

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

WILSON OLIVEIRA SANTOS

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA FAMÍLIA DE METILTRANSFERASES
SMYD EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOIDE CRÔNICA

Brasília
2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

WILSON OLIVEIRA SANTOS

Análise da expressão gênica da família de metiltransferases SMYD em pacientes com leucemia linfóide crônica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araujo

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Pittella da Silva

Brasília
2015

WILSON OLIVEIRA DOS SANTOS

Análise da expressão gênica da família de metiltransferases SMYD em pacientes com leucemia linfóide crônica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 25 de junho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Rodrigo Haddad – Universidade de Brasília - FCE

Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira – Universidade Católica de Brasília - UCB

“Deus Seja Louvado”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me permitir enfrentar mais este desafio da formação acadêmica. Agradeço ao Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araujo pela orientação e, principalmente, pelos conselhos de vida acadêmica. Mais do que meu orientador, é um exemplo de competência, caráter e perseverança, qualidades que sempre acompanham não um professor, mas sim um EDUCADOR.

Um agradecimento em especial à amiga Doralina Rabelo, pelo companheirismo e pela ajuda sempre prestativa no laboratório.

Aos meus colegas do Laboratório de patologia molecular do Câncer meu muito obrigado pelo convívio e pelos momentos de descontração.

A minha família pela paciência nas minhas ausências e pelo apoio quando eu estava presente.

RESUMO

SANTOS, Wilson Oliveira. **Análise da expressão gênica da família de metiltransferase SMYD em pacientes com leucemia linfóide crônica**. Brasília, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

A leucemia linfóide crônica (LLC) é uma doença linfoproliferativa em que há acúmulo de células B monoclonais na medula óssea, sangue periférico, linfonodos e baço. O curso clínico da LLC é bastante variável, sendo os sintomas mais comuns o acúmulo de linfócitos B e, nos casos mais graves, a ocorrência de hepatomegalia, esplenomegalia, anemia e trombocitopenia. Embora a fisiopatologia da doença seja desconhecida, alguns marcadores prognósticos da LLC são bem definidos, sendo a expressão de ZAP70+ um dos mais avaliados. Atualmente, a fisiopatologia de diversos tipos de neoplasias tem sido relacionada a mecanismos epigenéticos. Nessa linha, nosso grupo recentemente demonstrou o envolvimento da família SMYD no desenvolvimento da leucemia linfóide aguda. Essa associação da família SMYD com uma neoplasia linfóide nos levou a desenvolver o presente trabalho, em que investigamos o padrão de expressão gênica de componentes da família SMYD em amostras de LLC e avaliamos a influência desse achado sobre dados laboratoriais como leucometria, número de plaquetas, expressão da proteína ZAP70 e achados citogenéticos dos pacientes estudados. Para isso, usamos 59 amostras de LLC e 10 amostras de células B obtidas de doadores saudáveis, como controles. Os pacientes com LLC foram submetidos a coleta de sangue para determinação do hemograma. Por citometria de fluxo determinamos a expressão da proteína ZAP-70 nas células B leucêmicas. Além disso, todas as amostras foram submetidas à análise citogenética e a extração de RNA para a análise do perfil de expressão genica da família SMYD por PCR em tempo real. Analisando as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LLC enrolados no estudo, 66% dos casos foram classificados como Binet A, 22% como Binet B e 12% como Binet C. Nessa amostragem, 25% dos casos apresentaram cariótipo normal e 75% dos casos apresentaram algum tipo de alteração citogenética. As amostras de células B leucêmicas e normais não expressaram SMYD1. Entretanto, as células da LLC, comparadas as amostras controle, apresentaram maior expressão de SMYD2, SMYD3, SMYD4 e SMYD5. Tendo em vista a heterogeneidade na expressão desses

genes pelas amostras de LLC, as amostras neoplásicas foram dicotomizadas em casos de baixa e alta expressão dos membros SMYD. As amostras que tiveram menor expressão de SMYD2, SMYD3 e SMYD4 dentro do grupo de LLC apresentaram maior número de leucócitos, comparadas aos casos de maior expressão desses genes. É interessante, pois essas amostras com baixa expressão de SMYD2 e SMYD3 apresentaram um elevado índice de alterações citogenéticas complexas, que é um indicador de progressão e de mau prognóstico na LLC. Outro aspecto importante é que existe forte correlação entre a expressão dos genes SMYDs na LLC, indicando a possibilidade de existir na LLC um mecanismo de regulação comum para indução da expressão dos membros dessa família. Por fim, mais estudos são necessários para estabelecer os mecanismos pelo qual essas metiltransferases regulam a evolução da LLC. Esses resultados poderão servir de base para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para prevenir a progressão da LLC.

Palavras-chave: Leucemia Linfóide crônica, SMYD, ZAP-70, cariótipo.

ABSTRACT

SANTOS, Wilson Oliveira. **Gene expression analysis of methyltransferase family SMYD in patients with chronic lymphocytic leukemia**. Brasília, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a lymphoproliferative disease that coexists with monoclonal B cells accumulated in the bone marrow, peripheral blood, lymph nodes and spleen. The clinical course of CLL is highly variable, and the most common symptoms are the accumulation of B lymphocytes and, in severe cases, the occurrence of hepatomegaly, splenomegaly, anemia and thrombocytopenia. Although the pathophysiology of the disease is unknown, some CLL prognostic markers are well defined, being the expression of ZAP70+ is one of the most assessed. Recently, the pathophysiology of various types of cancers has been linked to epigenetic mechanisms. In this line, our group recently demonstrated the involvement of SMYD family in the development of acute lymphocytic leukemia. This association of SMYD family with a lymphoid neoplasia led us to develop this work, in which we investigated the gene expression of SMYD members in CLL samples and evaluated the influence of this finding on white blood cell count, platelet count, expression of ZAP70 protein and cytogenetic findings. For this purpose, we recruited 59 CLL samples and 10 normal B-cells. ZAP-70 protein expression was determined by flow cytometry. In addition, all samples were subjected to cytogenetic analysis and RNA extraction, in order to study the genetic profile expression of SMYD family by real time PCR. Analyzing the clinical and laboratorial characteristics of patients with CLL enrolled in the study, 66% of cases were classified as Binet A, 22% as Binet B and 12% as Binet C. Normal karyotype was detected in 25% of cases, while 75% of cases presented some type of alteration cytogenetic. SMYD1 gene expression was not detected in CLL and in normal B-cells. However, compared to the control group, patients with CLL showed higher levels of the genes SMYD2, SMYD3, SMYD4 and SMYD5. Taking into account that the expression of the genes evaluated was heterogeneous among the CLL patients, we used the median value of genes expression as the cut-off to dichotomize CLL patients in “low” and “high” SMYD gene expression. Interestingly, patients with residual expression of SMYD2, SMYD3 and

SMYD4 possess high WBC count. More important, these samples with low expression of SMYD2 and SMYD3 expression presented complex cytogenetic alterations, in contrast to the cases where the expression of these genes is high, where the karyotype was normal. Another important aspect is that there is a strong correlation among the SMYDs genes, indicating the possible existence of a common regulatory mechanism of induction of these genes in this cancer. Additional studies are required to establish the complete mechanism by which these methyltransferases regulate the evolution of the CLL. These results may provide an important starting point for studies aiming to develop new therapeutic strategies to prevent CLL progression.

Keywords: Chronic Lymphoid Leukemia, SMYD, ZAP-70, Karyotype.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1: Ilustração do nucleossomo..... | 21 |
| Figura 2: Representação esquemática da Família SMYD..... | 22 |
| Figura 3: Expressão SMYD2 em diversos tecidos saudáveis comparadas com pool de amostras de LLC..... | 30 |
| Figura 4: Expressão SMYD3 em diversos tecidos saudáveis comparadas com pool de amostras de LLC..... | 31 |
| Figura 5: Expressão SMYD4 em diversos tecidos saudáveis comparadas com pool de amostras de LLC | 32 |
| Figura 6: Expressão SMYD5 em diversos tecidos saudáveis comparadas com pool de amostras de LLC..... | 33 |
| Figura 7: Comparação entre a expressão de SMYD2 em linfócitos B normais e na LLC..... | 34 |
| Figura 8: Comparação entre a expressão de SMYD3 em linfócitos B normais e na LLC..... | 34 |
| Figura 9: Comparação entre a expressão de SMYD4 em linfócitos B normais e na LLC..... | 35 |
| Figura 10: Comparação entre a expressão de SMYD5 em linfócitos B normais e na LLC..... | 35 |
| Figura 11: Relação entre a expressão do gene SMYD2 e os dados laboratoriais..... | 36 |
| Figura 12: Relação entre a expressão do gene SMYD3 e os dados laboratoriais..... | 37 |
| Figura 13: Relação entre a expressão do gene SMYD4 e os dados laboratoriais..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 14: Relação entre a expressão do gene SMYD5 e os dados laboratoriais..... | 39 |
| Figura 15: Correlação entre a expressão dos genes SMYD e número de leucócitos em pacientes com LLC..... | 40 |
| Figura 16: Relação entre a expressão do gene SMYD2 e o cariótipo... | 41 |
| Figura 17: Relação entre a expressão do gene SMYD3 e o cariótipo... | 42 |
| Figura 18: Relação entre a expressão do gene SMYD4 e o cariótipo... | 43 |
| Figura 19: Relação entre a expressão do gene SMYD5 e o cariótipo .. | 44 |
| Figura 20: Correlação entre a expressão dos genes da família SMYD no grupo controle..... | 45 |
| Figura 21: Correlação entre a expressão dos genes da família SMYD nas amostras com LLC..... | 46 |
| Figura 22: Regressão Linear das correlações entre a expressão dos genes SMYDs..... | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1: Sistema de Estadiamento de Rai (1975)..... | 17 |
| Tabela 2: Sistema de Estadiamento de Binet (1981)..... | 18 |
| Tabela 3: Estratificação de risco conforme achados citogenéticos e perfil de expressão gênicas..... | 19 |
| Tabela 4: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LLC..... | 29 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FISH: Hibridização fluorescente *in situ*

P53: Gene supressor de Tumores

INCA: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

Ig: Imunoglobulina

LLC: Leucemia Linfóide Crônica

Pb: Pares de bases

PCR: Reação em cadeia polimerase

ZAP-70: Proteína cinase 70 kda associada a cadeia Zeta

Del: deleção

IWG-CLL: Do inglês, *International Working Group for Chronic Lymphocytic Leukemia*

cDNA: DNA complementar

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

IgM: Imunoglobulina de cadeia pesada M

IgD: Imunoglobulina de cadeia pesada

IgVH: região variável da cadeia pesada na imunoglobulina

HMTase: Enzima Histona metiltransferase

H3K9: Enzima Histona lisina 9 metiltransferase

H3K27: Enzima Histona lisina 27 metiltransferase

H4K20: Enzima Histona lisina 20 metiltransferase

HDAC: Enzima de Histona Deacetilação

SET: Supressor de diversidade, Enhancer de zeste, Trithorax

SRF: Fatores regulatórios séricos

Pdgr- α : Receptor alfa de fator de crescimento de derivado- plaquetário

MMP: matrix Metaloproteína

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2. OBJETIVOS..... | 24 |
| 2.1 <i>Geral</i> | 24 |
| 2.2 <i>Específicos</i> | 24 |
| 3. METODOLOGIA..... | 25 |
| 3.1 <i>Casuística</i> | 25 |
| 3.2 <i>Citometria de fluxo</i> | 25 |
| 3.3 <i>Análise citogenética</i> | 25 |
| 3.4 <i>Processamento das amostras para estudo de expressão gênica</i> | 26 |
| 3.5 <i>Extração do RNA e transcrição reversa</i> | 26 |
| 3.6 <i>PCR em tempo real</i> | 27 |
| 3.7 <i>Análise estatística</i> | 28 |
| 4. RESULTADOS..... | 29 |
| 4.1 <i>Expressão dos genes SMYDs em amostras obtidas de tecidos saudáveis e em um pool de LLC</i> | 30 |
| 4.2 <i>Expressão dos genes da família SMYD em amostras de LLC e em células B obtidas de pacientes saudáveis</i> | 33 |
| 4.3 <i>Relação entre a expressão de SMYD e os dados laboratoriais dos pacientes com LLC</i> | 36 |
| 4.4 <i>Correlações entre a expressão dos genes SMYD e o número de leucócitos</i> | 39 |
| 4.5 <i>Estratificação do cariótipo a partir da expressão dos genes SMYDs em paciente com LLC</i> | 40 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.6 | <i>Correlação entre a expressão dos genes SMYDs em amostras controle e em amostras de LLC.....</i> | 44 |
| 5. | DISCUSSÃO..... | 48 |
| 6. | CONCLUSÃO..... | 53 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 54 |

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfóide Crônica (LLC) se caracteriza por ser uma patologia em que ocorre acúmulo de linfócitos B monoclonais pequenos e maduros no sangue periférico, na medula óssea e no tecido linfóide. Essas células expressam marcadores de superfície como CD19, CD20, CD23, CD43, CD79a, CD5, bem como, a baixa densidade dos marcadores de superfície IgM e IgD (Plass, C., et al., 2007; Hallek, M., et al., 2008). Essa patologia tem curso clínico heterogêneo; muitos pacientes apresentam um estado indolente da doença, não necessitando de tratamento, enquanto outros possuem um padrão clínico agressivo (Orchard, A.J., et al., 2004).

A incidência da LLC varia com a faixa etária e o sexo na população, sendo os indivíduos idosos os predominantemente afetados — dois terços dos pacientes apresenta idade superior a 60 anos (Butler, T.; Gribben, J.G., 2010; Dighiero, G.; Hamblin, T.J., 2008). A LLC é o tipo mais comum de leucemia nos países ocidentais. Nos Estados Unidos a prevalência é de 4,1 casos para cada 100.000 habitantes (Hallek, M., 2013). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou 5.050 casos novos de leucemia em homens e 4.320 em mulheres, para o biênio 2014/2015. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,20 casos novos para cada 100 mil homens e 4,25 para cada 100 mil mulheres.

Embora se saiba que fatores genéticos estão envolvidos na patogênese da LLC, o mecanismo completo que leva ao desenvolvimento dessa doença ainda é desconhecido. Nesse sentido, também não existem evidências consistentes para alguns fatores de risco, como exposição ionizante ou química. As evidências que se têm, é de que trabalhadores agrícolas expostos a herbicidas possuem maior risco de desenvolvimento dessa neoplasia (Dighiero, G.; Hamblin, T.J., 2008).

Para estabelecer o diagnóstico da LLC, segundo a *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*(IWG-CLL), é necessário que a contagem de linfócitos no sangue periférico seja de no mínimo 5.000/ μ L por mais que três meses, sendo que essas células devem apresentar o padrão imunofenotípico característico da doença, como positividade para os marcadores a seguir: CD19, CD20, CD23, CD43, CD5, e baixa expressão de CD79b, IgM e IgD (Hallek, M., et al., 2008).

Na LLC existem pacientes que não necessitam de tratamento e que apresentam longa expectativa de vida, e casos que exibem um padrão de doença

agressiva e com necessidade de tratamento imediato. Essa diversidade de apresentação clínica motivou alguns pesquisadores a estabelecer uma classificação clínica. Rai e Binet definiram um sistema de estadiamento baseado em exames clínicos e em um simples exame laboratorial de sangue que permite agrupar os doentes em três grupos: bom prognóstico, risco intermediário e mau prognóstico (Rai, K.R., et al., 1975; Binet, J.L., et al., 1981). Essa definição contribuiu fortemente no campo, pois fundamentou os hematologistas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas a essa patologia.

O sistema de estadiamento de Rai, publicado em 1975, subdivide os doentes em grupos de prognósticos de acordo com a presença de adenomegalia, hepatoesplenomegalia, anemia e/ou trombocitopenia. Os doentes classificados como estádios 0 ou I têm prognóstico favorável, enquanto aqueles com estádios III/IV têm uma sobrevivência global bastante inferior (**Tabela 1**).

Tabela 1: Sistema de estadiamento de Rai (1975).

| Estadio | Características | Sobrevida (meses) |
|---------|--|-------------------|
| 0 | Linfocitose SP e MO | >150 |
| I | Linfocitose e adenomegalias | 101 |
| II | Linfocitose e Hepato e/ou Esplenomegália | 71 |
| III | Linfocitose e anemia com ou sem adenomegalia, esplenomegalia ou hepatomegalia | 19 |
| IV | Linfocitose e Plaquetopenia com ou sem adenomegalia, esplenomegalia ou hepatomegalia | 19 |

SP: Sangue periférico; MO: Médula Óssea.
Adaptado de Rai, K.R., et al., 1975

Em 1981, Binet propôs um sistema de estadiamento em três estádios, de acordo com a massa linfóide total. Os doentes no estadio “C”, o mais avançado, apresentam anemia e/ou trombocitopenia resultante do envolvimento medular, enquanto os pacientes classificados como estágio “B” apresentam padrão laboratorial mais ameno, porém, com envolvimento considerável de órgãos linfóides. No estágio “A” estão classificados os pacientes com melhor prognóstico (**Tabela 2**).

Tabela 2: Sistema de Estadiamento de Binet (1981).

| Estádio | Características | Sobrevivência (anos) |
|---------|--|----------------------|
| A | Hb \geq 10g/dL, plaquetas \geq 100.000/mm ³ , Duas ou menos regiões linfonodais acometidas | >7 |
| B | Hb \geq 10g/dL, paquetas \geq 100.000/mm ³ , Três ou mais regiões linfonodais acometidas | <5 |
| C | Hb<10g/dL,e/ou plaquetas<100.000/mm ³ Anemia e/ou plaquetopenia | <2 |

Hb: hemoglobina.

Adaptado de Binet, J.L., et al., 1981

Apesar da reconhecida contribuição desses sistemas, eles não são capazes de prever com acurácia o real prognóstico do paciente. Desse modo, têm-se utilizado outros marcadores prognósticos na tentativa de se ter melhor acesso às informações do comportamento da doença; de se estabelecer um diagnóstico personalizado; e de acompanhar as respostas ao tratamento.

Utilizando a técnica de fluorescência *in situ* hibridização (FISH), estabeleceu-se um modelo hierarquizado em cinco categorias de grau crescente de risco, que do pior prognóstico ao mais brando, são os seguintes: deleção do cromossomo 17p13 independente de anormalidades concomitantes; deleção do cromossomo 11q22-q23; trissomia do cromossomo 12; cariótipo normal; e deleção do cromossomo 13q14 (Dohner, H., et al., 2000).

De fato, as anormalidades genéticas têm importante papel na patogenia da doença. Desde os anos 90, existem evidências que certas anormalidades citogenéticas são frequentemente encontradas, como perda parcial de um cromossomo (deleções 6q, 11q, 13q, ou 17p) e ganhos de cromossomos inteiros (trissomia 12) (Puiggros, A.; Blanco, G.; Espinet, B., 2014). É importante ressaltar que as lesões citogenéticas não explicam por completo a heterogeneidade da LLC (Foà, R., et al., 2013).

Junto às alterações citogenéticas, mutações em genes, como *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* e *BIRC3* também exercem influência prognóstica (Puiggros, A.; Blanco, G.; Espinet, B., 2014) (**Tabela 3**).

Tabela 3: Estratificação de risco conforme achados citogenéticos e alterações Gênicas.

| Categoria de Risco | Fator Genético Associado |
|---------------------|--|
| Altíssimo Risco | Del 17p/ mutação do gene <i>TP53</i> Ou mutação do gene <i>BIRC3</i> |
| Alto Risco | Del 11q/ mutação do gene <i>ATM</i> ou Mutação do gene <i>NOTCH1</i> ou Mutação do gene <i>SF3B1</i> |
| Risco Intermediário | Trissomia 12 e Cariótipo normal |
| Baixo Risco | Del 13q isolado |

Adaptado de PUIGGROS, A.; BLANCO, G.; ESPINET, B., 2014.

Outro marcador associado ao prognóstico é o *status* mutado ou não do gene que codifica a região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (*IgVH*), o que dicotomiza a doença em bom prognóstico (mutado) e em mau prognóstico (não mutado). Pacientes com *status* não mutado usualmente têm um estado avançado da doença com características citogenéticas preditivas de um curto tempo de vida, em contraste, pacientes com *status* mutado apresentam um padrão clínico indolente (Crespo, M.; et al., 2003). Apesar de útil, essa investigação, por envolver sequenciamento, é onerosa; consome tempo considerável e é de acesso relativamente restrito na rotina dos serviços de saúde do Brasil. Desta forma, se estabeleceu outro marcador prognóstico, a expressão de ZAP70, uma proteína tirosina cinase que está presente na via de sinalização de células T e NK, mas não em células B de pacientes saudáveis (Crespo, M.; et al., 2003). Existe uma correlação entre a expressão de ZAP70 com a proteína de migração CXCR4, o que faz com que as células B que possuem elevada expressão de ZAP70 apresentem capacidade de migração para centros germinativos, locais em que elas recebem estímulo de proliferação (Richardson, S.J.; et al., 2006). Esse mecanismo, além de, em parte, explicar o porquê dos pacientes com elevada expressão de ZAP70 terem

pior curso clínico, é de extrema relevância para o entendimento de onde advém a leucometria elevada desses na LLC, já que os linfócitos que se encontram no sangue periférico encontram-se na fase G0/G1 do ciclo celular. Contribui para o acúmulo de linfócitos, o fato de que essas células apresentarem baixa expressão de genes pró-apoptóticos e elevada expressão de genes anti-apoptóticos (Wiestner, A., 2012). Outro aspecto importante é que a expressão de ZAP70 se associa com o *status* de mutação do gene *IgVH* (Orchard, J.A.; et al., 2004).

Assim como ZAP70, a expressão de CD38 também se associa ao prognóstico na LLC. Tal como ZAP70, a expressão de CD38 é facilmente determinado por uso de citometria de fluxo e, também, está correlacionado com *status* mutacional do gene *IgVH*. Contudo esta relação não é absoluta, pois a expressão dessa proteína pode variar com o tempo (Gribben, J.G., 2008).

Além da expressão de proteínas, mutações e alterações citogenéticas, outros parâmetros laboratoriais também influenciam no curso da LLC. Nesse sentido, a leucocitose (aumento na contagem de células brancas) é um achado comum entre os pacientes. A avaliação cuidadosa da contagem de células do sangue é um passo essencial e necessário para caracterizar o processo leucêmico (Chabot-Richards, D.S.; George, T.I., 2014). É importante ressaltar que a elevada leucometria, acima de $50 \times 10^9/L$, constitui sinal de mau prognóstico na LLC (Wierda, W.G., et al., 2007).

O número de plaquetas também pode se apresentar alterado na LLC, já que essa doença é caracterizada por envolvimento medular. Tanto o sistema de estadiamento de Rai como o de Binet reconhecem que o número de plaquetas pode se apresentar como um fator desfavorável na LLC (Visco, C.; et al., 2008). É importante frisar que em alguns casos os pacientes com LLC desenvolvem trombocitopenia imune. Não se sabe a verdadeira prevalência deste achado, entretanto, se estima que a trombocitopenia imune pode complicar o curso da LLC em aproximadamente 2% dos pacientes (Diehl, L.F.; Ketchum, L.H., 1998; Visco, C.; et al., 2008).

Como pode ser visto, existem diversos fatores bem definidos na LLC que parecem estar associados ao desenvolvimento e a progressão da doença, mas que não são capazes de explicar por completo como se desenvolve esse câncer.

Atualmente, o surgimento e a progressão de diversos tipos de neoplasia estão sendo associados a mecanismos epigenéticos.

As células do corpo humano têm aproximadamente 2 metros de DNA genômico que está empacotado no núcleo, sendo a organização deste material nesse compartimento celular de vital importância para a funcionalidade da maquinaria genética (Maeshima, K.; et al., 2014). A dupla fita do DNA tem um esqueleto de fosfato que cria uma carga negativa, não permitindo dobras sobre si mesmo. Como solução, esta dupla fita de DNA se enrola ao redor de um núcleo de histonas em formato de octâmero (Li, G.; Reinberg, D., 2011). Assim, forma-se uma unidade chamada de nucleossomo (**Figura 1**).

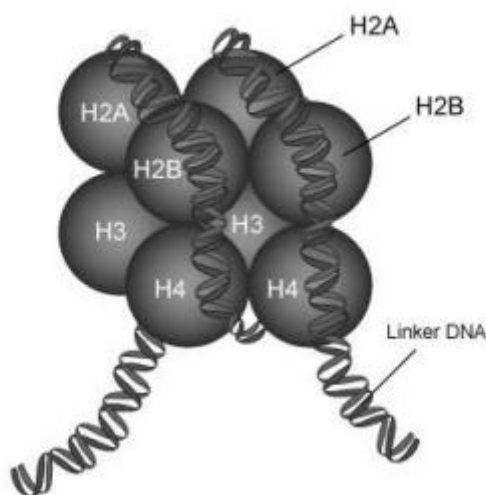


Figura 1: Ilustração do nucleossomo com as 8 proteínas histônicas (um par de cada um dos subtipos H2A, H2B, H3 e H4) envolvidas pela dupla fita de DNA, que circunda o núcleo de histonas por 1,6 voltas em um comprimento de 146 pares de base. O DNA que não envolve o núcleo histônico é denominado DNA de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

O acesso às informações do DNA podem sofrer restrições de leitura ou ter a leitura facilitada. As alterações que permite ou não a acessibilidade ao DNA são pós-transcricionais. Nesse sentido, as histonas estão sujeitas a várias formas de modificações pós-transcricionais, incluindo metilação, acetilação, fosforilação dentre outras (Leinhart, K.; Brown, M., 2011).

A metilação de histona é catalisada por enzimas metiltransferases (HMTase), o que influencia diversos processos biológicos, como o desenvolvimento normal, crescimento celular e a regulação da transcrição gênica. A enzima histona lisina metiltransferase catalisa um radical metil pelo uso de um domínio SET. O domínio SET consiste em aproximadamente 130 aminoácidos. As mais conhecidas histonas alvo das lisinas metiltransferases são as histonas H3, lisina 9 (H3K9), lisina 27

(H3K27) e lisina 20 (H4K20) que estão relacionadas ao silenciamento gênico (Zhang, X.; Wen, H.; Shi, X., 2012).

Mais de 60 proteínas com domínio SET são conhecidas, incluindo-se a família SMYD, que compreende um conjunto de cinco proteínas que apresentam uma arquitetura única desse domínio. O domínio SET é cortado em dois segmentos pelo domínio MYND (dedo de zinco modificado), que é seguido pelo domínio pós SET rico em cisteína (Leinhart, K.; Brown, M., 2011) (**Figura 2**).

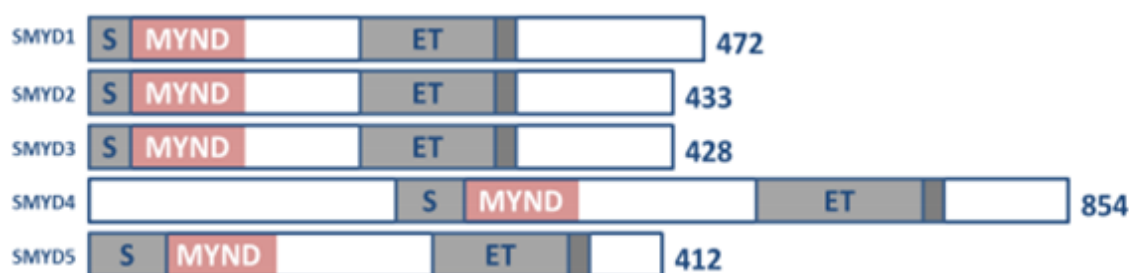


Figura 2: Representação esquemática da família SMYD – Linear representação da estrutura do domínio da família SMYD. Domínio SET é mostrado em cinza claro, O domínio MYND em rosa, o domínio pós-SET em cinza escuro. Os números no final são referentes ao tamanho de cada proteína SMYD em humanos. Obtido de Leinhart, K.; Brown, M. (2011).

O domínio MYND é um *zinc finger motif* que está envolvido em interações proteína-proteína e é definido por sete resíduos de cisteína conservados e um único resíduo de histidina que são arranjados em um consenso C4-C2HC (Spadaccini, R.; et al., 2006). Foi assim nomeado porque *myeloid*, *nervy* e *DEAF-1* são as mais bem caracterizadas proteínas que contém o domínio MYND (Foreman, K.W.; et al., 2011). Já o domínio SET é uma sequência evolucionariamente conservada, cuja função é a adição de grupos metil. Seu nome é derivado das três proteínas nas quais foi inicialmente caracterizado em *Drosophila*: *Suv (var) 3-9*, *Enhancer-of-zeste* e *Trithorax* (Jones, R.S.; Gelbart, W.M., 1990; Thompson, E.C.; Travers, A.A., 2008).

Assim como as mutações genéticas, o padrão de expressão de enzimas metiltransferase também está associado a LLC. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a metiltransferase EZH2, que apresenta expressão elevada em diversos tipos de câncer, tem um importante papel na malignidade da LLC, se associando ao acúmulo de linfócitos, a elevada expressão de ZAP70 e às alterações citogenéticas (Rabello, D.A.; et al., 2014). Em um estudo prévio, já havíamos demonstrado que a expressão de SMYD2 está elevada em pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA), constituindo um fator de mau prognóstico (Sakamoto, L.H.; et al., 2014). Essa associação da família SMYD com uma neoplasia linfóide nos levou

a desenvolver o presente trabalho, em que investigamos o padrão de expressão gênica de componentes da família SMYD em amostras de LLC e avaliamos a influência desse achado sobre os dados laboratoriais, expressão de ZAP70 e análise citogenética dos pacientes estudados.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar a expressão dos membros da família de metiltransferases SMYD na Leucemia Linfóide Crônica e analisar se esses achados estão envolvidos na progressão e/ou no prognóstico desse câncer.

2.2 Específicos

- Avaliar a expressão da proteína ZAP-70 em amostras de LLC;
- Investigar o cariótipo dos pacientes com LLC;
- Avaliar a expressão dos genes da família SMYD em diversos tecidos saudáveis;
- Comparar a expressão dos genes da família SMYD entre pacientes com LLC e pacientes saudáveis;
- Correlacionar a expressão dos genes SMYD com a leucometria dos pacientes avaliados;
- Relacionar a expressão de ZAP-70 das amostras de LLC com os dados de expressão gênica;
- Relacionar a avaliação citogenética das amostras de LLC com os dados de expressão gênica.

3. METODOLOGIA

3.1 Casuística:

O presente estudo incluiu pacientes portadores de LLC diagnosticados e atendidos no serviço de hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). O diagnóstico de LLC foi estabelecido com base nas diretrizes do *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*, baseando-se no número de linfócitos, em aspectos morfológicos e na avaliação imunofenotípica. Em paralelo, foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes saudáveis, pareados por idade com a amostragem de LLC, com vistas a se isolar células B controle. Todos os sujeitos que concordaram em participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, previamente aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da FMRP-USP e FS-UnB.

3.2 Citometria de fluxo:

O sangue periférico (5mL) de todos os pacientes com LLC foi coletado em EDTA. As células mononucleares foram isoladas em gradiente de densidade Ficoll Hypaque (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), após centrifugação. A concentração final de células foi ajustada para 10^6 por tubo. O painel inicial de citometria de fluxo, utilizada para diagnóstico dos casos recrutados consistiu em 3 tubos: i) CD20 FITC, CD79b PE, CD19 PE-Cy5, CD5 APC; (ii) anti- λ FITC, anti- κ PE, CD19 PE-Cy5, CD5 APC; (iii) Anti- λ FITC, anti- κ PE, CD19 PE-Cy5, CD5 APC. Todos os anticorpos monoclonais foram obtidos da Becton Dickinson (San Jose, CA, USA), exceto os anticorpos anti- λ e anti- κ (Dako, Carpinteria, CA, USA). Ademais, foi analisada a expressão do marcador prognóstico ZAP-70 (San Jose, CA, USA), sendo todos os testes analisados no citometro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson).

3.3 Análise Citogenética:

A análise do cariótipo foi realizada no laboratório de medicina da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Em suma, foram utilizadas 1×10^7 células mononucleares, sendo a metáfase induzida em meio RPMI-1640 (Invitrogen, Gaithersburg, MD) com 20% de SBF na presença do oligonucleotídeo

imunoestimulatório DSP30 (TIB Mol Biol, Berlin, Germany) e interleucina 2 (IL-2). Após 72 horas em cultura, foi adicionado colcemid (Sigma, Munich, Germany) antes da preparação dos cromossomos e análise cariotípica.

3.4 Processamento das amostras para estudo de expressão gênica:

Após coleta de sangue das amostras controles, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas com o uso do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Resumidamente, foi adicionado em cada amostra de sangue periférico 4 ml de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences), após o material foi centrifugado a 300g, por 30 minutos. Passado esse período, o anel de células mononucleares foi recolhido por auxílio de uma pipeta pasteur e transferido para outro tubo de 15 ml. As células mononucleares foram lavadas duas vezes em PBS por 10 minutos e submetidas à contagem celular.

Após a contagem de células, os linfócitos B dos pacientes saudáveis foram isolados através de coluna imunomagnética (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. Em suma, as células PBMC foram incubadas com o anticorpo monoclonal CD19 conjugado com *microbeads* (Miltenyi Biotec) e, posteriormente, a suspensão celular foi dispensada em uma coluna LS (MACS Separation Columns; Miltenyi Biotec) previamente acoplada em um ímã (SuperMACS). As células CD19 tinham na sua superfície a ligação de *beads* e ficaram retidas no campo magnético. Posteriormente a coluna foi retirada do campo magnético e as células obtidas para avaliação da pureza. Foram utilizadas nesse estudo as amostras que apresentaram marcação para CD19 superior a 90%. Pelo fato das amostras de LLC apresentarem elevada porcentagem de linfócitos B, as amostras utilizadas nesse estudo passaram apenas pela centrifugação pelo gradiente de densidade Ficoll-Hypaque antes de serem submetidas a extração de RNA.

3.5 Extração do RNA e transcrição reversa:

O RNA total dos pacientes com leucemia e das amostras purificadas CD19+ dos doadores saudáveis foi isolado por uso de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Depois de isoladas, as células foram centrifugadas e ressuspensas em PBS

tratado com 0.1% do inibidor de RNase DEPC (diethylpyrocarbonato). Em seguida, o reagente TRIZOL-LS foi adicionado e a mistura homogeneizada. Neste ponto, as amostras foram guardadas em freezer -80°C para serem posteriormente extraídas. Para a extração, foi adicionado clorofórmio para separação da fase aquosa contendo o RNA. O RNA presente na fase aquosa foi em seguida precipitado por centrifugação após a adição de isopropanol. Após ser lavado com etanol 75%, o RNA ressuspenso em água (tratada com DEPC) foi guardado em freezer a -70°C até ser utilizado. A quantificação do RNA foi calculada a partir da absorbância a 260nm (obtida em espectrofotômetro), e a pureza, a partir da razão A260/A280. A qualidade do RNA obtido foi verificada pela integridade das bandas 28S e 18S por visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 μg do total de RNA, por uso do Kit High-capacity (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 PCR em tempo real:

Para as reações de PCR, utilizamos 0,5 μL da sonda/primer específica para o gene estudado; 2,5 μL de máster mix; 5 μL de água e 2 μL de cDNA. As análises quantitativas das expressões dos genes foram realizadas pela metodologia TaqMan (Applied Biosystems), cujos primers e sondas (SMYD1, SMYD2, SMYD3, SMYD4 e SMYD5) foram adquiridos pelo sistema AssayOnDemand. O gene calibrador utilizado foi a B-actina (Applied Biosystems), cuja eficiência de amplificação é a mesma dos genes alvos, o que possibilitou a análise pela metodologia de $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak, K.J.; Schmittgen, T.D., 2001; Pfaffl, M.W., 2001). As amostras foram normalizadas pela diferença de ciclos (ΔCt) entre os genes avaliados e a referência interna (expressão de B-actin). O $\Delta\Delta\text{Ct}$ foi calculado pela subtração do ΔCt das amostras de LLC pela mediana dos ΔCt das amostras controles. As reações foram feitas em duplicatas, no aparelho de detecção de PCR em tempo real StepONE (Applied Biosystems).

Adicionalmente, um painel comercial de RNA de 12 tecidos humanos normais (fígado, baço, intestino delgado, cérebro, colón, coração, pulmão, testículo, estômago, rim, placenta e músculo), obtido da Origene® (*OriGene Technologies, Rockville, USA*) foi utilizado nesse estudo para se determinar a expressão padrão

dos genes SMYD1, SMYD2, SMYD3, SMYD4 e SMYD5 em tecidos normais e comparar com um *pool* com as 59 amostras de LLC.

3.7 Análise estatística:

Foi utilizado o software Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) para as análises estatísticas. O nível de significância adotado foi de 5% (CI 95%). Para as comparações envolvendo dois grupos, utilizamos o teste Mann-Whitney. Para as comparações com mais de dois grupos utilizamos o teste ANOVA seguido do pós teste Dunn's. Para as análises de contingência utilizamos o teste exato de Fischer.

4. RESULTADOS

Analisando as características clínicas e laboratoriais dos 59 pacientes com LLC agrupados no estudo encontramos 66% dos casos classificados como Binet A, 22% como Binet B e 12% como Binet C. Nessa amostragem, 25% dos casos apresentaram cariótipo normal e 75% mostraram algum tipo de alteração citogenética (**Tabela 4**).

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

| Características | Pacientes |
|---------------------------------|--------------|
| Gênero | |
| Homens | 35(59,3%) |
| Mulheres | 24(40,7%) |
| Idade média | 63 anos |
| Distribuição | 32 a 98 anos |
| Estadiamento pelo sistema Binet | |
| Binet A | 39(66%) |
| Binet B | 13(22%) |
| Binet C | 7(12%) |
| Análise Citogenética* | |
| Deleção 13q | 5(8,3%) |
| Deleção 17p | 4(6,7%) |
| Trissomia 12 | 16(26,7%) |
| Outros | 20(33,3%) |
| Normal | 15(25%) |
| Expressão de ZAP 70** | |
| >20% | 39(67,2%) |
| <20% | 19(32,8%) |

* Uma amostra apresentou deleção 13q e trissomia do 12, sendo alocada em ambos grupos.

** Um dado foi perdido.

4.1 Expressão dos genes SMYDs em amostras obtidas de tecidos saudáveis e em pool de LLC.

Inicialmente, comparamos a expressão de genes da família SMYD entre tecidos humanos normais, como fígado, baço, intestino delgado, cérebro, colón, coração, pulmão, testículo, estômago, rim, placenta e músculo, e um *pool* das amostras de LLC. Para analisar os resultados, a expressão dos genes estudados no *pool* de LLC foi escolhida como calibrador.

Em nenhuma amostra estudada houve expressão do gene SMYD1. A expressão de SMYD2 nas amostras de baço, estômago e placenta foram similares a expressão encontrada na LLC. O gene SMYD2 se mostrou mais expresso nas amostras de músculo, coração e pulmão, e menos expresso na amostra de fígado (Figura 3).

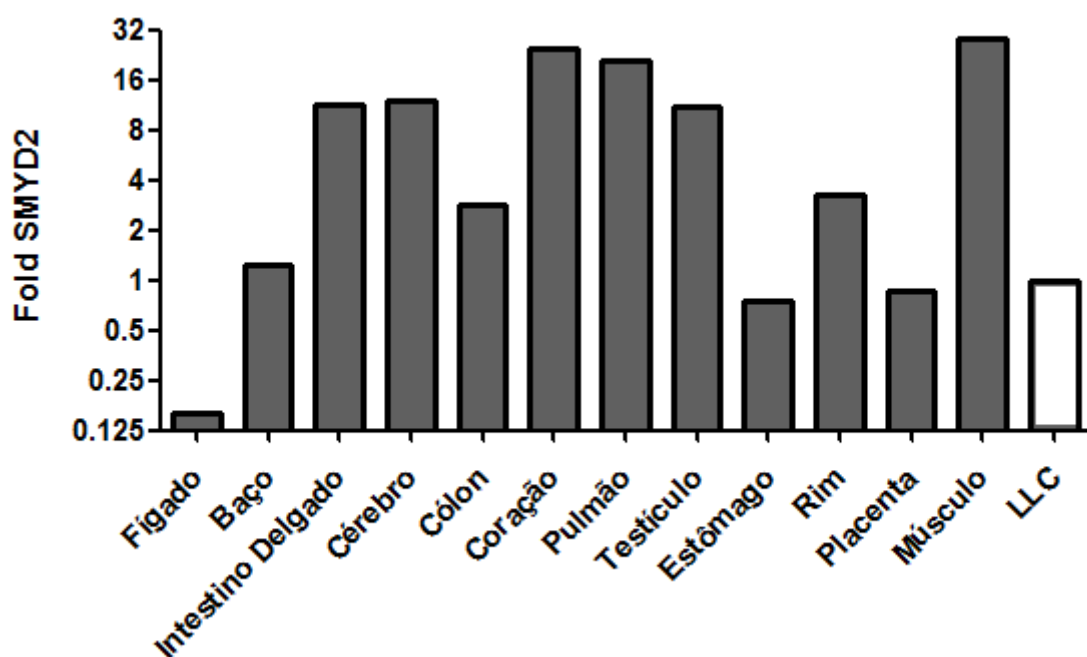


Figura 3: Expressão gênica de SMYD2 por PCR em tempo real em tecidos saudáveis (barras em cinza) e em *pool* de amostras de LLC (barra branca). Os valores relativos em *fold* foram obtidos pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando ΔCt do *pool* de LLC como referência.

Com relação a expressão de SMYD3, encontramos expressão similar entre as amostras de fígado, baço, estômago e o *pool* de LLC. A expressão mais baixa em relação a LLC foi encontrada na amostra de placenta, enquanto que no pulmão a expressão do gene foi 32 vezes superior ao encontrado no *pool* de LLC (Figura 4).

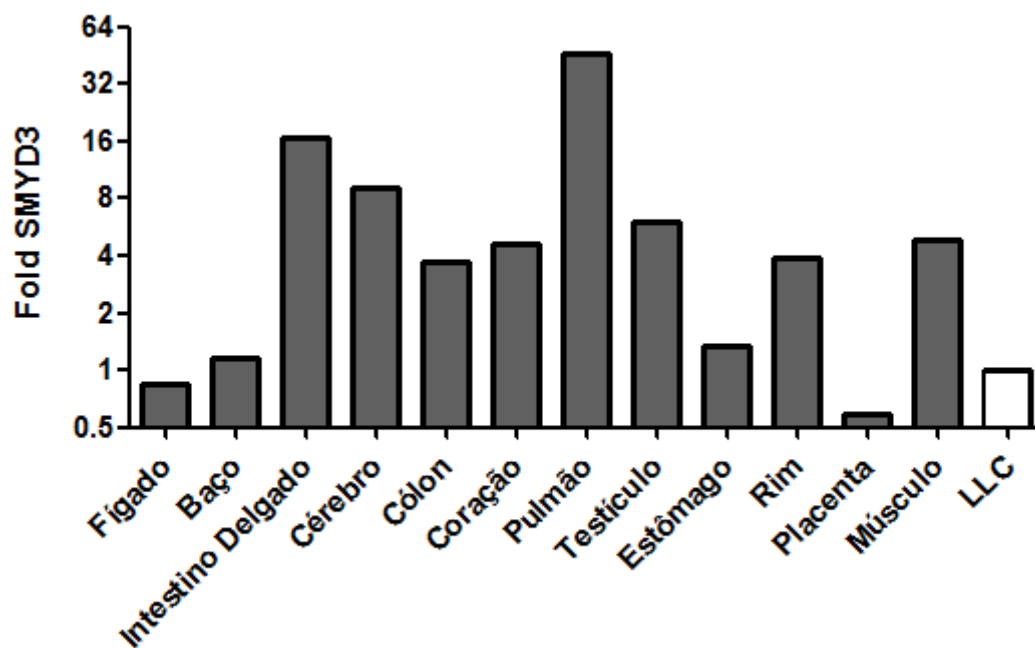


Figura 4: Expressão gênica de SMYD3 por PCR em tempo real em tecidos saudáveis (barras em cinza) e em *pool* de amostras de LLC (barra branca). Os valores relativos em *fold* foram obtidos pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando ΔCt do *pool* de LLC como referência.

A expressão de SMYD4 nas amostras dos tecidos saudáveis foi muito semelhante ao padrão encontrado na avaliação de SMYD3, sendo o fígado, baco e estômago tecidos com o nível de expressão similares ao encontrado no *pool* de LLC e a amostra placenta a de menor expressão do gene. Pulmão e intestino delgado foram os locais em que a expressão de SMYD4 se apresentou em maiores níveis (**Figura 5**).

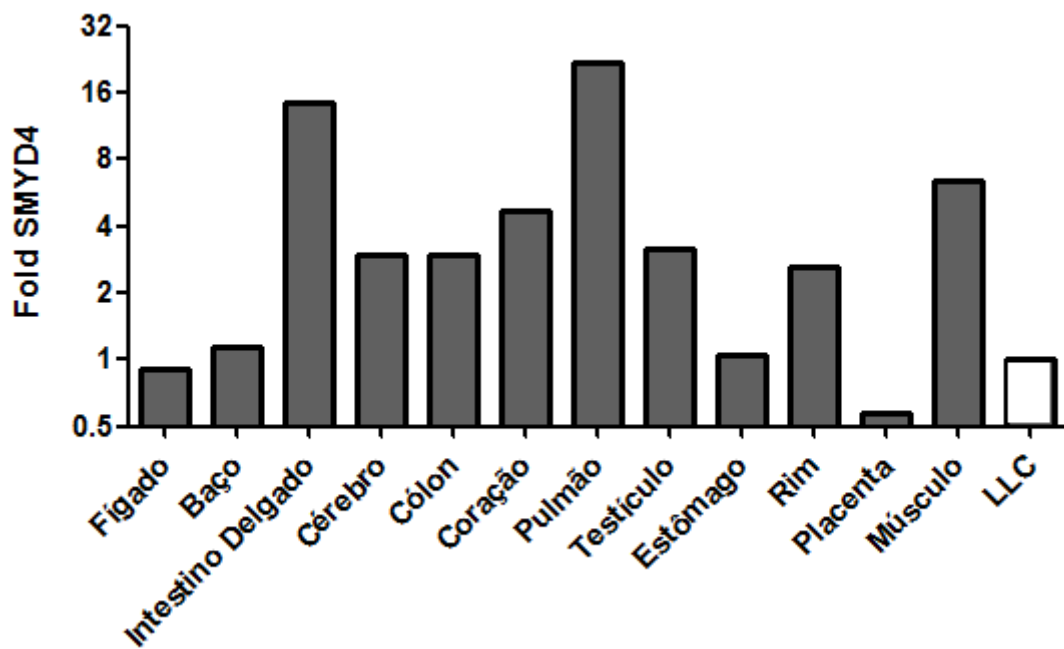


Figura 5: Expressão gênica de SMYD4 por PCR em tempo real em tecidos saudáveis (barras em cinza) e em *pool* de amostras de LLC (barra branca). Os valores relativos em *fold* foram obtidos pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando ΔCt do *pool* de LLC como referência.

Os níveis de expressão de SMYD5 no estômago ficaram próximo dos níveis de expressão encontrados na LLC. A amostra de baço foi a que apresentou menor expressão do gene, sendo que nas demais amostras a expressão de SMYD5 foi superior ao encontrado no *pool* de amostras de LLC (**Figura 6**).

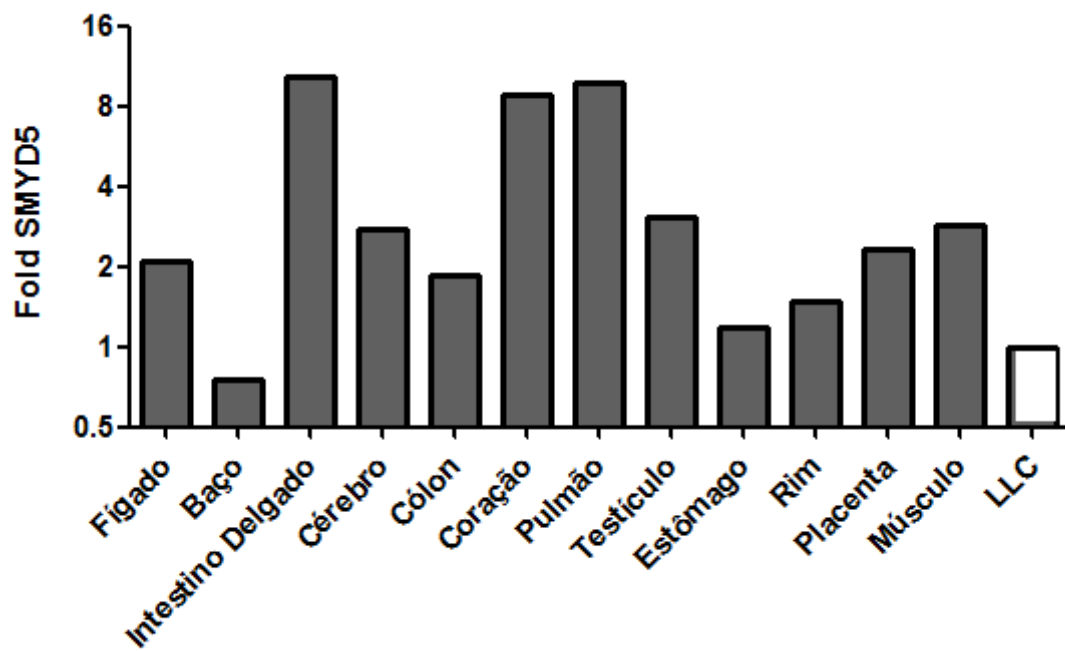


Figura 6: Expressão gênica de SMYD5 por PCR em tempo real em tecidos saudáveis (barras em cinza) e em *pool* de amostras de LLC (barra branca). Os valores relativos em *fold* foram obtidos pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando ΔCt do *pool* de LLC como referência.

4.2 Expressão dos genes da família SMYD em amostras de LLC e em células B obtidas de pacientes saudáveis.

Após avaliar o padrão de expressão dos genes da família SMYD nas amostras de tecidos saudáveis, investigamos a expressão dos genes SMYDs nas amostras de LLC e em células B obtidas de pacientes saudáveis.

A expressão do gene SMYD1 não foi detectada em nenhuma das amostras estudadas. As amostras de LLC apresentaram o nível de expressão do gene SMYD2 superior ao encontrado nas amostras controles ($p < 0,0001$) (**Figura 7**).

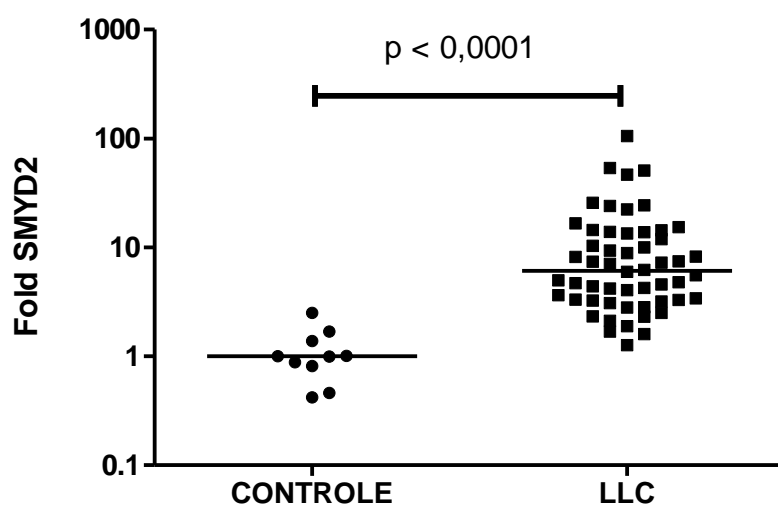


Figura 7: Comparação entre a expressão de SMYD2 em Linfócito B normais e na LLC por PCR em tempo real. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney. Os valores relativos em *fold* foram obtidos pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando a mediana do ΔCt das amostras controles como referência.

Apesar do padrão de expressão do gene SMYD3 ser heterogêneo entre as amostras de LLC, a expressão desse gene nessas amostras foi elevada, quando comparada aos níveis de expressão encontrados nas amostras controle ($p = 0,0017$) (Figura 8).

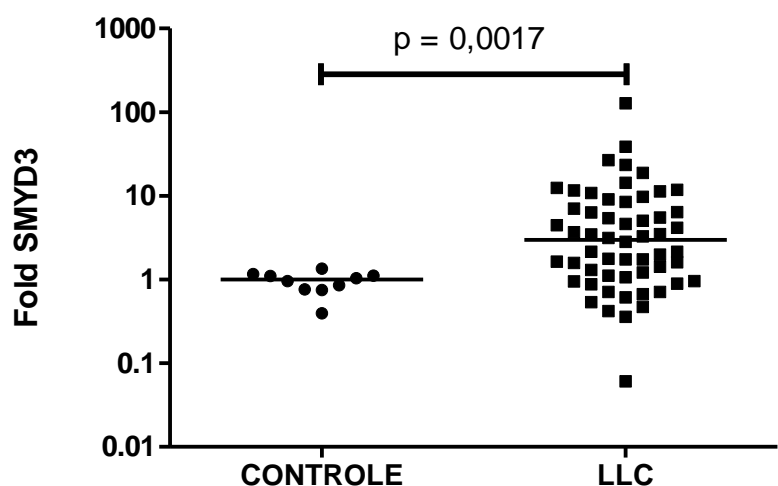


Figura 8: Comparação entre a expressão de SMYD3 em Linfócito B normais e na LLC por PCR em tempo real. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney. Os valores relativos em *fold* foram obtidos pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando a mediana do ΔCt das amostras controles como referência.

Assim, como foi verificado para os genes SMYD2 e SMYD3, a expressão de SMYD4 também se mostrou elevada nas amostras de LLC, quando comparadas as amostras controle ($p = 0,0001$) (**Figura 9**).

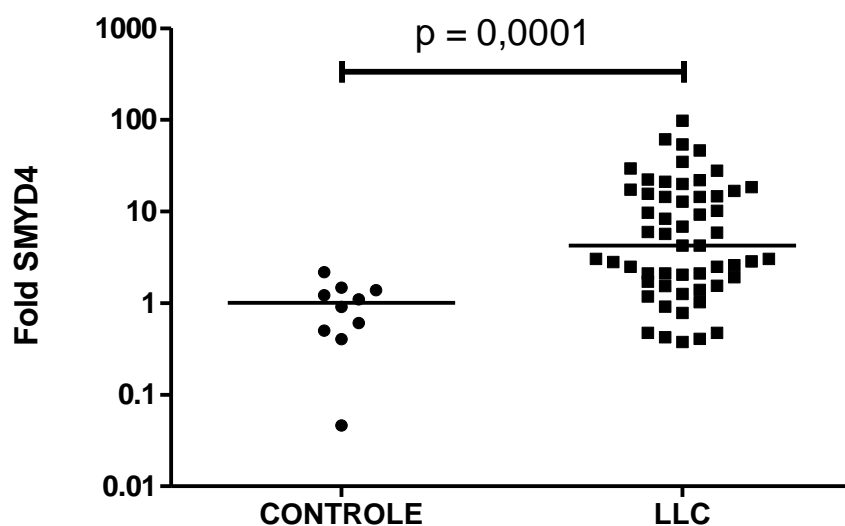


Figura 9: Comparação entre a expressão de SMYD4 em Linfócito B normais e na LLC por PCR em tempo real. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney. Os valores relativos em *fold* foram obtidos pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando a mediana do ΔCt das amostras controles como referência.

Por fim, as amostras de LLC apresentaram maior expressão do gene SMYD5 do que as amostras controle ($p < 0,0001$) (**Figura 10**).

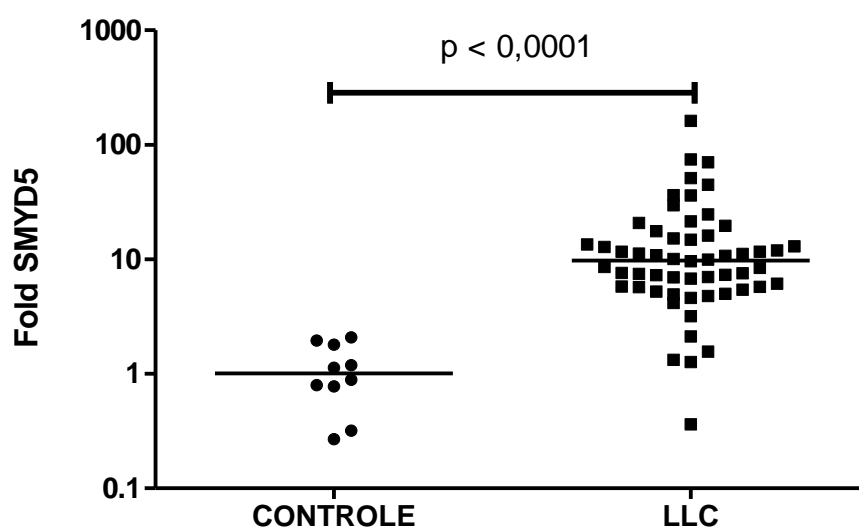


Figura 10: Comparação entre a expressão de SMYD5 em Linfócito B normais e na LLC por PCR em tempo real. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney. Os valores relativos em

fold foram obtidos pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando a mediana do ΔCt das amostras controles como referência.

4.3 Relação entre a expressão de SMYD e os dados laboratoriais dos pacientes com LLC.

Como encontramos um padrão heterogêneo na expressão dos genes investigados em nossos dados, dicotomizamos nossa amostragem em “BAIXA” e “ALTA” expressão de genes SMYD, utilizando a mediana de expressão encontrada nas amostras. A partir dessa classificação, investigamos se a expressão desses genes influenciava a leucometria, número de plaquetas, expressão da proteína ZAP70 e resultado citogenético desses pacientes.

Com relação ao padrão de expressão do gene SMYD2 nas amostras de LLC, os pacientes que apresentam baixa expressão desse gene tiveram maior número de leucócitos que os pacientes com elevada expressão de SMYD2 ($p = 0,0099$). Entretanto, a expressão do gene SMYD2 não influenciou o número de plaquetas ($p = 0,1552$), a expressão de ZAP70 ($p = 0,3301$) e nem o padrão citogenético ($p = 0,1817$) (Figura 11).

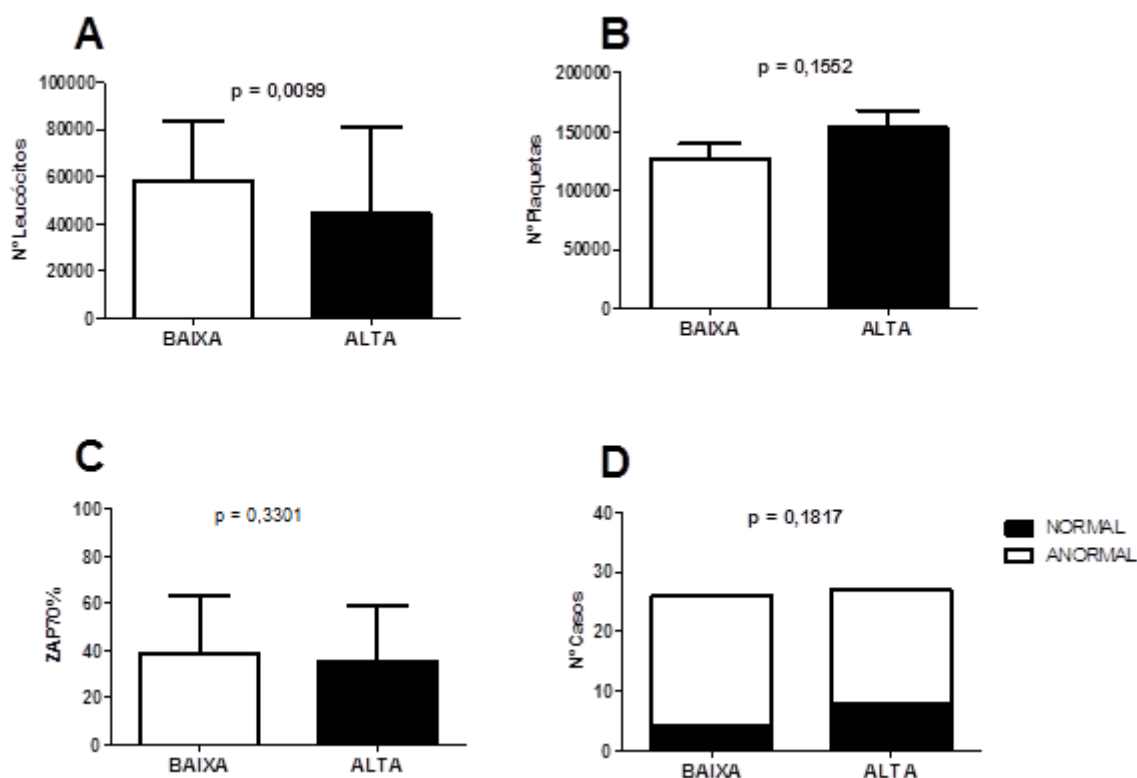


Figura 11: Influência da expressão do gene SMYD2 nos dados laboratoriais. SMYD2 foi associado ao número de leucócitos (A), número de plaquetas (B), expressão de ZAP70% (C), e as

anormalidades citogenéticas (D). As comparações entre a expressão do gene com o número de leucócitos, plaquetas e expressão do gene ZAP-70 foram realizadas pelo teste Mann-Whitney. A comparação com os dados citogenéticos foi realizada pelo teste exato de Fischer.

Os pacientes com BAIXA expressão de SMYD3 apresentaram maior leucometria ($p = 0,0082$). A expressão do gene SMYD3 não apresentou diferença estatística quando relacionada a contagem de plaquetas ($p = 0,2499$) e a expressão de ZAP70 ($p = 0,3357$). Além disso, pelo teste exato de Fischer evidenciamos que os pacientes que apresentam menor expressão de SMYD3 tendem a apresentar o cariótipo alterado ($p = 0,0322$ com RR = 0,3111 – 95% CI 0,09586 - 1,010) (**Figura 12**).

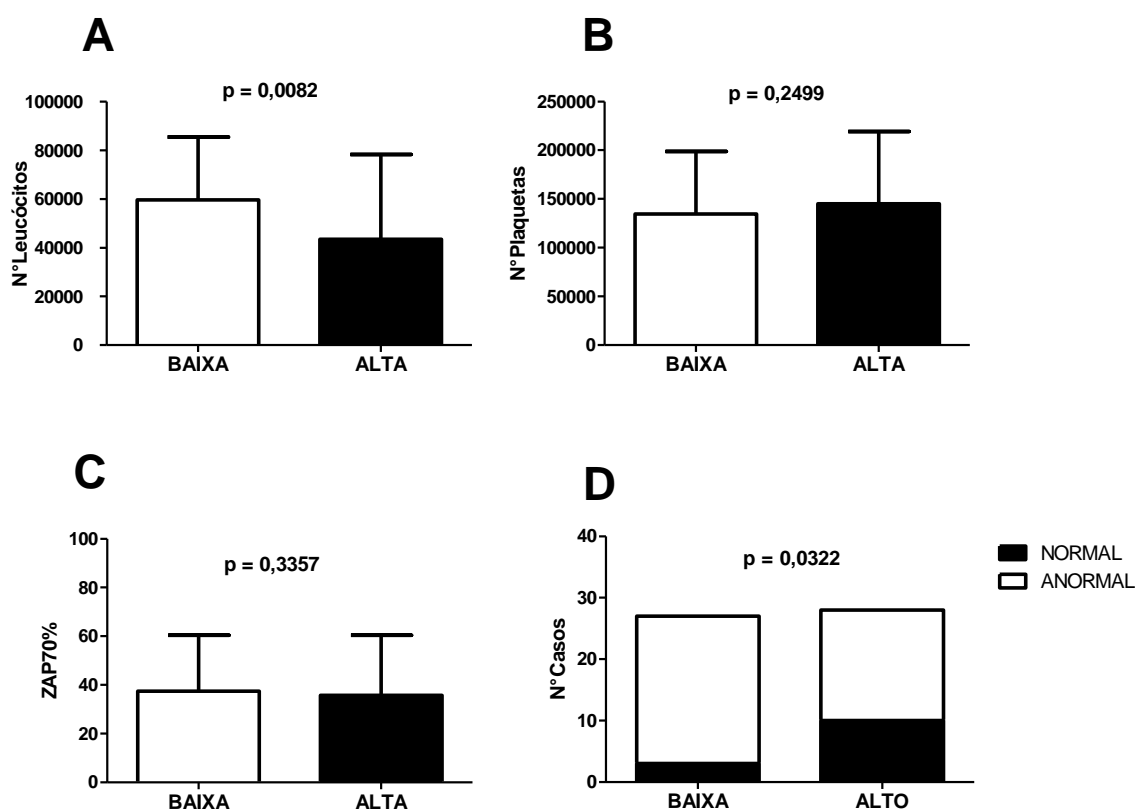


Figura 12: Influência da expressão do gene SMYD3 nos dados laboratoriais. SMYD3 foi associado ao número de leucócitos (A), número de plaquetas (B), expressão de ZAP70% (C), e as anormalidades citogenéticas (D). As comparações entre a expressão do gene com o número de leucócitos, plaquetas e expressão do gene ZAP-70 foram realizadas pelo teste Mann-Whitney. A comparação com os dados citogenéticos foi realizada pelo teste exato de Fischer.

Os pacientes com baixa expressão de SMYD4 apresentaram aumento no número de leucócitos ($p = 0,0073$). A expressão do gene SMYD4 não influenciou na

contagem de plaquetas ($p = 0,1284$) e na expressão de ZAP70 ($p = 0,4539$), entretanto, a baixa expressão desse gene influenciou na aquisição de anormalidades citogenéticas em paciente com LLC ($p = 0,0378$ com RR = 0,32 – 95% CI 0,09978 - 1,046) (**Figura 13**).

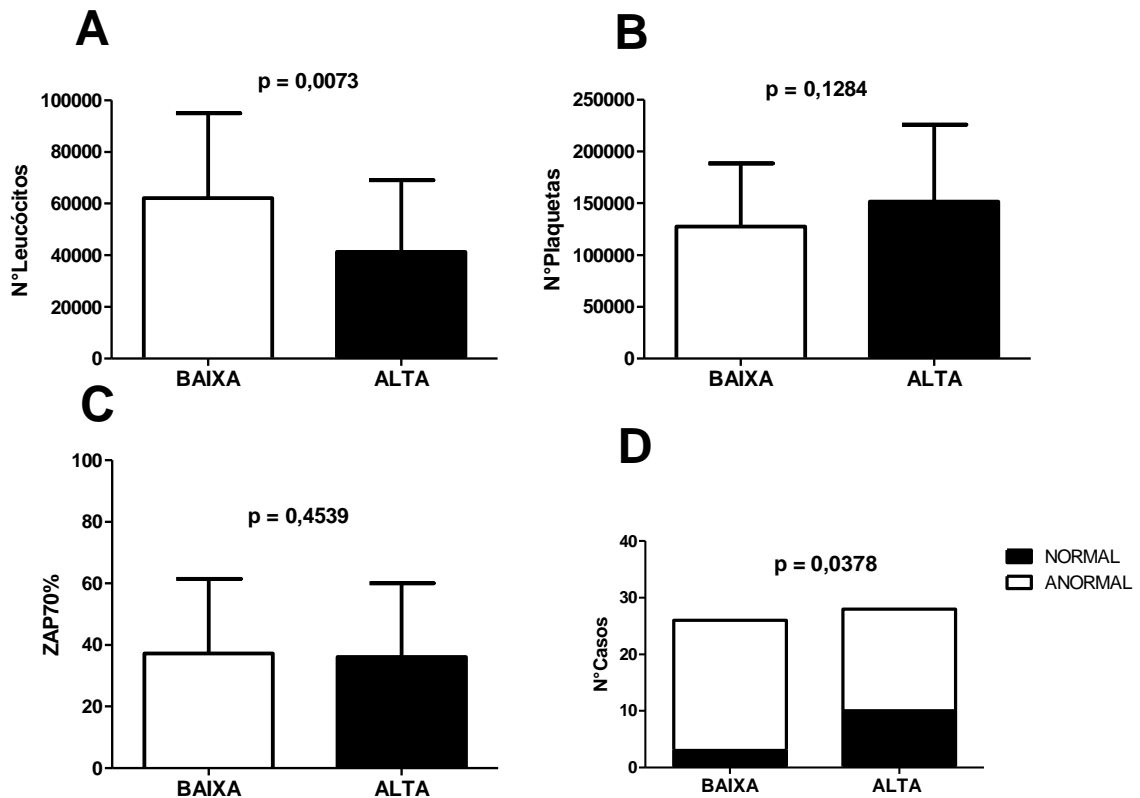


Figura 13: Influência da expressão do gene SMYD4 nos dados laboratoriais. SMYD4 foi associado ao número de leucócitos (A), número de plaquetas (B), expressão de ZAP70% (C), e as anormalidades citogenéticas (D). As comparações entre a expressão do gene com o número de leucócitos, plaquetas e expressão do gene ZAP-70 foram realizadas pelo teste Mann-Whitney. A comparação com os dados citogenéticos foi realizada pelo teste exato de Fischer.

O padrão de expressão do gene SMYD5 não influenciou o número de Leucócitos ($p = 0,1562$), o número de plaquetas ($p = 0,4101$), a expressão da proteína ZAP70 ($p = 0,5302$) e nem o cariótipo dos indivíduos com LLC ($p = 0,5302$ – RR = 0,88- 95% CI 0,3424 - 2,307) (**Figura 14**).

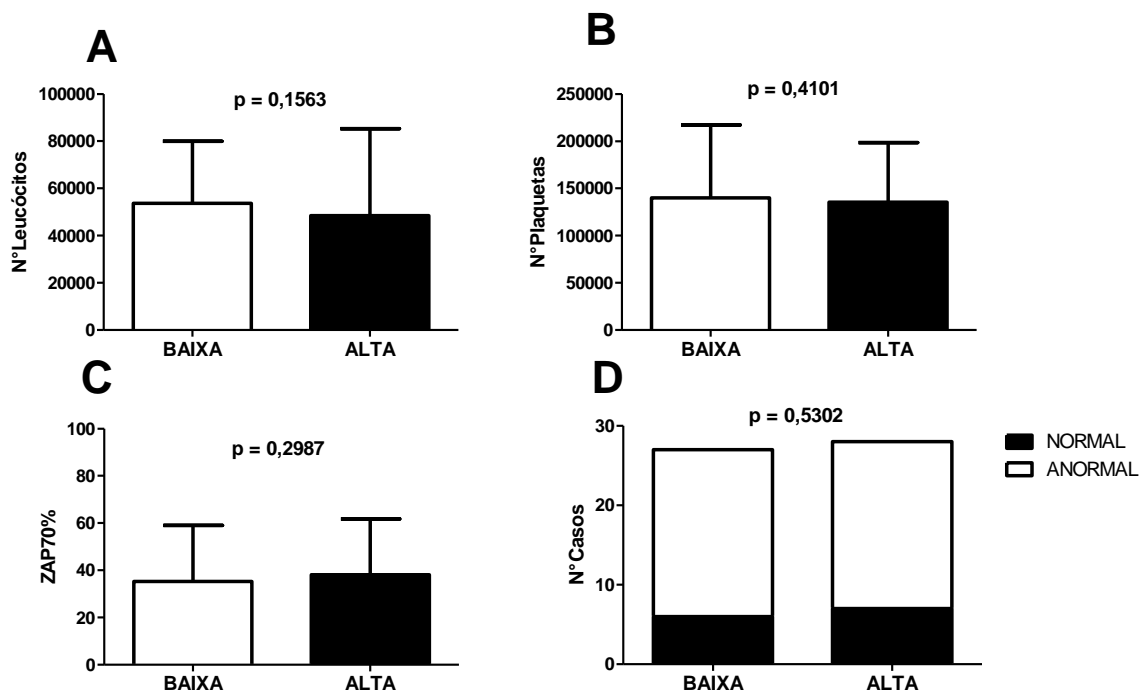


Figura 14: Influência da expressão do gene SMYD5 nos dados laboratoriais. SMYD5 foi associado ao número de leucócitos (A), número de plaquetas (B), expressão de ZAP70% (C), e as anormalidades citogenéticas (D). As comparações entre a expressão do gene com o número de leucócitos, plaquetas e expressão do gene ZAP-70 foram realizadas pelo teste Mann-Whitney. A comparação com os dados citogenéticos foi realizada pelo teste exato de Fischer.

4.4 Correlação entre a expressão dos genes SMYDs e o número de leucócitos.

Considerando que através do teste de Mann Whitney a expressão dos genes SMYD2, SMYD3 e SMYD4 influenciou na contagem de leucócitos, investigamos pelo teste de correlação de Spearman se haveria correlação entre esses parâmetros.

Evidenciamos uma correlação negativa na influência exercida pela expressão dos genes SMYDs sobre a contagem de leucócitos, sendo que a baixa expressão do gene se relaciona a alta contagem de número de leucócitos. Houve correlação entre SMYD2 e o número de leucócitos ($p = 0,0173$; $r = -0,2909$ [95% CI: $-0,5263 - -0,01409$]); assim como para SMYD3 ($p = 0,0105$; $r = -0,3105$ [95% CI: $-0,5378 - -0,04122$]); e SMYD4 ($p = 0,0282^*$; $r = -0,2612$ [95% CI: $-0,5005 - -0,01525$]). Não houve correlação entre a expressão do gene SMYD 5 e o número de leucócitos ($p = 0,0695$; $r = -0,2021$; [95% CI: $-0,4501 - -0,07484$]) (**Figura 15**).

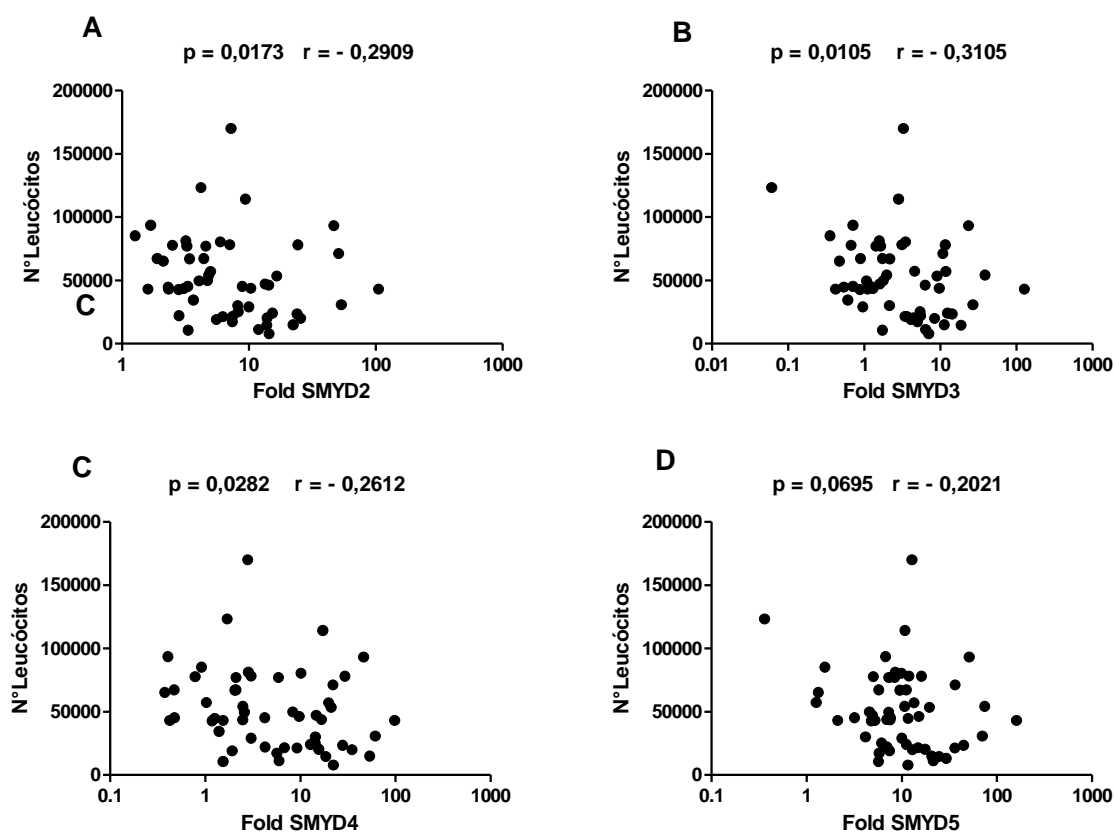


Figura 15: Correlações entre a expressão dos genes SMYDs e o número de leucócitos em pacientes com LLC. A) SMYD2; B) SMYD3; C) SMYD4; D) SMYD5. Análises realizadas pelo teste de Spearman, com intervalo de confiança 95%.

4.5 Estratificação do cariótipo a partir da expressão dos genes SMYDs em paciente com LLC.

Pelo teste exato de Fischer evidenciamos que os pacientes que apresentam menor expressão de SMYD3 e SMYD4 tendem a apresentar o cariótipo alterado. Assim, resolvemos estratificar o perfil citogenético dos pacientes com LLC, de acordo com a expressão dos genes da família SMYD. Inicialmente, estratificamos o resultado citogenético em “normal” e “anormal”. Em seguida, classificamos os cariótipos em “normal” com “uma ou duas alterações” e em “cariótipo complexo”.

Apesar do resultado não ser estatisticamente significativo, existe uma tendência da expressão do gene SMYD2 influenciar no resultado cariotípico ($p = 0,0684$). De fato, ao estratificar o cariótipo em “normal” com “uma ou duas

alterações” e em “cariótipo complexo”, observamos que a baixa expressão do gene SMYD2 influencia na aquisição do cariótipo complexo ($p = 0,0106$) (**Figura 16**).

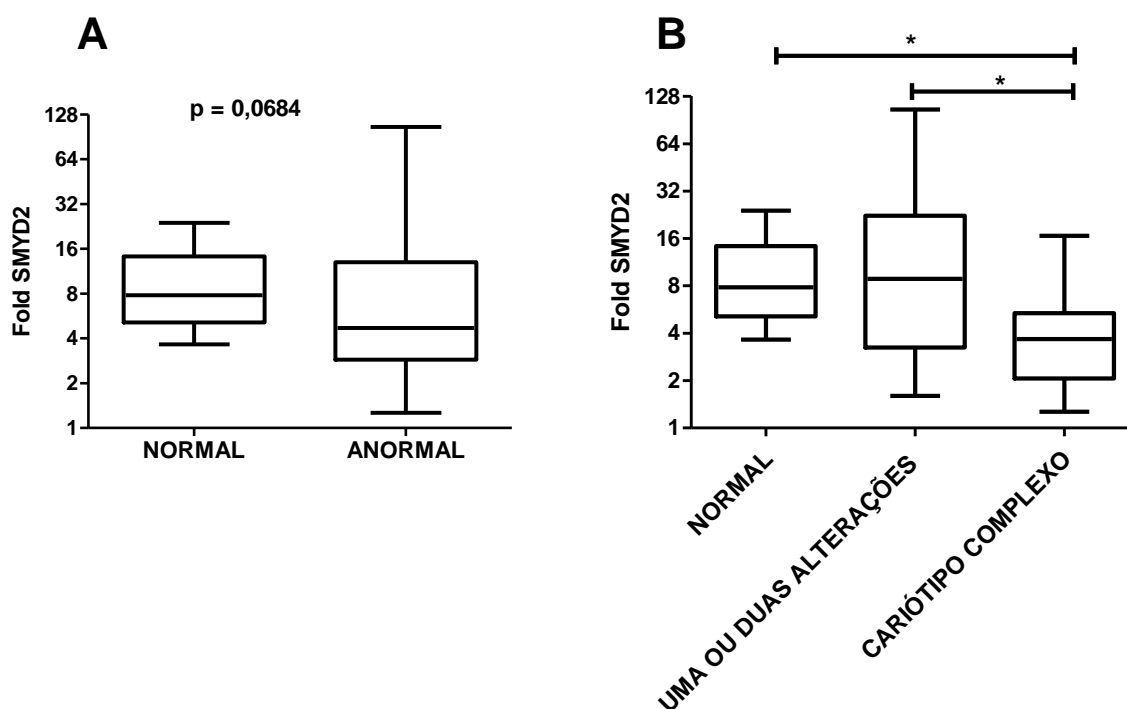


Figura 16: Relação entre a expressão do gene SMYD2 e cariótipo. A) comparação de expressão entre os de cariótipo normal e anormal B) comparação de expressão entre os de cariótipo normal, uma ou duas alterações e cariótipo complexo. Os dados foram analisados por Mann-Whitney e ANOVA com pós-teste Dunns.

A expressão do gene SMYD3 influenciou o resultado citogenético ($p = 0,0212$), especialmente, a evolução para um cariótipo complexo a partir de um cariótipo normal ou com uma ou duas alterações ($p = 0,0007$) (**Figura 17**).

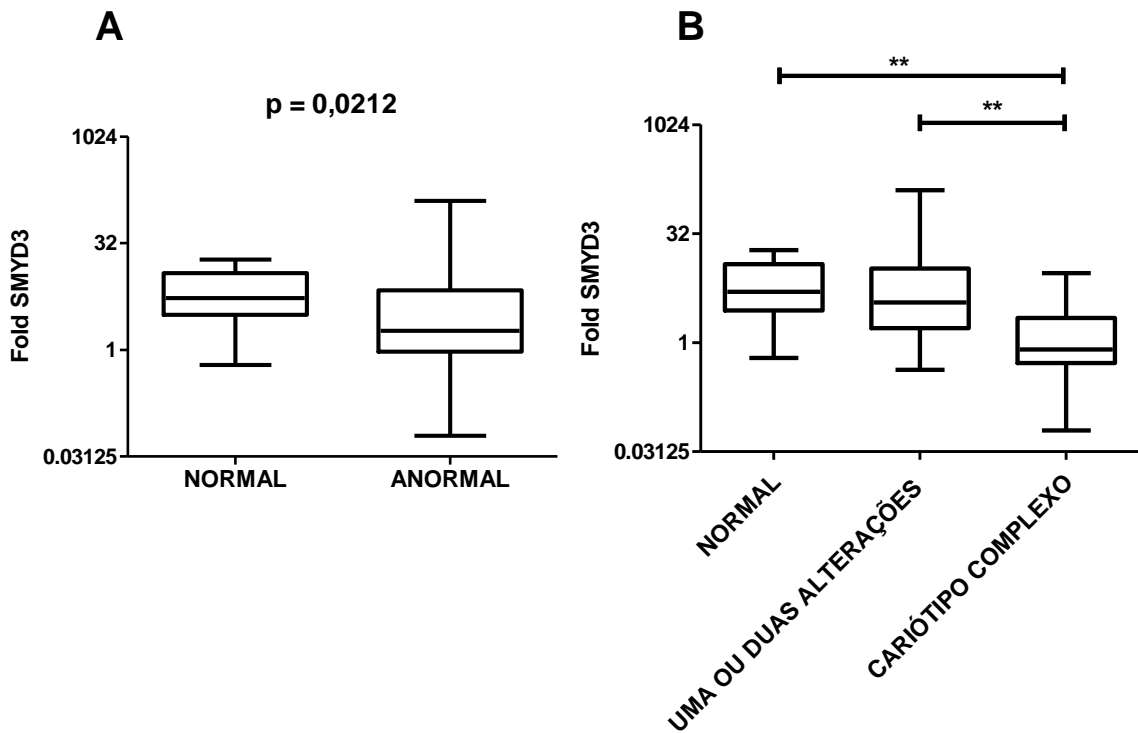


Figura 17: Relação entre a expressão do gene SMYD3 e cariótipo. A) comparação de expressão entre os de cariótipo normal e anormal B) comparação de expressão entre os de cariótipo normal, uma ou duas alterações e cariótipo complexo. Os dados foram analisados por Mann-Whitney e ANOVA com pós-teste Dunns.

A expressão de SMYD4 a primeira vista não influenciou o resultado citogenético ao se comparar cariótipos normais e alterados ($p = 0,1124$). Entretanto, ao se estratificar o resultado citogenético, se observa que a baixa expressão desse gene se associa ao desenvolvimento de cariótipo complexo ($p = 0,0198$) (**Figura 18**).

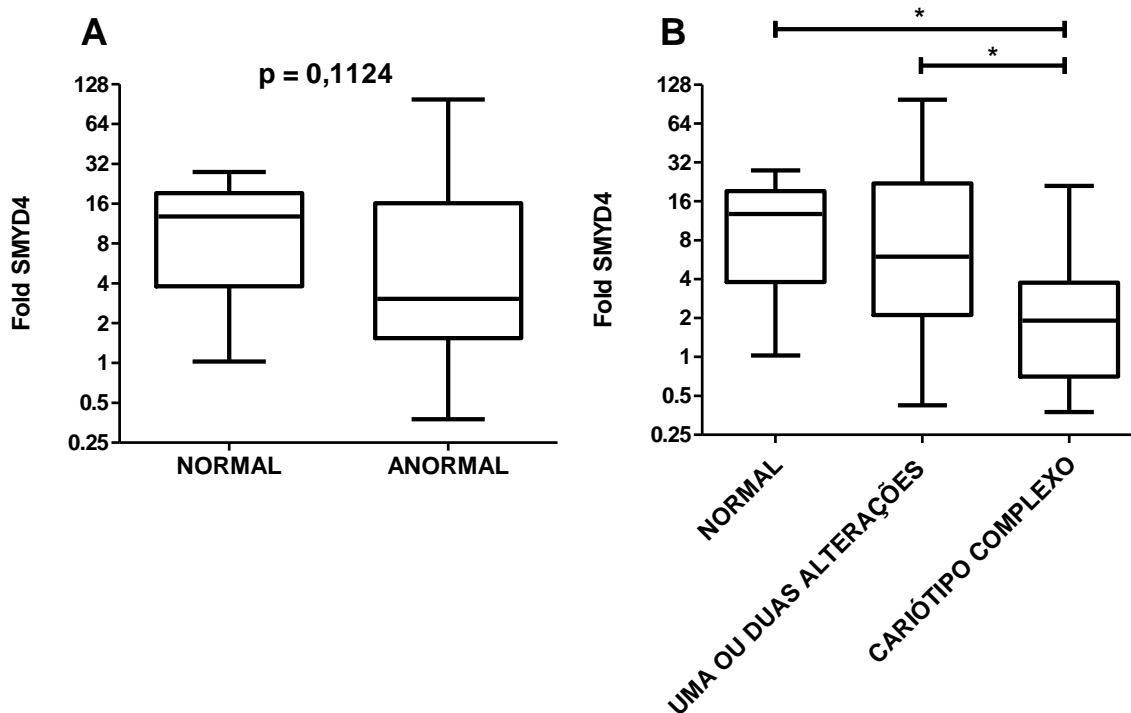


Figura 18: Relação entre a expressão do gene SMYD4 e cariótipo. A) comparação de expressão entre os de cariótipo normal e anormal B) comparação de expressão entre os de cariótipo normal, uma ou duas alterações e cariótipo complexo. Os dados foram analisados por Mann-Whitney e ANOVA com pós-teste Dunns.

A expressão do gene SMYD5 não influenciou no resultado cariotípico dos pacientes ($p = 0,4881$), nem mesmo ao se estratificar o resultado citogenético ($p = 0,1155$) (**Figura 19**).

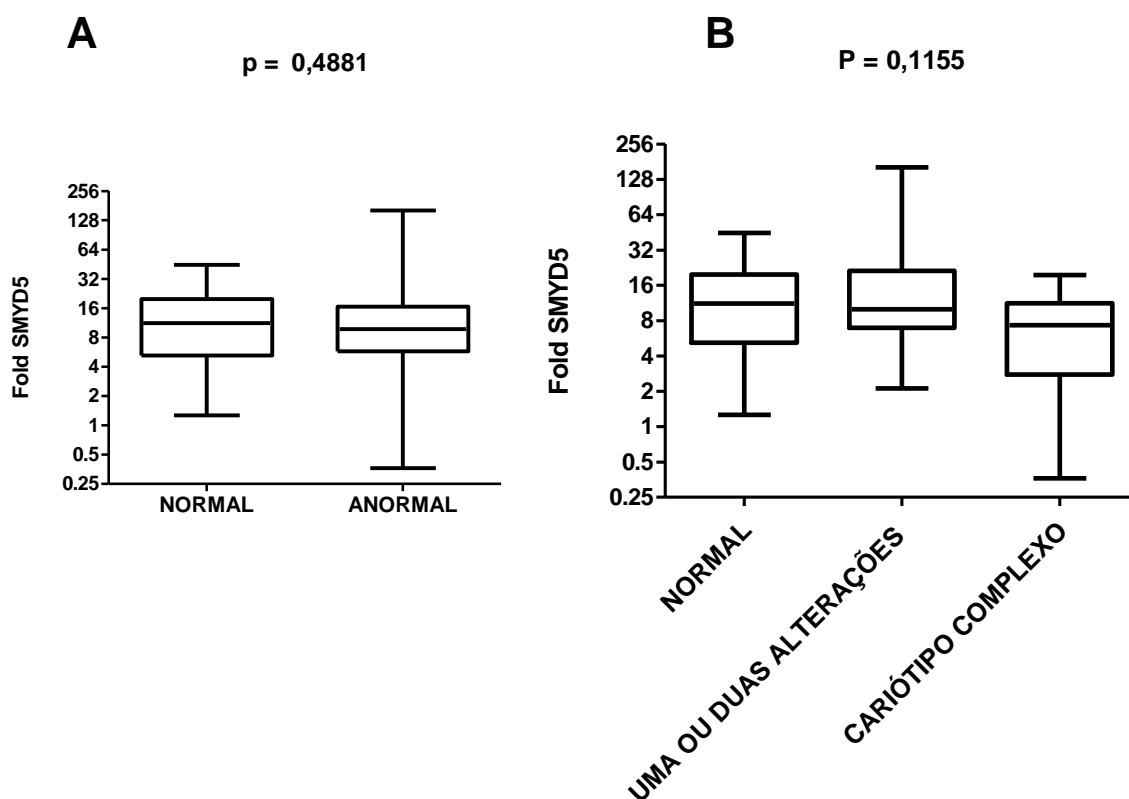


Figura 19: Relação entre a expressão do gene SMYD5 e cariótipo. A) comparação de expressão entre os de cariótipo normal e anormal B) comparação de expressão entre os de cariótipo normal, uma ou duas alterações e cariótipo complexo. Os dados foram analisados por Mann-Whitney e ANOVA com pós-teste Dunns.

4.6 Correlações entre a expressão dos genes SMYDs em amostras controle e em amostras de LLC.

Tendo em vista o padrão de relação encontrado entre a expressão dos genes SMYDs e o número de leucócitos, plaquetas, expressão de ZAP70 e alterações citogenéticas, investigamos pelo teste de Spearman se existe correlação entre as expressões dos genes SMYDs no grupo controle e na LLC. Esse tipo de investigação se torna importante, pois pode indicar a possibilidade de existir um fator de transcrição ou complexo transcricional comum regulando a expressão dos genes SMYDs.

As correlações entre a expressão dos genes SMYDs no grupo controle mostraram-se sem correlação entre SMYD2 e SMYD3; com forte correlação entre SMYD2 e SMYD4 ($p = 0,0015$; $r = 0,8303$); com correlação entre SMYD2 e SMYD5 ($p = 0,0030$; $r = 0,07339$); sem correlação entre SMYD3 e SMYD4; com correlação

entre SMYD3 e SMYD5 ($p = 0,0046$; $r = 0,7697$) e entre SMYD4 e SMYD5 ($p = 0,0408$; $r = 0,5758$) (**Figura20**).

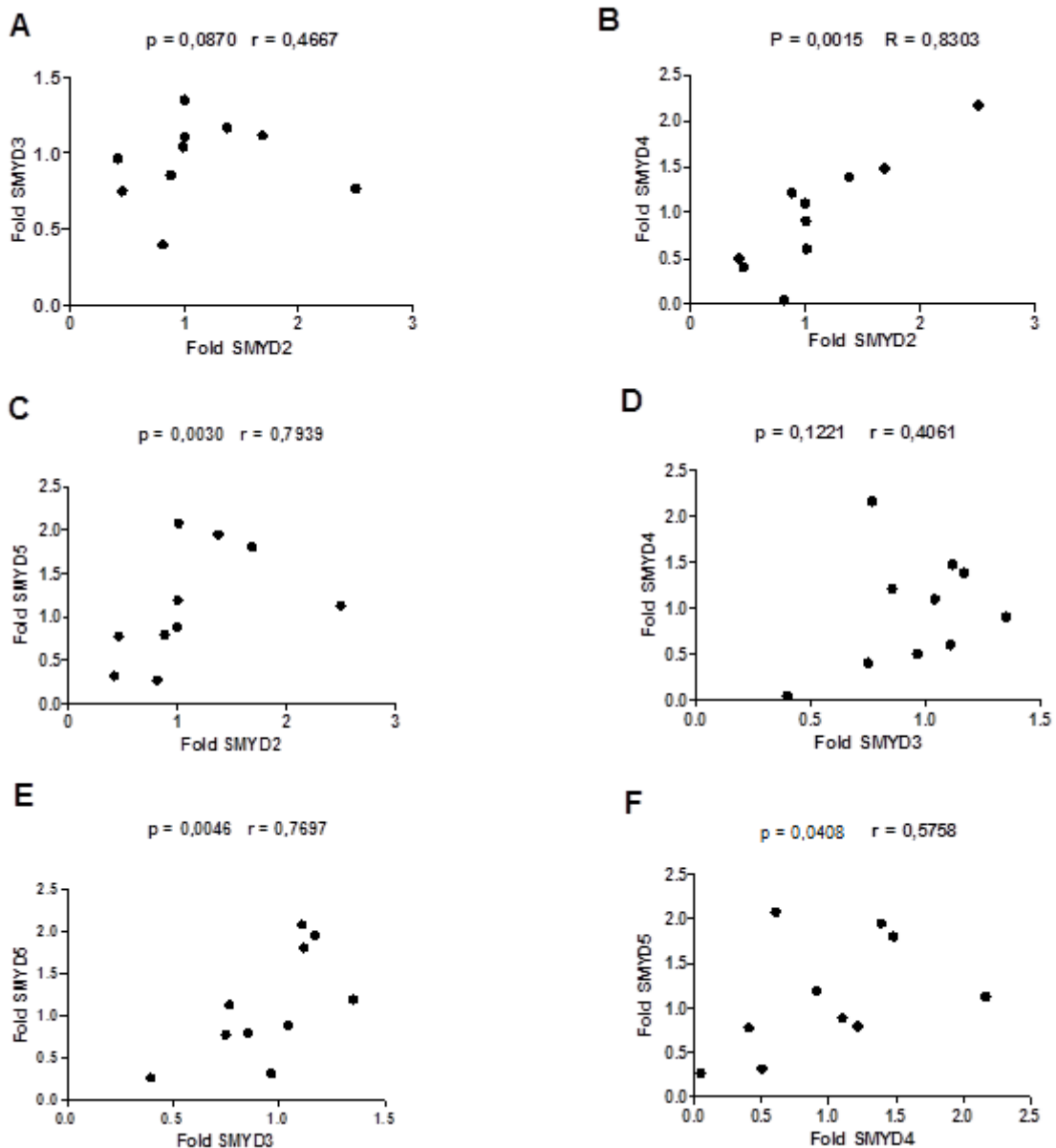


Figura 20: Correlação entre a expressão dos genes da família SMYD no grupo controle. A) Correlação entre a expressão dos genes SMYD2 e SMYD3; B) SMYD2 e SMYD4; C) SMYD2 e SMYD5; D) SMYD3 e SMYD4; E) SMYD3 e SMYD5; e F) SMYD4 e DMYD5. Análises realizadas pelo teste de Spearman, com intervalo de confiança 95%.

Nas amostras de LLC, existiu correlação significativa entre a expressão dos genes SMYD2 e SMYD3 ($p < 0,0001$; $r = 0,8331$ [95% CI: 0,7224 - 0,9021]); SMYD2 e SMYD4 ($p < 0,0001$; $r = 0,8967$ [95% CI: 0,8242 - 0,9403]); SMYD2 e SMYD5 ($p < 0,0001$; $r = 0,7078$ [95% CI: 0,5330 - 0,8246]); SMYD3 e SMYD4 ($p < 0,0001$; $r = 0,8409$ [95% CI: 0,7360 - 0,9064]); SMYD3 e SMYD5 ($p < 0,0001$; $r = 0,7363$

[95% CI: 0,5782 - 0,8411]); e SMYD4 e SMYD5 ($p < 0,0001$; $r = 0,7213$ [95% CI: 0,5546 - 0,8324]) (Figura 21).

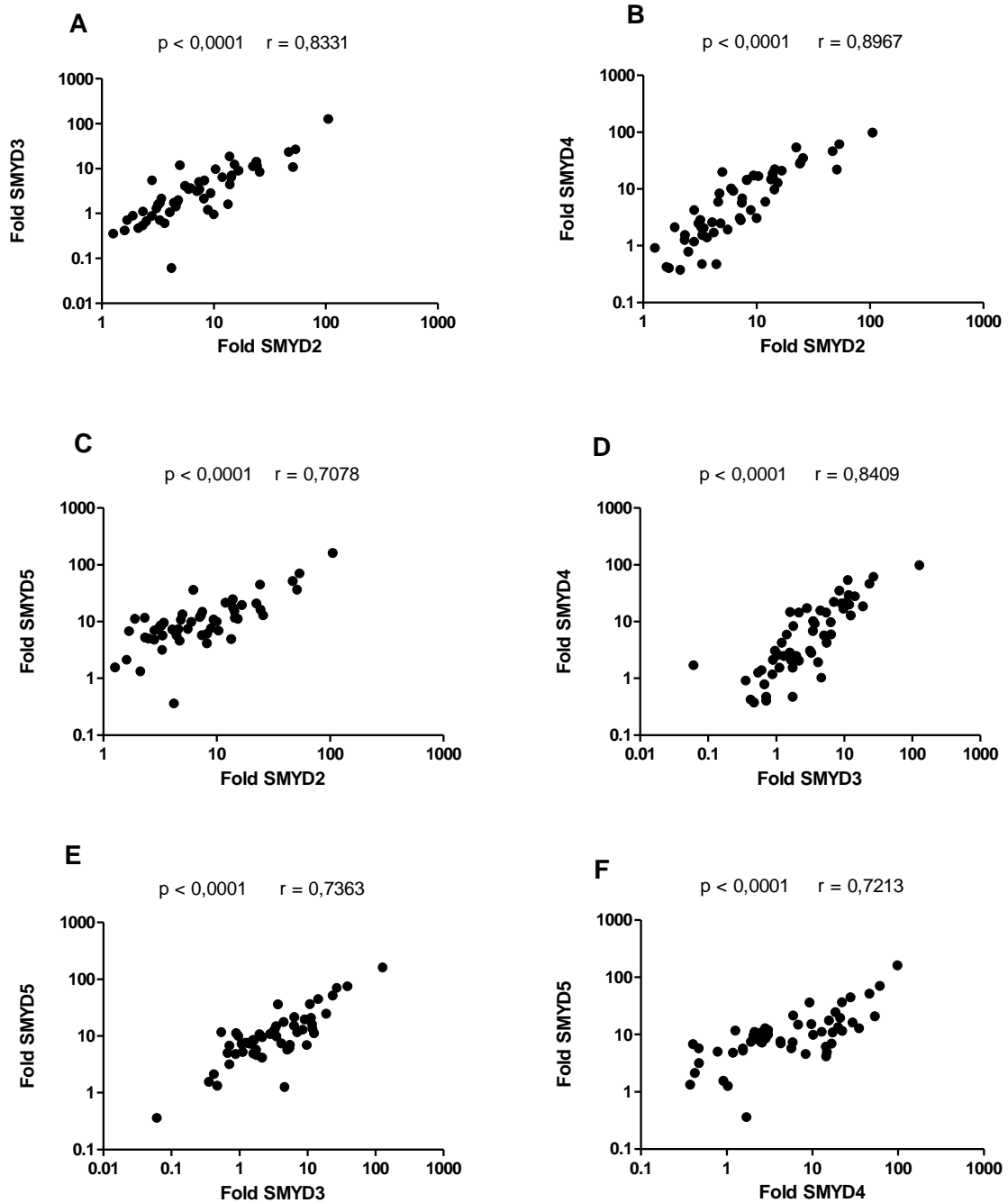


Figura 21: Correlação entre a expressão dos genes da família SMYD nas amostras com LLC. A) Correlação entre a expressão dos genes SMYD2 e SMYD3; B) SMYD2 e SMYD4; C) SMYD2 e SMYD5; D) SMYD3 e SMYD4; E) SMYD3 e SMYD5; e F) SMYD4 e SMYD5. Análises realizadas pelo teste de Spearman, com intervalo de confiança 95%.

Tendo em vista as correlações evidenciadas para as amostras de LLC, realizamos testes de regressão linear com vistas a fortalecer as associações previamente detectadas. Encontramos significância para todas as análises, como SMYD2 e SMYD3 ($r^2 = 0,7836$, $p < 0,0001$); SMYD2 e SMYD4 ($r^2 = 0,8363$, $p < 0,0001$); SMYD2 e SMYD5 ($r^2 = 0,8605$, $p < 0,0001$); SMYD3 e SMYD4 ($r^2 = 0,6912$, $p < 0,0001$); SMYD3 e SMYD5 ($r^2 = 0,8867$, $p < 0,0001$) e SMYD4 e SMYD5 ($r^2 = 0,7374$, $p < 0,0001$) (**Figura 22**).

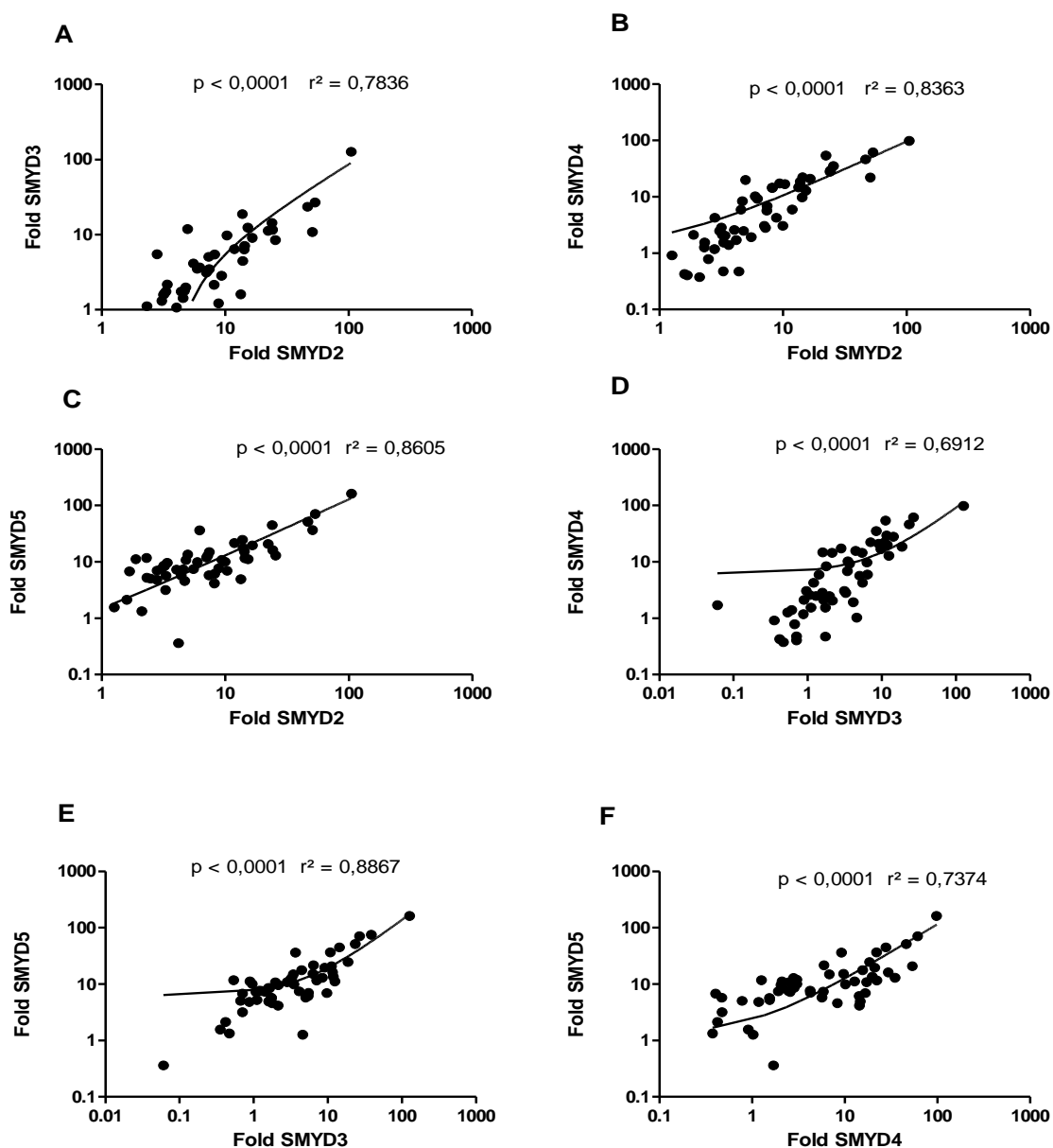


Figura 22: Regressão Linear das correlações entre a expressão dos genes da família SMYDs. A) SMYD2 e SMYD3 B) SMYD2 e SMYD4 C) SMYD2 e SMYD5 D) SMYD3 e SMYD4 E) SMYD3 e SMYD5 F) SMYD4 e SMYD5. Análise realizada com *Goodness of Fit* com intervalo de confiança 95%.

5. DISCUSSÃO

A descoberta das enzimas metiltransferases tem revelado um processo dinâmico de controle genético através da regulação da estrutura da cromatina. Essas modificações epigenéticas da cromatina têm importante papel na regulação da divisão, morte e diferenciação celular (Kawamura, S.; et al., 2008). A família de metiltransferases SMYD, por exemplo, tem sido relacionada a vários tipos de câncer (Hamamoto, R.; et al., 2004; Hamamoto, R.; et al., 2006). Nesse estudo demonstramos que pacientes com LLC apresentam elevada expressão das metiltransferases SMYD2, SMYD3, SMYD4 e SMYD5, sendo que os membros SMYD2, SMYD3 e SMYD4 influenciam a leucometria e a estabilidade cromossômica nesse câncer.

A enzima metiltransferase SMYD1 foi primeiramente descoberta em células T citotóxicas e células dos músculos esqueléticos e cardíacos adultos, sendo essencial para a morfogênese e diferenciação celular do coração durante desenvolvimento embrionário (Li, D.; et al., 2009; Gottlieb, P.D.; et al., 2002, Leinhart, K.; Brown, M., 2011). Esse membro da família SMYD desempenha papel essencial na montagem do filamento grosso da miosina em cardiomiócitos (Kawamura, S.; et al., 2008), contribuindo para a rápida contração do músculo esquelético (Just, S.; et al., 2011).

No nosso estudo, não encontramos expressão do gene SMYD1 nos tecidos avaliados, nem mesmo no muscular e cardíaco, o que diverge da literatura. Da mesma forma, não houve expressão de SMYD1 nas amostras dos pacientes com LLC e nas células B normais.

A metiltransferase SMYD2 é expressa em diversos tecidos normais e tumorais (Brown, M.A.; et al., 2006), sendo essa expressão muito elevada no coração (Leinhart K.; Brown, M., 2011). Nosso resultado corrobora com esses relatos; o gene SMYD2 se mostrou mais expresso nas amostras de tecidos normais de coração, pulmão e músculo.

Mais importante, no presente trabalho mostramos que o gene SMYD2 está altamente expresso na LLC, sendo que a expressão residual desse gene se relaciona à contagem elevada de leucócitos e às anormalidades citogenéticas, especialmente à aquisição de cariótipo complexo. É importante notar que o acúmulo de células na LLC é um indicador clássico de progressão desse câncer (Molica, S.;

Alberti, A., 1987; Hallek, M.; et al., 2008). Essa não é a primeira demonstração da influência de mecanismos epigenéticos no aumento do número de células em leucemias. Nós já havíamos demonstrado que a expressão elevada de EZH2 está associada ao aumento de células na LLC (Rabello, D.A.; et al., (2015). Além disso, a expressão de SMYD2 se correlaciona com a leucometria de pacientes com leucemia linfóide aguda (Sakamoto, L.H.; et al., 2014).

É interessante que SMYD2 atua como regulador transcricional em cooperação com Sin3A e HDAC1, podendo bloquear o processo de proliferação celular (Brown, M.A.; et al., 2006). Esse membro da família SMYD também está relacionada com a metilação de proteínas não-histonas, como p53 (Huang, J.; et al., 2006). Desse modo, SMYD2 exerce uma função oncogênica por eliminar um mecanismo de supressão tumoral (Leinhart, K.; Brown, M., 2011; Huang, J.; et al., 2006). Além disso, alguns estudos têm associado a perda de função de p53 à instabilidade genômica e à aquisição de tetraploidia e aneuploidia (Thompson, S.L.; Compton, D.A., 2010; Fujiwara, B.D. ; et al., 2005). Nessa linha, foi demonstrado que na LLC a presença de TP53 inativo está associada a aquisição de anormalidades citogenéticas (Dicker, F.; et al., 2009).

Além de ter p53 como alvo, SMYD2 regula a proteína supressora de tumor retinoblastoma (RB) (Saddic, L.A.; et al., 2010), podendo promover a progressão do ciclo celular através da dissociação de RB de E2F (Cho, H.S.; et al., 2012). Diversas proteínas são alvos de E2F, como, por exemplo, proteínas que podem causar instabilidade cromossômica, como ciclina E1 e ciclina E2. Quando esses fatores estão com expressão elevada podem ocasionar aneuploidia e poliploidia. Mad 2 e RubR1, componentes que atuam regulando os pontos de checagem do ciclo celular, também são alvos de E2F. A expressão elevada desses dois fatores leva a erros de segregação cromossômica (Coschi, C.H.; Dick, F.A., 2012). É interessante, pois recentemente foi demonstrado que a expressão elevada de E2F na LLC está relacionada à progressão desse câncer (Herishanu, Y.; et al., 2011; Tavolaro, S.; et al., 2015).

SMYD2 também metila PARP1, proteína envolvida no reparo do DNA, em modificações da cromatina, na regulação transcricional e na estabilidade gênica. Foi mostrado que essa atuação de SMYD2 tem ação oncogênica por aumentar a

atividade enzimática do PARP1, levando as células cancerosas a escapar do mecanismo de sinalização de apoptose (Piao, L.; et al., 2014).

A metiltransferase SMYD2 está altamente expressa na LLA e está relacionada a mau prognóstico (Sakamoto, L.H.; et al., 2014). Além de estar envolvida na LLA, SMYD2 é um marcador relevante na clínica diária do carcinoma de célula escamosa e do carcinoma de bexiga, também podendo ser utilizado para prever mau prognóstico dos pacientes (Kamatsu, S.; et al., 2014, Cho, H.S.; et al., 2012; Sakamoto, L.H.; et al., 2014).

A primeira metiltransferase da família SMYD a ter a atividade catalítica confirmada foi SMYD3. No nosso estudo, SMYD3 foi expresso em todos os tecidos, com expressão mais elevada em pulmão, intestino delgado e cérebro. Esse membro da família SMYD pode atuar como fator oncogênico por interagir com genes que estão envolvidos nos processos de proliferação e apoptose (Luo, X.G.; et al., 2009). Já foi demonstrado que SMYD3 atua promovendo a proliferação celular no câncer de mama, coloretal e hepatocelular (Hamamoto, R.; et al., 2004; Hamamoto, R.; et al., 2006). Nossos resultados mostram que o gene SMYD3 é mais expresso em células da LLC, comparado às células B dos pacientes controle. Além disso, a expressão residual de SMYD3 está associada ao acúmulo de células cancerosas e à aquisição de anormalidades citogenéticas complexas. Essa associação, assim como ocorreu com SMYD2, fornece indícios de que esses membros podem estar relacionados a progressão da LLC. É interessante destacar que SMYD3 ativa WNT10B, ocasionado ativação aberrante da via WNT/B-catenina, processo que frequentemente está associado ao câncer (Moon, R.T.; et al., 2004). Na LLC as proteínas WNT estão com expressão elevada e influenciam a sobrevivência celular e conseqüentemente o acúmulo de células neoplásicas (Gandhirajan, R.K.; et al., 2010).

Recentemente, foi demonstrado que SMYD3 é capaz de metilar MAP3K2, aumentando a sinalização da via MAP cinase e promovendo a formação de carcinomas por atuação de Ras (Mazur, P.K.; et al., 2014). As proteínas oncogênicas Ras estão envolvidas em uma grande variedade de cânceres, onde elas atuam promovendo proliferação e supressão de apoptose (Pylayeva-Gupta, Y.; Grabocka, E.; Bar-Sagi, D., 2011). Mais importante, foi demonstrado que Ras promove instabilidade genômica por induzir aurora cinase A — mecanismo que

induz aneuploidia e poliploidia (Yang, G. ; et al., 2013). Já foi demonstrado que aurora cinase A induz a formação de anormalidades citogenéticas desfavoráveis na leucemia mielóide aguda (Lucena-Araujo, A.R.; et al., 2011), entretanto, esse mecanismo ainda não foi investigado na LLC.

Assim como a elevada leucometria, a aquisição de anormalidades citogenéticas complexas também constitui um indicador de progressão da LLC, sendo que os pacientes que estão sob essa condição passaram recentemente a ser classificados no grupo de mau prognóstico da LLC (Dohner, H.; et al., 2000; Mayr, C.; et al., 2006). Ademais, é importante ressaltar que a aquisição de anormalidades adicionais na LLC não está relacionada ao tratamento (Mayr, C.; et al., 2006).

Os dados disponíveis na literatura quanto aos mecanismos biológicos promovidos por SMYD4 são extremamente escassos. Pelo menos no câncer de mama, esse membro da família SMYD parece atuar como um supressor de tumor (Hu, L.; et al., 2009). O gene SMYD4 é expresso em músculo, cérebro e tecidos sexuais específicos (Thompson, E.C.; Travers, A.A., 2008). Nossos resultados, em parte, corroboram com a literatura, mostrando que SMYD4 possui expressão elevada em tecido muscular.

As amostras de LLC apresentaram maior expressão de SMYD4, quando comparadas as células B controle. Além disso, a expressão residual de SMYD4, assim como ocorreu com SMYD2 e SMYD3, também está associada ao aumento de células malignas e à aquisição de cariótipo complexo. Tendo em vista o comportamento particular dessas metiltransferases em se associar à elevada leucometria e as alterações citogenéticas complexas, investigamos se havia correlação entre a expressão desses membros SMYD. Surpreendentemente, houve forte correlação entre a expressão desses membros SMYD, o que nos permite levantar a hipótese de haver um mecanismo transcricional comum regulando a sinalização dessas metiltransferases na LLC.

Assim como SMYD4, a metiltransferase SMYD5 é muito pouco investigada. Em nossas análises com tecidos normais, SMYD5 foi mais expresso em Intestino delgado, pulmão e coração. Além disso, esse membro da família SMYD foi mais expresso nas amostras de LLC que em células B normais, entretanto, não encontramos nenhuma associação entre essa expressão e os demais parâmetros laboratoriais que dispomos nesse estudo.

Por fim, os resultados obtidos nesse estudo contribuem fortemente com a área de investigação em que se inserem, mostrando claramente o envolvimento da família SMYD com o desenvolvimento da LLC, especialmente dos membros SMYD2, SMYD3 e SMYD4, cuja baixa expressão se relaciona a indicadores clássicos de progressão desse câncer. Além disso, a forte correlação entre a expressão desses genes indica a possibilidade de existir na LLC um mecanismo transcricional promovendo a sinalização desses membros. Esses achados servem de base para que novos estudos sejam conduzidos com vistas a investigar funcionalmente a atuação dos membros SMYD2, SMYD3 e SMYD4 sobre processos de proliferação, apoptose e estabilidade genômica. A elucidação desses mecanismos pode ser útil para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas com vistas a impedir a progressão da LLC.

6. CONCLUSÃO:

- O gene SMYD1 não se mostrou expresso nem em tecidos saudáveis, nem em amostras de LLC;

- O gene SMYD2 possui expressão em tecidos saudáveis, sendo mais elevado em coração, pulmão e músculo;

- Células B de indivíduos com LLC apresentam maior expressão do gene SMYD2 que os linfócitos B saudáveis, sendo que essa expressão exerce influência no número de leucócitos desses pacientes.

- Células B de pacientes com LLC apresentam maior expressão do gene SMYD3 que os linfócitos B saudáveis, sendo que essa expressão exerce influência no número de leucócitos e na aquisição de anormalidades cariotípicas em pacientes com LLC;

- Células B de pacientes com LLC apresentam maior expressão do gene SMYD4 que os linfócitos B saudáveis, sendo que essa expressão exerce influência no número de leucócitos e na aquisição de anormalidades cariotípicas em pacientes com LLC;

- Células B de pacientes com LLC apresentam maior expressão do gene SMYD5 que os linfócitos B saudáveis, mas essa expressão não influencia o número de leucócitos, plaquetas, expressão de ZAP e o resultado cariotípico dos pacientes com LLC;

- Nas amostras controles, a expressão de gene SMYD2 se correlacionou com a expressão do gene SMYD4 e SMYD5; assim como houve correlação entre SMYD3 e SMYD5, e SMYD4 e SMYD5;

- Nas amostras de LLC, existiu correlação entre todos os genes da família SMYD, com exceção do SMYD1, que não apresentou expressão. A expressão do gene SMYD2 mostrou correlação com SMYD3, SMYD4 e SMYD5; A expressão do gene SMYD3 mostrou correlação com SMYD4 e SMYD5 e, por fim, a expressão do gene SMYD4 se correlacionou com a expressão do gene SMYD5.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- BINET, J.L.; et al., (1981). "A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis". Cancer **48**(1):198-206.
- BROWN, M.A.; et al., (2006). "Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex". Molecular Cancer **5**:26.
- BUTLER, T.; GRIBBEN, G.; (2010). "Biologic and Clinical significance of molecular profiling in Chronic Lymphocytic Leukemia". Blood **24**(3):135-141.
- CHABOT-RICHARDS, D.S.; GEORGE, T.I., (2014). "Leukocytosis". International Journal of Laboratory Hematology **36**:279-288.
- CHO, H.S.; et al. (2012). "RB1 methylation by SMYD2 enhances cell cycle progression through an increase of RB1 phosphorylation" Neoplasia **14**(6):476-486.
- COSCHI, C.H.; DICK, F.A., (2012). "Chromosome instability and deregulated proliferation: an unavoidable duo". Cell Mol. Life Sci **69**(12):2009-2024.
- CRESPO, M.; et al., (2003). "ZAP70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia". The New England Journal of Medicine **348**:1764-1775.
- DICKER, F.; et al., (2009). "The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype". Leukemia **23**(1):117-124.
- DIEHL, L.F.; KETCHUM, L.H., (1998). "Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia". Semin Oncol **25**(1):80-97.
- DIGHIERO, G.; HAMBLIN, T.J., (2008). "Chronic Lymphocytic Leukaemia". THE LANCET **371**:1017-1029.
- DOHNER, H.; et al., (2000). "Genomic aberrations and survival in Chronic Lymphocytic Leukemia". The New England journal of Medicine **343**(26):1910-1916.
- FOÀ, R.; et al., (2013). "Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leucemia". Haematologica **98**(5):675-685.
- FOREMAN, K.W.; et al., (2011). "Structural and Functional Profiling of the Human Histone Methyltransferase SMYD3". PLoS ONE **6**(7):e22290.
- FUJIWARA, B.D. ; et al., (2005). "Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells". Nature **437**(7061):1043-2057.
- GANDHIRAJAN, R.K.; et al., (2010). "Wnt/ β -catenin/LEF-1 signaling in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a target for current and potential therapeutic options". Curr. Cancer Drug Targets **10**(7):716-726.

GOTTLIEB, P.D. ; et al., (2002). "Bop encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis". nature genetics **31**:25-32.

GRIBBEN, J.G., (2008). "Molecular Profiling in CLL". American Society of Hematology **1**:444-449.

HALLEK, M.; et al., (2008). "Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the Internagional Workshop on Chronic lymphocytic Leucemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines". Blood **111**(12):5446-5456.

HALLEK, M., (2013). "Chronic lymphocytic Leukemia: 2013 up date on diagnosis, risk stratification and treatment". Am.J. Hematol. **88**(9):803-16.

HAMAMOTO, R.; et al., (2004). "SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells". Nat.Cell Bio, **6**:731-740.

HAMAMOTO, R.; et al., (2006). "Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells". Cancer Sci **97**(2):113-118.

HERISHANU, Y.; et al., (2011). "The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia". Blood **117**(2):563-574.

HU, L.; et al., (2009). "Identification of Smyd4 as a Potential Tumor Suppressor Gene Involved in Brest Cancer Development". Cancer Research **69**(9):4067-4072.

HUANG. J.; et al., (2006). "Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation". Nature **444**:629-692.

INCA - Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2014/2015: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014. www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf

JONES, R.S.; GELBART, W.M., (1990). "Genetic Analysis of the Enhancer of zeste Locus and Its Role in Gene Regulation in *Drosophila melanogaster*". Genetics **126**: 185-199.

JUST, S.; et al., (2011). "The myosin-interacting protein SMYD1 is essential for sarcomere organization". Journal of Cell Science **124**(18):3127-3136.

KAWAMURA, S.; et al., (2008). "*smyd1* and *smyd2* are expressed in muscle tissue in *Xenopus laevis*". Cytotechnology **57**:161-168.

KOMATSU, S.; et al., (2014). "Overexpression of SMYD2 contributes to malignant outcome in gastric cancer". Britisch Journal of Cancer **112**:357-364.

LEINHART, K.; BROWN, M., (2011). "SET/MYND Lysine Methyltransferases Regulate Gene Transcription and Protein activity". Genes **2**:210-218.

- LI, D.; et al., (2009). "SMYD1, the myogenic activator, is a direct target of serum response factor and myogenin". Nucleic Acids Research **37**(21):7059-7071.
- LI, G.; REINBERG, D., (2011). "Chromatin higher-order structures and gene regulation". Curr. Opin. Gent. Dev. **21**(2):175-186.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D., (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method". Methods **25**(4):402-408.
- LUCENA-ARAUJO, A.R.; et al., (2011). "High expression of AURKA and AURKB is associated with unfavorable cytogenetic abnormalities and high white blood cell count in patients with acute myeloid leukemia". Leukemia Res. **35**(2):260-264.
- LUO, X.G.; et al., (2009). "Effects of SMYD3 overexpression on transformation, serum dependence, and apoptosis sensitivity in NIH3T3 cells". IUBMB Life **61**(6):679-684.
- MAZUR, P.K.; et al., (2014). "SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer". NATURE **510**:283-287.
- MAYR, C.; et al., (2006). "Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia". Blood **107**(2):742-751.
- MAESHIMA, K.; et al., (2014). "Chromatin as dynamic 10-nm fibers". Chromossoma **123**(3):225-237.
- MOLICA, S.; ALBERTI, A., (1987). "Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia". Cancer **60**(1):2712-2716.
- MOON, R.T.; et al., (2004). "WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies". Nature Rev. Genet. **5**(9):691-701.
- ORCHARD, J.A. ; et al., (2004). "ZAP-70 Expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia". THE LANCET **363**:105-111.
- PIAO, L.; et al., (2014). "The Histone Methyltransferase SMYD2 Methylates PARP1 and Promotes Poly(ADP-ribosyl)ation Activity in Cancer Cell". Neoplasia **16**(3):257-264.
- PFAFFI, M.W., (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR". Nucleic acids res. **29**(9):e45.
- PLASS, C.; et al., (2007). "Molecular profiling of Chronic lymphocytic Leukaemia: genetics meets epigenetics to identify predisposing genes". British Journal of Haematology **139**:744-752.
- PUIGGROS, A.; BLANCO, G.; ESPINET, B., (2014). "Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go". Biomed Res. Int. 2014;2014:435983. doi: 10.1155/2014/435983. Epub 2014 May 22.

PYIAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D., (2011). "RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web". Nat. Rev. Cancer **11**(11):761-774.

RABELLO, D.A.; et al., (2015). "Overexpression of EZH2 associates with a poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia". Blood Cells, Molecules and Diseases **54**(1):97-102.

RAI, K.R.; et al., (1975). "Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia". Blood **46**: 219-234.

RICHARDSON, S.J.. et al., (2006). "ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)". Blood **107**(9):3584-3592.

SADDIC, L.A.; et al., (2010). "Methylation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor by SMYD2". The Journal of Biological Chemistry **285**(48):37733-37740.

SAKAMOTO, L.H.T.; et al., (2014). "SMYD2 is highly expressed in pediatric acute lymphoblastic leukemia and constitutes a bad prognostic factor". Leukemia Research **38**:496-502.

SPADACCINI, R.; et al., (2006). "Structure and Functional analysis of the MYND domain". J.Mol. Biol. **358**:498-508.

TAVOLARO, S.; et al., (2015). "Increased chronic lymphocytic leukemia proliferation upon IgM stimulation is sustained by the upregulation of miR-132 and miR-212". Genes Chromosomes Cancer **54**(4):222-234.

THOMPSON, E.C.; TRAVERS, A.A., (2008). "A *Drosophila* Smyd4 homologue is a Muscle-Specific Transcriptional Modulator Involved in Development". PLoS ONE **3**(8):e3008.

THOMPSON, S.L.; COMPTON, D.A., (2010). "Proliferation of aneuploid human cells is limited by a p53-dependent mechanism". J. Cell Biol. **188**(3):369-381.

VISCO, C.; et al., (2008). "Impact of immune thrombocytopenia on the clinical course of chronic lymphocytic leukemia". Blood **111**(3):1110-1116.

WIESTNER, A., (2012). "Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia". Blood **120**(24):4684-4691.

WIERDA, W.G.; et al., (2007). "Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia". Blood **109**(11):4679-4685).

YANG, G.; et al., (2013). "RAS promotes tumorigenesis through genomic instability induced by imbalanced expression of Aurora-A and BRCA2 in midbody during cytokinesis". Int. J. Cancer **133**(2):275-285.

ZHANG, X.; WEN, H.; SHI, X., (2012). "Lysine methylation: beyond histones". Acta Biochim. Biophys Sin. **44**(1):14-27.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

| | |
|-------|---|
| S237a | <p>Santos, Wilson Oliveira Análise da Expressão Gênica da Família de Metiltransferases SMYD em pacientes com Leucemia Linfoide Crônica / Wilson Oliveira Santos; Orientador Felipe Saldanha de Araujo; Co-orientador Fábio Pittella da Silva. - - Brasília, 2015. 57 p.</p> <p>Dissertação (Mestrado – Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - - Universidade de Brasília, 2015.</p> <p>1. Leucemia Linfoide Crônica. 2. SMYD. 3. ZAP70. 4. Cariótipo. I. Araujo, Felipe Saldanha de , oriente. II. Silva, Fábio Pittella da, co-orient. III. Título.</p> |
|-------|---|