



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – FS**  
**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

**ANA PAULA DORNELES ALENCAR**

**PRIMING EPIGENÉTICO COM FOCO EM EHMT INDUZ HIPEREXPRESSÃO  
DE TP53 E TP73 E INDUZ APOPTOSE NA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA**

**BRASÍLIA**

**2019**

**ANA PAULA DORNELES ALENCAR**

**PRIMING EPIGENÉTICO COM FOCO EM EHMT INDUZ HIPEREXPRESSION  
DE TP53 E TP73 E INDUZ APOPTOSE NA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

Co-orientadora: M.<sup>a</sup>. Amandda Évelin Carvalho

**BRASÍLIA**

**2019**

**PRIMING EPIGENÉTICO COM FOCO EM EHMT INDUZ HIPEREXPRESSION  
DE TP53 E TP73 E INDUZ APOPTOSE NA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo**

Departamento de Farmácia - Universidade de Brasília- UnB

Orientador

---

**Amanda Évelin Silva de Carvalho**

PPG em Patologia Molecular - Universidade de Brasília- UnB

Co-orientadora

---

**Luma Dayane de Carvalho Filiú Braga**

PPG em Ciências Farmacêuticas - Universidade de Brasília- UnB

Examinadora

---

**Martha de Oliveira Bravo**

PPG em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília - UCB

Examinadora

## RESUMO

As histona-lisina N-metiltransferase 1 (EHMT1) e EHMT2 são duas enzimas metiltransferases que promovem a monometilação e dimetilação da lisina 9 da histona 3. Essas enzimas foram observadas hiperexpressas em diversos tipos de câncer e sua desregulação está associada ao desenvolvimento e progressão de diferentes tumores. Neste trabalho, investigamos o nível de expressão de EHMT1/EHMT2 na Leucemia Linfóide Aguda (LLA) e se a modulação dessas enzimas poderia ter algum impacto celular ou molecular na linhagem de LLA Jurkat. Para isso, usamos o inibidor seletivo para EHMT1/EHMT2, UNC0646, e investigamos seu efeito sobre a proliferação e viabilidade celular pelo ensaio de MTT. Além disso, a apoptose celular e as bases moleculares que poderiam estar envolvidas nos desfechos observados foram determinadas por citometria de fluxo (Anexina V/Iodeto de Propídeo) e PCR em tempo real, respectivamente. Nossa análise do banco de dados *Bloodspot* confirmou que tanto o EHMT1 quanto o EHMT2 apresentavam expressão elevada na LLA. Curiosamente, observamos também que a inibição dessas metiltransferases diminuiu significativamente a viabilidade celular da linhagem Jurkat de maneira dose dependente ( $p < 0,0001$ ). Conseqüentemente, a inibição de EHMT1/EHMT2 promoveu a apoptose das células leucêmicas, que foi acompanhada pelo aumento da expressão de P53 ( $p = 0,006$ ), TP73 ( $p < 0,0001$ ), BAX ( $p = 0,001$ ) e MDM4 ( $p = 0,01$ ). Em suma, esses resultados indicaram que a inibição de EHMT1/EHMT2 induz a expressão de genes pró apoptóticos na LLA, promovendo a morte celular. Mais importante, que a modulação dessas histonas metiltransferases pode representar um alvo epigenético promissor para o tratamento da LLA.

**Palavras-Chave:** Leucemia Linfóide Aguda, EHMT1, EHMT2, UNC0646, epigenética.

## ABSTRACT

Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1 (EHMT1) and EHMT2 are two methyltransferase enzymes that promote monomethylation and dimethylation of Histone 3 lysine 9. These enzymes are upregulated in several human cancers, and their deregulation is associated with tumor development and progression. In this work we investigated the expression level of EHMT1/EHMT2 in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and whether modulation of these enzymes could have any cellular or molecular impact on ALL cells. For this, we used UNC0646 inhibitor to target EHMT1/EHMT2 and investigated its effect on proliferation and cell viability of Jurkat cells by MTT assay. Cellular apoptosis was determined by Annexin V/PI staining using flow cytometry. The molecular bases that could be involved in the observed effects were investigated by RT-PCR. Our analysis from Bloodspot database confirmed that both EHMT1 and EHMT2 were overexpressed in ALL. Interestingly, we observed that the inhibition of EHMT1/EHMT2 significantly decreased Jurkat cell viability in a dose-dependent manner ( $p < 0,0001$ ). Accordingly, the inhibition of EHMT1/EHMT2 promoted Jurkat cells apoptosis, which was accompanied by increased expression of P53 ( $p = 0,006$ ), TP73 ( $p < 0,0001$ ), BAX ( $p = 0,001$ ), and MDM4 ( $p = 0,01$ ). Altogether, these results indicate that inhibition of EHMT1/EHMT2 induces pro-apoptotic gene expression in ALL and promotes cell death. More importantly, the modulation of these histone methyltransferases may be a promising epigenetic target for ALL treatment.

**Keywords:** Acute Lymphoblastic Leukemia, EHMT1, EHMT2, UNC0646, Epigenetics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alterações citogenéticas comuns na LLA .....	12
Figura 2 – Subtipos da LLA conforme classificação FAB .....	15
Figura 3 – Estrutura do nucleossomo.....	18
Figura 4 – Modificações de histonas .....	19
Figura 5 – Ação das histonas metiltransferases EHMT1 e EHMT2 sobre a histona 3 .....	20
Figura 6 – Expressão de EHMT1 e EHMT2 na LLA .....	27
Figura 7 – Inibição de EHMT1 e EHMT2 reduz a viabilidade celular na LLA .....	28
Figura 8 – Inibição de EHMT1 e EHMT2 aumenta a apoptose na LLA .....	30
Figura 9 – Inibição de EHMT1 e EHMT2 modifica o perfil transcricional da LLA .....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação morfológica (FAB) da Leucemia Linfóide Aguda .....	14
Tabela 2 – Perfil imunofenotípico das leucemias linfóides .....	15
Tabela 3 – Classificação citogenética da LLA .....	16
Tabela 4 – Sequência dos primers utilizados .....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$  = Microlitro

$\mu\text{M}$  = Micromolar

11q23 = Locus do gene MLL

BAX = do inglês "*BCL-2 associated protein X*"

BCL-2 = do inglês "*B-cell lymphoma 2*"

BCR-ABL = Produto da translocação do cromossomo 9 com o 22

BIX-01294 = Inibidor seletivo de EHMT1 e EHMT2

c $\mu$  = Cadeia  $\mu$  citoplasmática

CASP2 = Caspase 2

CD = do inglês "*Cluster of Differentiation*"

DMSO = Dimetil Sulfóxido

EGIL – do inglês "*European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*"

EHMT1 = do inglês "*Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 1*"

EHMT2 = do inglês "*Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 2*"

ETV6-RUNX1 = Produto da translocação do cromossomo 12 com o 21

FAB = Grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico

G9a = Metiltransferase de histona

GAPDH = Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GLP = do inglês "*G9a-like protein*"

HKMTs = Família da histona lisina metiltransferase

HLA-DR = do inglês "*Human Leukocyte antigen DR*"

IC = Concentração Inibitória

IP = Iodeto de Propídeo

IT = Intratecal



IV = Intravenoso

LLA = Leucemia Linfóide Aguda

LLA-B = Leucemia Linfóide aguda que acomete a linhagem de linfócitos B

LLA-T = Leucemia linfóide aguda que acomete a linhagem de linfócitos T

LMA = Leucemia Mieloide Aguda

LMC = Leucemia Mieloide Crônica

MDM4 = Gene que codifica a proteína MDM4

MILE = do inglês "*International Microarray Innovations in Leukemia*"

MLL = do inglês "*Mixed-Lineage Leukemia*"

MTT = 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

OMS = Organização Mundial da Saúde

P53 = Gene supressor de tumor

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase

q = Braço longo cromossômico

RPMI1640 = do inglês "*Roswell Park Memorial Institute*"

SFB = Soro Fetal Bovino

SmIg = Imunoglobulina de Superfície

t(1;19) = Translocação do cromossomo 1 com o 19

t(12;21) = Translocação do cromossomo 12 com o 21

t(9;22) = Translocação do cromossomo 9 com o 22

TCF3-PBX1 = Produto da translocação do cromossomo 1 com o 19

TdT = Terminal desoxinucleotidil transferase

TP73 = do inglês "*Tumor protein 73*"

UNC0646 = Inibidor químico seletivo de EHMT1 e EHMT2

VO = Via Oral

x g = Força G

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1 Fisiopatologia da Leucemia Linfoide Aguda .....	12
1.2 Diagnóstico e Classificação .....	13
1.3 Tratamento .....	17
1.4 Epigenética e câncer .....	18
2. OBJETIVOS .....	22
2.1 Objetivo Geral .....	22
2.2 Objetivos Específicos .....	22
3. METODOLOGIA .....	23
3.1 Análise <i>in silico</i> .....	23
3.2 Cultivo celular e inibição de EHMT1/2 .....	23
3.3 Ensaio de viabilidade/proliferação celular por MTT .....	23
3.4 Ensaio de apoptose por Anexina V e Iodeto de Propídeo .....	24
3.5 Extração de RNA e transcrição reversa .....	24
3.6 PCR em tempo real .....	25
3.7 Análise estatística .....	26
4. RESULTADOS .....	27
4.1 Expressão de EHMT1 e EHMT2 .....	27
4.2 Inibição de EHMT1/2 diminui a viabilidade na LLA .....	28
4.3 Inibição de EHMT1/2 induz apoptose na LLA .....	29

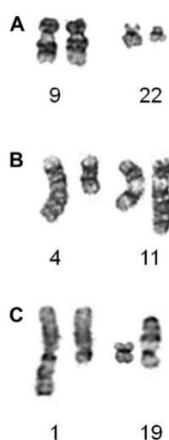
4.4 Inibição de EHMT1/2 aumenta a expressão de genes pro-apoptóticos .....	30
5. DISCUSSÃO .....	32
6. CONCLUSÃO .....	35
7. REFERÊNCIAS .....	36

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Fisiopatologia da Leucemia Linfoide Aguda

A Leucemia Linfoide Aguda (LLA) se caracteriza como uma desordem maligna resultante da proliferação clonal de precursores linfoides com maturação interrompida. É uma doença que está usualmente associada a rearranjos gênicos e mutações cromossômicas, que acomete principalmente crianças, sendo mais prevalente no sexo masculino do que no feminino (3:1) quando essa leucemia acomete a linhagem de linfócitos T (PUI; ROBISON; LOOK, 2008; BILGIR et al., 2013; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

As alterações cromossômicas mais frequentes na LLA são a hiperplóidia e translocações como t(12;21)(p13;q22) codificando ETV6–RUNX1, t(1;19)(q23;p13) codificando TCF3–PBX1, t(9;22)(q34;q11) codificando BCR–ABL e o rearranjo leucemia de linhagem mista, MLL, em 11q23 (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013) (Figura 1). Entretanto, algumas dessas alterações quando induzidas em modelos experimentais, não levam ao desenvolvimento da doença, o que sugere que provavelmente existam outros fatores associados ao desenvolvimento dessa patologia que ainda não foram descritos. Ademais, há uma parcela de pacientes portadores da LLA que apresentam cariótipo íntegro (ARROWSMITH et al., 2012; BERRY; JANKNECHT, 2013).



**Figura 1. Alterações citogenéticas comuns na LLA.** Cariótipos parciais de paciente com (A) t(9;22)(q34;q11) ou cromossomo Philadelphia, (B) t(4;11)(q21;q23) e (C) t(1;19)(q23;p13.3). (Adaptado de HARRISON, 2011).

Apesar da maioria dos casos de LLA serem resultantes do comprometimento da linhagem de linfócitos B (HARRISON, 2011; LITZOW, 2014), essa patologia também pode acometer linfócitos T imaturos, os quais podem se acumular na medula óssea, sangue periférico e alguns sítios extramedulares. O acometimento da linhagem de linfócitos B (LLA-B) é geralmente associado a um bom prognóstico e apresenta uma taxa de cura em crianças de aproximadamente 85%, enquanto em adultos a taxa de sobrevivência é menor que 50%. Já o comprometimento da linhagem T (LLA-T) acontece em aproximadamente 15% das crianças e 25% dos adultos com LLA e é normalmente considerada como doença agressiva de alto risco, evidenciando a importância de mais estudos sobre a LLA que acomete essa linhagem (FARIAS; CASTRO, 2004). Aproximadamente 90% das crianças com LLA alcançam remissão. No entanto, quando essa leucemia se desenvolve em adultos, o índice de cura é extremamente baixo (PUI; ROBISON; LOOK, 2008; MAVRAKIS et al., 2011; MALOUF; OTTERSBACH, 2018).

## **1.2 Diagnóstico e Classificação**

A maioria dos sintomas apresentados na LLA deriva da supressão da hematopoiese normal causada pela infiltração das células leucêmicas na medula óssea. Assim, os pacientes tendem a apresentar sintomas progressivos de palidez, fraqueza, cansaço e indisposição. Febre e sudorese noturna podem estar presentes, associados ou não a infecções, assim como hemorragias de pele e mucosas. Manifestações neurológicas como confusão mental, cefaleia e comprometimento de nervos cranianos podem ser resultantes de infiltrações blásticas no Sistema Nervoso Central (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

Apesar do hemograma e do mielograma serem importantes na fase da detecção laboratorial da LLA, a classificação da doença tem se baseado principalmente nas análises morfológica e citoquímica dos linfócitos neoplásicos e na análise imunofenotípica, metodologia que auxilia na detecção de subgrupos dificilmente classificáveis

morfologicamente sendo importante tanto na determinação do prognóstico, quando na definição terapêutica (FARIAS; CASTRO, 2004).

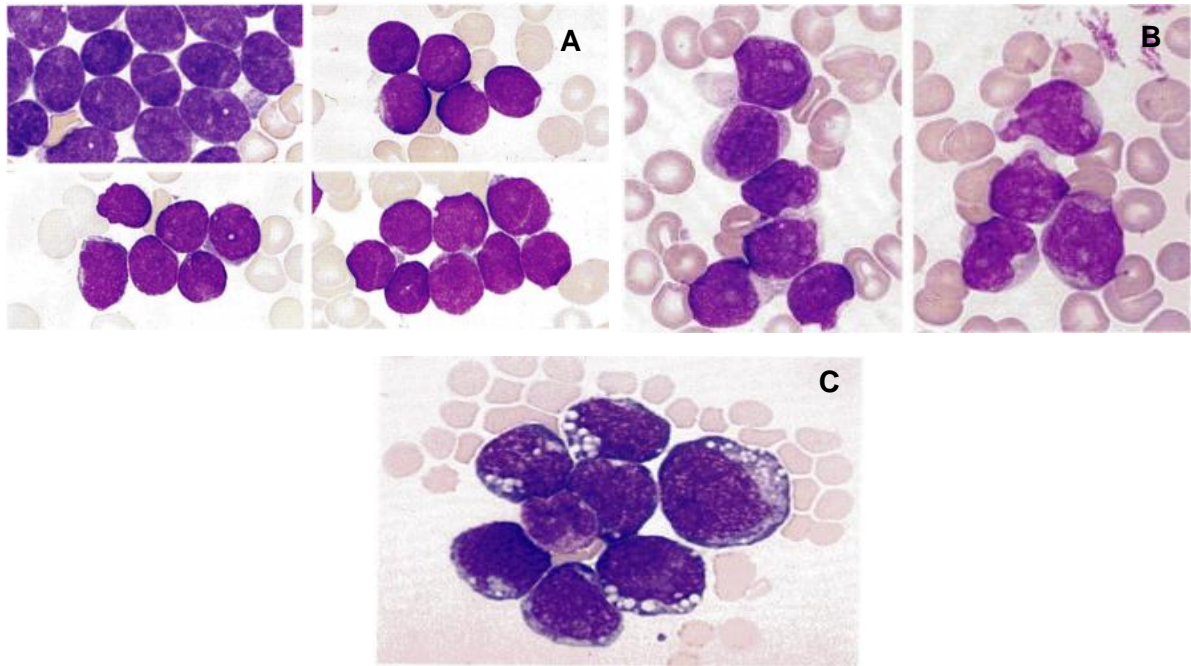
Inicialmente, a classificação morfológica da LLA foi estabelecida pelo grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB), no entanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS), com o intuito de aprimorar a reprodutibilidade, concordância inter-observador e a aplicação de protocolos terapêuticos, acabou aprimorando essa classificação (FARIAS; CASTRO, 2004; ARBER et al., 2016; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

O grupo FAB classificava a LLA em 3 grupos: L1, L2 e L3. Essa classificação se baseava em aspectos morfológicos (Figura 2), como diâmetro celular, na forma do núcleo, no número e na protuberância dos nucléolos e no tamanho e aspecto do citoplasma (Tabela 1). (FARIAS; CASTRO, 2004; NAOUM F.; NAOUM P, 2006).

**Tabela 1. Classificação morfológica (FAB) da Leucemia Linfóide Aguda.**

<b>Aspecto Morfológico</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>
<b>Diâmetro Celular</b>	Predominância de células pequenas, homogêneas	Grandes, heterogêneas	Grandes, homogêneas
<b>Cromatina Nuclear</b>	Fina ou aglomerada	Fina	Fina
<b>Forma do Núcleo</b>	Regular, pode apresentar fenda ou indentação	Irregular, podendo apresentar fenda ou indentação	Regular, redondo ou oval
<b>Nucléolos</b>	Indistintos ou não-visíveis	Um ou mais por célula, grandes, proeminentes	Um ou mais por célula, grandes, proeminentes
<b>Quantidade de Citoplasma</b>	Escassa;	Moderadamente abundante	Moderadamente abundante
<b>Basofilia Citoplasmática</b>	Ligeira	Ligeira	Evidente
<b>Vacúolos Citoplasmáticos</b>	Variáveis	Variáveis	Evidente

L1 = Leucemia Linfóide Aguda tipo L1; L2 = Leucemia Linfóide Aguda tipo L2; L3 = Leucemia Linfóide Aguda tipo L3; (Adaptado de FARIAS; CASTRO, 2004).



**Figura 2. Subtipos da LLA conforme classificação FAB.** L1 (A) representa células primitivas, imaturas, com citoplasma escasso, núcleo arredondado e geralmente apenas um nucléolo. L2 (B) é um grupo caracterizado por células primitivas imaturas que variam consideravelmente de tamanho e quantidade de citoplasma, apresentam usualmente núcleos variáveis quanto a forma e muitos nucléolos. Já L3 (C) é composta por células primitivas imaturas com citoplasma de coloração azul intensa, contendo numerosos vacúolos perinucleares pequenos. (Adaptado de FADEL, 2010).

A classificação da OMS por sua vez, leva em consideração tanto parâmetros imunofenotípicos propostos pelo Grupo Europeu para Classificação Imunofenotípica das Leucemias (EGIL), que divide a LLA em dois grandes grupos: na Leucemia de linhagem B e na Leucemia de linhagem T (Tabela 2), quanto aspectos citogenéticos (Tabela 3) (FARIAS; CASTRO, 2004; ARBER et al., 2016; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

**Tabela 2. Perfil imunofenotípico das leucemias linfoides.**

Marcador	Linhagem B				Linhagem T		
	Pró-B	Comum	Pré-B	B	Pré-T	Intermediário	T
<b>HLA-DR</b>	+	+	+	+	+/-	-	-
<b>TdT</b>	+	+	+	+/-	+	+	+
<b>CD19</b>	+	+	+	+	-	-	-



<b>CD22(c)</b>	-/+	+	+	+	-	-	-
<b>CD10</b>	-	+	+	-/+	-/+	-/+	+/-
<b>CD20</b>	-	-/+	+	+	-	-	-
<b>cμ</b>	-	-	+	-	-	-	-
<b>SmIg</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>CD7</b>	-	-	-	-	+	+	+
<b>CD2</b>	-	-	-	-	-	+	+
<b>CD3(c)</b>	-	-	-	-	+/-	+	+
<b>CD1a</b>	-	-	-	-	-	+/-	-
<b>CD3</b>	-	-	-	-	-	-	+
<b>CD4/CD8</b>	-	-	-	-	-	+/-	+

TdT = Terminal desoxinuclotidil transferase; CD22(c) = CD22 intracitoplasmático; cμ = cadeia μ citoplasmática; SmIg = Imunoglobulina de superfície; +: expressão do antígeno; +/-: expressão variável frequentemente positiva; -: ausência de expressão do antígeno; -/+: expressão variável frequentemente negativa; (Adaptado de FARIAS; CASTRO, 2004).

**Tabela 3. Classificação citogenética da LLA.**

Leucemia linfoblástica de células B não especificada anteriormente

*Leucemia linfoblástica de células B com anormalidades genéticas recorrentes:*

Leucemia linfoblástica de células B com hipodiploidia

Leucemia linfoblástica de células B com hiperdiploidia

Leucemia linfoblástica de células B com t(9;22)(q34;q11.2)[BCR-ABL1]

Leucemia linfoblástica de células B com t(v;11q23)[rearranjo MLL]

Leucemia linfoblástica de células B com t(12;21)(p13;q22)[ETV6-RUNX1]

Leucemia linfoblástica de células B com t(1;19)(q23;p13.3)[TCF3-PBX1]

Leucemia linfoblástica de células B com t(5;14)(q31;q32)[IL3-IGH]

Leucemia linfoblástica de células B com amplificação intracromossomal do cromossomo 21 (iAMP21)<sup>b</sup>

Leucemia linfoblástica de células B com translocações envolvendo tirosina quinases ou receptores de citocinas ('BCR-ABL1-LIKE ALL')<sup>b</sup>

ALL = significa o mesmo que LLA, do inglês “Acute Lymphoblastic Leukemia”. <sup>b</sup> = Entidade provisória. (Adaptado de TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017)

### **1.3 Tratamento**

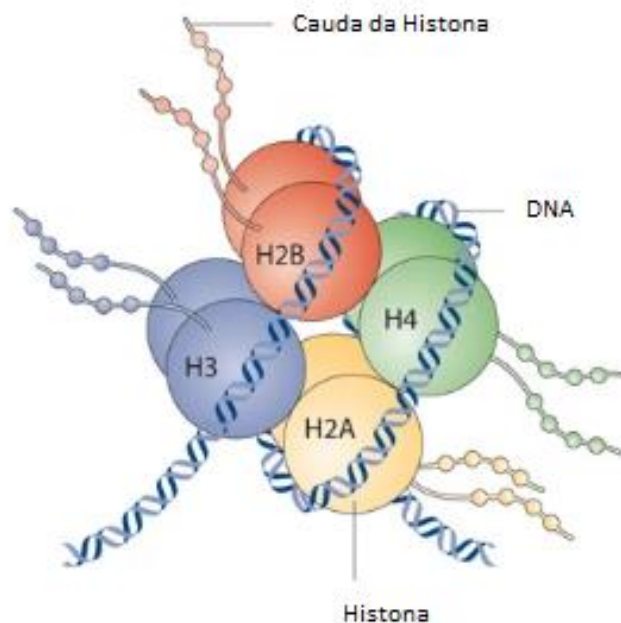
A classificação dos diferentes tipos de LLA é o principal elemento norteador na definição dos grupos de tratamento dessa leucemia. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) (2001), o protocolo de tratamento da LLA é dividido em três diferentes grupos de risco: grupo de risco básico, grupo de risco médio e grupo de risco alto. Para todos esses grupos, o tratamento é administrado em ciclos e consiste em três diferentes etapas: indução de remissão, consolidação e manutenção. Na primeira fase do tratamento, a Prednisona via oral (VO), Vincristina intravenosa (IV), Daunorubicina IV, Asparaginase intramuscular (IM) e Metotrexato intratecal (IT) são introduzidos de forma sutil, a fim de eliminar os blastos do sangue periférico e reduzi-los na medula. Já a etapa de consolidação, considerada mais intensiva, tem como objetivo destruir as células leucêmicas remanescentes. Para isso, essa fase conta geralmente com o uso de Mercaptina VO, Metotrexato IV, Vincristina IV, Citarabina IV, Ciclofosfamida com Mesna IV e Asparaginase IM. A manutenção, por sua vez, é mais branda, com o uso de apenas Mercaptina VO e Metotrexato VO, mas se caracteriza como a fase mais longa do tratamento.

Embora este protocolo de tratamento seja efetivo para curar cerca de 40% dos pacientes portadores da LLA, alguns estudos já têm demonstrado mecanismos de resistência múltipla a várias dessas drogas utilizadas. Além disso, dados adicionais mostram ainda que, em adultos, existe uma maior incidência na expressão desses mecanismos de resistência (INCA, 2002; PUI; ROBISON; LOOK, 2008; INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013; HUNGER; MULLIGHAN, 2015).

## 1.4 Epigenética e câncer

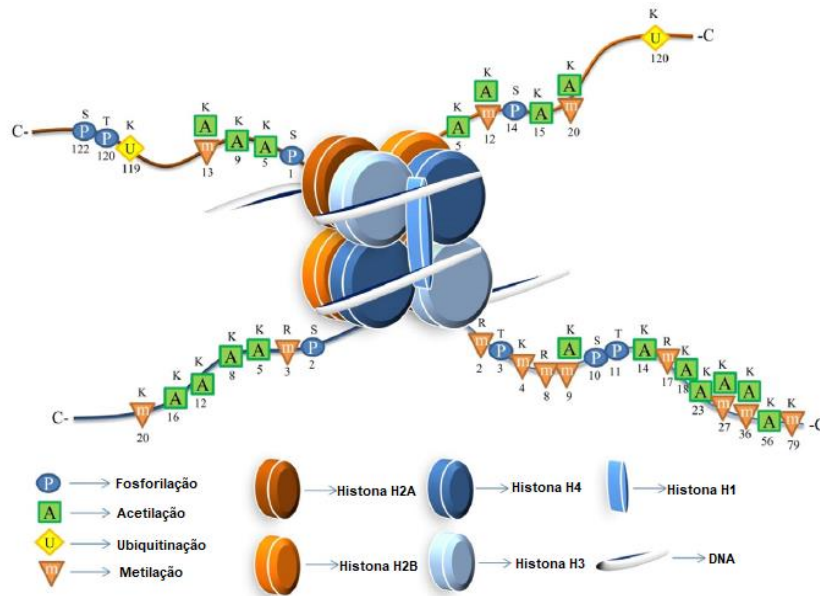
A epigenética está envolvida no estudo das alterações hereditárias no padrão de expressão gênica que não resultam de modificações na sequência nucleotídica, mas sim de mudanças na conformação do complexo de DNA (MORTON; COOKE; DAVIDGE, 2016), podendo levar à modificação no fenótipo sem alterar o genótipo de uma célula (ZAIDI et al., 2012).

O DNA é armazenado dentro das células nos cromossomos, por meio do seu enovelamento nos chamados nucleossomos (AUDIA; CAMPBELL, 2015). Estes, por sua vez, são constituídos por duas cópias das quatro histonas principais H2A, H2B, H3 e H4, associados à histona de ligação H1, formando um octâmero onde as fitas de DNA se enovelam (Figura 3) (AUDIA; CAMPBELL, 2015; BISWAS; RAO, 2017; CASTILLO et al., 2017).



**Figura 3. Estrutura do nucleossomo.** Os nucleossomos são formados por um octâmero de proteínas altamente básicas conhecidas como histonas. Estas se arranjam na forma de um tetrâmero (H3/H4) de dois heterodímeros (H2A/H2B). Esse complexo protéico em forma de disco se mantém unido quando 145-147 pares de base (pb) DNA faz 1,7 voltas em sua circunferência (Adaptado de TSANKOVA et al., 2007).

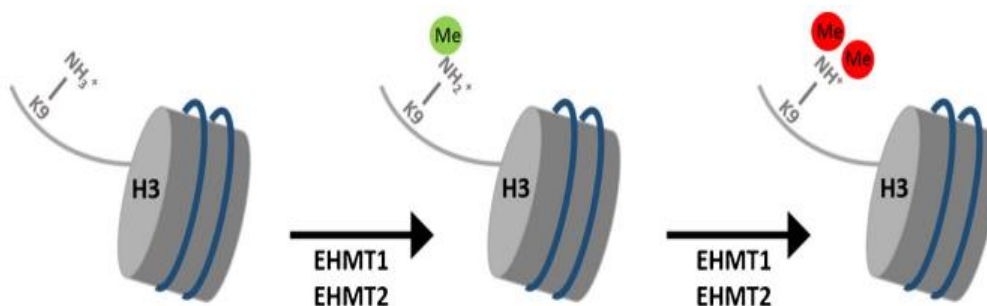
As caudas das histonas podem sofrer modificações pós-traducionais através de processos como metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação (Figura 4). Essas modificações podem afetar a transcrição gênica, uma vez que alteram a estrutura e acessibilidade de uma região genômica (BISWAS; RAO, 2017).



**Figura 4. Modificações de histonas.** As caudas das histonas podem sofrer modificações pós-traducionais. A cauda N-terminal das histonas desempenha um papel crucial na modulação da estrutura e função do nucleossomo. Diversas modificações nos diferentes resíduos da cauda das histonas estão sendo mostradas aqui onde S, T, K e R representam Serina, Treonina, Lisina e Arginina respectivamente. (Adaptado de BISWAS; RAO, 2017)

Uma série de estudos tem demonstrado que diferentes enzimas modificadoras de histonas estão super expressas em processos cancerígenos e tem relacionado os mecanismos epigenéticos ao desenvolvimento e à progressão de diversos tipos de câncer (ARROWSMITH et al., 2012; BERRY; JANKNECHT, 2013; ALVES-SILVA et al., 2018). Nessa linha, mecanismos de metilação de histonas já demonstraram associações a diversas funções, incluindo formação de heterocromatina, inativação cromossômica, reparo de DNA e diferenciação celular. Dentre as metiltransferases, diversos estudos têm demonstrado a importância das enzimas EHMT1 (GLP) e EHMT2 (G9a) nos processos neoplásicos (CASCIELLO et al., 2015; SALZBERG et al., 2017; ALVES-SILVA et al., 2018).

EHMT1 e EHMT2 pertencem à família da histona lisina metiltransferase (HKMTs), subgrupo Suv39h do SET *domain-containing* e são responsáveis por catalisar a monometilação e a dimetilação na lisina 9 da Histona 3 (Figura 5) (BATTISTI et al., 2016). Recentemente, alguns autores demonstraram que essas enzimas estão relacionadas a vários processos patológicos, incluindo a inflamação e o câncer (ANTIGNANO et al., 2014). EHMT1 foi identificada hiperexpressa no câncer esofágico, no melanoma hepatocelular, no câncer de pulmão, cerebral e no mieloma múltiplo. Já EHMT2 parece ter papel chave na homeostase imunológica, além de possuir p53 como alvo direto, um fator de transcrição frequentemente mutado no câncer (RATHERT et al., 2008; CASCIELLO et al., 2015; NODA et al., 2016).



**Figura 5. Ação das histonas metiltransferases (EHMT1 e EHMT2) sobre a histona 3.** EHMT1 e EHMT2 são duas enzimas capazes de catalisar a adição de um ou dois grupos metil na lisina 9 da histona 3. A monometilação está codificada na figura pela cor verde e a dimetilação pela cor vermelha. (Adaptado de EBBERS; RUNGE; NTHWANG, 2016).

Dentro do grupo de desordens hematológicas, um estudo realizado por Lehnertz et al. (2014) demonstrou que EHMT2 possui relação com o aumento rápido de progenitores mieloides na Leucemia Mieloide Aguda (LMA), levando ao aumento da agressividade da doença e, segundo Alves-Silva et al. (2018), a expressão elevada de EHMT1 na leucemia linfocítica crônica está relacionada ao pior prognóstico dos pacientes. Entretanto, o conhecimento sobre o impacto dessas enzimas na LLA ainda é escasso. Dentro desse contexto e considerando o envolvimento direto dos mecanismos epigenéticos com o desenvolvimento do câncer, nesse estudo investigamos os níveis transcricionais de

EHMT1/EHMT2 em 750 amostras de pacientes com LLA e 73 amostras de medula óssea saudáveis, bem como avaliamos o impacto da inibição das metiltransferases de histonas EHMT1 e EHMT2 sobre a proliferação e viabilidade celular na LLA.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar o impacto da inibição das metiltransferases de histonas EHMT1 e EHMT2 sobre a proliferação e viabilidade celular na Leucemia Linfóide Aguda (LLA).

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar a expressão de EHMT1 e EHMT2 em amostras de LLA a partir do banco de dados *Bloodspot*;
- Investigar o impacto da inibição de EHMT1 e EHMT2 sobre a viabilidade e proliferação da linhagem de linfócitos T leucêmicos Jurkat;
- Investigar o impacto da inibição de EHMT1 e EHMT2 sobre a apoptose da linhagem de linfócitos T leucêmicos Jurkat;
- Investigar os mecanismos moleculares envolvidos nos desfechos funcionais observados.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Análise *in silico***

A expressão dos genes EHMT1 (sonda 225461\_at) e EHMT2 (sonda 202326\_at) foi obtida a partir dos dados de *microarray* de oligonucleotídeos disponíveis no banco de dados *Bloodspot* (BAGGER et al., 2016) do grupo de estudo *International Microarray Innovations in Leukemia* (MILE) (LABAJ et al., 2017). A análise foi realizada em uma coorte de 73 amostras de medula óssea saudáveis e de 750 pacientes com LLA estratificados nos seguintes grupos: 58 amostras de LLA t(12;21), 36 amostras de LLA t(1;19), 40 amostras de LLA hiperdiploide, 70 amostras de LLA-Pro-B t(11q23)/MLL, 237 amostras de c-/LLA-Pre-B sem t(9;22), 122 amostras de c-/LLA-Pre-B t(9;22), 174 amostras de LLA-T e 13 amostras de LLA-B com t(8;14). A expressão do mRNA foi apresentada na forma logarítmica (log<sub>2</sub>).

#### **3.2 Cultivo celular e inibição de EHMT1/2**

Para realização desse estudo, utilizamos a linhagem de linfócitos T leucêmicos Jurkat. Essas células foram cultivadas em meio RPMI1640 suplementado com 10% de Soro fetal bovino (SFB), 100 µg/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina, 2mM de L-glutamina e mantidas em estufa incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para inibição de EHMT1 e EHMT2, utilizamos o inibidor químico UNC0646 (Sigma-Aldrich).

#### **3.3 Ensaio de viabilidade/proliferação celular por MTT**

O efeito de inibição das metiltransferases EHMT1 e EHMT2 foi investigado pelo ensaio de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Em uma placa de 96 poços foram semeadas  $5 \times 10^4$  células da linhagem Jurkat por poço em meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB. As células foram tratadas com concentrações



crecipientes do inibidor químico UNC0646 (1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 4 $\mu$ M, 8 $\mu$ M, 16 $\mu$ M e 32 $\mu$ M), seletivo para inibição de EHMT1/EHMT2, por 24 horas e mantidas em estufa incubadora a 37°C com atmosfera úmida e a 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, foram adicionados 5mg/mL de MTT aos poços e a placa passou por nova incubação durante 4 horas, sob as mesmas condições anteriores. Findada a incubação, a placa foi submetida a centrifugação por 10 minutos a uma velocidade de 400 *x g*. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e 100 $\mu$ L de Dimetil Sulfóxido (DMSO) foram adicionados aos poços. A placa foi então mantida em bandeja agitadora por 15 minutos para dissolver os cristais de formazan. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância na leitora de placas DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter) no comprimento de onda de 570nm. Paralelamente, foi mantida uma outra placa sob as mesmas condições para realização da contagem celular com auxílio da câmara de Neubauer.

### **3.4 Ensaio de apoptose por Anexina V e Iodeto de Propídeo**

Com base nos resultados obtidos no ensaio de MTT, estabelecemos, utilizando o software prism 7, as concentrações do inibidor que mataram 50% (IC<sub>50</sub>) e 75% (IC<sub>75</sub>) das células e avaliamos o efeito promovido por essas concentrações sobre a taxa de apoptose celular. Para isso, cultivamos 2,5 x 10<sup>5</sup> células por poço em uma placa de 48 poços em meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB. Essas células foram tratadas com o IC<sub>50</sub> (9.6  $\mu$ M) e o IC<sub>75</sub> (12.4  $\mu$ M) do UNC0646 por 24 horas paralelamente ao grupo controle que não recebeu tratamento. Após esse período as células foram recolhidas e submetidas à marcação com Anexina-V-FITC (BD Bioscience, USA) e Iodeto de Propídeo (Thermo Fisher) conforme recomendações do fabricante. A análise final foi realizada por citometria de fluxo (FacsVerse, BD Bioscience, USA) mediante a aquisição de 10.000 eventos.

### 3.5 Extração de RNA e transcrição reversa

Para a extração de RNA,  $5 \times 10^5$  células foram cultivadas em uma placa de 48 poços contendo meio RPMI1640 suplementado com 10% SFB. As células foram tratadas com as doses de  $IC_{50}$  e  $IC_{75}$  do UNC0646 por 24 horas. Dado o período de incubação, o RNA das células tratadas e não tratadas foi extraído com o kit GenElute™ RNA Miniprep (Sigma-Aldrich), de acordo com as orientações do fabricante. A quantidade e a qualidade do RNA obtido foi verificada através da utilização do espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare) e a transcrição reversa do material para síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit High Capacity cDNA Archive Kit (Thermo Fisher), seguindo as orientações do fabricante.

### 3.6 PCR em tempo real

A fim de investigar o impacto da inibição de EHMT1 e EHMT2 sobre o perfil transcricional das células leucêmicas tratadas e não tratadas, realizamos a análise quantitativa da expressão dos genes BAX, P53, TP73 e MDM4 (Tabela 4) por PCR em tempo real (StepOnePlus) utilizando a metodologia de SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata e a análise da expressão gênica se deu pela metodologia de  $\Delta\Delta Ct$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001) a partir da utilização do gene calibrador GAPDH, cuja eficiência de amplificação é a mesma dos genes alvo.

**Tabela 4. Sequência dos primers utilizados.**

Gene	Sequência (5' – 3')
GAPDH	CCCTGGACATCGAGATCGC TGTGCTCCTGCTTGGACTC

<b>BAX</b>	CAGACCGTGACCATCTTTGT GCCTCAGCCCATCTTCTTC
<b>P53</b>	AGAAAACCTACCAGGGCAGC ACATCTTGTTGAGGGCAGGG
<b>TP73</b>	CACCTCAGCTCTCCATCTTATTG GCATGGGTCTTAGCCTTTCT
<b>MDM4</b>	CCACGAGACGGGAACATTATT CCCAGCCTTCTTTAGTCTTCTG

---

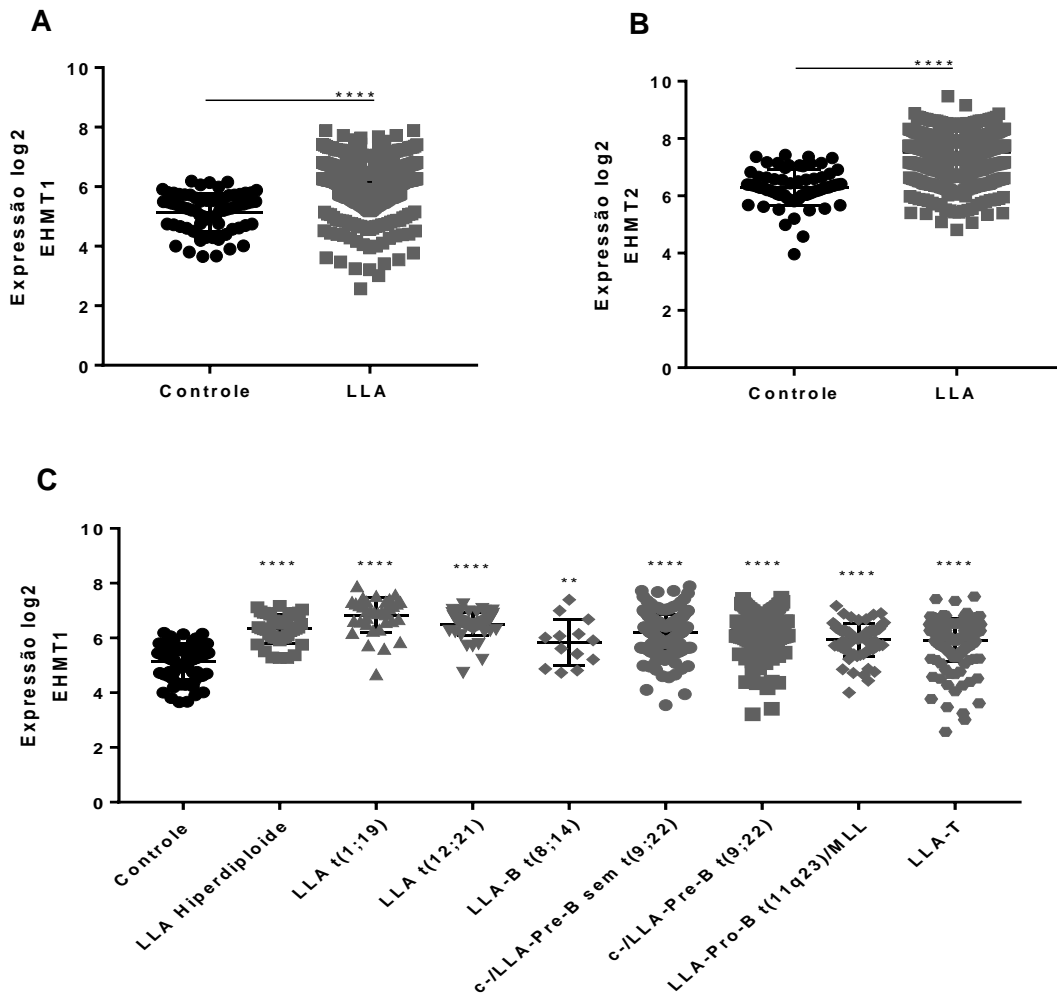
### **3.7 Análise estatística**

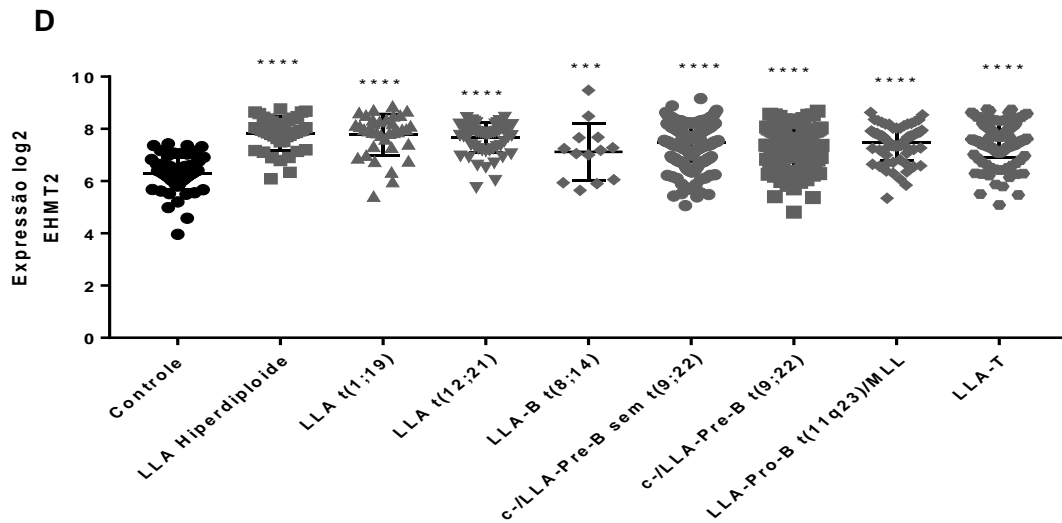
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e o limiar de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparações numéricas entre dois grupos. Comparações incluindo mais grupos foram realizadas usando ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Expressão de EHMT1 e EHMT2

Avaliamos em um primeiro momento, os níveis de expressão dos genes EHMT1 e EHMT2 nas amostras de LLA e em amostras de medula óssea saudáveis. A expressão de ambos os genes foi maior em todas as amostras de LLA ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente) (Figura 6A e 6B). Em seguida, avaliamos os níveis de expressão desses genes após estratificarmos as amostras de LLA em 8 grupos: LLA t(12;21), LLA t(1;19), LLA hiperdiplóide, LLA-Pro-B t(11q23)/MLL, c-/LLA Pre-B t(9;22), c-/LLA Pre-B sem t(9;22), LLA-T e LLA-B com t(8;14). Novamente, todos os grupos de LLA apresentaram maior expressão de EHMT1 ( $p < 0,0001$ ) e EHMT2 ( $p < 0,0001$ ) quando comparados com amostras saudáveis de medula óssea (Figura 6C e 6D).

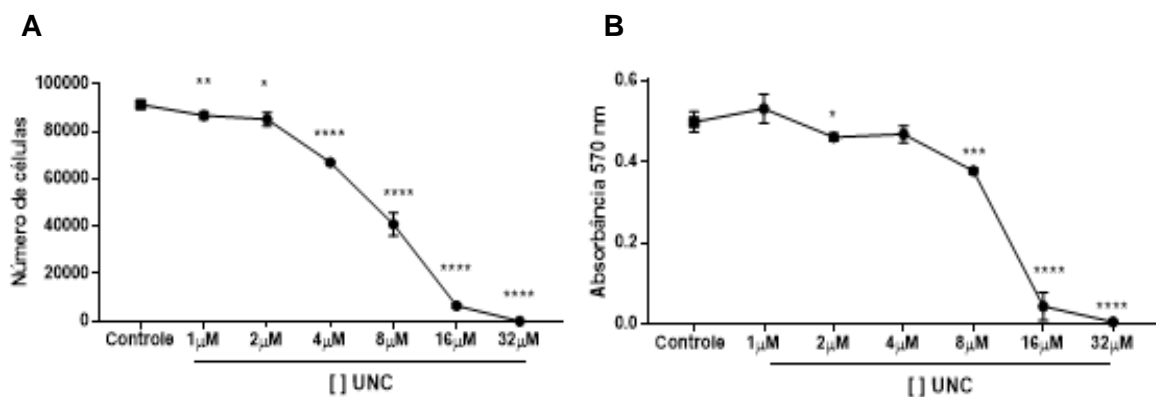


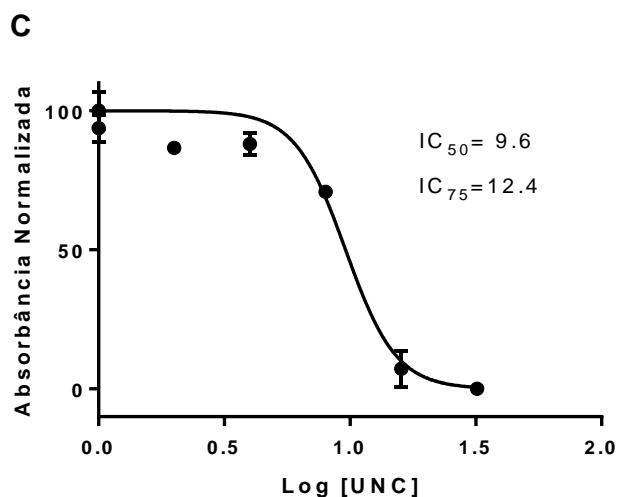


**Figura 6. Expressão de EHMT1 e EHMT2 na LLA.** O nível de expressão de EHMT1 (A) e EHMT2 (B) está aumentado na LLA. Além disso, foi observado que, para todos os tipos de LLA, tanto a expressão de EHMT1 (C), como a de EHMT2 (D) estão aumentadas quando comparadas com o grupo controle. \* significa  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 4.2 Inibição de EHMT1/2 diminui a viabilidade na LLA

A fim de investigar o papel de EHMT1 e EHMT2 sobre a proliferação/viabilidade celular na LLA realizamos o ensaio de MTT. Após 24 horas de incubação, as Jurkat tratadas apresentaram diminuição da viabilidade celular de maneira dose dependente ( $p < 0,0001$ ) (Figura 7A e 7B). A partir desses resultados, estabelecemos as doses para  $IC_{50}$  e  $IC_{75}$  que foram de  $9,6 \mu\text{M}$  e  $12,4 \mu\text{M}$ , respectivamente. (Figura 7C).

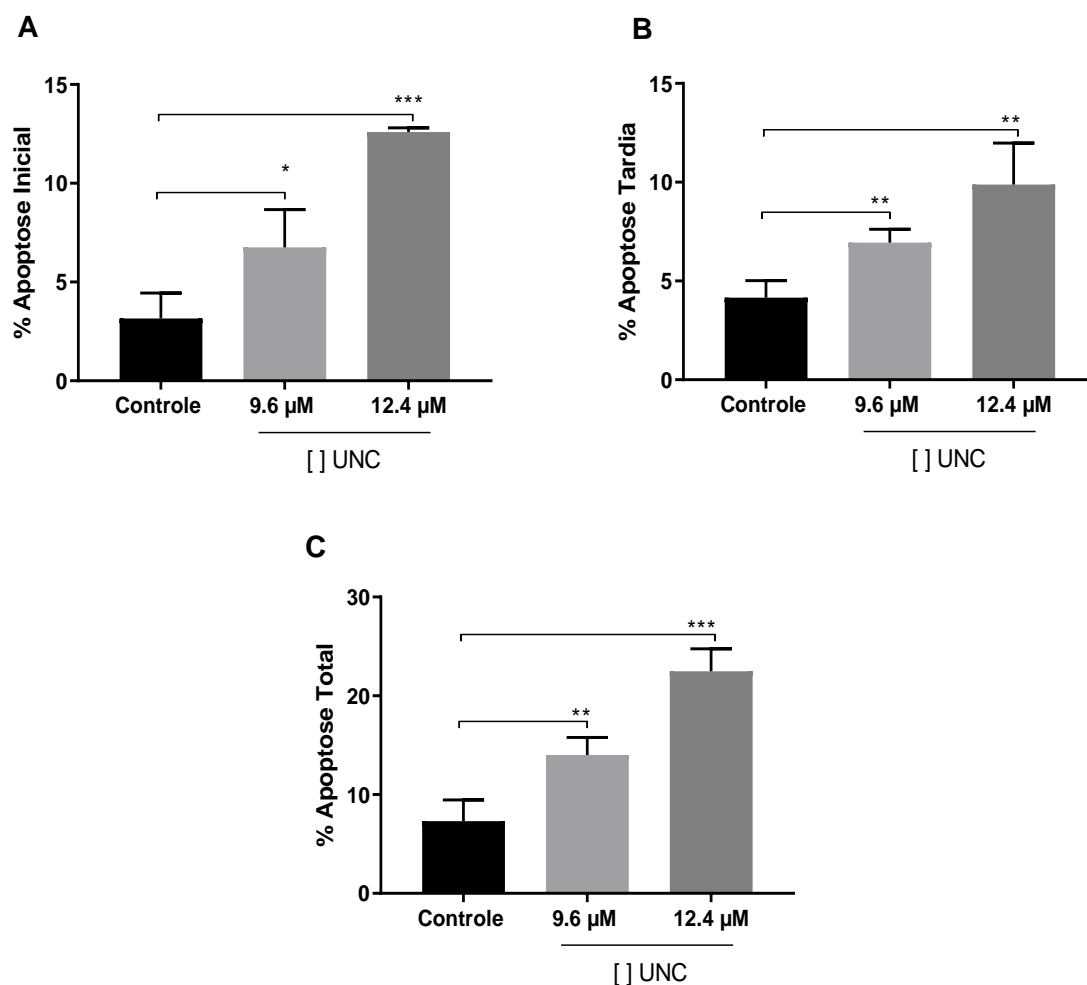




**Figura 7. A inibição de EHMT1 e EHMT2 reduz a viabilidade celular na LLA.** Após tratamento da linhagem celular Jurkat com doses crescentes do inibidor UNC0646 (1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 8  $\mu$ M, 16  $\mu$ M e 32  $\mu$ M) por 24 horas, verificamos os resultados encontrados por espectrofotometria (A) e validamos os achados através da contagem celular (B). A concentração do inibidor encontrada para o  $IC_{50}$  foi de 9,6  $\mu$ M, enquanto para  $IC_{75}$  foi de 12,4  $\mu$ M (C). Todos os resultados foram expressos utilizando a média  $\pm$  o desvio padrão. \* significa  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 4.3 Inibição de EHMT1/2 induz apoptose na LLA

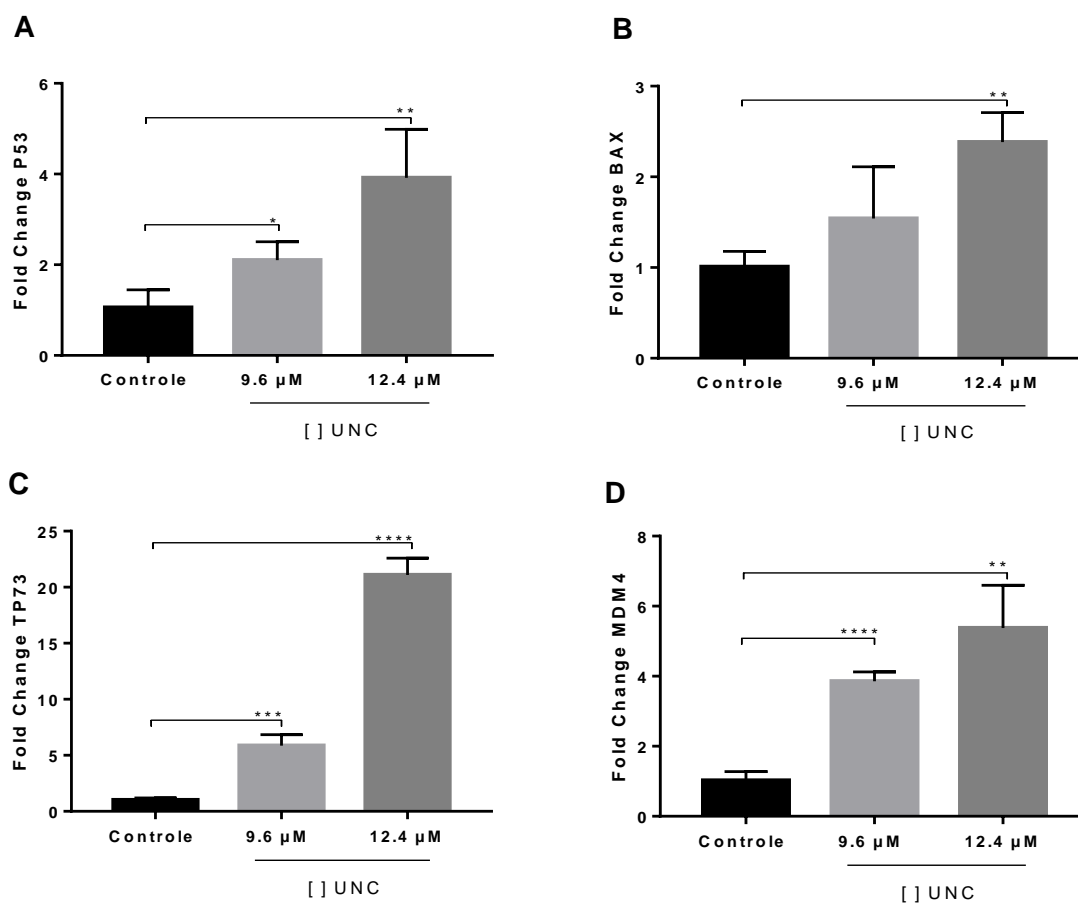
Com o objetivo de verificar o efeito que a inibição de EHMT1/2 promove sobre a apoptose celular na LLA, tratamos a linhagem de linfócitos leucêmicos com o  $IC_{50}$  e o  $IC_{75}$  encontrados para o inibidor UNC0646 por um período de 24 horas e avaliamos por citometria de fluxo, mediante a marcação dessas células com Anexina V e Iodeto de Propídeo (IP), os níveis de apoptose inicial (Anexina<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>), apoptose tardia (Anexina<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>) e de apoptose total (Anexina<sup>+</sup>). Observamos então que a inibição química dessas enzimas resultou em um aumento da apoptose inicial (Figura 8A), bem como da apoptose tardia (Figura 8B) de maneira dose-dependente o que, conseqüentemente, influenciou no aumento dos níveis de apoptose total (Figura 8C).



**Figura 8. A inibição de EHMT1 e EHMT2 aumenta a apoptose na LLA.** É possível observar um aumento da apoptose de forma dose dependente na apoptose inicial (A), tardia (B) e total (C). Todos os resultados foram expressos utilizando a média  $\pm$  o desvio padrão. \* significa  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.4 Inibição de EHMT1/2 aumenta a expressão de genes pro-apoptóticos

Após determinar o efeito apoptótico nas células Jurkat, buscamos investigar a expressão de genes importantes envolvidos neste cenário. Para isso, tratamos as Jurkat com as mesmas concentrações de  $IC_{50}$  e  $IC_{75}$  encontradas para o UNC0646, por 24 horas. Concordantemente com os achados do ensaio anterior, observamos que os níveis de transcrição de TP53 ( $p = 0,004$ ) (Figura 9A), BAX ( $p = 0,009$ ) (Figura 9B), TP73 ( $p = 0,0001$ ) (Figura 9C), e MDM4 ( $p = 0,0007$ ) (Figura 9D) aumentaram significativamente nas células tratadas (Figura 9) quando comparadas com o grupo controle.



**Figura 9. A inibição de EHMT1 e EHMT2 modifica o perfil transcricional da LLA.** Para todos os genes pesquisados, a inibição dessas metiltransferases provocou um aumento da expressão. P53 (A), BAX (B), TP73 (C) e MDM4 (D) apresentaram um aumento da expressão de maneira dose dependente. Todos os resultados foram expressos utilizando a média  $\pm$  o desvio padrão. \* significa  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



## 5. DISCUSSÃO

Além das lesões citogenéticas, os mecanismos epigenéticos parecem desempenhar um papel importante na fisiopatologia da LLA e de diversos tipos de câncer. Processos de acetilação, desacetilação, metilação e desmetilação de histonas são capazes de alterar a compactação e acessibilidade do DNA (TIKHODEYEV, 2016), interferindo assim na transcrição gênica. Dentre estes, os processos de metilação de histonas já demonstraram associações a diversas funções, incluindo formação de heterocromatina, inativação cromossômica, reparo de DNA e diferenciação celular (SHINKAI; TACHIBANA, 2011;). No presente estudo, buscamos investigar a influência da inibição das metiltransferases EHMT1 e EHMT2 sobre a viabilidade celular na LLA.

EHMT1 e EHTM2 estão entre as histonas metiltransferases mais amplamente estudadas devido aos relatos de expressão exacerbada em diversos tipos de câncer. EHMT1 foi observado super expresso nos cânceres de esôfago, mama e estômago (CEBRIAN et al., 2006; GUAN et al., 2014; ALVES-SILVA et al., 2018; YANG et al., 2018), enquanto a expressão elevada de EHMT2 foi relatada na LMA, em câncer de pulmão, cólon e até mesmo no mieloma múltiplo (HUANG et al., 2010; MIN-WEI et al, 2010; LEHNERTZ, 2014; ZHANG et al, 2015; BATTISTI, 2016). A partir dos dados obtidos do estudo MILE, observamos que tanto EHMT1 quanto EHMT2 apresentam expressão elevada na LLA quando comparados a amostras de medula óssea saudável. Esse aumento se mostrou presente em todas as amostras de LLA, independentemente do seu subtipo (BAGGER et al., 2016; LABAJ et al., 2017).

Conforme foi relatado por Flotho et al. (2009), inibidores de metiltransferases parecem inibir a proliferação celular e desencadear a apoptose. Pappano et. al. (2015), mostraram que a inibição de EHMT resultou na inibição da proliferação, bem como diminuiu a viabilidade celular na LMA. Mais recentemente, a literatura mostrou também que a inibição de

EHMT1/2 foi capaz de induzir aumento da apoptose em linhagens de câncer de bexiga, como T24 e J82 (YUE-PENG et al., 2019). Ademais, existem relatos de que a inibição de EHMT1/EHMT2 aumenta os níveis de apoptose mediada por interferon e pelo imatinibe na Leucemia Mieloide Crônica (LMC) (LOH et al., 2014). Considerando todos esses achados, nós optamos por investigar se a inibição dessas metiltransferases (EHMT1/EHMT2) poderia exercer algum impacto sobre a viabilidade celular na LLA. De forma similar aos estudos citados, nossos resultados demonstraram que a inibição de EHMT1 e EHMT2 promoveu morte celular na LLA de maneira dose dependente. Corroborando com os nossos achados, Huang et al. (2017) também demonstraram que a inibição de EHMT2 é capaz de induzir apoptose nas linhagens MOLT-4 e Jurkat, além de ativar a via das caspases em estudos com câncer de bexiga (CUI et al., 2015).

Conforme abordado anteriormente, alterações gênicas e modificações no modelo de expressão gênica são comumente observadas em patologias como o câncer (RATHERT et al., 2008; ARROWSMITH et al., 2012; BERRY; JANKNECHT, 2013; CASCIELLO et al., 2015; INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013; NODA et al., 2016; ALVES-SILVA et al., 2018). A fim de investigar os possíveis eventos moleculares envolvidos nos nossos achados, analisamos os níveis de expressão de alguns genes relacionados aos processos apoptóticos.

P53 é conhecido por exercer função importante na regulação da transcrição e é usualmente o gene mais mutado nos cânceres humanos (HOLLSTEIN et al., 1991; STRANO et al., 2007; TOUFEKCHAN; TOLEDO, 2018). Esse gene exerce um papel importante na supressão tumoral, através da ativação da transcrição de proteínas pro e anti-apoptóticas, podendo interagir diretamente com BAX e estimular a apoptose (MIYASHITA et al., 1994; FINDLEY et al., 1997; TOUFEKCHAN; TOLEDO, 2018). Em nossos achados foi possível notar que a inibição de EHMT1/2 provocou um aumento na expressão de TP53 e de BAX,

indicando que TP53 exerce um papel central na apoptose das células Jurkat. Similarmente, a inibição de EHMT2 através do inibidor BIX-01294 suprime a expressão da DNA desmetilase DNMT1, regula positivamente a expressão de BAX e caspase-3, bem como induz a apoptose celular (HUANG et al., 2017). De maneira interessante, percebemos que além da hiperexpressão de TP53, a modulação de EHMT1/2 também promoveu aumento na expressão de MDM4, uma proteína de ligação a P53 capaz de inibir a sua função de ativação transcricional (KARNI-SCHMIDT; LOKSHIN; PRIVES et al., 2016). Embora existam relatos realçando a função de inativação de MDM4 (TOLEDO; WAHL, 2007), o papel desse gene no processo de apoptose ainda não é muito claro. Além disso, existem também outros registros direcionando o papel de MDM4 na estabilização de P53 (GIGLIO et al., 2010; DI CONZA et al., 2012) e na promoção da apoptose (MANCINI et al., 2004; LI et al., 2010).

P73 é um dos membros mais estudados da família de transcrição P53 devido a sua sobreposição funcional e a possibilidade de compensar a perda de atividade de P53 quando esse fator está mutado ou inativo. Além disso, o P73 também pode ativar genes responsivos a p53, incluindo BAX (SCIAN et al., 2008; YOON et al., 2015). O tratamento de células Jurkat com UNC0646 levou a super expressão de TP73 e BAX, sugerindo que P53 e P73 podem cooperar para induzir apoptose na LLA. Curiosamente, TP73 também foi associado a morte celular no câncer de pulmão (LIU; ZHUANG; MAI, 2013) e com a regulação positiva da expressão de BAX e aumento da apoptose em células de glioblastoma (RATOVITSKI, 2017). Outros estudos mostraram ainda que a indução transcricional de TP73 é também associada a apoptose em leucemia promielocítica aguda e síndromes mielodisplásicas (MOMENY et al, 2010; ZHAO et al., 2013).

## **6. CONCLUSÃO**

Em conjunto, todos esses dados mostraram que EHMT1 e EHMT2 apresentam expressão elevada na LLA e que a inibição dessas metiltransferases de histona por uso do inibidor químico UNC0646, induz morte celular nessa leucemia. Nossos resultados sugerem ainda que a modulação epigenética por EHMT1 e EHMT2 exercem efeito sobre os genes TP53 e TP73, que desempenham papéis importantes na regulação positiva do processo apoptótico, achados que indicam e evidenciam uma estratégia promissora para o tratamento da LLA.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALVES-SILVA, J.; CARVALHO, J.; RABELLO, D.; et al. GLP overexpression is associated with poor prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia and its inhibition induces leukemic cell death. **Investigational New Drugs**, v. 36, n. 5, p. 955-960, 2018.
- ANTIGNANO, F.; BURROWS, K.; HUGHES, M. R.; et al. Methyltransferase G9A regulates T cell differentiation during murine intestinal inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 5, p. 1945, 2014.
- ARBER, D. A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; et al. The revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, p. 2391-2405, 2016.
- ARROWSMITH, C. H.; BOUNTRA, C.; FISH, P. V.; et al. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 5, p. 384, 2012.
- AUDIA, J. E.; CAMPBELL, R. M. Histone Modifications and Cancer. **Epigenetics**, p. 895–925, 2015.
- BAGGER, F.O.; SASIVAREVIC, D.; SOHI, S.H.; L. BloodSpot: a database of gene expression profiles and transcriptional programs for healthy and malignant haematopoiesis. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D917–24, 2016.
- BATTISTI, V.; PONTIS, J.; BOYARCHUK, E.; et al. Unexpected Distinct Roles of the Related Histone H3 Lysine 9 Methyltransferases G9a and G9a-Like Protein in Myoblasts. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 11, p. 2329-2343, 2016.
- BERRY, W. L.; JANKNECHT, R. KDM4/ JMJD2 histone demethylases: epigenetic regulators in cancer cells. **Cancer Research**, v. 73, n. 10, p. 2936-2942, 2013.
- BILGIR, O.; BILGIR, M. C. F.; CAGLIYAN, G.; et al. An experience with plasma exchange treatment of acute lymphoblastic leukemia in a case with fulminant hepatitis related to l-asparaginase. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 49, n. 2, p. 328-330,

2013.

BISWAS, S.; RAO, C. M. Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 173, p. 118–134, 2017.

CAO, YP.; SUN, JY.; LI, MQ.; et al. Inhibition of G9a by a small molecule inhibitor, UNC0642, induces apoptosis of human bladder cancer cells. **Springer Nature**, v. 40, n. 8, p. 1076-1084, 2019.

CASCIELLO, F.; WINDLOCH, K.; GANNON, F.; et al. Functional Role of G9a Histone Methyltransferase in Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 487, 2015.

CASTILLO, J.; LÓPEZ-RODAS, G.; FRANCO, L. Histone Post-Translational Modifications and Nucleosome Organization in Transcriptional Regulation. Protein Reviews. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 966, p. 65–92, 2017.

CEBRIAN, A.; PHAROAH, P.D.; AHMED, S.; et al. Genetic variants in epigenetic genes and breast cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 8, p. 1661–1669, 2006.

CUI, J.; SUN, W.; HAO, X.; et al. EHMT2 inhibitor BIX-01294 induces apoptosis through PMAIP1-USP9X-MCL1 axis in human bladder cancer cells. **Cancer Cell International**, v. 15, n. 1, p. 4, 2015.

DANIEL A. A., ATTILIO O., ROBERT H., et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood** 2016, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 2016.

DI CONZA, G.; MANCINI, F.; BUTTARELLI, M.; et al. MDM4 enhances p53 stability by promoting an active conformation of the protein upon DNA damage. **Cell Cycle**, v. 11, n. 4, p. 749–760, 2012.

EBBERS, L.; RUNGE, K.; NOTHWANG, H. G. Differential patterns of histone methylase EHMT2 and its catalyzed histone modifications H3K9me1 and H3K9me2 during maturation of central auditory system. **Cell and Tissue Research**, v. 365, n. 2, 247–264, 2016.

FADEL, A. P. Investigação Laboratorial de LLA. **AC&T Científica**, v.1, n.1, 2010.

FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfoides agudas.

**Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 2, p. 91-98, 2004.

FINDLEY, H. W.; GU, L.; YEAGER, A. M.; et al. Expression and Regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax Correlate With p53 Status and Sensitivity to Apoptosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, v. 89, n. 8, p. 2986-2993, 1997.

FLAVAHAN, W. A.; GASKELL, E.; BERNSTEIN, B. E. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 357, p. 6348, 2017.

FLOTHO, C.; CLAUS, R.; BATZ, C.; et al. The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. **Leukemia**, v. 23, n. 6, p. 1019-1028, 2009.

FORDE, P. M.; BRAHMER, J. R.; KELLY, R. J. New strategies in lung cancer: epigenetic therapy for non-small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 9, p. 2244-2248, 2014.

GIGLIO, S.; MANCINI, F.; PELLEGRINO M.; et al. Regulation of MDM4 (MDMX) function by p76(MDM2): a new facet in the control of p53 activity. **Oncogene**, v. 29, n. 44, p. 5935–5945, 2010.

GUAN, X.; ZHONG, X.; MEN, W.; et al. Analysis of EHMT1 expression and its correlations with clinical significance in esophageal squamous cell cancer. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 2, n. 1, p. 76-80, 2014.

HARRISON, C. J. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, n. 4, p. 631-647, 2011.

HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; et al. p53 mutations in human cancers. **Science**, v. 253, n. 5015, p. 49–53, 1991.

HUANG, J.; DORSEY, J.; CHUIKOV, S.; et al. G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 13, p. 9636–9641, 2010.

HUANG, Y.; ZOU, Y.; LIN, L.; et al. Effect of BIX-01294 on proliferation, apoptosis and histone methylation of acute T lymphoblastic leukemia cells. **Leukemia Research**, v. 62, p. 34–39, 2017.

HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 16, p. 1541-1552, 2015.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943-1955, 2013.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Leucemia Linfóide Aguda em Adulto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 309-312, 2002.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Leucemias Agudas na Infância e na Adolescência. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 245-257, 2001.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 6, p. 415, 2002.

KARNI-SCHMIDT, O.; LOKSHIN, M.; PRIVES, C.; The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, p. 617–644, 2016.

LABAJ W., PAPIEZ A., POLANSKI A., et al. “Comprehensive Analysis of MILE Gene Expression Data Set Advances Discovery of Leukaemia Type and Subtype Biomarkers.” **Interdisciplinary sciences, computational life sciences**, v. 9, n. 1, p. 24-35, 2017.

LEHNERTZ, B.; PABST, C.; SU, L.; et al. The methyltransferase G9a regulates HoxA9 dependent transcription in AML. **Genes and Development**, v. 28, n. 4, p. 317–327, 2014

LI, B.; CHENG, Q.; LI, Z.; et al. p53 inactivation by MDM2 and MDMX negative feedback loops in testicular germ cell tumors. **Cell Cycle**, v. 9, n. 7, p. 1411–1420, 2010.

LITZOW, M. R. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology**, v. 19, n. 4, p. 246-247, 2014.

LIU, K.; ZHUANG, X.; MAI, Z. p73 expression is associated with cellular chemosensitivity in human non-small cell lung cancer cell lines. **Oncology Letters**, v. 5, n. 2, p. 583–587, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-



time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 408-408, 2001.

LOH, S.W.; NG, W.L.; YEO, K.S.; et al. Inhibition of euchromatic histone methyltransferase 1 and 2 sensitizes chronic myeloid leukemia cells to interferon treatment. **PLoS One**, v. 9, n.7, p. e103915, 2014.

MALOUF, C.; OTTERSBAACH, K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 3, p. 417–446, 2018.

MANCINI, F.; GENTILETTI, F.; D'ANGELO, M.; et al. MDM4 (MDMX) overexpression enhances stabilization of stress-induced p53 and promotes apoptosis. **J. Biol. Chem**, v. 279, n. 9, p. 8169– 8180, 2004.

MAVRAKIS, K. J.; MEULEN, J. V. D.; WOLFE, A. L. et al. A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-celllymphoblastic leukemia (T-ALL). **Nature Genetics**, v. 43, n. 7, p. 673, 2011.

MIN-WEI, C.; KUO-TAI, H.; HSIN-JUNG, K.; et al. H3K9 Histone Methyltransferase G9a Promotes Lung Cancer Invasion and Metastasis by Silencing the Cell Adhesion Molecule Ep-CAM. **Cancer research**, v. 70, n. 20, p. 7830-7840, 2010.

MIYASHITA, T.; KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA M.; et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. **Oncogene**, v. 9, n. 6, p. 1799-1805, 1994.

MOMENY, M.; ZAKIDIZAJI, M.; GHASEMI, R.; et al. Arsenic trioxide induces apoptosis in NB-4, an acute promyelocytic leukemia cell line, through up-regulation of p73 via suppression of nuclear factor kappa B-mediated inhibition of p73 transcription and prevention of NF-kappaB-mediated induction of XIAP, cIAP2, BCL-XL and surviving. **Med. Oncol**, v. 27, n. 3, p. 833–842, 2010.

MORTON, J. S.; COOKE, C-L.; DAVIDGE, S. T. In utero origins of hypertension: mechanisms and targets for therapy. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 2, p. 549-603, 2016.

NAOUM F. A.; NAOUM P.C. Hematologia Laboratorial - Leucócitos 1 ed. **Academia de**

**Ciências e Tecnologia**, p.91-98, 2006.

NODA, T.; NOMIYAMA, T.; KAWANAMI, T.; et al. PE-23 - Overexpression of GLP-1 receptor in hepatocellular carcinoma causes anti-cancer effect of Exendin-4, **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 120, p. S138-S138, 2016.

ORNELLAS, F.; CARAPETO, P. V.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; et al. Pais obesos levam a metabolismo alterado e obesidade em seus filhos na idade adulta: revisão de estudos experimentais e humanos. **Jornal de Pediatria**, v. 93, n. 6, p. 551-559, 2017.

PAPPANO, W.; GUO, J.; HE, Y.; et al. The Histone Methyltransferase Inhibitor A-366 Uncovers a Role for G9a/GLP in the Epigenetics of Leukemia. **PLoS one**, v. 10, n. 7, p. e0131716, 2015.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PUI, C. H.; ROBISON, L. L.; LOOK, T. Acute Lymphoblastic Leukaemia. **Lancet**, v. 371, n. 9617, p. 1030-1043, 2008;

RATHERT, P.; DHAYALAN, A.; MURAKAMI, M.; et al. Protein lysine methyltransferase G9a acts on non-histone targets. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 6, 344-347, 2008.

RATOVITSKI, E.A. Dehydroleucodine Induces a TP73-dependent Transcriptional Regulation of Multiple Cell Death Target Genes in Human Glioblastoma Cells. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 17, n. 6, p. 839–850, 2017.

SALZBERG, A. C.; HARRIS-BECKER, A.; POPOVA, E. Y.; et al. Genome-wide mapping of histone H3K9me2 in acute myeloid leukemia reveals large chromosomal domains associated with massive gene silencing and sites of genome instability. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–30, 2017.

SCIAN, M.J.; CARCHMAN, E.H.; MOHANRAJ, L.; et al. Wild-type p53 and p73 negatively regulate expression of proliferation related genes. **Oncogene**, v. 27, n. 18, p. 2583–2593, 2008.

SHINKAI, Y.; TACHIBANA, M. H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule

GLP. **Genes & Development**, v. 25, p. 781-788, 2011.

STRANO, S.; DELL'ORSO, S.; FONTEMAGGI, G.; et al. Mutant p53: an oncogenic transcription factor. **Oncogene**, v. 26, n. 15, p. 2212-2219, 2007.

TEE, W-W.; REINBERG D. Chromatin features and the epigenetic regulation of pluripotency states in ESCs. **Development**, V. 141, n. 12, p. 2376-2390, 2014.

TERWILLIGER T., ABDUL-HAY M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer J.**, v. 7, n. 6, p. 577, 2017.

TIKHODEYEV, O. N. Epigenetic and Eugenetic Processes. **Biology Bulletin Reviews**, v. 6, n. 4, p. 333–343, 2016.

TOLEDO, F.; WAHL, M. G. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 7-8, p. 1476-1482, 2007.

TOUFEKTCHAN, E.; TOLEDO, F.; The Guardian of the Genome Revisited: p53 Downregulates Genes Required for Telomere Maintenance, DNA Repair, and Centromere Structure. **Cancers**, v. 10, n. 5, p. e135, 2018.

TSANKOVA, N.; RENTHAL, W.; KUMAR, A.; et al. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 355–367, 2007.

WEE, S.; DHANAK, D.; LI, H.; et al. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 13091, p. 30-36, 2014.

YANG, Y.; SHEN, J.; YAN, D.; et al. Euchromatic histone lysine methyltransferase 1 regulates cancer development in human gastric cancer by regulating E-cadherin. **Oncology Letters**, v. 15, n. 6, p. 9480-9486, 2018.

YAO, X.; XING, M.; OOI, W.F. et al. Epigenomic Consequences of Coding and Noncoding Driver Mutations. **Trends in Cancer**, v. 2, n. 10, p. 585–605, 2016.

YOON, MK.; HA, JH.; LEE, MS.; et al. Structure and apoptotic function of p73. **BMB Reports**, v. 48, n. 2, p. 81–90, 2015.

YUE-PENG, C.; JING-YA, S.; MEI-QIAN, L.; et al. Inhibition of G9a by a small molecule inhibitor, UNC0642, induces apoptosis of human bladder cancer cells. **Acta**

**Pharmacologica Sinica**, v. 40, p. 1076–1084, 2019.

ZAIDI, S. K.; TROMBLY, D. J.; DOWDY, C. R.; et al. Epigenetic mechanisms in leukemia. **Advances in Biological Regulation**, v. 52, n. 3, p. 369-376, 2012.

ZHANG, J.; PENGXING, H.; XI, Y.; et al. Down-regulation of G9a triggers DNA damage response and inhibits colorectal cancer cells proliferation. **Oncotarget**, v. 6, n. 5, p. 2917–2927, 2015.

ZHAO, Y.; FEI, C.; ZHANG, X.; et al. Methylation of the p73 gene in patients with myelodysplastic syndromes: correlations with apoptosis and prognosis. **Tumor Biology**, v. 34, n. 1, p. 165–172, 2013.