</i>	Hs00256558_m1
<i>β-actina</i>	Hs99999903_m1

Assim que adquiridos, todos os ensaios foram padronizados por diluição seriada utilizando cDNAs da linhagem HCC1954 e MCF7 (Figura 7).

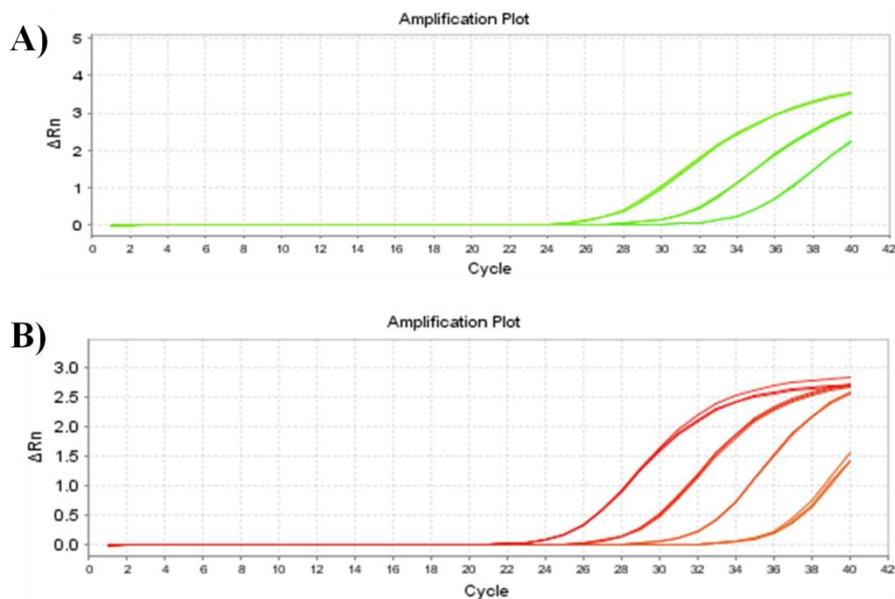


Figura 7. Curva de padronização por qPCR de alguns dos ensaios adquiridos. Ensaios para A) *SETD3* e B) *SETD6*. Os valores de eficiência utilizados nesses e em ensaios não mostrados foram sempre maiores que 90%.

Para uma reação de PCR em tempo real, utilizou-se 2,5 μ L de água MiliQ, 5 μ L de MasterMix Universal para Taqman® (Applied Biosystems - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA), 0,5 μ L do ensaio de iniciadores e sonda (Applied Biosystems - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA) e 2 μ L de amostra de cDNA (em um padrão 1:10 de diluição em água miliQ, de forma que o CT para o gene da β -actina ficasse em posição intermediária – cerca de 24 ciclos), totalizando 10 μ L de volume final. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA) em triplicata para cada gene e os ciclos foram determinados automaticamente pelo próprio programa do termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA) - *Holding stage*: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C; 1 minuto a 60°C. Utilizamos o cDNA da linhagem celular HEK293 como controle de placa de qPCR, sendo o CT do gene de β -actina para esta linhagem o mesmo (com variação de meio ciclo para mais ou para menos) em todas as placas. Isso nos garantia o correto funcionamento do ensaio.

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

2.9. ANÁLISES DOS DADOS GERADOS PELO PCR EM TEMPO REAL

Os dados gerados pelo equipamento foram organizados em uma tabela utilizando o programa Excel (Microsoft) e todos os cálculos para chegar à quantificação relativa pelo método $\Delta\Delta CT$ foram baseados no manual do fabricante do equipamento (Applied Biosystems - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA) (Applied Biosystems, 2008), sendo que o CT (*Cycle Threshold*) representa o ciclo da reação de PCR em que a amplificação do produto entra na fase exponencial. A média dos valores de todo CT dos genes das famílias SETD e NSD de cada amostra foi calculada e normalizada por subtração do valor de CT do gene endógeno (*β -actina*) co-amplificado, gerando o valor ΔCT (CT gene em estudo – CT gene endógeno). Em seguida, foi calculada a média dos CTs de todas as amostras não-tumorais e a média dos CT do gene endógeno destas mesmas amostras, com cálculo do ΔCT das médias. O ΔCT de cada amostra foi subtraído do ΔCT das médias, gerando o valor $\Delta\Delta CT$. A quantidade do gene-alvo, normalizada com uma referência endógena e relativa ao calibrador foi convertida em quantificação relativa (QR) pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Utilizando o valor da QR final, os gráficos e a análise estatística foram realizados utilizando-se o programa *GraphPad Prism®* versão 5. Utilizamos o teste estatístico de *Mann-Whitney* para amostras independentes, o teste t para amostras pareadas e o teste de correlação binária de *Spearman*. A significância estatística foi definida como um valor de $p < 0,05$ que representa uma confiabilidade de 95% da análise.

2.10. PESQUISA EM BANCO DE DADOS ON-LINE DE IMUNOHISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS

A plataforma *The Human Protein Atlas* foi utilizada para avaliarmos a presença das proteínas codificadas pelos genes de interesse deste estudo em um grupo de pacientes. Nesta base de dados de livre acesso pode-se procurar por genes ou proteínas e encontrar perfis de expressão de proteínas baseados na imunohistoquímica para uma grande variedade de tecidos humanos, amostras de câncer e linhagens celulares. Além desta possibilidade, pode-se ainda obter a localização subcelular do gene ou proteína em

três linhagens celulares e obter os níveis de expressão/transcrição em três linhagens celulares.

2.11. ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FS/UnB e aprovado sob o número 021/12 (Apêndice B). A aprovação foi baseada na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde, e foi iniciado apenas após sua aprovação.

Todos os pacientes envolvidos no presente estudo, ou seus representantes legais, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) concordando em participar desta pesquisa.

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES

Foram analisadas 17 amostras de tecido normal de mucosa intestinal e 16 amostras de tecido tumoral de pacientes com diagnóstico de câncer colorretal, sendo 16 amostras pareadas (quando as amostras normal e tumoral são provenientes de mesmo paciente). Neste grupo de estudo temos registros de 10 indivíduos do sexo feminino e 6 indivíduos do sexo masculino. A idade média dos pacientes foi de aproximadamente 58 anos, sendo que o paciente mais novo apresentava idade de 44 anos e o mais idoso de 78 anos (Tabela 12).

Tabela 12. Idade, sexo e estadiamento do câncer colorretal dos pacientes.

Paciente	Gênero	Idade	Estadiamento
P1	M	45	pTis pN0 pMx
P2	F	62	ypT4b ypN1a ypMx
P3	M	44	ypT3 pN1b pMy
P4	F	ND	ND
P5	F	61	pT2 pN0 pMx
P6	M	55	pT3 pN2b
P7	M	71	pT4b pN0 nMx
P8	M	48	ypT3 ypN0 ypMx
P9	F	78	ND
P11	F	72	T3 N1 M0
P13	F	62	pT2 pN0 pMx
P14	M	ND	ND
P15	F	44	pT3 N2a
P16	F	74	ND
P17	F	54	pT4a N0
P18	F	53	T1 N0 M0

F = feminino; M = masculino; ND = informação não disponível; p = classificação patológica, y = cânceres que foram identificados antes de pré-tratamento neoadjuvante e x = metástase à distância não pode ser avaliada.

Com base nos dados dos prontuários que obtivemos acesso, 6 pacientes não apresentavam invasão angiolinfática evidenciada e 2 pacientes apresentavam invasão angiolinfática. Invasão perineural foi evidenciada em 3 pacientes e não evidenciada em 7 pacientes. Não houve nenhum paciente com invasão angiolinfática evidenciada concomitantemente com invasão perineural evidenciada. Houve uma média de 19 linfonodos isolados após cada ressecção cirúrgica, com mínimo de 2 e máximo de 50 linfonodos avaliados. A média de linfonodos com lesão metastática foi de 5 (Tabela 13).

Tabela 13. Avaliação da invasão angiolinfática e perineural e de linfonodos acometidos.

Paciente	Invasão angiolinfática	Invasão perineural	Linfonodos isolados	Linfonodos acometidos
P1	Não evidenciada	Não evidenciada	ND	0
P2	Não evidenciada	Presente	4	1
P3	Não evidenciada	Não evidenciada	50	2
P5	Não evidenciada	Presente	21	1
P6	Presente	Não evidenciada	28	15
P7	Não evidenciada	Presente	21	0
P8	Não evidenciada	Não evidenciada	17	0
P13	Não evidenciada	Não evidenciada	12	0
P15	Presente	Não evidenciada	16	6
P17	Não evidenciada	Não evidenciada	19	0

ND = informação não disponível.

Quanto à extensão microscópica do tumor houve a possibilidade de análise de 9 pacientes, variando de invasão à muscular da mucosa até invasão do tumor na parede

posterior da vagina ou bexiga. Os dados detalhados da extensão microscópica do tumor se encontram na Tabela 14.

Tabela 14. Avaliação da extensão microscópica do tumor em 9 pacientes.

Paciente	Extensão microscópica
P1	O tumor invade a muscular da mucosa
P2	O tumor invade parede posterior da vagina
P3	Sigmoide: o tumor invade subserosa. Reto: o tumor invade muscular própria
P5	O tumor invade até a muscular própria
P6	O tumor atravessa a muscular própria até o tecido adiposo subseroso ou pericólico não peritonizado ou tecidos moles perirretais, mas não atinge a serosa
P7	O tumor penetra a serosa e invade a bexiga
P8	O tumor ultrapassa muscular própria com foco de extensão para adventícia perirretal
P13	O tumor invade até a muscular própria
P17	O tumor penetra peritônio visceral

Em relação à presença de alterações histológicas associadas à instabilidade microsatélite obtivemos amostras com infiltrados de linfócitos intratumorais e peritumorais que variaram de discreto a moderado, conforme consta na Tabela 15.

Tabela 15. Alterações histológicas associadas à instabilidade microsatélite.

Paciente	Infiltrado de linfócito intratumoral	Infiltrado de linfócito peritumoral
P2	Moderada	Moderada
P3	Discreta	Moderada
P5	Discreta	Discreta
P6	Discreta a moderada	Discreta a moderada
P7	Moderada	Moderada
P8	Moderada	Moderada
P13	Moderado	Moderado
P15	Discreto	Discreto

3.2. EXPRESSÃO GÊNICA DOS COMPONENTES DAS FAMÍLIAS SETD E NSD EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER COLORRETAL

Primeiramente investigamos a expressão de todos os genes das famílias SETD e NSD na linhagem celular de HCT, de câncer colorretal. Para tanto, foi realizada PCR em tempo real (qPCR) para todos os 13 genes em nossa amostra piloto (Figura 8). Observou-se a amplificação de todos os genes propostos para este estudo na linhagem celular de CCR. Notamos que os Δ CT (o gene endógeno normalizador foi a β -actina) de cada gene variaram dentro da mesma amostra, indicando que a presença desses genes não se dá de forma homogênea em uma mesma célula. Isto posto, fomos capazes de seguir com a avaliação da expressão gênica em amostras de tecidos tumorais de CCR.

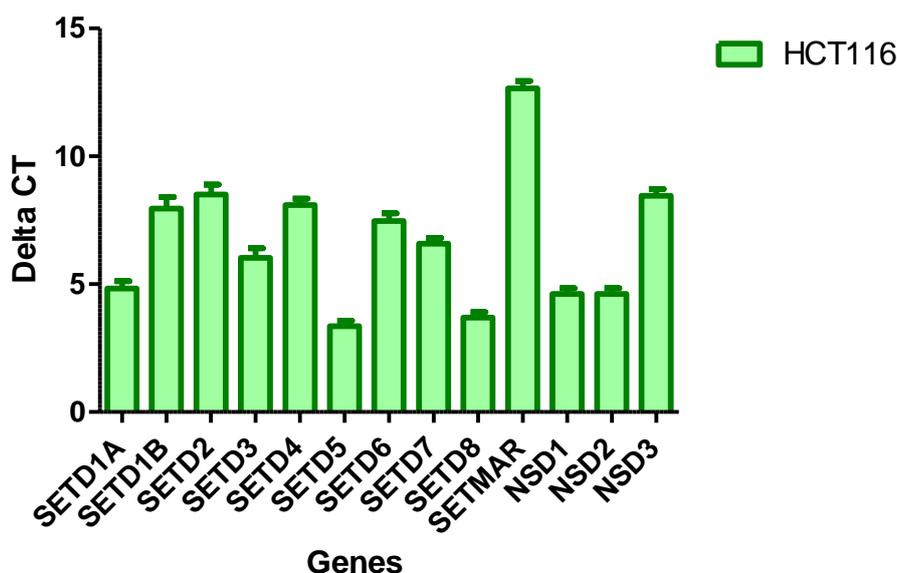


Figura 8. Δ CT dos genes das famílias SETD e NSD em linhagem celular de câncer colorretal. Gene endógeno normalizador = β -actina. Todos os genes de interesse do presente estudo se encontram expressos em linhagem de câncer colorretal.

3.3. PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS FAMÍLIAS SETD E NSD NO CÂNCER COLORRETAL

3.3.1. AMOSTRAS NORMAIS VERSUS AMOSTRAS TUMORAIS

3.3.1.1. EXPRESSÃO COMPARATIVA DE SETD2 E SETD8 NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DE TECIDOS TUMORAIS QUANDO PAREADAS ÀS AMOSTRAS DE TECIDOS NORMAIS

Avaliamos de forma isolada no grupo total de amostras aquelas que denominamos pareadas. Estas amostras possuem como importante característica o fato de ambas (normal e tumoral) terem sido coletadas de mesmo paciente.

No cenário clínico específico de amostras pareadas observamos a hipoeexpressão relativa dos genes *SETD2* e *SETD8* nas amostras tumorais quando comparado às amostras normais (N = 15 para cada um dos genes) (Figuras 9 e 10).

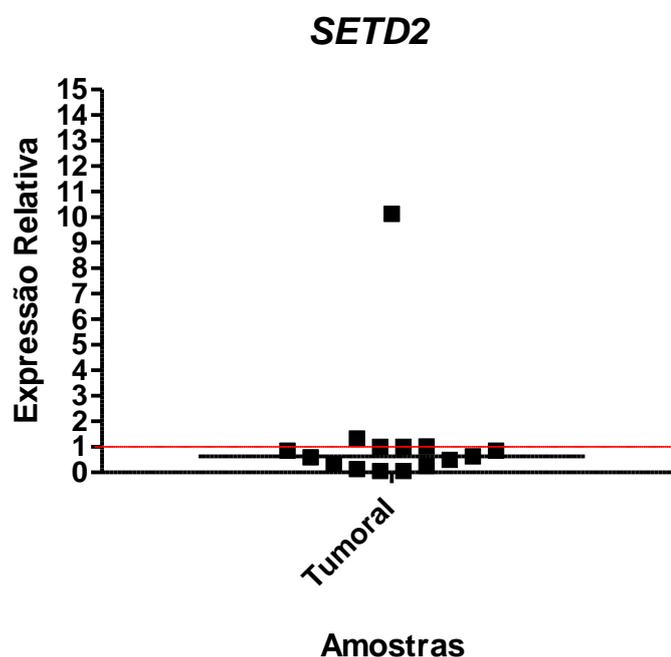


Figura 9. Expressão relativa do *SETD2* em amostras pareadas de câncer colorretal. Teste t, com $p = 0,0256$. A expressão gênica foi representada em relação às expressões em amostras de tecidos normais, onde o valor foi arbitrariamente atribuído como 1 (sinalizado pela linha vermelha).

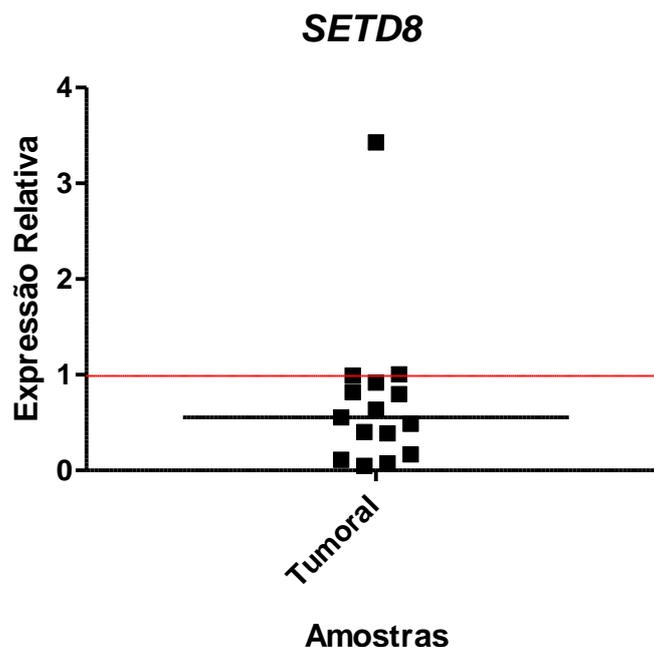


Figura 10. Expressão relativa do *SETD8* em amostras pareadas de câncer colorretal. Teste de t, com $p = 0,0084$. A expressão gênica foi representada em relação às expressões em amostras de tecidos normais, onde o valor foi arbitrariamente atribuído como 1 (sinalizado pela linha vermelha).

3.3.1.2. CORRELAÇÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES *SETD2* E *SETD8* NAS AMOSTRAS DE TECIDOS TUMORAIS

Realizamos uma avaliação de correlação de expressão entre os dois genes envolvidos na expressão diferencial em amostras pareadas e notamos que há uma correlação entre *SETD2* e *SETD8* nas amostras clínicas de pacientes com câncer colorretal (Figura 11).

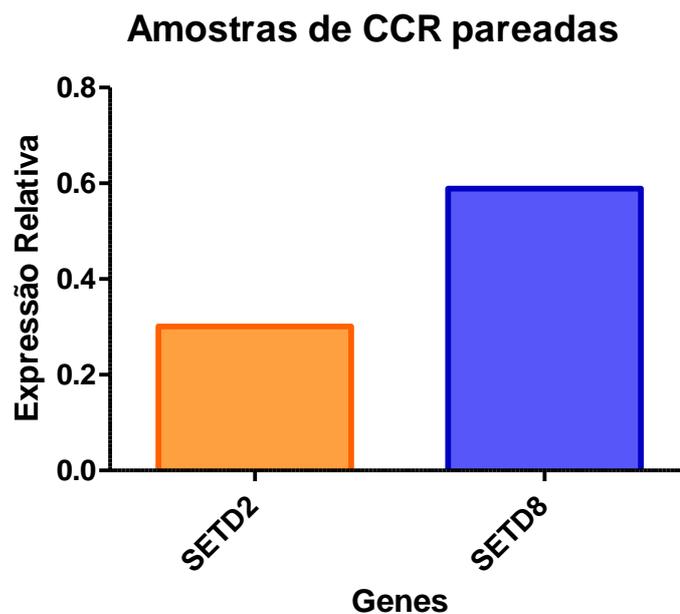


Figura 11. Correlação de expressão entre *SETD2* e *SETD8* em amostras clínicas pareadas. Correlação de *Spearman*. Coeficiente de correlação = 0,847. $p = 0,00003$.

3.3.1.3. EXPRESSÃO COMPARATIVA DOS DEMAIS MEMBROS DA FAMÍLIA SETD E FAMÍLIA NSD NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DE TECIDOS TUMORAIS QUANDO PAREADAS ÀS AMOSTRAS DE TECIDOS NORMAIS

Ainda no contexto de análise de amostras pareadas, não observamos expressão diferencial estatisticamente significativa para os genes *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6*, *SETD7* e *SETMAR* (Figura 12), assim como para os genes *NSD1*, *NSD2* e *NSD3* (Figura 13).

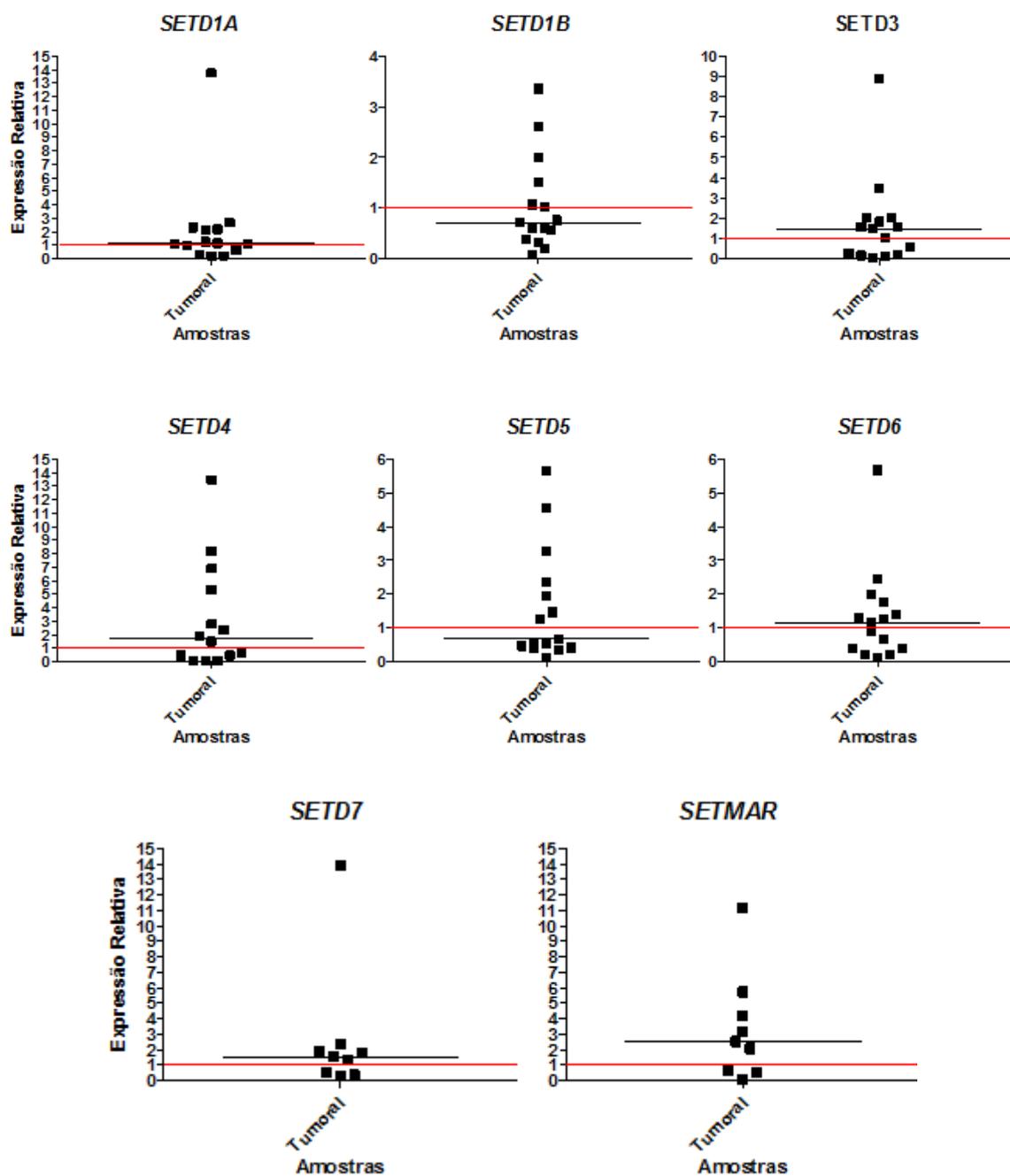


Figura 12. Expressão relativa de *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6*, *SETD7* e *SETMAR* em amostras pareadas de câncer colorretal. Teste t, com $p = 0,1937$ para *SETD1A*, $p = 0,5995$ para *SETD1B*, $p = 0,4887$ para *SETD3*, $p = 0,1531$ para *SETD4*, $p = 0,6788$ para *SETD5*, $p = 0,8040$ para *SETD6*, $p = 0,2500$ para *SETD7* e $p = 0,0547$ para *SETMAR*. A expressão gênica foi representada em relação às expressões em amostras de tecidos normais, onde o valor foi arbitrariamente atribuído como 1 (sinalizado pela linha vermelha).

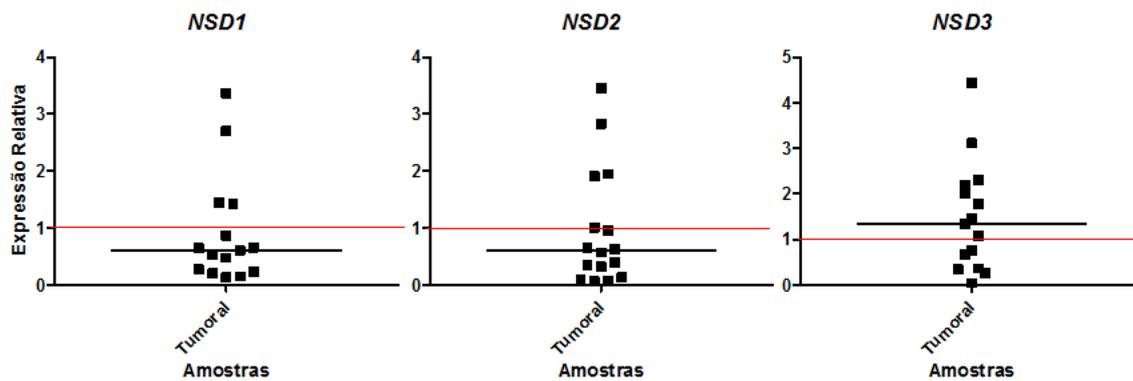


Figura 13. Expressão relativa de *NSD1*, *NSD2* e *NSD3* em amostras pareadas de câncer colorretal. Teste t, com $p = 0,2769$ para *NSD1*, $p = 0,3936$ para *NSD2* e $p = 0,2524$ para *NSD3*. A expressão gênica foi representada em relação às expressões em amostras de tecidos normais, onde o valor foi arbitrariamente atribuído como 1 (sinalizado pela linha vermelha).

3.3.2. SEXO

Separamos as amostras em dois grupos, um de pacientes do sexo feminino e outro com pacientes do sexo masculino. Analisamos apenas as amostras de tecido tumoral desses pacientes e não observamos diferença de expressão estatisticamente significativa para os genes da família SETD (Figura 14) nem para os genes da família NSD (Figura 15).

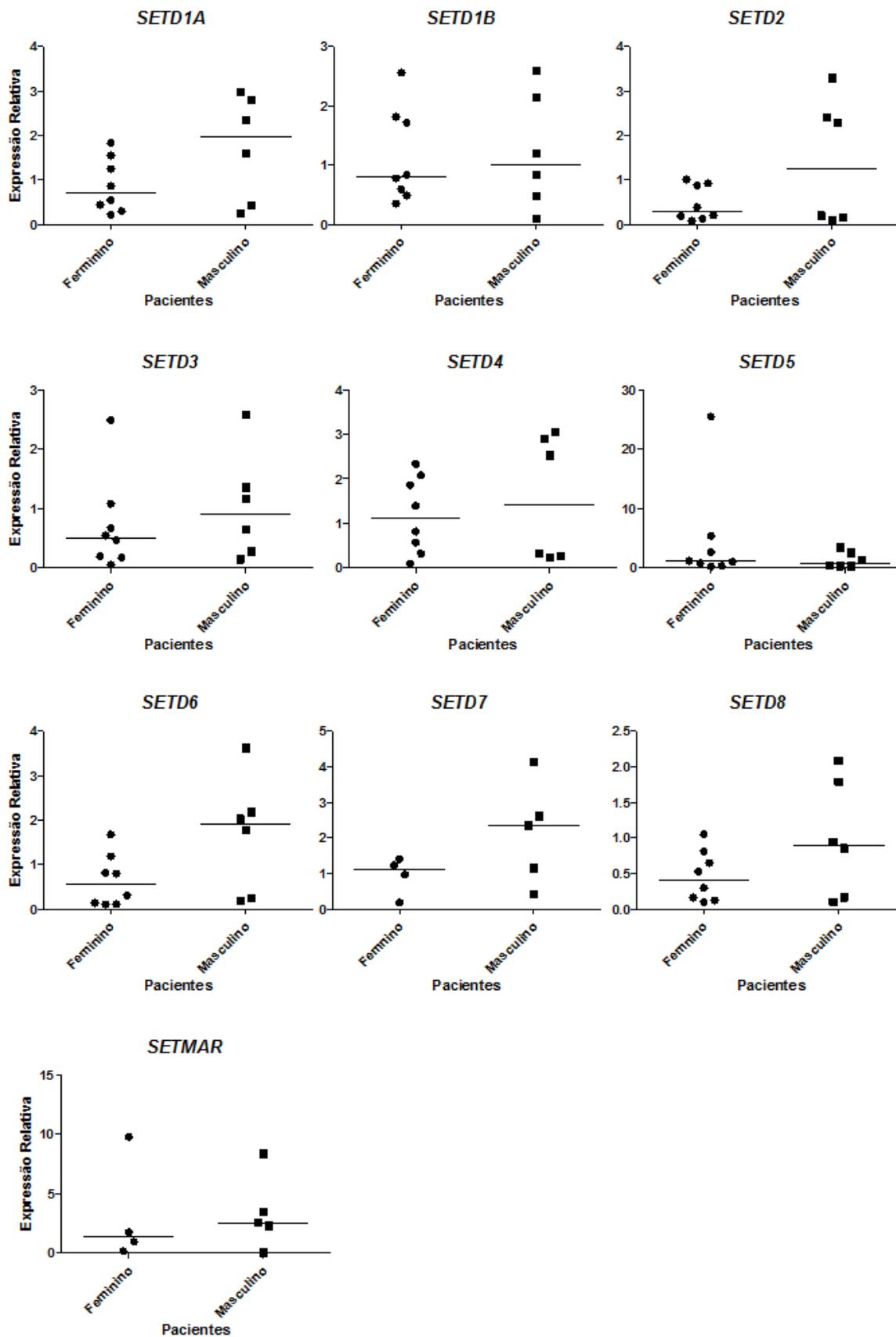


Figura 14. Expressão relativa de *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6*, *SETD7*, *SETD8* e *SETMAR* e sexo dos pacientes. Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,2284$ para *SETD1A*, $p = 0,9497$ para *SETD1B*, $p = 0,4908$ para *SETD2*, $p = 0,4136$ para

SETD3, $p = 0,7546$ para *SETD4*, $p = 0,6620$ para *SETD5*, $p = 0,0813$ para *SETD6*, $p = 0,2857$ para *SETD7*, $p = 2824$ para *SETD8* e $p = 0,7302$ para SETMAR.

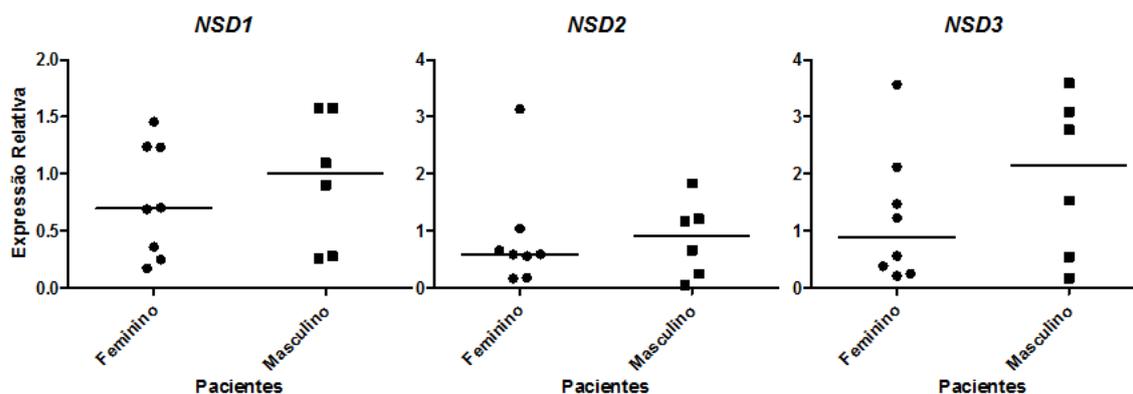


Figura 15. Expressão relativa de *NSD1*, *NSD2* e *NSD3* e sexo dos pacientes. Teste de Mann-Whitney, com $p = 0,4908$ para *NSD1*, $p = 0,5728$ para *NSD2* e $p = 0,4136$ para *NSD3*.

3.3.3. IDADE

3.3.3.1. *SETD1A* E *SETD6* ESTÃO SUPEREXPRESSOS NAS AMOSTRAS DE TECIDOS TUMORAIS DE PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL DE IDADE ATÉ 60 ANOS

Agrupamos separadamente as amostras de tecidos tumorais de pacientes com até 60 anos de idade e de pacientes acima de 60 anos de idade e analisamos comparativamente a expressão gênica dos membros das famílias SETD e NSD. Notamos que há diferença de expressão gênica para dois genes. Os genes *SETD1A* e *SETD6* estão hipereexpressos nos pacientes com até 60 anos ($N = 5$) quando comparados com os pacientes mais seniores ($N = 7$) (Figuras 16 e 17).

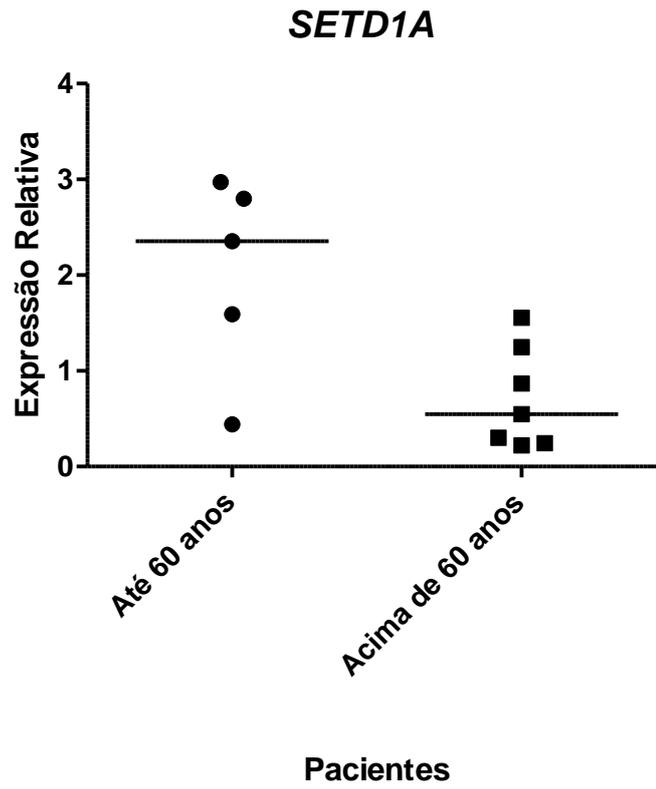


Figura 16. Expressão relativa do *SETD1A* e idade dos pacientes. Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,0303$.

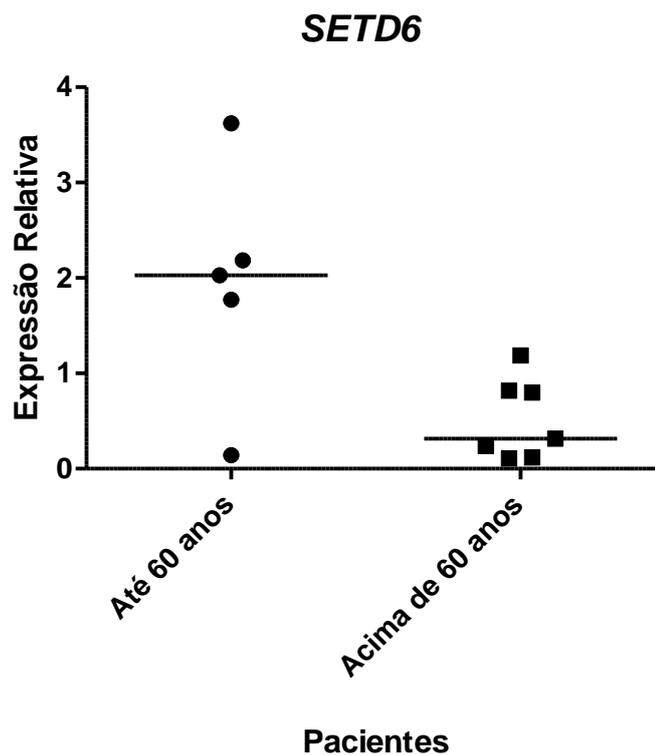


Figura 17. Expressão relativa do *SETD6* e idade dos pacientes. Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,0480$.

3.3.3.2. CORRELAÇÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES *SETD1A* E *SETD6* NAS AMOSTRAS DE TECIDOS TUMORAIS DE PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL DE IDADE ATÉ 60 ANOS

Realizamos uma avaliação de correlação de expressão entre os dois genes envolvidos na diferença de idade dos pacientes e notamos que há uma correlação de expressão entre *SETD1A* e *SETD6* em pacientes com idade menos avançada (até 60 anos) com câncer colorretal (Figura 18).

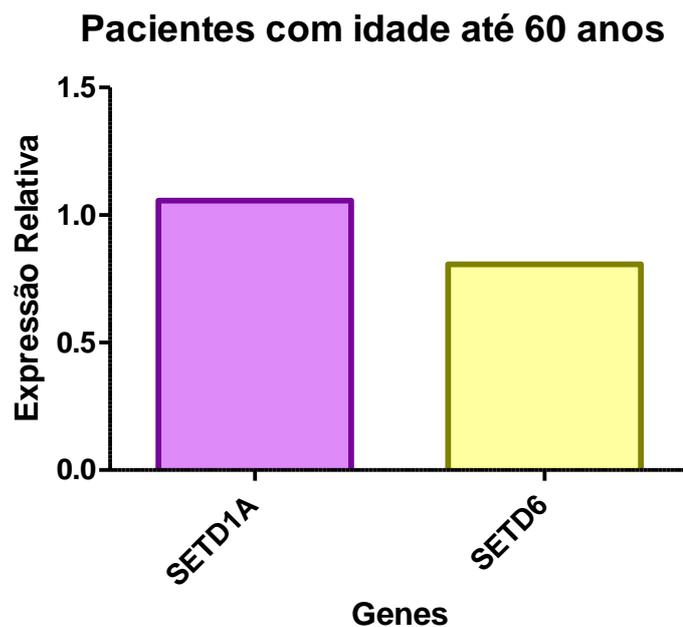


Figura 18. Correlação de expressão entre *SETD1A* e *SETD6* em pacientes com idade menos avançada (até 60 anos). Correlação de *Spearman*. Coeficiente de correlação = 0,968. $p = 9,132895e-010$.

3.3.3.3. EXPRESSÃO COMPARATIVA DOS DEMAIS MEMBROS DA FAMÍLIA SETD E FAMÍLIA NSD NAS AMOSTRAS DE TECIDOS TUMORAIS DE PACIENTES AGRUPADOS POR IDADE

Analisamos comparativamente a expressão dos demais genes da família SETD e família NSD nos grupos de pacientes com até 60 anos e pacientes acima de 60 anos e não obtivemos resultados estatisticamente significativos relacionando a idade para os genes *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD7*, *SETD8* e *SETMAR* (Figura 19), bem como para os genes *NSD1*, *NSD2* e *NSD3* (Figura 20).

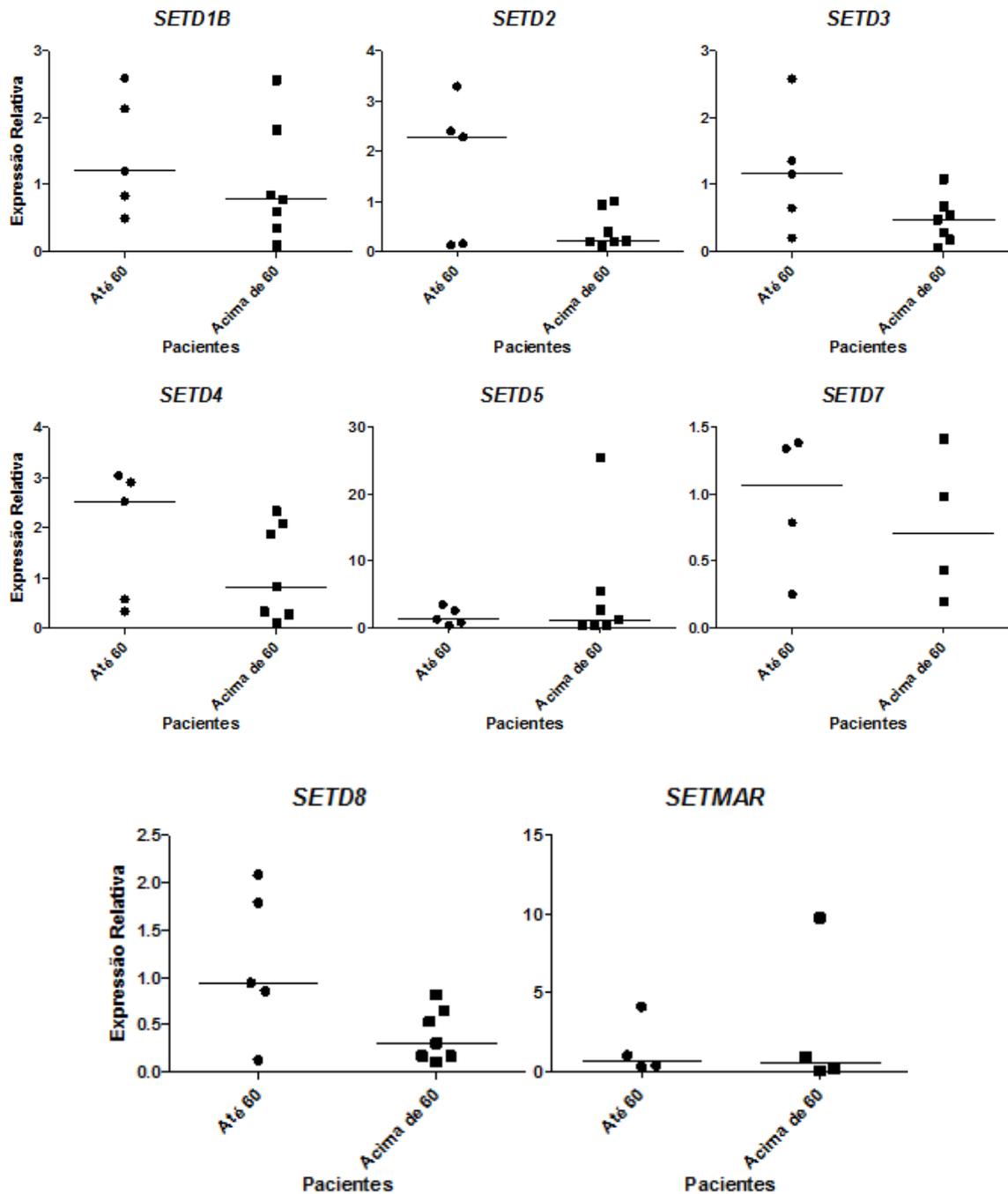


Figura 19. Expressão relativa de *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD7*, *SETD8* e *SETMAR* e idade dos pacientes. Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,3434$ para *SETD1B*, $p = 0,4318$ para *SETD2*, $p = 0,1061$ para *SETD3*, $p = 0,2020$ para *SETD4*, $p = 1,0000$ para *SETD5*, $p = 0,8857$ para *SETD7*, $p = 0,0732$ para *SETD8* e $p = 0,6857$ para *SETMAR*.

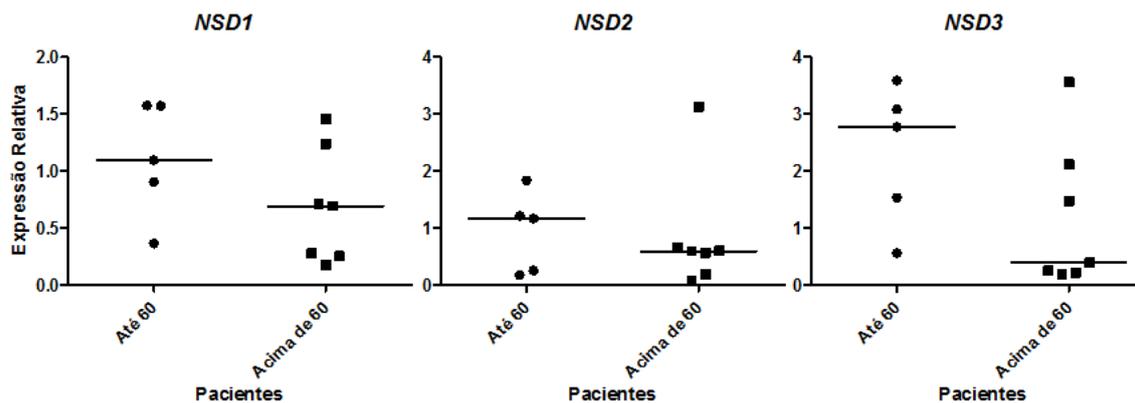


Figura 20. Expressão relativa de *NSD1*, *NSD2* e *NSD3* e idade dos pacientes. Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,1490$ para *NSD1*, $p = 0,6389$ para *NSD2* e $p = 0,1061$ para *NSD3*.

3.3.4. EXTENSÃO MICROSCÓPICA

Dividimos as amostras tumorais em dois grupos, de acordo com as extensões microscópicas do tumor. Um grupo englobava as amostras que invadiam até a muscular própria e o outro grupo continha as amostras que ultrapassavam a muscular própria. Analisamos comparativamente a expressão dos genes das famílias SETD e NSD nesses dois grupos e não obtivemos resultados estatisticamente significativos para os genes *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6* e *SETD8* (Figura 21), bem como para os genes *NSD1*, *NSD2* e *NSD3* (Figura 22). Para aplicar o teste estatístico de *Mann-Whitney* necessita-se de pelo menos três valores para cada grupo estudado. Assim, não analisamos a expressão gênica de *SETD7* e *SETMAR* neste contexto clínico por termos o valor de QR desses dois genes para apenas duas amostras tumorais que avançavam até a muscular própria, e esse pequeno número impossibilitava a análise estatística.

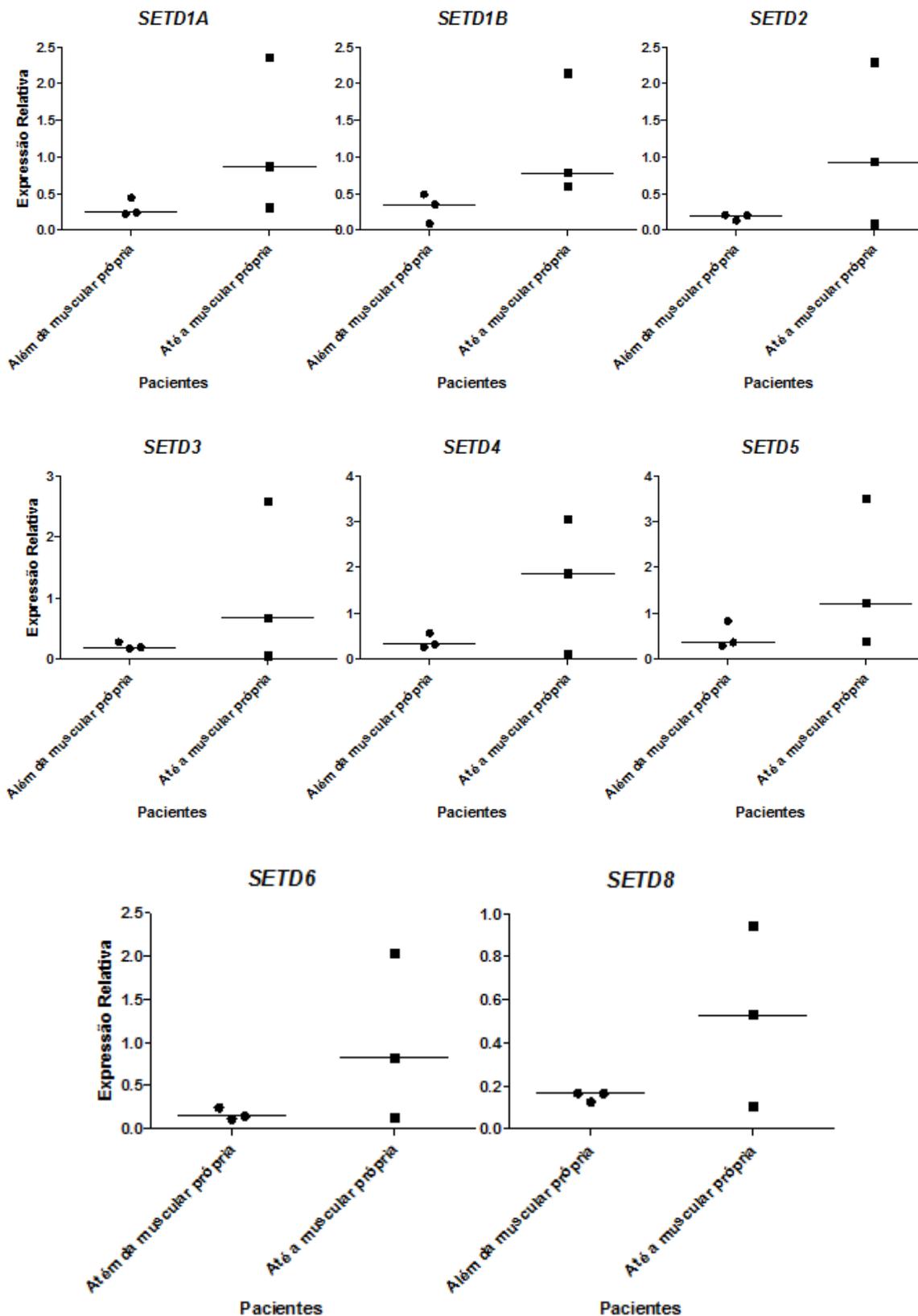


Figura 21. Expressão relativa de *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6* e *SETD8* e extensão microscópica do tumor. Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,2000$ para *SETD1A*, $p = 0,1000$ para *SETD1B*, $p = 0,7000$ para *SETD2*, $p = 0,7000$ para *SETD3*, $p = 0,7000$ para *SETD4*, $p = 0,2000$ para *SETD5*, $p = 0,4000$ para *SETD6* e $p = 0,7000$ para *SETD8*.

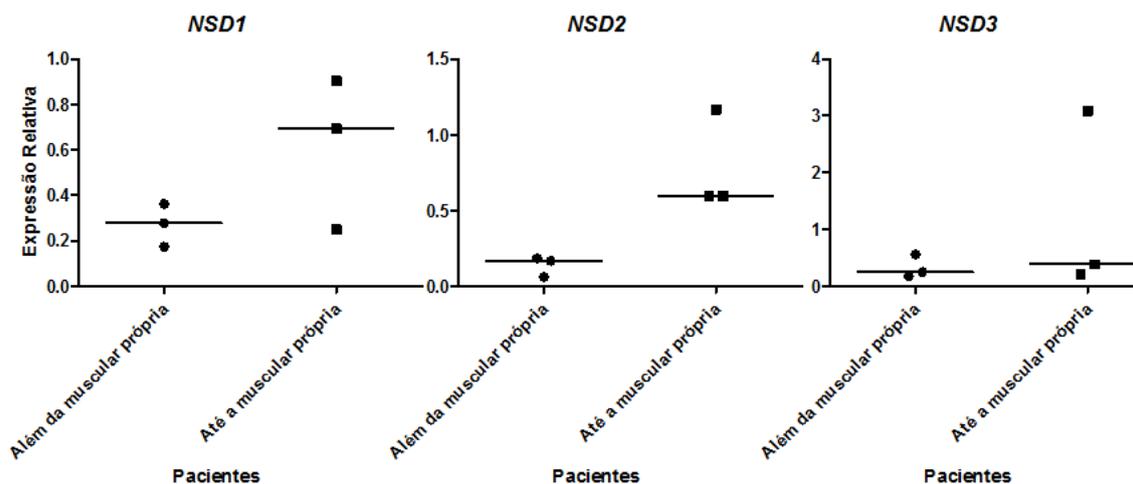


Figura 22. Expressão relativa de *NSD1*, *NSD2* e *NSD3* e extensão microscópica do tumor. Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,4000$ para *NSD1*, $p = 0,1000$ para *NSD2* e $p = 0,7000$ para *NSD3*.

3.3.5. INVASÃO PERINEURAL

3.3.5.1. *NSD3* ESTÁ SUPEREXPRESSO NAS AMOSTRAS DE TECIDOS TUMORAIS DE PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL QUE APRESENTAM INVASÃO PERINEURAL NÃO EVIDENCIADA

Dividimos as amostras tumorais dos pacientes em dois grandes grupos, sendo um de pacientes que apresentavam invasão perineural evidenciada e outro de pacientes que apresentavam invasão perineural não evidenciada. Realizamos a avaliação da expressão comparativa das amostras e observamos que o gene *NSD3* encontrou-se superexpresso quando a invasão perineural era não evidenciada ($N = 6$) comparada a evidencia deste achado anatomopatológico ($N = 3$) (Figura 23).

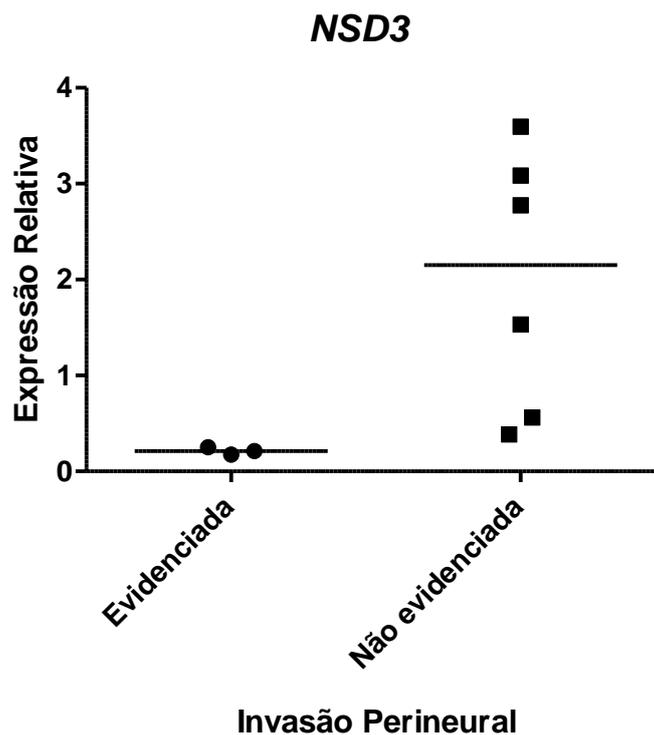


Figura 23. Expressão relativa de *NSD3* e invasão perineural. Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,0238$.

3.3.5.2. EXPRESSÃO GÊNICA COMPARATIVA DA FAMÍLIA SETD E DOS DEMAIS MEMBROS DA FAMÍLIA NSD NAS AMOSTRAS DE TECIDOS TUMORAIS DE PACIENTES AGRUPADOS DE ACORDO COM INVASÃO PERINEURAL

Analisamos comparativamente a expressão gênica da família SETD e dos demais membros da família NSD nos dois grandes grupos de pacientes gerados de acordo com a característica de invasão perineural evidenciada ou não evidenciada. Observamos que nenhum dos genes da família SETD apresentou expressão diferencial estatisticamente significativa (Figura 24), bem como os genes *NSD1* e *NSD2* (Figura 25).

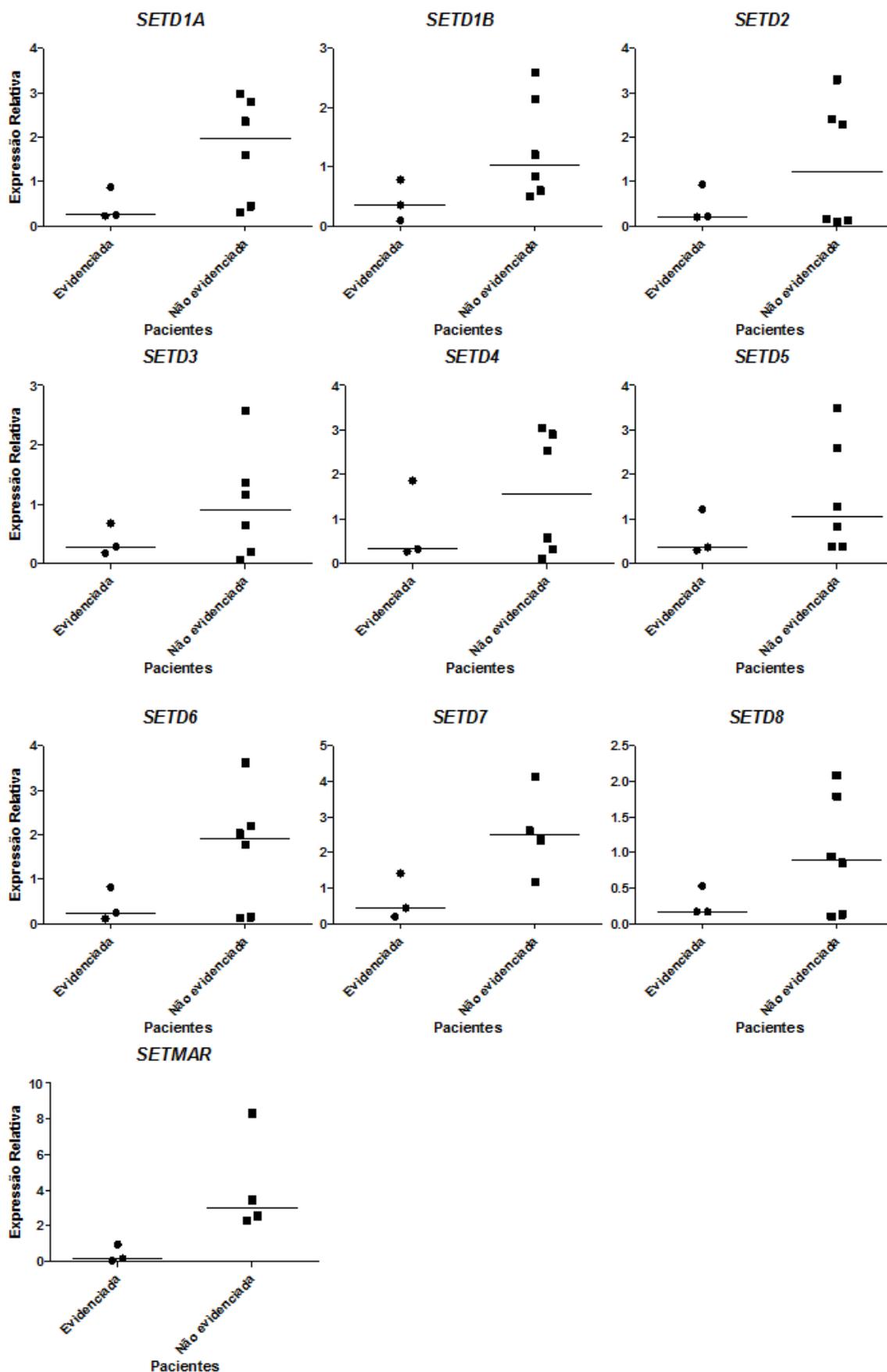


Figura 24. Expressão relativa de *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6*, *SETD7*, *SETD8* e *SETMAR* e invasão perineural. Teste de *Mann-Whitney*, com $p =$

0,0952 para *SETD1A*, $p = 0,0952$ para *SETD1B*, $p = 1,000$ para *SETD2*, $p = 0,5476$ para *SETD3*, $p = 0,5476$ para *SETD4*, $p = 0,1667$ para *SETD5*, $p = 0,2619$ para *SETD6*, $p = 0,1143$ para *SETD7*, $p = 0,5476$ para *SETD8* e $p = 0,0571$ para *SETMAR*.

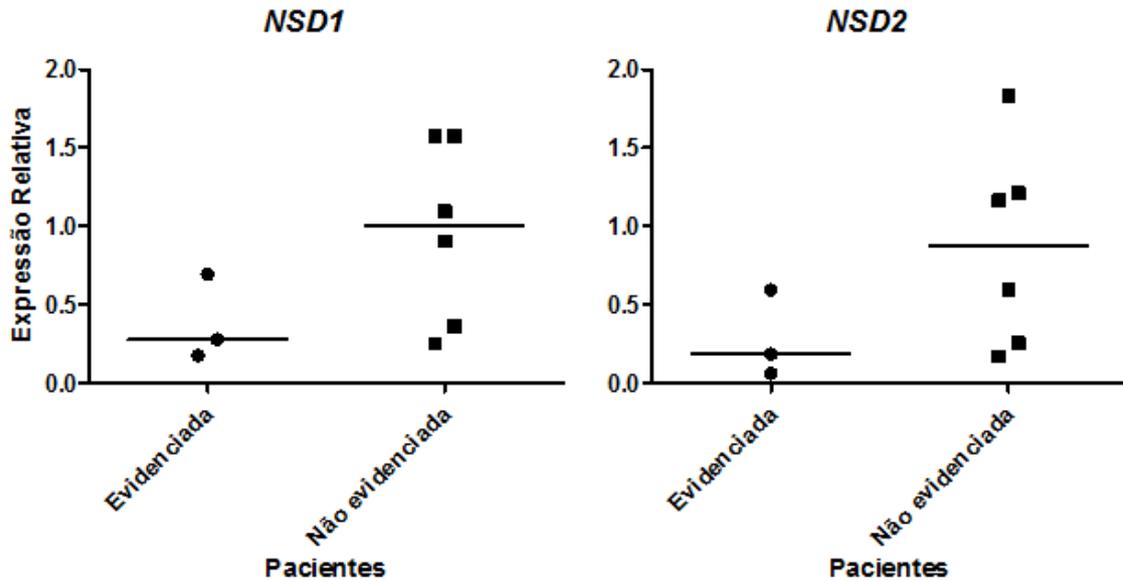


Figura 25. Expressão relativa de *NSD1* e *NSD2* e invasão perineural. Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,1667$ para *NSD1* e $p = 0,2619$ para *NSD2*.

3.3.6. LINFONODOS ACOMETIDOS

Avaliamos a relação da expressão gênica dos membros das famílias *SETD* e *NSD* com a presença ou ausência de metástase nos linfonodos analisados pelos laudos histopatológicos. Não observamos diferença de expressão gênica estatisticamente significativa entre os dois grupos analisados para nenhum dos genes da família *SETD* (Figura 26), bem como para nenhum dos genes da família *NSD* (Figura 27).

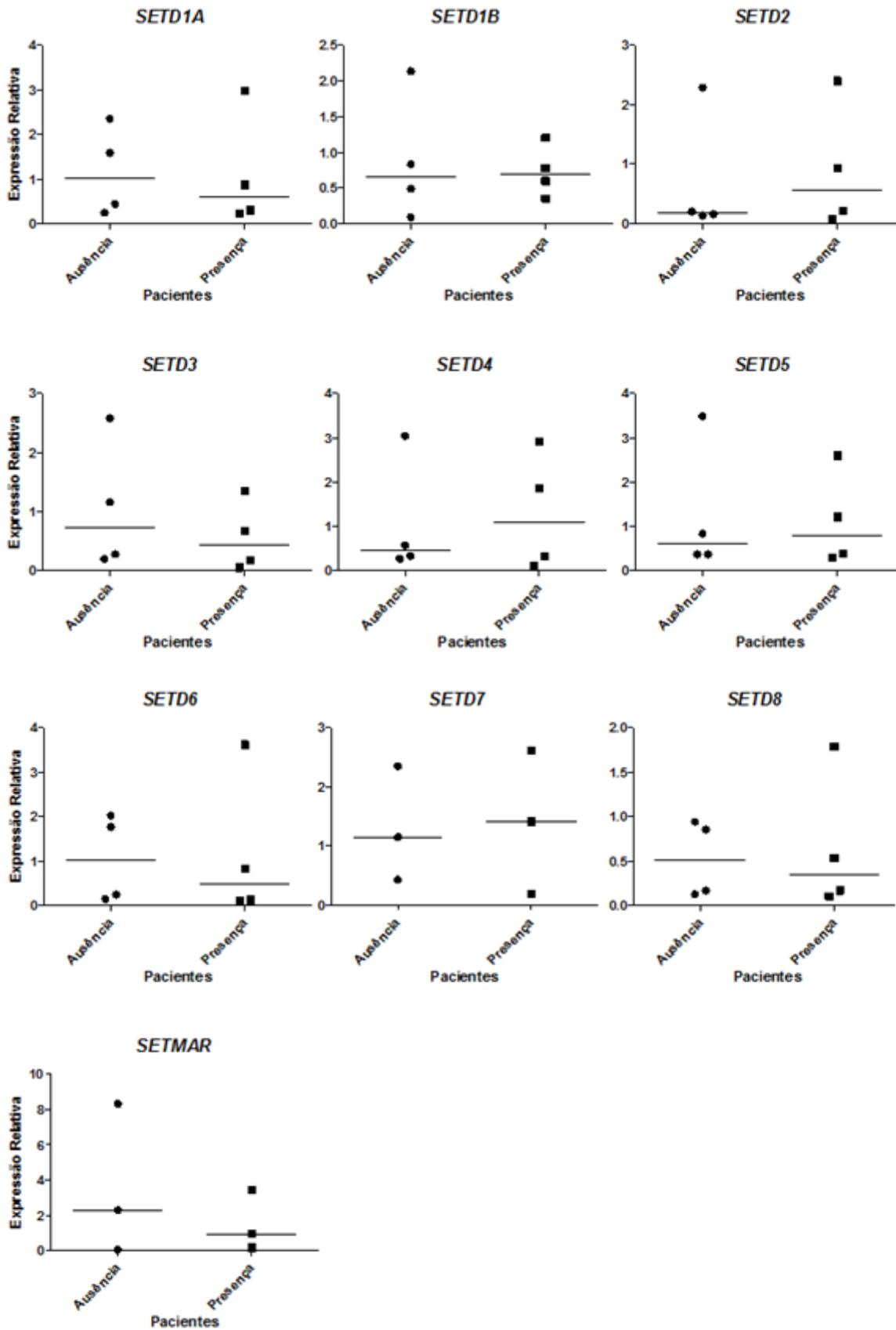


Figura 26. Expressão relativa de *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6*, *SETD7*, *SETD8* e *SETMAR* e linfonodos acometidos. Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,5587$ para *SETD1A*, $p = 1,0000$ para *SETD1B*, $p = 0,6857$ para *SETD2*, $p = 0,4857$ para

SETD3, $p = 1,0000$ para *SETD4*, $p = 1,0000$ para *SETD5*, $p = 0,6857$ para *SETD6*, $p = 1,0000$ para *SETD7*, $p = 1,0000$ para *SETD8* e $p = 1,0000$ para *SETMAR*.

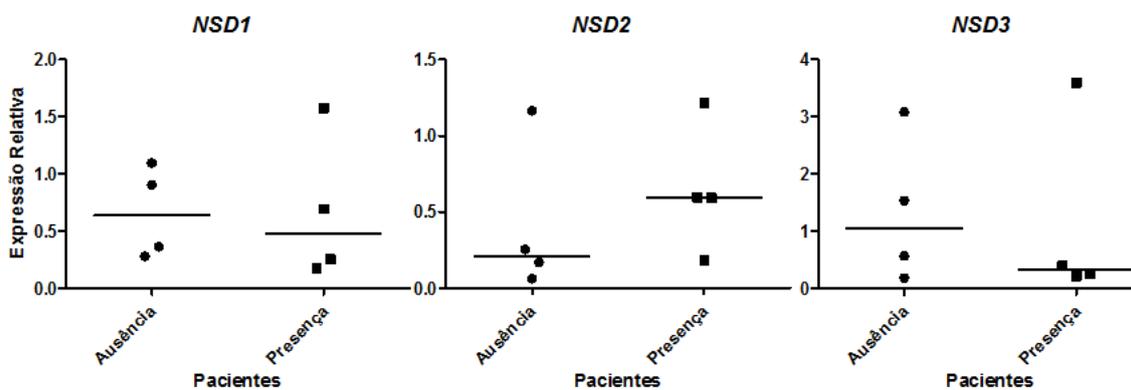


Figura 27. Expressão relativa de *NSD1*, *NSD2* e *NSD3* e linfonodos acometidos. Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,6857$ para *NSD1*, $p = 0,3429$ para *NSD2* e $p = 0,8857$ para *NSD3*.

3.3.7. ESTADIAMENTO

Para avaliarmos a relação entre a expressão gênica das famílias *SETD* e *NSD* e o grau de estadiamento dos tumores, separamos as amostras tumorais em grupos que possuíam estágio menor que III (de 0 a IIC) e estágio maior que III (de IIA e IVB) (Tabela 2). Nenhum dos 10 genes da família *SETD* apresentaram diferença de expressão gênica estatisticamente significativa (Figura 28), assim como nenhum dos 3 genes da família *NSD* (Figura 29).

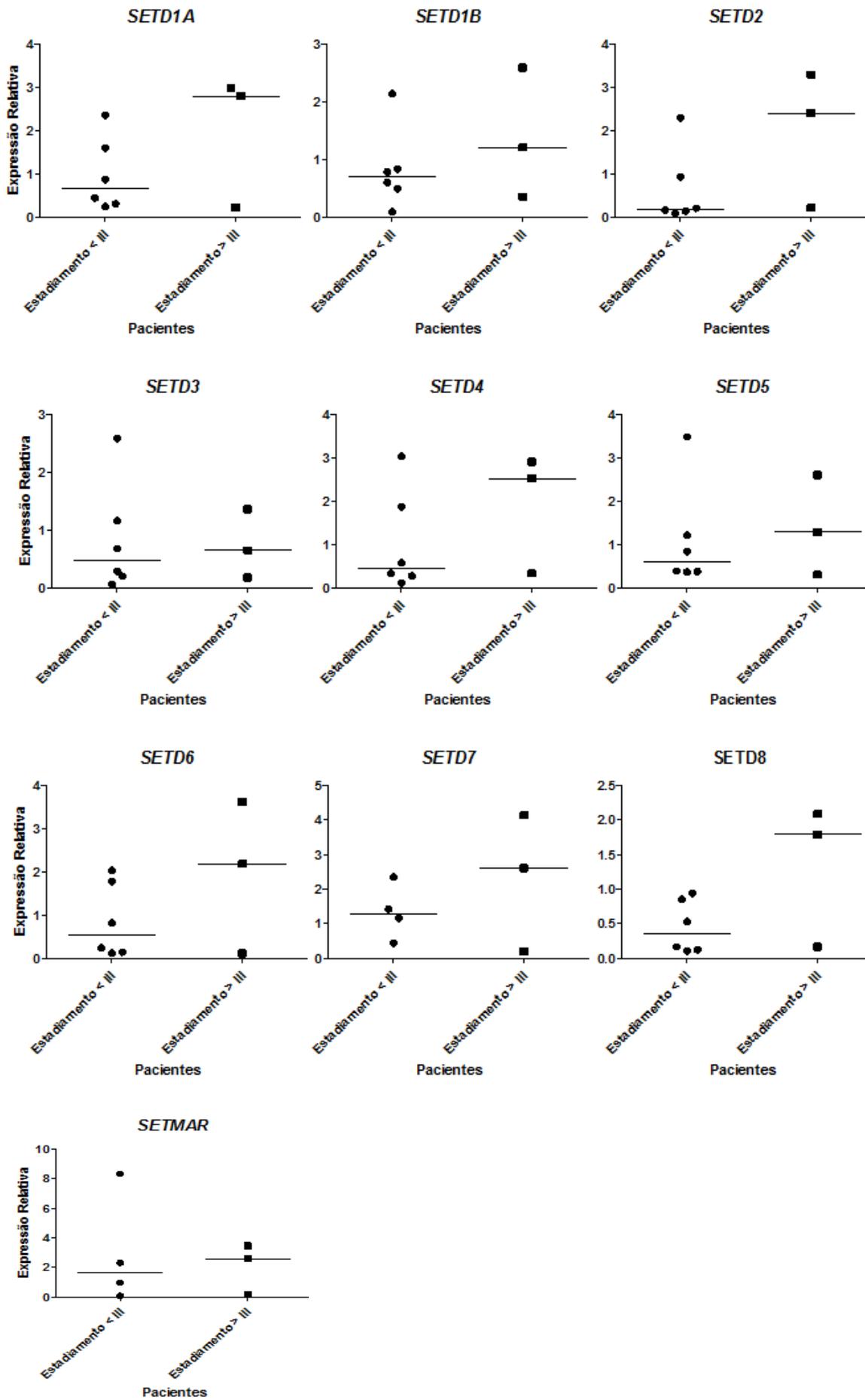


Figura 28. Expressão relativa de *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6*, *SETD7*, *SETD8* e *SETMAR* e estadiamento Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,5476$ para *SETD1A*, $p = 0,5476$ para *SETD1B*, $p = 0,0952$ para *SETD2*, $p = 1,0000$ para *SETD3*, $p = 0,3810$ para *SETD4*, $p = 0,9048$ para *SETD5*, $p = 0,5476$ para *SETD6*, $p = 0,6286$ para *SETD7*, $p = 0,1667$ para *SETD8* e $p = 0,8571$ para *SETMAR*.

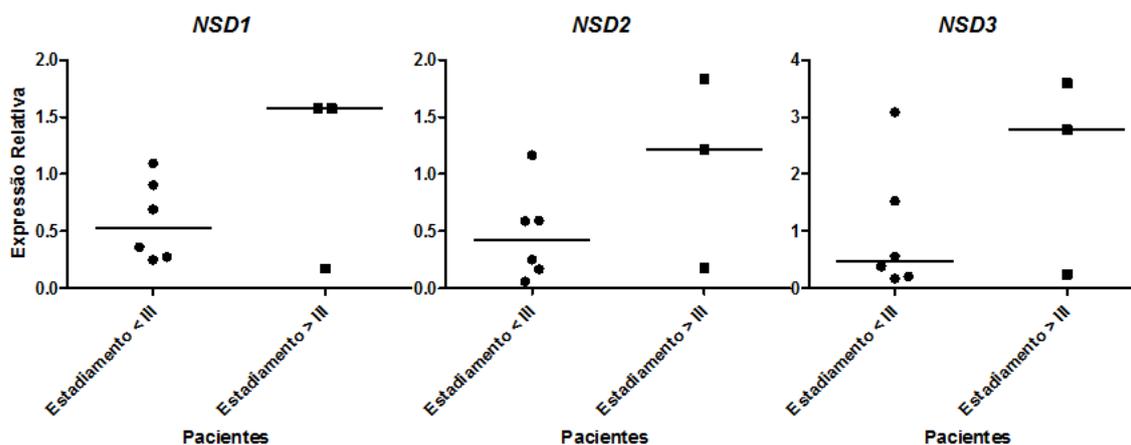


Figura 29. Expressão relativa de *NSD1*, *NSD2* e *NSD3* e estadiamento Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,5476$ para *NSD1*, $p = 0,2619$ para *NSD2* e $p = 0,3810$ para *NSD3*.

3.3.8. INSTABILIDADE MICROSSATÉLITE

Para avaliarmos a relação entre a expressão gênica das famílias SETD e NSD e o dado histopatológico característico para instabilidade microssatélite separamos as amostras tumorais em dois grupos. Um grupo apresentava infiltrado de linfócitos intratumorais e peritumorais discretos enquanto outro grupo apresentava infiltrado de linfócitos intratumorais e peritumorais moderados. Nesse grupo de amostras não observamos diferença estatisticamente significativa na expressão gênica dos membros da família SETD (Figura 30), bem como dos membros da família NSD (Figura 31).

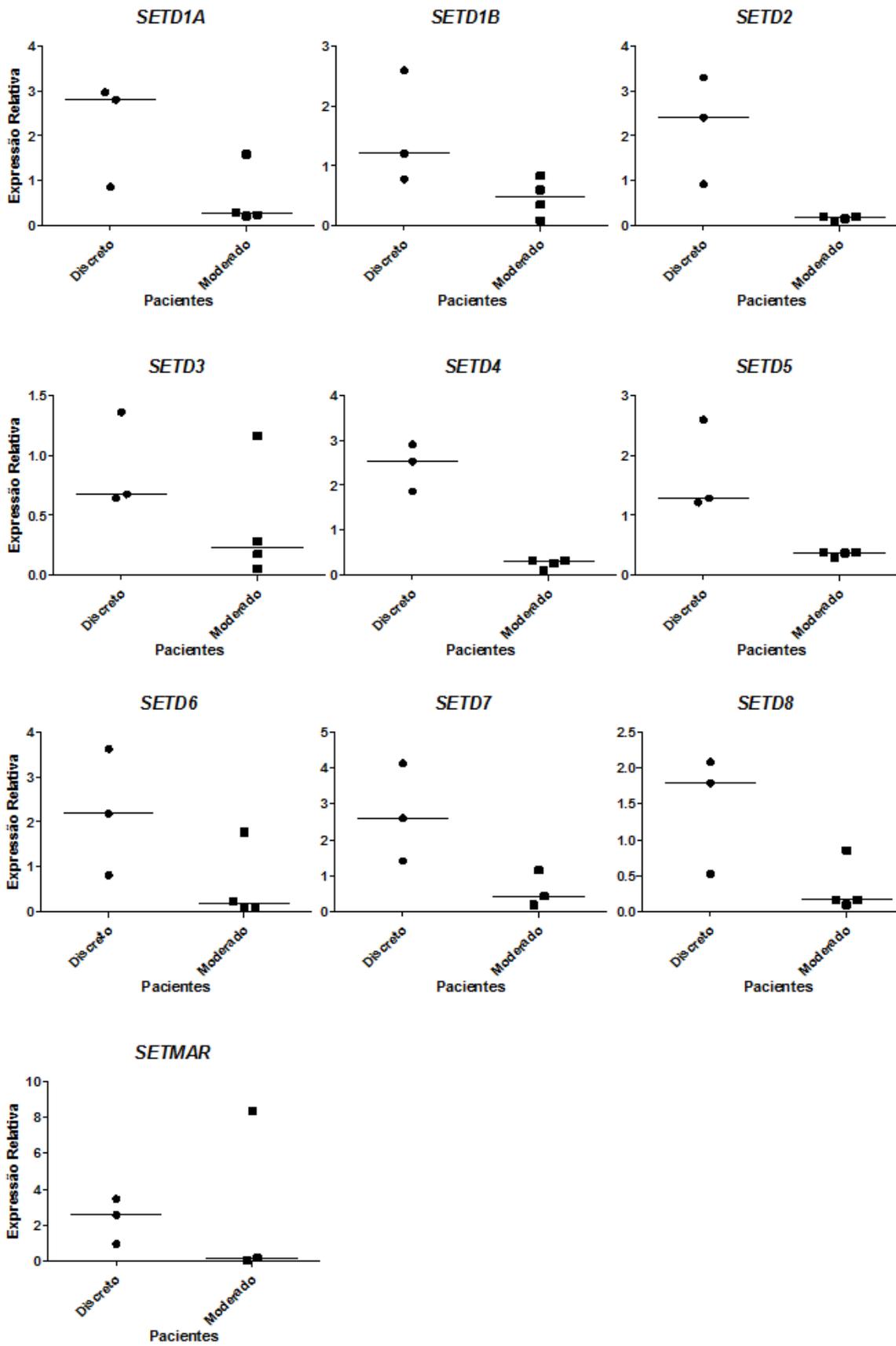


Figura 30. Expressão relativa de *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6*, *SETD7*, *SETD8* e *SETMAR* e instabilidade microsatélite. Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,1143$ para *SETD1A*, $p = 0,1143$ para *SETD1B*, $p = 0,0571$ para *SETD2*, $p = 0,2286$

para *SETD3*, $p = 0,0571$ para *SETD4*, $p = 0,0571$ para *SETD5*, $p = 0,1143$ para *SETD6*, $p = 0,1000$ para *SETD7*, $p = 0,1143$ para *SETD8* e $p = 0,7000$ para *SETMAR*.

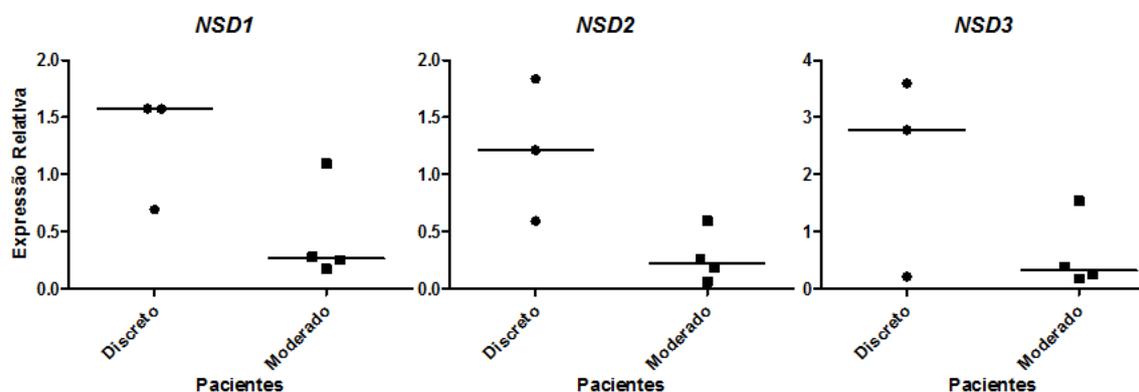


Figura 31. Expressão relativa de *NSD1*, *NSD2* e *NSD3* e instabilidade microssatélite. Teste de *Mann-Whitney*, com $p = 0,1143$ para *NSD1*, $p = 0,0571$ para *NSD2* e $p = 0,4000$ para *NSD3*.

3.4. VISÃO GLOBAL DA PRESENÇA DAS PROTEÍNAS SETD1A E NSD3 EM AMOSTRAS DE TECIDOS DE CÂNCER COLORRETAL

Realizamos pesquisa em banco de dados on-line de imunohistoquímica de proteínas a fim de avaliarmos a presença das proteínas codificadas pelos genes que no presente trabalho foram observados diferencialmente expressos em diferentes contextos clínicos. Com o auxílio da plataforma *The Human Protein Atlas* conseguimos avaliar como estavam globalmente se comportando as proteínas SETD1A e NSD3 em amostras de câncer colorretal, por meio da técnica de imunohistoquímica. Para a proteína SETD1A foram analisadas 11 amostras e para NSD3 foram analisadas 13 amostras.

SETD1A apresenta-se altamente expresso em 6 das 11 amostras e medianamente expresso nas outras 5 amostras. NSD3 apresenta-se altamente expresso em 5 de 13 amostras e medianamente expresso nas outras 7 amostras (Figura 32).

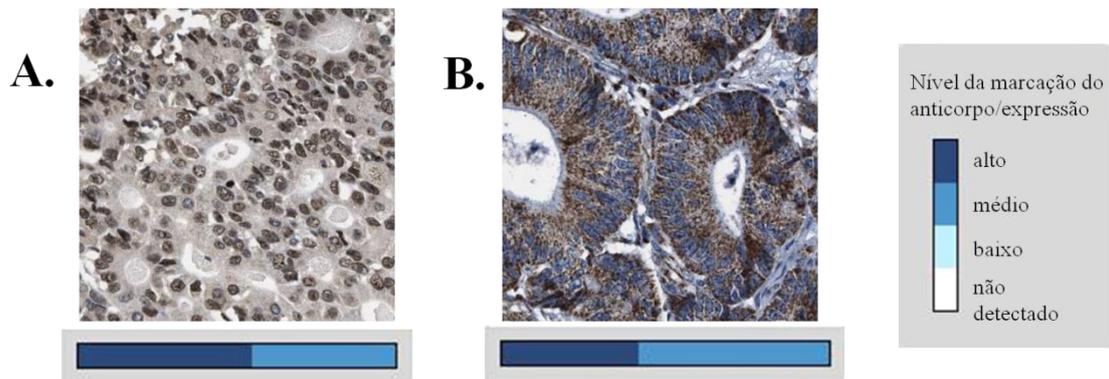


Figura 32. Análise de presença global das proteínas SETD1A e NSD3 em amostras de câncer colorretal. A) proteína SETD1A; B) proteína NSD3. Para cada proteína tem-se uma imagem representativa da lâmina imunohistoquímica, exemplificando os achados para cada gene em um grupo de pacientes analisados. Abaixo dessa imagem temos um sumário da presença/expressão de cada uma dessas enzimas nos seus grupos de pacientes analisados. Adaptado de: *Protein Atlas version 12* – 2013.12.05.

4. DISCUSSÃO

Aberrações genéticas e epigenéticas estão envolvidas em uma rede complexa e tanto podem predispor ou causar o desenvolvimento de um ao outro. Em 2004 Hamamoto e colaboradores caracterizaram a metiltransferase de histona SMYD3 e a relacionaram com o câncer colorretal, dentre outros tipos de cânceres (HAMAMOTO et al., 2004). Mazur e colaboradores, por exemplo, elucidaram o papel essencial da metiltransferase de lisina SMYD3 na regulação da via de sinalização oncogênica Ras. Em linhagens celulares foi visto que SMYD3 metila MAP3K2 na lisina 260 e potencia a ativação da via de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK, e a depleção de *SMYD3* bloqueia a tumorigênese dirigida pela via Ras (MAZUR et al., 2014). A compreensão destes mecanismos podem contribuir para a otimização de sistemas de diagnóstico e prognóstico, bem como a geração de novas abordagens terapêuticas orientadas (DAWSON; KOUZARIDES, 2012; VAN ENGELAND et al., 2011; YOU; JONES, 2012).

Assim, nos questionamos se enzimas cujas ações refletem na modificação pós-traducional de histonas poderiam desempenhar papel chave no desenvolvimento e/ou manutenção do câncer colorretal.

Primeiramente verificamos em estudo piloto a expressão distinta de todas as metiltransferases propostas neste trabalho em linhagem celular de câncer colorretal HCT116 (Figura 8), o que nos permitiu estender nosso estudo para amostras de tecidos normais e tumorais de pacientes.

Quando analisamos as amostras de forma pareada, ou seja, selecionando as amostras normais e tumorais de mesmos pacientes, obtivemos resultados que indicaram os genes *SETD2* e *SETD8* como hipoexpressos nas amostras de tumorais quando comparados às amostras de tecidos normais (Figuras 9 e 10). Não há relatos na literatura científica do envolvimento específico desses dois genes no câncer colorretal.

Sabe-se que o gene *SETD2* tem sido relatado como um gene supressor tumoral. Observou-se maior expressão deste gene em tecidos tumorais quando comparados aos tecidos normais de pacientes com câncer de mama. A perda deste gene foi apontada como um passo importante na progressão de cânceres (DALGLIESH et al., 2010; FONTEBASSO et al., 2013; GERLINGER et al., 2012). O *SETD2* está mutado em

vários tipos de cânceres, incluindo câncer de mama, pulmão, leucemia linfóide aguda, câncer renal de células claras e glioma, corroborando com o seu papel de supressor tumoral (AL SARAQBI et al., 2009; DALGLIESH et al., 2010; FONTEBASSO et al., 2013; NEWBOLD; MOKBEL, 2010; ZHANG et al., 2012). Sabe-se que a ação enzimática de trimetilação da lisina 36 da histona H3, efetuada pela SETD2, é necessária para o reparado do DNA e a estabilidade genômica, o que condiz com o fato dos cânceres deficientes em *SETD2* exibirem uma ampla variedade de mutações, incluindo inserções, deleções e aberrações cromossômicas (PFISTER et al., 2014; SATO et al., 2013; ZHU et al., 2014). Juntos, esses dados da literatura reforçam a importância do nosso achado para o gene *SETD2* no câncer colorretal, uma vez que não há relatos na literatura do envolvimento deste gene com a carcinogênese colorretal. Podemos, portanto, sugerir *SETD2* como um potencial marcador molecular para o CCR.

O gene *SETD8* possui como atividade enzimática principal a monometilação da lisina 20 da histona H4 (H4K20me1). Yu e colaboradores (YU et al., 2013) demonstraram que o microRNA-7 inibe a monometilação da lisina 20 da histona H4 e isso, em câncer de mama, está relacionado com a supressão da transição epitélio-mesenquima das células tumorais, diminuindo assim seu potencial invasivo. *SETD8* está envolvido no ciclo celular. A regulação da H4K20me1 durante as diferentes fases do ciclo celular é necessária para a progressão adequada do mesmo, e não necessariamente a enzima SETD8 por si (WU; RICE, 2011). Desta forma, podemos considerar o surpreendente resultado obtido para o gene *SETD8* como plausível, pois apesar de sua hipoeexpressão, a atividade de monometilação da H4K20 pode ser realizada por outra enzima, mantendo assim a sinalização proliferativa, um dos *hallmarks* do câncer propostos por Hanahan e Weinberg (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Além disso, sugerimos avaliação do perfil de expressão de SETD8 em diferentes tecidos, podendo o mesmo se encontrar distribuído de forma não ubíqua nos mesmos. Isto nos daria uma nova dimensão no nosso achado não se assimilar ao que já foi relatado para outros tipos de cânceres.

Os genes *SETD2* e *SETD8* apresentaram expressão correlacionada (Figura 11). Este resultado nos sugere uma possível relação biológica entre esses dois genes no contexto do CCR, agregando informação nunca antes descrita para a compreensão da carcinogênese colorretal.

Foi possível evidenciar expressão gênica diferencial de duas metiltransferases quando os pacientes foram estratificados em grupos conforme suas idades: até 60 anos e acima de 60 anos. A escolha dessa estratificação se justificou pelo fato de a idade avançada ser um fator de risco já estabelecido para o CCR, sendo inclusive estabelecido como fator epidemiológico em estudos. *SETD1A* e *SETD6* apresentaram altas taxas de transcritos em pacientes com idade até 60 anos (Figuras 16 e 17).

O resultado obtido para o gene *SETD1A* foi condizente com outros estudos que indicaram em modelo animal que o silenciamento deste gene resultou em desaparecimento da lesão tumoral de células de CCR e em células de câncer de mama um inibidor de glutamina se apresentou citotóxico para as células, decorrente da hipossilenciamento de *SETD1A* (SALZ et al., 2014; SIMPSON et al., 2012). Além disso, sabe-se que *SETD1A* interage com a β -catenina para ativar um conjunto de genes alvo da via Wnt. A supressão de *SETD1A* em linhagens de câncer colorretal desencadeou um significativo decréscimo nos níveis de H3K4me3, na expressão gênica de alvos de Wnt e no crescimento da célula tumoral. A não regulação da via de sinalização Wnt é frequentemente envolvida na carcinogênese e conduz a cerca de 70%-90% de todo o CCR humano, indicando que Wnt possui um papel crítico no câncer colorretal e que *SETD1A* está envolvido nesse processo (GILES; VAN ES; CLEVERS, 2003; SALZ et al., 2014; SURAWEEERA et al., 2006). Visto de forma conjunta, reforçamos a sugestão de *SETD1A* se comportar como um oncogene, principalmente no tocante ao CCR.

Para o gene *SETD6* obtivemos um resultado inédito, pois não havia registro na literatura científica do envolvimento deste gene no desenvolvimento e/ou manutenção da carcinogênese colorretal. *SETD6* também esteve superexpresso em pacientes com idade até 60 anos. Sabe-se, no entanto, que este gene está envolvido na indução células tronco embrionárias de camundongos a se diferenciarem (BINDA et al., 2013, p. 6). A perda dos nichos de células-tronco pluripotenciais é um marco importante do processo de envelhecimento celular (REZZA; SENNETT; RENDL, 2014). *SETD6* também foi relatado como um novo regulador da via do NF- κ B. *SETD6* monometila a proteína RelA nuclear na lisina 310 e atenua a sinalização de NF- κ B por encaixe de GLP (uma outra metiltransferase) em genes-alvo para gerar um estado de cromatina silenciada, efetivamente tornando a ligação entre RelA e a cromatina inerte (LEVY et al., 2011). A não regulação de NF- κ B está ligado a processos inflamatórios e câncer e *SETD6* inibe a sinalização NF- κ B em diferentes tipos de células, incluindo células primárias humanas

(ALBERT; HELIN, 2010; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; LU et al., 2010). Podemos sugerir, portanto, que a atuação de *SETD6* na via de NF- κ B possui importância para a manutenção e/ou desenvolvimento do câncer colorretal em pacientes de até 60 anos.

Nossos achados de superexpressão dos genes *SETD1A* e *SETD6* com uma alta taxa de correlação de expressão desses genes em pacientes com até 60 anos (Figura 18), associados aos dados da literatura, sugerem um papel biológico concomitante e importante desses genes na carcinogênese do cólon e reto em pacientes com até 60 anos, trazendo um pouco mais de compreensão para a relação entre fatores de risco e idade no câncer colorretal.

O prognóstico de pacientes com CCR depende da extensão anatômica do tumor por ocasião do diagnóstico e da possibilidade de se realizar extirpação completa da neoplasia. Cumpridas essas exigências, passam a influenciar o prognóstico outras variáveis, dentre as quais se destaca o estudo histopatológico. A invasão do espaço perineural, uma variável indicada no estudo histopatológico, foi associada com maior recidiva local e reduzida sobrevida (BOGNETL et al., 1995). A invasão perineural indicaria o potencial de a neoplasia crescer localmente. Neste trabalho mostramos que o gene *NSD3* se encontra superexpresso em amostras tumorais de pacientes que apresentavam invasão perineural não evidenciada, quando comparado à amostras tumorais de pacientes que apresentavam invasão perineural evidenciada (Figura 23). Esse achado celular e clínico foi pela primeira vez reportado, estando condizente com estudos anteriores que demonstraram *NSD3* superexpresso em diferentes amostras de câncer e estando, portanto, envolvido com a carcinogênese (ANGRAND et al., 2001; KANG et al., 2013). *NSD3* foi encontrado amplificado em linhagens celulares de câncer de mama e carcinomas primários da mama. Além disso, *NSD3* está envolvido no câncer de pulmão e leucemia mieloide aguda, onde se encontra fusionado com a proteína NUP98. Sugerimos, portanto, que a elevada presença de *NSD3* especificamente nas amostras tumorais com invasão perineural é um potencial marcador molecular de melhor prognóstico em pacientes diagnosticados com câncer colorretal. Isto posto, poderá haver um melhor direcionamento das abordagens terapêuticas de tratamento escolhidas para esses pacientes.

A análise por imunohistoquímica feita através de pesquisa em banco de dado *on-line* corroborou nossos achados no que diz respeito à expressão dos genes *SETD1A* e *NSD3* (Figura 32). Ambos os genes se encontram de mediana para altamente expressos nas 11 e 13 lâminas, respectivamente, que foram analisadas para cada proteína. O fato de não terem sido obtidos resultados 100% de alta expressão para as duas proteínas pode ser justificado pela heterogeneidade clínica dos tecidos analisados, visto que observamos alta na expressão de *SETD1A* e *NSD3* em amostras de tecido tumoral de pacientes até 60 anos e de pacientes que apresentavam invasão perineural, respectivamente.

Os resultados das análise por imunohistoquímica via banco de dado *on-line* nos indicaram a necessidade de adentrarmos o campo proteico e avaliar como se comportam as proteínas transcritas pelos nossos genes de interesse nas próprias amostras dos pacientes que estamos estudando. Assim, poderemos ter um controle refinado sobre níveis de RNA e proteína correlacionados com dados clínicos dos pacientes.

As 32 amostras clínicas totais utilizadas no presente estudo apresentaram-se bastante heterogêneas no que diz respeito tanto às expressões gênicas quanto aos dados clínicos encontrados. Além dos genes *SETD1A*, *SETD2*, *SETD6*, *SETD8* e *NSD3*, não encontramos expressões gênicas diferencias estatisticamente significantes para os demais genes face aos diferentes achados clínicos. Acreditamos que esforços futuros serão necessários para captar um maior número de amostras clínicas de tecidos normais e de tecidos tumorais para podemos obter resultados estatisticamente relevantes também para os outros genes e características clínicas, principalmente por diminuir a heterogeneidade das amostras.

5. CONCLUSÃO

O conjunto de dados obtido em nosso trabalho sugere que diferentes genes codificadores de metiltransferases estão diferencialmente expressos no câncer colorretal como um todo e também em determinados contextos clínicos, evidenciando a importância do estudo desta classe de genes para a compreensão da origem e manutenção deste câncer.

Os genes *SETD1A* e *SETD6* encontram-se superexpressos nas amostras de tecido tumorais de pacientes portadores de câncer colorretal de até 60 anos de idade. Além disso, esses dois genes possuem expressões correlacionadas. Com este achado podemos sugerir *SETD1A* e *SETD6* como potenciais marcadores do câncer colorretal em indivíduos de até 60 anos. O resultado envolvendo o gene *SETD6* ainda não foi reportado no contexto do câncer colorretal.

O gene *NSD3* está superexpresso nas amostras de tecidos tumorais de pacientes que possuem invasão perineural não evidenciada, que é uma característica de casos de melhor prognóstico de câncer colorretal. Assim, sugerimos que *NSD3* possa ser um potencial marcador prognóstico para casos de câncer colorretal.

Os genes *SETD2* e *SETD8* se encontram hipoexpressos nas amostras de tecidos tumorais de pacientes portadores de câncer colorretal quando comparados às amostras de tecidos normais de mesmos pacientes. Ademais, esses dois genes possuem expressões correlacionadas. Combinados os nossos dados sugerem esses dois genes como potenciais marcadores moleculares do câncer colorretal. Esse achado ainda não foi reportado para o câncer colorretal.

6. PERSPECTIVAS

Diante da necessidade de se ampliar os estudos envolvendo os eventos epigenéticos, como a metilação de histonas, e o câncer colorretal, temos como perspectivas:

⇒ Captar mais amostras clínicas de tecidos normais e tumorais de pacientes diagnosticados com câncer colorretal. Com um maior número de amostras poderemos alcançar resultados com significâncias estatísticas ainda não obtidas no presente estudo, mas que mostraram tendências de expressão gênica diferencial;

⇒ Extrair proteína das amostras clínicas para realizar experimentos de *Western Blot*, visando analisar a presença/expressão das proteínas codificadas pelos genes que no presente trabalho apresentaram expressão diferencial entre tecidos normais e tumorais de pacientes. Com essa abordagem poderemos avaliar se a expressão gênica e a presença de proteínas nos tecidos estão ou não correlacionadas;

⇒ Realizar ensaios *in vitro* de superexpressão e depleção dos genes que no presente trabalho apresentaram expressão diferencial entre tecidos normais e tumorais de pacientes, avaliando o envolvimento de cada gene com a viabilidade celular das linhagens;

⇒ Realizar ensaios de localização subcelular dos genes que no presente trabalho apresentaram expressão diferencial entre tecidos normais e tumorais de pacientes ainda não foram completamente descritos e caracterizados;

⇒ Realizar ensaios de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) para analisar as interações das metiltransferases no contexto do CCR;

⇒ Aplicar os resultados como indicadores de potenciais alvos moleculares e marcadores para intervenção terapêutica no câncer colorretal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL SARAQBI, W. et al. The mRNA expression of SETD2 in human breast cancer: correlation with clinico-pathological parameters. **BMC Cancer**, v. 9, n. 1, p. 290, 2009.
- ALBERT, M.; HELIN, K. Histone methyltransferases in cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 21, n. 2, p. 209–220, 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, p. 786–794, maio 1964.
- ANGRAND, P. O. et al. NSD3, a new SET domain-containing gene, maps to 8p12 and is amplified in human breast cancer cell lines. **Genomics**, v. 74, n. 1, p. 79–88, 15 maio 2001.
- Applied Biosystems. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real time quantitative PCR. **Applied Biosystems**, 2008.
- ASHKTORAB, H. et al. Global histone H4 acetylation and HDAC2 expression in colon adenoma and carcinoma. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 54, n. 10, p. 2109–2117, out. 2009.
- BACCARELLI, A.; BOLLATI, V. Epigenetics and environmental chemicals. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 21, n. 2, p. 243–251, abr. 2009.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 381–395, mar. 2011.
- BARDHAN, K.; LIU, K. Epigenetics and Colorectal Cancer Pathogenesis. **Cancers**, v. 5, n. 2, p. 676–713, 5 jun. 2013.
- BECK, B. D. et al. Biochemical characterization of metnase's endonuclease activity and its role in NHEJ repair. **Biochemistry**, v. 50, n. 20, p. 4360–4370, 24 maio 2011.
- BERDASCO, M. et al. Epigenetic inactivation of the Sotos overgrowth syndrome gene histone methyltransferase NSD1 in human neuroblastoma and glioma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 51, p. 21830–21835, 22 dez. 2009.
- BINDA, O. et al. SETD6 monomethylates H2AZ on lysine 7 and is required for the maintenance of embryonic stem cell self-renewal. **Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society**, v. 8, n. 2, p. 177–183, fev. 2013.

- BOGNEL, C. et al. Prognostic value of neural invasion in rectal carcinoma: a multivariate analysis on 339 patients with curative resection. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 31A, n. 6, p. 894–898, jun. 1995.
- BOLAND, C. R.; GOEL, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2073–2087.e3, jun. 2010.
- BOS, J. L. et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. **Nature**, v. 327, n. 6120, p. 293–297, 28 jun. 1987.
- BOS, J. L. ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Research**, v. 49, n. 17, p. 4682–4689, 1 set. 1989.
- BRACKEN, A. P.; HELIN, K. Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 11, p. 773–784, nov. 2009.
- BRENNER, H.; KLOOR, M.; POX, C. P. Colorectal cancer. **Lancet**, v. 383, n. 9927, p. 1490–1502, 26 abr. 2014.
- BRITO, J. L. R. et al. MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells. **Haematologica**, v. 94, n. 1, p. 78–86, jan. 2009.
- BUCK, M. J. et al. Alterations in chromatin accessibility and DNA methylation in clear cell renal cell carcinoma. **Oncogene**, 4 nov. 2013.
- BURT, R. W. Colon cancer screening. **Gastroenterology**, v. 119, n. 3, p. 837–853, set. 2000.
- CARROLL, M. R. R.; SEAMAN, H. E.; HALLORAN, S. P. Tests and investigations for colorectal cancer screening. **Clinical Biochemistry**, v. 47, n. 10-11, p. 921–939, jul. 2014.
- CENTER, M. M. et al. Worldwide Variations in Colorectal Cancer. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 59, n. 6, p. 366–378, 1 nov. 2009.
- CENTER, M. M.; JEMAL, A.; WARD, E. International trends in colorectal cancer incidence rates. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 18, n. 6, p. 1688–1694, jun. 2009.
- CEOL, C. J. et al. The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. **Nature**, v. 471, n. 7339, p. 513–517, 24 mar. 2011.
- CHEN, Z. et al. The role of a newly identified SET domain-containing protein, SETD3, in oncogenesis. **Haematologica**, v. 98, n. 5, p. 739–743, maio 2013.

CHEUNG, P.; ALLIS, C. D.; SASSONE-CORSI, P. Signaling to chromatin through histone modifications. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 263–271, 13 out. 2000.

CHO, H.-S. et al. Demethylation of RB regulator MYPT1 by histone demethylase LSD1 promotes cell cycle progression in cancer cells. **Cancer Research**, v. 71, n. 3, p. 655–660, 1 fev. 2011.

CHUIKOV, S. et al. Regulation of p53 activity through lysine methylation. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 353–360, 18 nov. 2004.

CICCOLALLO, L. et al. Survival differences between European and US patients with colorectal cancer: role of stage at diagnosis and surgery. **Gut**, v. 54, n. 2, p. 268–273, fev. 2005.

COMPTON C.C. Pathology and prognostic determinants of colorectal cancer. 2012.

CONSORTI, F. et al. Prognostic significance of mucinous carcinoma of colon and rectum: a prospective case-control study. **Journal of Surgical Oncology**, v. 73, n. 2, p. 70–74, fev. 2000.

CROSS, N. C. P. Histone modification defects in developmental disorders and cancer. **Oncotarget**, v. 3, n. 1, p. 3–4, jan. 2012.

CUNNINGHAM, D. et al. Colorectal cancer. **The Lancet**, v. 375, n. 9719, p. 1030–1047, mar. 2010.

DALGLIESH, G. L. et al. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. **Nature**, v. 463, n. 7279, p. 360–363, 21 jan. 2010.

DAWSON, M. A.; KOUZARIDES, T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 12–27, jul. 2012.

DE SOUSA E MELO, F. et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. **Nature Medicine**, v. 19, n. 5, p. 614–618, maio 2013.

DEL RIZZO, P. A.; TRIEVEL, R. C. Substrate and product specificities of SET domain methyltransferases. **Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society**, v. 6, n. 9, p. 1059–1067, 1 set. 2011.

DOUBENI, C. A. et al. Screening colonoscopy and risk for incident late-stage colorectal cancer diagnosis in average-risk adults: a nested case-control study. **Annals of Internal Medicine**, v. 158, n. 5 Pt 1, p. 312–320, 5 mar. 2013.

EDGE SB et al. **AJCC Cancer Staging Manual**. 7. ed. New York: Springer, 2010.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457–463, 27 maio 2004.

FARIA, J. A. Q. A. 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. 2013.

FEARON, E. R. Molecular genetics of colorectal cancer. **Annual Review of Pathology**, v. 6, p. 479–507, 2011.

FEINBERG, A. P. Cancer epigenetics takes center stage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 2, p. 392–394, 16 jan. 2001.

FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**; 2013.

FOG, C. K.; JENSEN, K. T.; LUND, A. H. Chromatin-modifying proteins in cancer. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 115, n. 10, p. 1060–1089, out. 2007.

FONTEBASSO, A. M. et al. Mutations in SETD2 and genes affecting histone H3K36 methylation target hemispheric high-grade gliomas. **Acta Neuropathologica**, v. 125, n. 5, p. 659–669, maio 2013.

FRIZELLE, F. A. et al. Adenosquamous and squamous carcinoma of the colon and upper rectum: a clinical and histopathologic study. **Diseases of the Colon and Rectum**, v. 44, n. 3, p. 341–346, mar. 2001.

FUREY, E.; JHAVERI, K. S. Magnetic Resonance Imaging in Rectal Cancer. **Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America**, v. 22, n. 2, p. 165–190, maio 2014.

GERLINGER, M. et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 10, p. 883–892, 8 mar. 2012.

GILES, R. H.; VAN ES, J. H.; CLEVERS, H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1653, n. 1, p. 1–24, 5 jun. 2003.

GOSSAGE, L. et al. Clinical and pathological impact of VHL, PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A, and JARID1c in clear cell renal cell carcinoma. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 53, n. 1, p. 38–51, jan. 2014.

GRADY, W. M.; MARKOWITZ, S. D. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 3, p. 101–128, 2002.

GREEN, J. B. et al. Mucinous carcinoma--just another colon cancer? **Diseases of the Colon and Rectum**, v. 36, n. 1, p. 49–54, jan. 1993.

GREER, E. L.; SHI, Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. **Nature Reviews. Genetics**, v. 13, n. 5, p. 343–357, maio 2012.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 19 mar. 2010.

GUTTMACHER, A. E. et al. Hereditary Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 10, p. 919–932, 6 mar. 2003.

HAMAMOTO, R. et al. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 8, p. 731–740, ago. 2004.

HAMAMOTO, R. et al. Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. **Cancer Science**, v. 97, n. 2, p. 113–118, fev. 2006.

HAMILTON S.R.; AALTONEN A.L. **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System**. Lyon: IARC Press, 2000.

HAMON, M. A.; COSSART, P. Histone Modifications and Chromatin Remodeling during Bacterial Infections. **Cell Host & Microbe**, v. 4, n. 2, p. 100–109, ago. 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HARRIS, C. C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. **Cancer Research**, v. 51, n. 18 Suppl, p. 5023s–5044s, 15 set. 1991.

HATTORI, M. et al. The DNA sequence of human chromosome 21. **Nature**, v. 405, n. 6784, p. 311–319, 18 maio 2000.

HERMAN, J. G. et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 12, p. 6870–6875, 9 jun. 1998.

HIROHASHI, S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. **The American Journal of Pathology**, v. 153, n. 2, p. 333–339, ago. 1998.

HU, H. et al. Set9, NF- κ B, and microRNA-21 mediate berberine-induced apoptosis of human multiple myeloma cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 1, p. 157–166, jan. 2013.

HUANG, J. et al. G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 13, p. 9636–9641, 26 mar. 2010.

HUANG, N. et al. Two distinct nuclear receptor interaction domains in NSD1, a novel SET protein that exhibits characteristics of both corepressors and coactivators. **The EMBO journal**, v. 17, n. 12, p. 3398–3412, 15 jun. 1998.

HUISINGA, K. L.; BROWER-TOLAND, B.; ELGIN, S. C. R. The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. **Chromosoma**, v. 115, n. 2, p. 110–122, abr. 2006.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014.

ISHIHAMA, K. et al. Expression of HDAC1 and CBP/p300 in human colorectal carcinomas. **Journal of Clinical Pathology**, v. 60, n. 11, p. 1205–1210, nov. 2007.

JASPERSON, K. W. et al. Hereditary and familial colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2044–2058, jun. 2010.

JASS, J. R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. **Histopathology**, v. 50, n. 1, p. 113–130, jan. 2007.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69–90, mar. 2011.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5532, p. 1074–1080, 10 ago. 2001.

KANG, D. et al. The histone methyltransferase Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (WHSC1L1) is involved in human carcinogenesis. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 52, n. 2, p. 126–139, fev. 2013.

KAPOOR-VAZIRANI, P.; VERTINO, P. M. A Dual Role for the Histone Methyltransferase PR-SET7/SETD8 and Histone H4 Lysine 20 Monomethylation in the Local Regulation of RNA Polymerase II Pausing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 11, p. 7425–7437, 14 mar. 2014.

KIM, D.-W. et al. Characterization of a novel histone H3K36 methyltransferase setd3 in zebrafish. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 2, p. 289–294, 2011.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell**, v. 87, n. 2, p. 159–170, 18 out. 1996.

KOOISTRA, S. M.; HELIN, K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 4 abr. 2012.

- KOUSKOUTI, A. et al. Gene-specific modulation of TAF10 function by SET9-mediated methylation. **Molecular Cell**, v. 14, n. 2, p. 175–182, 23 abr. 2004.
- LEE, J.-H. et al. Identification and characterization of the human Set1B histone H3-Lys4 methyltransferase complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 18, p. 13419–13428, 4 maio 2007.
- LEE, J.-H.; SKALNIK, D. G. CpG-binding protein (CXXC finger protein 1) is a component of the mammalian Set1 histone H3-Lys4 methyltransferase complex, the analogue of the yeast Set1/COMPASS complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 50, p. 41725–41731, 16 dez. 2005.
- LEE, J.-K.; KIM, K.-C. DZNep, inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, down-regulates expression of SETDB1 H3K9me3 HMTase in human lung cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 438, n. 4, p. 647–652, 6 set. 2013.
- LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instability in colorectal cancers. **Nature**, v. 386, n. 6625, p. 623–627, 10 abr. 1997.
- LENNARTSSON, A.; EKWALL, K. Histone modification patterns and epigenetic codes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1790, n. 9, p. 863–868, set. 2009.
- LEVIN, B. et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. **Gastroenterology**, v. 134, n. 5, p. 1570–1595, maio 2008.
- LEVY, D. et al. Lysine methylation of the NF- κ B subunit RelA by SETD6 couples activity of the histone methyltransferase GLP at chromatin to tonic repression of NF- κ B signaling. **Nature Immunology**, v. 12, n. 1, p. 29–36, jan. 2011.
- LI, Y. et al. The target of the NSD family of histone lysine methyltransferases depends on the nature of the substrate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 49, p. 34283–34295, 4 dez. 2009.
- LOEB, L. A. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 51, n. 12, p. 3075–3079, 15 jun. 1991.
- LOPEZ, J. et al. The context and potential of epigenetics in oncology. **British Journal of Cancer**, v. 100, n. 4, p. 571–577, 24 fev. 2009.
- LU, T. et al. Regulation of NF- κ B by NSD1/FBXL11-dependent reversible lysine methylation of p65. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 1, p. 46–51, 5 jan. 2010.

- LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, n. 6648, p. 251–260, 18 set. 1997.
- MARTIN, C.; ZHANG, Y. The diverse functions of histone lysine methylation. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 838–849, nov. 2005.
- MAUCHLEY, D. C. et al. Clinical utility and cost-effectiveness of routine preoperative computed tomography scanning in patients with colon cancer. **American Journal of Surgery**, v. 189, n. 5, p. 512–517; discussion 517, maio 2005.
- MAZUR, P. K. et al. SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer. **Nature**, v. 510, n. 7504, p. 283–287, 21 maio 2014.
- MINAMOTO, T. Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 4, p. 519–527, 1 abr. 1999.
- MIRABELLA, F. et al. A novel functional role for MMSET in RNA processing based on the link between the REIIBP isoform and its interaction with the SMN complex. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99493, 2014.
- MOOLGAVKAR, S. H.; KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 66, n. 6, p. 1037–1052, jun. 1981.
- MUZNY, D. M. et al. The DNA sequence, annotation and analysis of human chromosome 3. **Nature**, v. 440, n. 7088, p. 1194–1198, 27 abr. 2006.
- NEWBOLD, R. F.; MOKBEL, K. Evidence for a tumour suppressor function of SETD2 in human breast cancer: a new hypothesis. **Anticancer Research**, v. 30, n. 9, p. 3309–3311, set. 2010.
- NIMURA, K. et al. A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nkx2-5 to Wolf-Hirschhorn syndrome. **Nature**, v. 460, n. 7252, p. 287–291, 9 jul. 2009.
- NITSCHKE, U. et al. Mucinous and signet-ring cell colorectal cancers differ from classical adenocarcinomas in tumor biology and prognosis. **Annals of Surgery**, v. 258, n. 5, p. 775–782; discussion 782–783, nov. 2013.
- OUKOLKOV, A. V.; BILIM, V. N.; BILLADEAU, D. D. Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 21, p. 6790–6796, 1 nov. 2008.
- PARK, J.-I.; KWAK, J.-Y. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Colorectal Cancer. **PPAR Research**, v. 2012, p. 1–12, 2012.
- PELTOMÄKI, P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 4, p. 299–310, 15 fev. 2012.

PFISTER, S. X. et al. SETD2-Dependent Histone H3K36 Trimethylation Is Required for Homologous Recombination Repair and Genome Stability. **Cell Reports**, v. 7, n. 6, p. 2006–2018, jun. 2014.

PIERCE B.A. **Genética: um enfoque conceitual**. 3. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2012.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1057–1068, out. 2010.

QIAN, C.; ZHOU, M.-M. SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 23, p. 2755–2763, dez. 2006.

RAYASAM, G. V. NSD1 is essential for early post-implantation development and has a catalytically active SET domain. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 12, p. 3153–3163, 16 jun. 2003.

REED, J. C. Dysregulation of apoptosis in cancer. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 17, n. 9, p. 2941–2953, set. 1999.

REX, D. K. et al. American College of Gastroenterology Guidelines for Colorectal Cancer Screening 2008. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 104, n. 3, p. 739–750, mar. 2009.

REZZA, A.; SENNETT, R.; RENDL, M. Adult stem cell niches: cellular and molecular components. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 107, p. 333–372, 2014.

RODRIGUEZ-PAREDES, M. et al. Gene amplification of the histone methyltransferase SETDB1 contributes to human lung tumorigenesis. **Oncogene**, v. 33, n. 21, p. 2807–2813, 22 maio 2014.

ROY, H. K.; LYNCH, H. T. Diagnosing Lynch syndrome: is the answer in the mouth? **Gut**, v. 52, n. 12, p. 1665–1667, dez. 2003.

SADANANDAM, A. et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. **Nature Medicine**, v. 19, n. 5, p. 619–625, maio 2013.

SALZ, T. et al. hSETD1A Regulates Wnt Target Genes and Controls Tumor Growth of Colorectal Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 74, n. 3, p. 775–786, 1 fev. 2014.

SATO, Y. et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. **Nature Genetics**, v. 45, n. 8, p. 860–867, ago. 2013.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27–36, jan. 2010.

- SIMON, J. M. et al. Variation in chromatin accessibility in human kidney cancer links H3K36 methyltransferase loss with widespread RNA processing defects. **Genome Research**, v. 24, n. 2, p. 241–250, fev. 2014.
- SIMPSON, N. E. et al. Modifying metabolically sensitive histone marks by inhibiting glutamine metabolism affects gene expression and alters cancer cell phenotype. **Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society**, v. 7, n. 12, p. 1413–1420, 1 dez. 2012.
- SUBRAMANIAN, K. et al. Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. **Molecular Cell**, v. 30, n. 3, p. 336–347, 9 maio 2008.
- SUI, X. et al. p53 signaling and autophagy in cancer: a revolutionary strategy could be developed for cancer treatment. **Autophagy**, v. 7, n. 6, p. 565–571, jun. 2011.
- SUN, X.-J. Identification and Characterization of a Novel Human Histone H3 Lysine 36-specific Methyltransferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 42, p. 35261–35271, 24 ago. 2005.
- SUN, X.-J. et al. Genome-Wide Survey and Developmental Expression Mapping of Zebrafish SET Domain-Containing Genes. **PLoS ONE**, v. 3, n. 1, p. e1499, 30 jan. 2008.
- SURAWEERA, N. et al. Mutations within Wnt pathway genes in sporadic colorectal cancers and cell lines. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 119, n. 8, p. 1837–1842, 15 out. 2006.
- SZYF, M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 243–263, 2009.
- TANG, W.; HO, S. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 8, n. 2, p. 173–182, jun. 2007.
- The Human Protein Atlas. Disponível em: <<http://www.proteinatlas.org>>. Acesso em: 10 abr. 2014.
- THOMPSON, E. C.; TRAVERS, A. A. A Drosophila Smyd4 homologue is a muscle-specific transcriptional modulator involved in development. **PloS One**, v. 3, n. 8, p. e3008, 2008.
- TIWARI, V. K. et al. PcG Proteins, DNA Methylation, and Gene Repression by Chromatin Looping. **PLoS Biology**, v. 6, n. 12, p. e306, 2008.
- TOYOKAWA, G. et al. Histone lysine methyltransferase Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 is involved in human carcinogenesis through regulation of the Wnt pathway. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 13, n. 10, p. 887–898, out. 2011.
- VAN ENGELAND, M. et al. Colorectal Cancer Epigenetics: Complex Simplicity. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 10, p. 1382–1391, 1 abr. 2011.

- VARIER, R. A.; TIMMERS, H. T. M. Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1815, n. 1, p. 75–89, jan. 2011.
- VERDECCHIA, A. et al. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EURO CARE-4 data. **The Lancet Oncology**, v. 8, n. 9, p. 784–796, set. 2007.
- VOGELSTEIN, B. et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 9, p. 525–532, 1 set. 1988.
- WANG, G. G. et al. NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 7, p. 804–812, jul. 2007.
- WANG, H. et al. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. **Molecular Cell**, v. 8, n. 6, p. 1207–1217, dez. 2001.
- WANG, S. S. et al. Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5387, p. 284–287, 9 out. 1998.
- WASHINGTON, M. K. et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 133, n. 10, p. 1539–1551, out. 2009.
- WEINBERG, R. A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 49, n. 14, p. 3713–3721, 15 jul. 1989.
- WEISS, J. M. et al. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results--Medicare data. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 29, n. 33, p. 4401–4409, 20 nov. 2011.
- WICKHAM, R.; LASSERE, Y. The ABCs of Colorectal Cancer. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 23, p. 1–8, fev. 2007.
- WILLIAMSON, E. A. et al. The SET and transposase domain protein Metnase enhances chromosome decatenation: regulation by automethylation. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 18, p. 5822–5831, out. 2008.
- WOLFFE, A. P.; GUSCHIN, D. Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. **Journal of Structural Biology**, v. 129, n. 2-3, p. 102–122, abr. 2000.
- WRAY, J. et al. Metnase mediates resistance to topoisomerase II inhibitors in breast cancer cells. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5323, 2009a.
- WRAY, J. et al. Metnase mediates chromosome decatenation in acute leukemia cells. **Blood**, v. 114, n. 9, p. 1852–1858, 27 ago. 2009b.
- WU, S.; RICE, J. C. A new regulator of the cell cycle: the PR-Set7 histone methyltransferase. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 10, n. 1, p. 68–72, 1 jan. 2011.

- YADAV, S. et al. hSET1: a novel approach for colon cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 10, p. 1635–1641, 15 maio 2009.
- YOU, J. S.; JONES, P. A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? **Cancer Cell**, v. 22, n. 1, p. 9–20, 10 jul. 2012.
- YU, N. et al. microRNA-7 Suppresses the Invasive Potential of Breast Cancer Cells and Sensitizes Cells to DNA Damages by Targeting Histone Methyltransferase SET8. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 27, p. 19633–19642, 5 jul. 2013.
- ZEESTRATEN, E. C. M. et al. Addition of interferon- α to the p53-SLP[®] vaccine results in increased production of interferon- γ in vaccinated colorectal cancer patients: a phase I/II clinical trial. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 132, n. 7, p. 1581–1591, 1 abr. 2013.
- ZHANG, J. et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 481, n. 7380, p. 157–163, 12 jan. 2012.
- ZHANG, K.; HAVERSAT, J. M.; MAGER, J. CTR9/PAF1c regulates molecular lineage identity, histone H3K36 trimethylation and genomic imprinting during preimplantation development. **Developmental Biology**, v. 383, n. 1, p. 15–27, 1 nov. 2013.
- ZHANG, X. et al. Structure of the Neurospora SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase. **Cell**, v. 111, n. 1, p. 117–127, 4 out. 2002.
- ZHANG, X.; WEN, H.; SHI, X. Lysine methylation: beyond histones. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 44, n. 1, p. 14–27, 1 jan. 2012.
- ZHAO, Q. et al. Transcriptome-guided characterization of genomic rearrangements in a breast cancer cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 6, p. 1886–1891, 10 fev. 2009.
- ZHU, X. et al. Identification of functional cooperative mutations of SETD2 in human acute leukemia. **Nature Genetics**, v. 46, n. 3, p. 287–293, mar. 2014.
- ZINGG, J. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 5, p. 869–882, 1 maio 1997.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

Os pesquisadores da Universidade de Brasília (UnB) e os médicos do Hospital da Universidade de Brasília (HUB) estão desenvolvendo este projeto colaborativo, sob a coordenação do Prof. Dr. Fábio Pittella Silva e supervisão do Dr. João Nunes de Matos Neto (CRM-DF 9165), para estudar os mecanismos celulares e moleculares que geram o câncer colorretal. Um dos benefícios desse projeto de pesquisa será fornecer bases para o desenvolvimento de diagnósticos mais precisos. Ajudará a caracterização da doença na Região Centro-Oeste, Norte e Nordeste do país. Outro benefício é que medicamentos específicos para o tratamento do câncer poderão ser desenvolvidos.

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

O procedimento para o estudo será o seguinte:

- O(A) senhor(a) será convidado a responder um questionário referente ao histórico da doença, compondo dados que farão parte do prontuário médico.

- O(A) senhor(a) está ciente de que há uma suspeita de acometimento com uma doença chamada câncer colorretal, que requer tratamento e acompanhamento médico. Uma das maneiras pelas quais se pode confirmar ou excluir tal suspeita é através da(s) amostra(s) de biópsia(s), ou seja, retirada de pequeno(s) fragmento(s) do tecido do órgão afetado. Esse(s) fragmento(s) será(ão) examinado(s) por um(a) médico(a)-patologista treinado(a), que poderá utilizar técnicas modernas apropriadas (como a imuno-histoquímica) para o diagnóstico e, posteriormente, emitirá um laudo. Na maioria dos casos, o pesquisador-responsável irá recomendar o tratamento do tumor. Nesse caso, o(a) senhor(a) será encaminhado a um médico-cirurgião do HUB, que lhe fornecerá todos os esclarecimentos com relação ao tratamento. No caso de tratamento

cirúrgico, amostras do tecido poderão ser examinados também pelo(a) patologista. Não haverá qualquer custo para a realização dos exames relacionados ao tratamento, ou para o tratamento em si, mesmo que cirúrgico.

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

- As amostras biológicas serão utilizadas apenas pelos pesquisadores envolvidos neste projeto, sendo experimentalmente manipuladas no Laboratório de Farmacologia Molecular, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. As características moleculares das mesmas serão analisadas por meio de técnicas de biologia molecular e celular. As amostras não serão disponibilizadas para outros estudos em qualquer hipótese.

- Os dados e registros relacionados a este projeto serão mantidos no laboratório de farmacologia molecular e somente os pesquisadores diretamente relacionados ao projeto terão acesso aos mesmos. Se desejar, o(a) senhor(a) será informado(a) dos resultados dessa pesquisa, que tem duração prevista de 2 anos. Os resultados também serão publicados em revistas científicas e de interesse médico, sempre mantendo o seu anonimato.

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

Li e entendi este Termo. Durante a entrevista, eu me senti esclarecido quanto aos objetivos do trabalho de pesquisa. Estou ciente de que a participação no projeto é voluntária e não acarreta ônus para mim e/ou minha família. Sei ainda que em qualquer

momento, posso pedir maiores esclarecimentos ao pesquisador responsável, bem como cancelar a participação sem que isso traga prejuízo a mim.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Data: _____

Assinatura do(a) paciente

Data: _____

Assinatura da testemunha

Data: _____

Assinatura do médico responsável pela pesquisa

Dr. João Nunes de Matos Neto – Cancerologista – CRM-DF 9165

Data: _____

Assinatura do coordenador do projeto de pesquisa

Prof. Dr. Fábio Pittella Silva –FS/UnB

Telefones para contatos:

Comitê de Ética em Pesquisa, Faculdade de Ciências da Saúde, UnB (CEP/FS) – Tel:
(61) 31071947

Dr. João Nunes Neto – Tel: (61) 3448-5021

Prof. Dr. Fábio Pittella Silva – Tel: (61) 3107-1998

APÊNDICE B – Processo de Análise de Projeto de Pesquisa – CEP 021/12



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

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **021/12**

Título do Projeto: “Análise da expressão gênica de metiltransferases proteicas no câncer colorretal”

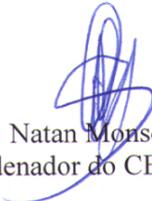
Pesquisadora Responsável: Fábio Pittella Silva

Data de Entrada: 04/04/2012

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto: **021/12** com o título: “Análise da expressão gênica de metiltransferases proteicas no câncer colorretal”, analisado na 4ª reunião ordinária realizada no dia 08 de maio de 2012.

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

Brasília, 23 de maio de 2012.


Natan Monsores
Coordenador do CEP-FS/UnB