UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JULIANA POLTRONIERI DE OLIVEIRA

Análise funcional da proteína KMT2E na leucemia mielóide aguda

Ribeirão Preto

2017

JULIANA POLTRONIERI DE OLIVEIRA

Análise funcional da proteína KMT2E na leucemia mielóide aguda

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular.

Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego

Ribeirão Preto

2017

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

Oliveira, Juliana Poltronieri de

Análise funcional da proteína KMT2E na leucemia mielóide aguda, 2017.

93 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Orientador: Rego, Eduardo Magalhães.

1. Hematologia. 2. Leucemia Mielóide Aguda. 3. KMT2E.

Nome: OLIVEIRA, Juliana Poltronieri de

Título: Análise Funcional da Proteína KMT2E na Leucemia Mielóide Aguda.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof(a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Rogério e Neli, e ao meu irmão, Eduardo, pelo amor e apoio incondicionais.

Aos meus avós, Artur e Mercedes, e tios, Waldir e Márcia, pelo incentivo emocional e financeiro.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus** pela Sua infinita misericórdia para comigo. Tive a oportunidade desse mestrado devido à Sua preparação e foi somente pela Sua força que eu consegui realizar este trabalho.

Aos meus amados pais, **Rogério** e **Neli**, e meu irmão, **Eduardo**, por acreditarem em mim e não medir esforços para me ajudar em todos os aspectos da minha vida.

Ao meu orientador, **Eduardo Rego**, pela honra de ser sua aluna. Pelo entusiasmo com a pesquisa, paciência e compreensão nos meus estudos. Mesmo ele estando em alta posição na instituição, portador de uma inteligência invejável, mantém uma atitude humana e de respeito para com seus alunos, possuindo uma bondade exemplar.

Às minhas queridas amigas **Luciana** e **Isabel**, pelo companheirismo e pelas risadas, que possibilitou momentos muito agradáveis no laboratório, tornando os dias mais leves e o trabalho menos pesado. Além da grande ajuda nos experimentos e análise dos resultados.

À **Izabela** e **Ana Lange** pelo apoio e amizade sincera.

Ao **João Agostinho** pelas dicas essenciais para o bom andamento do meu mestrado, além do auxílio sincero e desinteressado, o qual foi de suma importância para a concretização deste trabalho.

À **Priscila, Carol, Cleide, Larissa, Virgínia, Ana Sílvia, Adriana** e **Dalvinha** pelo auxílio e contribuição.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A **Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP** – fundamental para a minha formação científica e profissional.

O Senhor é o meu pastor; nada me faltará.
Deitar-me faz em verdes pastos; guia-me
mansamente a águas tranquilas.
Refrigera a minha alma; guia-me pelas
veredas da justiça por amor do seu nome.
Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da
morte, não temeria mal algum, porque tu estás
comigo; a tua vara e o teu cajado me
consolam.

Preparas uma mesa perante mim na presença
dos meus inimigos; unges a minha cabeça
com óleo, o meu cálice transborda.
Certamente que a bondade e a misericórdia
me seguirão todos os dias da minha vida: e
habitarei na casa do Senhor por longos dias.

Salmos, 23.

RESUMO

OLIVEIRA, J.P. **Análise funcional da proteína KMT2E na leucemia mielóide aguda**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O gene humano lysine methyltransferase 2E (*KMT2E*) pertence ao grupo Trithorax (TrxG) e age como proteína modificadora de histonas envolvida no controle transcricional de genes relacionados a hematopoiese. Foi previamente identificado como supressor tumoral, atuando sobre a diferenciação, proliferação e ciclo celular. DAMM et al. (2011) e LUCENA-ARAÚJO et al. (2014) descreveram a associação entre baixos níveis de expressão do gene *KMT2E* e desfechos desfavoráveis do tratamento de pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) e leucemia promielocítica aguda (LPA), respectivamente. O objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos do aumento da expressão do gene *KMT2E* na leucemia mielóide aguda (LMA). Foi utilizada a linhagem celular U937, reconhecida como modelo de LMA, e o aumento da expressão do gene de interesse foi obtido por meio da transfecção das células com um vetor lentiviral contendo o cDNA codificante para a isoforma longa do gene (pCDH-MSCV-MCS-EF1-GFP+Puro, aqui chamado pMEG). As partículas lentivirais foram geradas por co-transfecção em células da linhagem HEK 293T, e posteriormente, titulados com a linhagem celular HT 1080. A expressão do gene e a presença da proteína foram confirmadas por qPCR e western blotting, respectivamente. Foram realizados ensaios funcionais de ciclo celular, proliferação, viabilidade, apoptose espontânea e induzida por trióxido de arsênio e luz ultravioleta e diferenciação celular induzida por *12-miristato 13-acetato de forbol* (TPA), com as amostras U937 *wild type* (WT), U937 pMEG (U937 transduzidas com o vetor vazio) e U937 pMEG-*KMT2E*. Também foram realizadas mensurações da massa tumoral das células inoculadas em camundongos NSG. A expressão relativa do gene *KMT2E* na célula U937 pMEG-*KMT2E* foi 1000 vezes mais alta que na célula U937 sem a modificação genética. Os ensaios de diferenciação celular demonstraram que as células U937 pMEG-*KMT2E* apresentaram maior diferenciação em monócitos/macrófagos que as células controles, quando levada em consideração a marcação para o antígeno CD11c. A expressão induzida de *KMT2E* em células U937 não alterou a proliferação, viabilidade, ciclo celular, apoptose,

espontânea ou induzida e o aspecto clonogênico *in vitro*, porém, foi associado a um maior crescimento tumoral em modelo animal. Nossa hipótese para justificar as diferenças entre os achados *in vitro* e *in vivo* é que o aumento da expressão de *KMT2E*, talvez por meio do aumento de CD11c, facilitou a interação entre as células e o microambiente, estimulando assim o crescimento tumoral *in vivo*.

Palavras-chave: Hematologia. Leucemia mielóide aguda. *KMT2E*.

ABSTRACT

OLIVEIRA, J.P. **Functional analysis of KMT2E protein in acute myeloid leukemia.** 2017. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The human lysine methyltransferase 2E (*KMT2E*) gene belongs to the Trithorax (TrxG) group and acts as a histone modifying protein participating in the transcriptional regulation of hematopoiesis-related genes. *KMT2E* has been previously described as a tumor suppressor, involved in cellular differentiation, proliferation and cell cycle progression. DAMM et al. (2011) and LUCENA-ARAÚJO et al. (2014) described the association between low levels of *KMT2E* gene expression and poor treatment outcomes in patients with acute myeloid leukemia (AML) and acute promyelocytic leukemia (APL), respectively. The aim of this project was to study the effects of high levels of *KMT2E* expression in acute myeloid leukemia (AML). For this purpose, the U937 AML cell line was used and an high expression of the gene was obtained by transfecting the cells with a lentiviral vector containing the cDNA encoding the long isoform of the gene (pCDH-MSCV-MCS-EF1-GFP + Pure, here called pMEG). The lentiviral particles were transfected into HEK 293T cells and the viral concentration was determined by titration using HT 1080 cells. The gene expression and the protein presence were confirmed by qPCR and western blotting, respectively. All experiments to determine the biological function of overexpressed *KMT2E* were conducted with U937 wild type, U937 pMEG (U937 transduced with the empty vector) and U937 pMEG-*KMT2E* cells. In-vitro the impact of overexpressed *KMT2E* was studied on cell cycle progression, proliferation and cell viability, spontaneous and induced apoptosis by arsenic trioxide and ultraviolet light and cell differentiation induced by 12-myristate 13-phorbol acetate (TPA). *In vivo*, the effect of overexpressed *KMT2E* was detected by comparing the tumor mass growth in NSG mice when inoculating U937 pMEG and pMEG-*KMT2E* cells in each flank of the same mouse. The relative expression level of the *KMT2E* gene in pMEG-*KMT2E* U937 cells was 1000 higher than in the wild type U937 strain. The cell differentiation assay revealed that U937 pMEG-*KMT2E* cells presented an increased monocyte/macrophage differentiation, when analyzing the CD11c antigen. Induced

overexpression of *KMT2E* in U937 cells did not alter cell proliferation, cell viability, cell cycle progression, spontaneous or induced apoptosis or clonogenic appearance *in vitro*. However, the overexpression of *KMT2E* resulted in an increased tumor mass formation *in vivo*. Taking our discrepant *in vitro* and *in vivo* results into account, we could hypothesize that the increased expression of *KMT2E*, possibly caused by the enhanced expression of CD11c, favored the interaction between U937 pMEG-*KMT2E* cells and their microenvironment, thereby stimulating tumor growth *in vivo*.

Key words: Hematology. Acute myeloid leukemia. *KMT2E*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composição de domínios dos membros da família KMT2. A imagem representa os integrantes da família KMT2 e seus respectivos tamanhos, em aminoácidos (aa), assim como, os domínios para ligação proteína-proteína, PDH e SET, e os domínios para ligação ao DNA, post-SET e A-T hooks. Adaptado de LIU; WESTERGARD; HSIEH, 2009.	6
Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose dos DNA plasmidiais usados nos experimentos de transfecção. M: marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega, EUA). A: pMEG-KMT2E não digerido. B: pMEG-KMT2E digerido com BamHI e EcoRI, liberando o gene de interesse (banda de 5589 pb). C: pMEG vazio não digerido. D: pMEG vazio digerido com EcoRI (banda de 8256 pb). E: ΔR8.2 não digerido. F: ΔR8.2 digerido com BamHI (banda de 13463 pb). G: VSV-G não digerido. H: VSV-G digerido com SpeI (banda de 6363 pb).	18
Figura 3 - Sequenciamento do gene <i>KMT2E</i> inserido no plasmídeo pMEG. A imagem ilustra a sobreposição das sequências geradas pelo sequenciamento de Sanger. A análise da sequência adquirida não evidenciou mutação espontânea.....	20
Figura 4 - Titulação dos lentivírus em células HT 1080, coradas com violeta cristal. A: ausência de lentivírus, B: diluição 1:50, C: diluição 1:100, D: diluição 1:1000, E: diluição 5000 e F: diluição 10000.	24
Figura 5 - Anticorpos utilizados na caracterização imunofenotípica das células U937 transduzidas. A análise foi realizada a partir da <i>gate</i> positiva para o anticorpo humano anti-CD45 APC-H7 (BD Biosciences, EUA). A cada tubo foi adicionado um grupo diferente de anticorpos humanos para a leitura no citômetro BD FACSCanto II (Becton–Dickinson, EUA).	26
Figura 6 - Expressão gênica de <i>KMT2E</i> entre linhagens de leucemia mielóide aguda. A expressão do gene <i>KMT2E</i> foi determinada nas células NB4, Kasumi-1, K562, U937, MV4-11, OCI-AML3 e THP-1 por PCR em tempo real usando o reagente <i>PowerSyber Green Master Mix</i> (Applied Biosystems, EUA). Os valores de expressão gênica de cada linhagem são relativos ao valor de expressão na linhagem U937.	39
Figura 7 - Análise da expressão de GFP em células U937 após transdução com vetor lentiviral contendo o gene <i>KMT2E</i> . O primeiro histograma mostra as células WT, que não foram transduzidas, e, portanto, não apresentam sinal de GFP positivo. O segundo histograma mostra a expressão de GFP das células transduzidas com vetor vazio pMEG. O último histograma apresenta a expressão referente às células transduzidas com o vetor pMEG-KMT2E. Os valores acima e à direita indicam a porcentagem de células positivas.	40

Figura 8 - Imagem representativa da expressão do gene <i>KMT2E</i> a partir da sequência otimizada inserida no plasmídeo pMEG- <i>KMT2E</i> na linhagem U937. As células U937 não transduzidas (WT) ou transduzidas com o vetor vazio (pMEG) não apresentaram amplificação da sequência do gene inserido no vetor. As demais replicatas encontram-se no apêndice.	41
Figura 9 - Detecção por western blotting da proteína <i>KMT2E</i> após transdução lentiviral nas células U937. As bandas são referentes aos extratos proteicos totais U937 WT (A), U937 pMEG (B), U937 pMEG- <i>KMT2E</i> (C), neutrófilos (D), representando o controle negativo, e HS-5 (D), representando o controle positivo. A proteína GAPDH foi usada como controle endógeno.	41
Figura 10 - Morfologia das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG- <i>KMT2E</i> e reação citoquímica para esterase não específica. Preparações de citocentrífuga das células coradas com corante de Leishman (A). Reação citoquímica das células para esterase não específica (B).	43
Figura 11 - Perfil imunofenotípico das células U937 WT (A), U937 pMEG (B) e U937 pMEG- <i>KMT2E</i> (C). Q1 identifica as células com a marcação para o anticorpo descrito no eixo Y; Q2 identifica células com dupla marcação (anticorpos descritos nos eixos X e Y); Q3 identifica células com marcação descrita no eixo X e Q4 identifica as células não marcadas. No primeiro e segundo quadro de cada grupo de gráficos pode-se ver a seleção de células viáveis e a <i>gate</i> para células marcadas com anti-CD 45 APC-H7, respectivamente.	44
Figura 12 - Ciclo celular das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG- <i>KMT2E</i> . Histogramas representativos de um experimento em quadruplicata (A). Gráfico de barras mostrando a distribuição das porcentagens de células em cada fase do ciclo celular, segundo a expressão de <i>KMT2E</i> (B).	45
Figura 13 - Proliferação das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG- <i>KMT2E</i> através de reagente MTT. A proliferação e/ou viabilidade celular foram determinadas após incubação das células por 48 horas.	46
Figura 14 - Proliferação das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG- <i>KMT2E</i> através da marcação do antígeno Ki-67. A proliferação celular foi determinada após 24 horas de <i>starvation</i> . MIF: média da intensidade de fluorescência.	46
Figura 15 - Proliferação e viabilidade das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG- <i>KMT2E</i> através de contagem em câmara de Neubauer. Proliferação celular determinada através de contagem em 24, 48 e 72 horas (A). Viabilidade celular determinada através de contagem em 24, 48 e 72 horas e marcação com <i>Trypan Red</i> (B).	47
Figura 16 - Apoptose basal das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG- <i>KMT2E</i> . Gráficos do tipo <i>dot plot</i> representativos de um experimento em triplicata (A). Q1 identifica porcentagem de células em necrose (células positivas para a marcação com PI); Q2 identifica porcentagem de células em apoptose tardia (células positivas para a marcação com anexina-V e PI); Q3 identifica porcentagem	

de células em apoptose inicial (células positivas para a marcação com anexina-V) e Q4 identifica porcentagem de células viáveis (células negativas para ambas as marcações). Gráfico de barras, mostrando a média e desvio padrão das porcentagens de células em apoptose (inicial e tardia) segundo a expressão de *KMT2E* (B). 48

Figura 17 - Apoptose induzida por trióxido de arsênico (ATO) nas células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E*. Gráficos do tipo *dot plot* representativos de um experimento em quintuplicata (A). Q1 identifica porcentagem de células em necrose (células positivas para a marcação com PI); Q2 identifica porcentagem de células em apoptose tardia (células positivas para a marcação com anexina-V e PI); Q3 identifica porcentagem de células em apoptose inicial (células positivas para a marcação com anexina-V) e Q4 identifica porcentagem de células viáveis (células negativas para ambas as marcações). Gráfico de barras, mostrando a média e desvio padrão das porcentagens de células em apoptose (inicial e tardia) segundo a expressão de *KMT2E* (B). ($p = 0,6335$)..... 49

Figura 18 - Apoptose induzida por luz ultravioleta (UV) nas células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E*. Gráficos do tipo *dot plot* representativos de um experimento em quadruplicata (A). Q1 identifica porcentagem de células em necrose (células positivas para a marcação com PI); Q2 identifica porcentagem de células em apoptose tardia (células positivas para a marcação com anexina-V e PI); Q3 identifica porcentagem de células em apoptose inicial (células positivas para a marcação com anexina-V) e Q4 identifica porcentagem de células viáveis (células negativas para ambas as marcações). Gráfico de barras, mostrando a média e desvio padrão das porcentagens de células em apoptose (inicial e tardia) segundo a expressão de *KMT2E* (B) ($p = 0,6677$)..... 50

Figura 19 - Análise de diferenciação celular induzida pelo tratamento com 20 nM de TPA nas células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E*. As amostras foram tratadas com a droga e incubadas por 48 e 72 horas e marcadas com anti-CD11c APC (A). A MIF de cada condição aumentou após o tratamento, mostrando que ocorreu a diferenciação monocítica. As células U937 contendo o gene *KMT2E* apresentaram um valor estatisticamente maior do que o valor dos dois controles no tempo de 72 horas (B). 51

Figura 20 - Morfologia das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E* e reação citoquímica para esterase não específica após 72 horas de incubação com TPA. Preparações de citocentrífuga das células coradas com corante de Leishman após tratamento com DMSO por 72 horas (A). Preparações de citocentrífuga das células coradas com corante de Leishman após tratamento com TPA por 72 horas (B). Reação citoquímica para esterase após tratamento com DMSO por 72 horas (C). Reação citoquímica para esterase após tratamento com TPA por 72 horas (D)..... 52

Figura 21 - Ensaio de formação de colônias. As células foram plaqueadas em meio semissólido de metilcelulose e incubadas por 8 dias. Após marcação com MTT para corar as colônias, as mesmas

foram contadas. Os grupos não mostraram diferença significativa entre si, apresentando o mesmo padrão clonogênico.....	53
Figura 22 - Volume das massas tumorais formadas pelas células U937 pMEG e U937 pMEG- <i>KMT2E</i> . Os tumores apresentaram aumento diário de crescimento, sendo que os que continham o gene de interesse mostraram uma tendência de maior volume.....	54
Figura 23 - Peso das massas tumorais formadas pelas células U937 pMEG e U937 pMEG- <i>KMT2E</i> . Cada marcação representa um animal analisado. Os tumores formados pelas células U937 pMEG- <i>KMT2E</i> mostraram uma diferença significativa de peso em relação aos demais.	54
Figura 24 - Análise de proliferação celular das massas tumorais formadas pelas células U937 pMEG e U937 pMEG- <i>KMT2E</i> . Cada marcação representa um animal analisado. Os tumores formados pelas células U937 pMEG- <i>KMT2E</i> apresentaram uma tendência a proliferar menos em relação aos demais, uma vez que revelaram menos células positivas para o antígeno Ki-67.	55
Figura 25 - Replicatas da análise da expressão do gene <i>KMT2E</i> a partir da sequência otimizada inserida no plasmídeo pMEG- <i>KMT2E</i> na linhagem U937. Ambos os gráficos representam as outras duas replicatas experimentais realizadas além do gráfico exposto nos resultados desse trabalho. ...	73
Figura 26 - Análises de diferenciação celular induzida pelo tratamento com 20 nM de TPA nas células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG- <i>KMT2E</i> através da marcação com anticorpos anti-CD11b e anti-CD14. As amostras foram tratadas com a droga e incubadas por 48 e 72 horas e marcadas com anti-CD11b (PE) e anti-CD14 APC (BD Biosciences, EUA). A média de intensidade de fluorescência dos grupos não alterou para esses marcadores, não mostrando diferença significativa de eficiência de diferenciação.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das linhagens celulares humanas.	13
Tabela 2 - Plasmídeos digeridos usados na transfecção viral. A tabela mostra as respectivas enzimas de restrição usadas para cada vetor e o tamanho esperado dos mesmos (pb).	17
Tabela 3 - Sequência dos iniciadores utilizados no sequenciamento do gene <i>KMT2E</i> inserido no vetor pMEG. Foram utilizados iniciadores no sentido <i>forward</i> da fita, cobrindo toda a sequência do gene e amplificando fragmentos com regiões que se sobrepõem entre si, para a realização da análise.	19
Tabela 4 - Sequência dos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real para análise da expressão do gene <i>KMT2E</i> . A sequência descrita como <i>KMT2E</i> basal analisa a expressão do gene presente naturalmente no DNA das linhagens. Os iniciadores denominados <i>KMT2E</i> otimizado são referentes à sequência enviada pela empresa GenScript (EUA).	22
Tabela 5 - Características dos anticorpos utilizados na reação de western blotting.	28
Tabela 6 - Cálculo da concentração de inibição média (IC ₅₀) de Trióxido de Arsênico (ATO) em células U937 após tratamento de 24 horas. Tabela contendo os valores de ATO utilizados (μM) e os respectivos valores de porcentagem de células apoptóticas. Os valores de anexina-V positivos finais (presente na tabela) foram determinados fazendo a subtração entre as porcentagens de apoptose com ATO e os valores com o controle NaOH, respectivos. A IC ₅₀ encontrada para o tratamento de 24 horas foi de 3 μM.	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leucemias Mielóides Agudas	1
1.2. O gene humano <i>lysine methyltransferase 2E (KMT2E)</i>	5
2. OBJETIVOS GERAIS	10
2.1. Objetivos específicos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Linhagens celulares e condições de cultivo	12
3.2. Preparação dos vetores de infecção viral	13
3.2.1. Clonagem e expansão do vetor contendo o gene de interesse	13
3.2.2. Digestão enzimática dos vetores.....	16
3.2.3. Sequenciamento do gene <i>KMT2E</i> inserido no vetor.....	18
3.3. Verificação dos níveis de expressão basal do gene de interesse em linhagens de LMA	20
3.3.1. Extração de RNA das linhagens	20
3.3.2. Síntese de DNA complementar dupla fita (cDNA)	21
3.3.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRq) para análise da expressão relativa do gene <i>KMT2E</i>	21
3.4. Superexpressão do gene <i>KMT2E</i> na linhagem U937.....	23
3.4.1. Transfecção da linhagem HEK 293T para geração de partículas virais	23
3.4.2. Titulação viral do gene de interesse a partir da linhagem HT 1080.....	24
3.4.3. Transdução da linhagem U937 com o gene de interesse	25
3.5. Característica imunofenotípica das células U937	25
3.6. Análise de expressão proteica.....	27
3.6.1. Extração de proteínas.....	27
3.6.2. Quantificação de proteínas	27
3.6.3. Western blotting	28
3.7. Ensaio funcionais das células U937 WT, pMEG e pMEG- <i>KMT2E</i>	29
3.7.1. Avaliação de ciclo celular	29
3.7.2. Análise de proliferação celular com o reagente MTT	29
3.7.3. Análise de proliferação celular por imuno-histoquímica para Ki-67.....	30
3.7.4. Análise de proliferação celular a partir da contagem em Câmara de Neubauer.....	31
3.7.5. Avaliação de apoptose basal por marcação com anexina-V (APC) e PI	31

3.7.6.	Análise de apoptose induzida	32
3.7.6.1.	Cálculo da concentração de inibição média (IC ₅₀) de Trióxido de Arsênico (ATO)	32
3.7.6.2.	Indução de apoptose por ATO e luz ultravioleta.....	33
3.7.7.	Avaliação de diferenciação celular	33
3.7.8.	Análise morfológica celular por citocentrifugação	34
3.7.9.	Esterase não específica	34
3.7.10.	Ensaio Clonogênico	35
3.8.	Ensaio <i>in vivo</i>	35
3.8.1.	Indução de tumores em camundongos NSG.....	35
3.8.2.	Mensuração da massa tumoral.....	36
3.8.2.1.	Dimensões e Peso.....	36
3.8.2.2.	Corte histológico	36
3.9.	Análise Estatística.....	36
4.	RESULTADOS	39
4.1.	Verificação do nível de expressão basal do gene <i>KMT2E</i> nas linhagens de LMA	39
4.2.	Transdução das células da linhagem U937 com lentivírus contendo o gene <i>KMT2E</i>	40
4.3.	Análises de características morfológicas e imunofenotípicas das células U937 após transdução lentiviral	42
4.4.	Análise da proliferação e ciclo celular das células U937 superexpressando ou não <i>KMT2E</i>	45
4.5.	Análise de apoptose basal e induzida nas células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG- <i>KMT2E</i> 47	50
4.6.	Diferenciação celular a partir de tratamento com TPA	53
4.7.	Ensaio clonogênico.....	53
4.8.	Mensuração da massa tumoral <i>in vivo</i>	53
5.	DISCUSSÃO	57
6.	CONCLUSÕES.....	64

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leucemias Mielóides Agudas

As leucemias mielóides agudas (LMAs) são um conjunto de doenças heterogêneas malignas de células progenitoras hematopoiéticas, que perdem a capacidade de se diferenciar e responder aos estímulos que regulam sua proliferação e morte celular, resultando no acúmulo de blastos (ESTEY; DÖHNER, 2006; SWERDLOW et al., 2008; ZAGO, 2013). Essas células tumorais se acumulam na medula óssea e impedem o desenvolvimento natural das células sanguíneas, comprometendo a hematopoiese, podendo adentrar outros tecidos e órgãos. São doenças de caráter genético, e na maior parte das vezes, não hereditário. Para o diagnóstico ser considerado LMA é necessária a identificação de $\geq 20\%$ de blastos mielóides leucêmicos na medula óssea ou no sangue periférico, ou, $< 20\%$ de blastos mielóides em presença de anormalidades citogenéticas específicas para LMA (KANSAL, 2016; SWERDLOW et al., 2008). A classificação das leucemias tiveram várias mudanças ao longo da história, sendo que hoje a mais utilizada é a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) que dividiu as doenças em categorias de acordo com a combinação de morfologia, imunofenótipo, aspectos genético-moleculares e síndromes clínicas (ARBER et al., 2016).

As LMAs são mais comuns em pacientes idosos, sendo a média de diagnóstico de 67 anos nos Estados Unidos (*NATIONAL CANCER INSTITUTE*, 2013). Os diagnósticos abaixo de 45 anos representam apenas 17% dos casos totais e sua incidência anual é de 4,1/100 mil habitantes. As taxas de morte anuais são de 2,8/100 mil habitantes e apenas 26% da população possui uma sobrevivência de, pelo menos, 5 anos após o diagnóstico da doença (*NATIONAL CANCER INSTITUTE*, 2013). No Brasil, a estimativa não é conhecida porque o Instituto Nacional do Câncer (INCA) relata casos de leucemias agudas no geral, não especificando o subtipo mielóide. De acordo com dados do INCA, aproximadamente, 10 mil casos foram esperados em 2016 para leucemias agudas (mielóide e linfóide),

sendo a média de casos anual para 100 mil habitantes de 5,63 para homens e 4,38 para mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016).

A etiologia das leucemias mielóides agudas ainda não é inteiramente compreendida, no entanto, estão associadas com alguns fatores. A exposição ao benzeno, encontrado na fumaça de cigarro, pode causar aberrações nos cromossomos 5 e 7 e translocações balanceadas entre os cromossomos 8 e 21 (ESTEY; DÖHNER, 2006; POGODA et al., 2002). Um estudo realizado por STROM et al. (2012), mostrou que há alta taxa de risco em pessoas fumantes que estão expostas à solventes. Assim, como um significativo aumento do risco em obesos. A radiação ionizante e a quimioterapia citotóxica aplicada no tratamento de outros tumores, geralmente tumores sólidos, também são considerados fatores de risco, uma vez que podem proporcionar alterações no cromossomo 11, monossomia dos cromossomos 5 e 7 e translocações balanceadas entre os cromossomos 15 e 17 (ESTEY; DÖHNER, 2006; SMITH et al., 2003).

O tratamento quimioterápico padrão aplicado nos últimos 30 anos, com pequenas variações, é a combinação de antraciclina (daunorrubicina ou idarrubicina) e citarabina (LÖWENBERG; GRIFFIN; TALLMAN, 2003; STONE; O'DONNELL; SEKERES, 2004; TALLMAN; GILLILAND; ROWE, 2005). Fatores essenciais a serem avaliados antes do tratamento são a idade do paciente, presença de alterações cromossômicas e mutações genéticas nos mieloblastos, uma vez que podem acarretar resistência ao tratamento (ESTEY; DÖHNER, 2006; MRÓZEK; HEINONEN; BLOOMFIELD, 2001; SLOVAK et al., 2000). Foram descritos vários fatores prognósticos de base molecular e/ou citogenética, como por exemplo, o impacto negativo de duplicações no gene *FLT3* e *MLL* ou o tipo de translocação que pode ser encontrada (LEVIS; SMALL, 2003; POPPE et al., 2004; STONE; O'DONNELL; SEKERES, 2004).

A análise do cariótipo no momento do diagnóstico fornece a informação prognóstica mais importante em adultos com LMA (BYRD et al., 2002; GRIMWADE et al., 1998). Aproximadamente, 55% dos casos diagnosticados de leucemia mielóide aguda, apresentam anormalidades cromossômicas (BYRD et al., 2002; MRÓZEK; HEINONEN; BLOOMFIELD, 2001; SLOVAK et al., 2000). Um exemplo de cariótipo aberrante de bom prognóstico é a leucemia promielocítica aguda (LPA), que está associada, em 98% dos casos, com translocações recíprocas e

balanceadas entre os cromossomos 15 e 17 (t(15;17)(q22;q21)) (HE et al., 1997; VARDIMAN et al., 2009). Essa translocação cromossômica gera um gene híbrido que codifica para uma proteína de fusão PML/RAR α , que atua bloqueando a diferenciação mielocítica (MINUCCI et al., 2002). Na maior parte dos casos, esse tipo de leucemia responde bem ao tratamento com ácido all-*trans*-retinóico (ATRA), derivado da vitamina A, associado à quimioterapia (DEGOS et al., 1995). Em oposição, a translocação entre os cromossomos 10 e 11, t(10;11)(p13;q14), que resulta no gene de fusão *CALM/MLLT10*, está associado a uma pior resposta ao tratamento e uma menor sobrevida livre de doença e sobrevida global (DREYLING et al., 1996; FIELDING et al., 2007; HARNED; GAYNON, 2008). Sua presença já foi descrita também em pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA) e linfoma não-Hodgkin, em leucemias de linhagens mistas e na linhagem celular imortalizada U937 (BOHLANDER et al., 2000; DREYLING et al., 1996; KUMON et al., 1999; NARITA et al., 1999; OU; LIU; YAN, 2004).

Aproximadamente metade dos pacientes não apresentam aberrações cromossômicas. Todos os casos de LMA com cariótipo normal (LMA-CN) são categorizados no grupo de risco intermediário, embora o mesmo seja bastante heterogêneo (ESTEY; DÖHNER, 2006; LÖWENBERG; GRIFFIN; TALLMAN, 2003). Nesses casos, recomenda-se verificar mutações nos genes *NPM1* (nucleofosmina 1), *FLT3* (Fms-like tyrosine kinase 3), *CEBPA* (fator de transcrição CCAAT enhancer-binding protein alpha) e *MLL* (mixed-lineage leukemia gene) (SCHLENK et al., 2009; ZAGO, 2013). A mutação no gene *NPM1* corresponde a cerca de 60% dos casos de LMA-CN (FALINI et al., 2005) e, por ser um gene considerado supressor tumoral, essas mutações podem ser críticas para a transformação maligna. Porém, na ausência de alterações no gene *FLT3*, as mutações no gene *NPM1* são consideradas de bom prognóstico, permitindo uma melhor resposta a quimioterapia e uma maior sobrevida global (DÖHNER et al., 2005; FALINI et al., 2005).

Alterações no gene *FLT3* (*FLT3-ITD*) têm sido detectadas em cerca de 30% dos pacientes adultos e 15% dos pacientes pediátricos (GILLILAND; GRIFFIN, 2002; MESHINCHI et al., 2002; STIREWALT et al., 2001). Estudos evidenciam um pior prognóstico em pacientes com menos de 60 anos que possuem essa mutação, uma vez que *FLT3-ITD* está relacionada com aumento do número de leucócitos e blastos, diminuição da taxa de remissão por indução, diminuição da sobrevida livre de

doença e sobrevida global (ABU-DUHIER et al., 2000; KOTTARIDIS et al., 2001; THIEDE et al., 2002; WHITMAN et al., 2001). O gene *CEBPA*, também importante no prognóstico, localizado no cromossomo 19, é um dos principais reguladores da diferenciação celular (ANTONSON; XANTHOPOULOS, 1995; KOSCHMIEDER et al., 2009) e mutações nesse gene são encontradas em cerca de 7% a 22% dos casos de LMA-CN. Quando estas acontecem nos dois alelos, podem indicar um prognóstico mais favorável, conferindo uma maior sobrevida global.

Estudos recentes de sequenciamento de exoma demonstram que os genes pertencentes à família *lysine methyltransferase 2* (*KMT2*) estão comumente mutados em diversos tipos de cânceres humanos (KANDOTH et al., 2013). Essa família pertence ao grupo Trithorax, composto de proteínas modificadoras de histonas envolvidas no controle transcricional de genes relacionados com a hematopoiese (EMERLING et al., 2002; ERNST et al., 2004). A família *KMT2* é altamente conservada entre os eucariotos e três subgrupos da mesma estão presentes em *Drosophila*: TRX, TRR e SET1 (EMERLING et al., 2002; RAO; DOU, 2015; SCHUETTENGROBER et al., 2011). Rearranjos no gene *KMT2A* (também conhecido por *MLL*), duplicações *in tandem* e amplificação do número de cópias do mesmo identificam um grupo de leucemia bifenotípica, onde blastos leucêmicos expressam marcadores mielóides e linfóides (RAO; DOU, 2015). Essas anormalidades, juntas, estão presentes em 10% das leucemias humanas e estão associadas a um pior prognóstico. Entretanto, na maior parte dos casos, a região C-terminal da proteína *MLL* é removida por translocações cromossômicas, formando diferentes genes de fusão.

Diferentes níveis de expressão de genes envolvidos na proliferação, sobrevida, ciclo celular e diferenciação também são importantes para a análise de prognóstico, predizendo uma melhor ou pior resposta ao tratamento. O gene *MN1* (meningioma 1), quando em altos níveis de expressão em pacientes diagnosticados com LMA-CN com 60 anos ou menos, está associado com falha no tratamento, aumento da taxa de recaída e baixa sobrevida livre de doença e sobrevida global, (HEUSER et al., 2006). Similarmente, o gene *BAALC* (*brain and acute leukemia, cytoplasmic*), presente nos precursores hematopoiéticos e tecidos neuroectodermais, e o gene *ERG* (*ETS-related gene*), envolvido na proliferação e diferenciação celular e apoptose, são considerados fatores prognósticos adversos e

podem definir um importante fator de risco para LMA-CN quando superexpressos (BALDUS et al., 2003; MARCUCCI et al., 2007).

Outros estudos descrevem resultados aditivos, mostrando que o nível de expressão de determinados genes apresenta importância nos resultados de tratamento em longo prazo, como o TGF- β e o supressor tumoral *WT1* (BERGMANN et al., 1997; WU et al., 2016, no prelo). Com o número de marcadores prognósticos crescendo, a contribuição relativa de cada um sobre a pesquisa se torna cada vez mais importante. Como as LMAs possuem um carácter genético, é essencial o estudo de genes que podem influenciar o prognóstico da doença a escolha do tratamento mais adequado.

1.2. O gene humano *lysine methyltransferase 2E (KMT2E)*

O gene humano *KMT2E* (lysine (K)-specific methyltransferase 2E), também conhecido como *mixed lineage leukemia 5 (MLL5)*, pertence ao grupo Trithorax e à família de genes *KMT2* (EMERLING et al., 2002; ERNST et al., 2004; HEUSER et al., 2009). Proteínas Trithorax (Trx-G) e Polycomb (Pc-G) regulam o desenvolvimento celular a partir da repressão ou expressão dos gene *HOX*, respectivamente (MILNE et al., 2002; GEISLER; PARO, 2015; POYNTER; KADOCH, 2016). Em especial, as do grupo Trx-G modulam a transcrição através de interações proteína-proteína mediadas pelos domínios PHD e SET, e ligam-se ao DNA através de motivos de homologia à metiltransferase e A-T *hooks*. A proteína KMT2E apresenta uma estrutura um tanto diferente dos demais membros do grupo (Figura 1). Possui apenas um domínio PHD *zinc finger* ao invés de um *cluster*, além de um domínio SET localizado na região N-terminal ao invés de C-terminal, aonde é comumente encontrado (EMERLING et al., 2002). A proteína KMT2E também se difere por não possuir domínio de homologia a metiltransferase e nem A-T *hooks*, o que sugere que ela provavelmente não se liga ao DNA, mas modula a transcrição gênica indiretamente, por meio de interações proteína-proteína através de seus domínios ativos (EMERLING et al., 2002; KOUZARIDES et al., 2002). SEBASTIAN et al. (2009) sugerem a aparente falta de atividade intrínseca de histona

metiltransferase de KMT2E, porém, mostram que o mesmo regula a expressão de enzimas modificadoras de histonas, como LSD1 e SET7/9, reforçando a hipótese de um mecanismo de ação indireto.

Figura 1 - Composição de domínios dos membros da família KMT2. A imagem representa os integrantes da família KMT2 e seus respectivos tamanhos, em aminoácidos (aa), assim como, os domínios para ligação proteína-proteína, PDH e SET, e os domínios para ligação ao DNA, post-SET e A-T *hooks*. Adaptado de LIU; WESTERGARD; HSIEH, 2009.

KMT2E está localizada em vários focos no núcleo celular e possui duas isoformas, sendo uma longa com 1.858 aminoácidos, e outra, curta, com 609 aminoácidos (DENG; CHIU; STROMINGER, 2004; FUJIKI et al., 2009). Seus domínios são altamente conservados, possuindo regiões idênticas ou de alta similaridade com sua ortóloga, upSET, presente em *Drosophila* (DENG; CHIU; STROMINGER, 2004; EMERLING et al., 2002). A proteína KMT2E é recrutada por mais de 15 mil regiões gênicas e se associa a diversas proteínas (ALI et al., 2013; CHENG et al, 2008; ZHOU, 2012), mostrando um papel diverso e multifuncional na manutenção genética.

O gene *KMT2E*, que codifica para a proteína KMT2E, é composto por 25 éxons e está presente no cromossomo humano 7q22, região frequentemente deletada em aberrações citogenéticas e leucemias mielóides. Sua expressão pode ser encontrada de forma ubíqua, possuindo maiores níveis no timo e rim fetal, cerebelo e tecido hematopoiético adulto (EMERLING et al., 2002). *Kmt2e* tem sido

descrito como um importante fator para a diferenciação mielóide e integridade das células tronco hematopoiéticas (MADAN et al., 2009; ZHANG et al., 2009).

O gene *KMT2E* foi previamente descrito como um possível supressor de tumor e seria esperado que o mesmo pudesse influenciar o andamento do ciclo celular (DENG; CHIU; STROMINGER, 2004; EMERLING et al., 2002). Alguns estudos evidenciam, de fato, uma regulação negativa de *KMT2E* sobre a divisão. A superexpressão do mesmo induz a parada do ciclo celular na fase G₀/G₁, tanto em células de rim embrionário, HEK 293T, que são altamente transformadas, como em células de linhagem de mioblastos murinos normais, C2C12 (DENG; CHIU; STROMINGER, 2004; SEBASTIAN et al., 2009). Sugere-se um papel indutor de quiescência em mioblastos murinos, além de prevenir expressão inapropriada de genes de fase S em células quiescentes de músculo (SAMBASIVAN; PAVLATH; DHAWAN, 2008; SEBASTIAN et al., 2009). Em contrapartida, estudos que silenciaram o gene *KMT2E* em células normais diploides (IMR-90, WI-38 e HEK 293T) e tumorais (U2OS, HeLa e HCT116), também mostram um bloqueio da proliferação celular relacionado à parada do ciclo nas fases: G₁ e G₂/M (CHENG et al., 2008; ZHOU et al., 2013).

Uma distinta isoforma da proteína KMT2E, conhecida por MLL5β, resulta da adição de 26 nucleotídeos no éxon 14 do RNA mensageiro (mRNA) de *KMT2E*, levando a introdução de um códon de parada. Tal processo gera uma proteína truncada de 503 aminoácidos, que está presente apenas em células primárias e de linhagem de HPV16/18 positivas (Yew et al., 2011). Essa isoforma, quando silenciada por RNAi, resulta na senescência e ativação da via de apoptose, além da diminuição da viabilidade celular, devido, entre outras coisas, a acumulação de p53 (NIN et al., 2015; Yew et al., 2011).

Sabe-se que o gene *KMT2E* também está relacionado com a diferenciação celular. Sebastian et al. (2009) mostra que o silenciamento do mesmo causa uma diferenciação profundamente defeituosa em células de mioblastos murinos, devido à expressão prejudicada de genes importantes para a via de diferenciação muscular, como *Pax7*, *Myf5* e miogenina. Resultado similar é demonstrado por KIM et al. (2010), que verificaram a associação transiente entre KMT2E e α-syntrophin durante a diferenciação de mioblastos, levando a uma regulação positiva de miogenina, fator chave na maturação muscular. A proteína KMT2E também se

apresenta associada com a diferenciação celular em ensaios *in vivo*. Camundongos machos com o gene *Kmt2e* inativado apresentam infertilidade, devido a defeitos na maturação tardia e mobilidade de seu espermatozoide (YAP et al., 2011; MADAN et al., 2009). A falta da proteína KMT2E leva a uma diferenciação deficiente da linhagem progenitora mielóide e à uma diminuição da capacidade das células tronco hematopoiéticas em repopular um ambiente comprometido (HEUSER et al., 2009; ZHANG et al., 2009).

Como a perda do cromossomo 7 ou deleções no mesmo são alterações genéticas comuns em malignidades mielóides, que geralmente indicam mau prognóstico, o gene *KMT2E* humano foi inicialmente identificado como um candidato a supressor de tumor (LUNA-FINEMAN et al., 1995; EMERLING et al., 2002). É possível que a inativação de um dos alelos do mesmo contribua para a leucemogênese por haploinsuficiência (EMERLING et al., 2002), embora as pesquisas *in vivo* não reportaram aumento da tumorigenicidade na deficiência de *KMT2E*. Pacientes com CBF-LMA (*core binding factor*), que envolvem t(8;21)(q22;q22) ou inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22), e LMA-CN, que possuem uma expressão gênica alta de *KMT2E*, fazem parte de um melhor prognóstico da doença, tendo maior sobrevida global, sobrevida livre de doença e uma maior taxa de resposta ao tratamento (DAMM et al., 2011). O mesmo resultado é observado em pesquisas do nosso grupo, quando o foco de estudo foi pacientes diagnosticados com LPA (LUCENA-ARAÚJO et al., 2014). Lucena-Araújo et al. (2014) mostram que baixos níveis de expressão do gene *KMT2E* foram associados com baixa taxa de remissão de LPA, menor sobrevida e maior risco de recaída na maioria dos pacientes tratados com ATRA e quimioterapia baseada em antraciclina.

Portanto, este trabalho teve como finalidade determinar se a superexpressão do gene *KMT2E* em linhagem celular de leucemia mielóide aguda (U937) modifica o crescimento, a viabilidade, apoptose espontânea ou após estímulos e a diferenciação celular induzida. Também, analisar se esta modificação genética altera o crescimento tumoral *in vivo*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da expressão induzida do gene *KMT2E* na linhagem U937 de leucemia mielóide aguda.

2.1. Objetivos específicos

- Produção do modelo lentiviral para indução da expressão gênica de *KMT2E*;
- Análise de proliferação e viabilidade, ciclo celular, apoptose basal e induzida por trióxido de arsênico (ATO) e luz ultravioleta (UV) e análise de diferenciação celular induzida por 12-miristato 13-acetato de forbol (TPA) nas células controle e transduzidas;
- Avaliação do crescimento da massa tumoral *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares e condições de cultivo

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as linhagens celulares U937, HEK 293T e HT-1080. A linhagem U937 é derivada de leucemia histiocítica humana, um tipo de leucemia considerada mielóide aguda (LMA). Seu cultivo foi realizado em meio de cultura RPMI 1640 (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado por calor (H.I. FBS, do inglês, *Heat Inactivated Fetal Bovine Serum*) em presença de 10000 U/mL de penicilina/streptomicina (Thermo Fisher Scientific, EUA), doravante denominado meio RPMI completo. As suspensões celulares foram mantidas em incubadora úmida com 5% de CO₂ a 37°C na densidade de 3.10⁵ células/mL. A manutenção do cultivo foi realizada duas vezes por semana, acompanhada da avaliação da viabilidade celular em câmara de Neubauer com o auxílio do corante vital *Trypan Red* 0,2% em PBS 1x (Sigma Aldrich, EUA).

Para o empacotamento das partículas virais, foi utilizada a linhagem aderente embrionária de rim HEK 293T, cultivada em meio IMDM suplementado com 10% de soro bovino fetal sem antibióticos (meio IMDM completo). A linhagem de fibrosarcoma HT-1080, que tem como característica a adesão ao plástico mesmo em altas densidades (RASHEED et al., 1974), foi empregada na titulação viral e mantida em meio α -MEM suplementado com 10% de soro bovino fetal sem antibióticos (meio α -MEM completo). Ambas as linhagens aderentes foram cultivadas em garrafa de 75 cm² em 15 mL de meio contendo 5.10⁵ células e repicadas ao atingirem uma confluência de 90%. Também foram cultivadas as linhagens K562, NB4 e Kasumi-1 (RPMI 1640 + 20% FBS) para extração de RNA e proteínas. Amostras de outras linhagens, THP-1, MV-4-11 e OCI-AML3, foram cedidas por colegas do grupo. Suas características podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características das linhagens celulares humanas.

Linhagem	Morfologia	Descrição
K562	Linfoblástica	Leucemia mielóide crônica, t(9;21)
Kasumi-1	Mieloblástica	Leucemia mielóide aguda M2, t(8;21)
MV4-11	Linfoblástica	Leucemia Mielomonocítica B bifenotípica, t(4;11) +8, +19
OCI-AML3	Mieloblástica	Leucemia mielóide aguda M4
NB4	Promieloblástica	Leucemia promielocítica aguda M3, t(15;17)
U937	Monocítica	Linfoma histiocítico*
THP-1	Monocítica	Leucemia monocítica aguda
HEK 293T	Epitelial	Células embrionárias de rim
HT-1080	Epitelial	Fibrosarcoma

*Linhagem celular utilizada como modelo de LMA (DICKSON et al., 2013).

3.2. Preparação dos vetores de infecção viral

3.2.1. Clonagem e expansão do vetor contendo o gene de interesse

A sequência de DNA complementar dupla fita (cDNA) do gene *KMT2E* (número de acesso no GenBank AF519459.1) foi selecionada e utilizada para clonagem em vetor de expressão lentiviral. A clonagem foi realizada pela empresa GenScript (EUA) e o vetor de escolha foi o pCDH-MSCV-MCS-EF1-GFP+Puro (pMEG), com 8256 pares de bases (pb). O mesmo foi desenhado de tal forma que a expressão do gene da proteína verde fluorescente (do inglês, *green fluorescent protein*, *GFP*) e do gene de resistência ao antibiótico puromicina, ocorra sob controle do promotor EF1 (do inglês, *Human elongation factor-1*), e a sequência de cDNA do gene de interesse, *KMT2E*, sob controle do promotor *murine embryonic stem cell*

virus (MSCV), indicado para altos níveis de expressão em células hematopoiéticas. Como os genes de resistência a puromicina e GFP estão separados por um sítio T2A ribossomal, todas as três proteínas são produzidas individualmente. O cDNA do gene *KMT2E* basal possui 6543 pb. Durante a clonagem do gene no vetor pMEG, a GenScript realizou uma otimização da sequência de cDNA do mesmo (*OptimunGene™ Codon Optimization Analysis - GenScript*), gerando um fragmento de 5589 pb. O algoritmo aperfeiçoou uma variedade de parâmetros que são críticos para uma maior eficiência da expressão gênica. No caso, o gene nativo empregava códons raros que podem reduzir a eficiência de tradução ou mesmo desengatar a maquinaria de tradução. Com esse procedimento, os códons foram otimizados e o conteúdo de GC foi aperfeiçoado de modo a aumentar a meia vida do RNA mensageiro (mRNA). Estruturas em forma de grampões, que diminuem a estabilidade do mRNA e dificultam sua ligação ao ribossomo, foram quebradas. A sequência gerada está descrita abaixo e, os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição EcoRI e BamHI, encontram-se destacados.

```
>GAATTCATGAGCATCGTGATCCCCCTGGGAGTGGACACCGCCGAAACATCCTATCTGGAAT
GGCAGCCCGGAAGCGAACCTGAAAGCGTGGAAGCCAGCCCTGTGGTTCGTGGAGAAGAGCAACTCCTACC
CACACCAGCTGTATACCAGCTCCTCTCACCATTCTCATAGTTACATTGGGCTGCCTTATGCAGACCAC
AATTACGGAGCCCCGGCCCCCTCCAACACCACCTGCCAGCCCACCACCTTCCGTCCTGATCTCTAAGAA
CGAAGTGGGGATTTTACCACACCAAATTTTGATGAAACCAGTTCAGCTACTACCATCTCAACAAGCG
AGGACGGCAGCTACGGCACAGATGTCACCTCGCTGCATCTGTGGGTTACCCACGACGATGGATATATG
ATTTGCTGTGACAAGTGCAGCGTGTGGCAGCATATTGACTGTATGGGAATCGATCGGCAGCACATTCC
CGACACATACCTGTGCGAGAGGTGTGAGCCTCGCAACCTGGATAAAGAACGCGCAGTGCTGCTGCAGC
GGAGAAAGCGGGAGAATATGAGCGACGGAGATACCAGTGCTACAGAATCAGGCGACGAGGTCCCAGTG
GAACTGTATACCGCATTTTACGCATACACCCACTTCCATTACCCTGACAGCCTCACGCGTCAGCAAGGT
GAACGATAAAAGGCGCAAGAAAAGCGGGCGAAAAGAGCAGCACATCTCCAAGTGCAAGAAAGCTTTCC
GAGAGGGCAGTCGGAAGAGCTCCAGAGTGAAGGGGTGAGCACCTGAAATCGACCCATCTAGTGATGGC
AGCAATTTTGGGTGGGAGACCAAAATTAAGGCCTGGATGGACCGGTACGAGGAAGCTAACAATAACCA
GTATTCCGAGGGGGTGCAGAGGGAAGCACAGCGCATCGCCCTGCGACTGGGAAACGGCAATGACAAGA
AAGAAATGAACAAGTCCGATCTGAATACCAATAACCTGCTGTTCAAACACCCGTGGAGTCACACATC
CAGAAGAACAAGAAAATTCTGAAAAGTGCTAAGGACCTGCCTCCAGATGCACTGATCATTGAGTACAG
GGGCAAGTTCATGCTGAGGGAACAGTTTGAGGCCAATGGGTATTTCTTTAAACGCCCTTACCCATTCTG
TCCTGTTTTATTCTAAGTTTCATGGGCTGGAAATGTGCGTGGACGCCCCGCACATTCGGAACGAGGCT
CGGTTTTATCCGACGGAGCTGTACTCCTAATGCCGAGGTGCGGCACGAAATCCAGGATGGCACCATTCA
TCTGTACATCTATTCCATTCACTCTATCCCAAAGGGAAGTGAAGATCACCATTTGCCTTCGACTTTGATT
ATGGCAACTGCAAATACAAGGTGCACTGCGCTTGTCTGAAAGAAAATCCAGAGTGTCCCGTGCTGAAG
AGATCAAGCGAAAGTATGGAGAACATCAATTCAGGGTATGAGACCAGAAGGAAGAAAGGAAGAAAGA
CGAGGACATCAGCAAGGAAAAGGACACACAGAACCAGAATATTACTCTGGATTGCGAGGGCGCCACTA
ACAAAATGAAGAGCCCAGAAACCAACAGCGCAAGCTGTCCCCCTGCGACTGTCCGTGTCTAATAAC
CAGGAGCCTGATTTTCATTGACGACATCGAGGAAAAAACCCCAATCTCAAATGAAGTGGAGATGGAAAG
CGAGGAACAGATTGCAGAACGGAAAAGAAAGATGACACGCGAGGAACGAAAGATGGAGGCCATTCTGC
AGGCATTTGCCCGGCTGGAAAAAAGAGAGAAGCGCCGAGAGCAGGCACTGGAAAGAATCTCCACAGCC
```

AAGACTGAGGTGAAAACAGAGTGTAAGGACACTCAGATCGTCTCCGATGCCGAAGTGATCCAGGAACA
GGCCAAGGAGGAAAACGCTTCTAAACCCACTCCTGCTAAAGTGAATAGGACCAAACAGCGCAAGAGTT
TCTCAAGGAGCCGCACTCATATCGGCCAGCAGCGGAGAAGGCACAGGACCGTGAGTATGTGCTCAGAC
ATCCAGCCTTCTCTCCAGATATTGAGGTCACCAGCCAGCAGAACGACATCGAAAATACCGTGCTGAC
AATTGAGCCTGAACTGAGACCGCTCTGGCAGAGATCATTACAGAACTGAGGTCCAGCCCTGAACA
AGTGTCCCAACAAATACCCTAAGACAAAGAAACACCTGGTGAACGAGTGGCTGAGCGAGAAGAACGAG
AAGACCGGAAAACCAAGCGACGGAAGTGTCCGAGCGGCCCTGAGAATCACAAGTATCCTGAAGTCCT
GGCCACACAGCTGAAGTCCCTGCCCGGGCTGACATATTCTCCTCACGTGTACAGTACTCCAAAGCACT
ATATCAGGTTTACCTCTCCCTTTCTGAGTGAGAAACGCCGACGGAAGGAACCTACCGAGAATATTTCC
GGATCTTGCAAGAAAAGATGGCTGAAACAGGCTCTGGAGGAAGAGAACTCTGCAATCCTGCACAGGTT
CAATAGTCCTTGCCAGGAGCGAAGTCGGTACCAGCCGTGAACGGCGAAAATAAGAGCCCCCTGCTGC
TGAACGACAGCTGTTCCCTGCCAGATCTGACCACACCCCTGAAGAAAAGAAGTTTCTACCAGCTGCTG
GACAGCGTGATTTCCGAGACCTCTACACCAACTCCCTCCCCTTACGCTACCCCCACACACACTGACAT
CACACCCATGGACCCCTCTTTTGCAACTCCCCCTCGGATCAAGAGTGACGATGAGACCTGCAGGAATG
GCTACAAGCCTATCTATAGCCCAGTCACTCCCGTGACCCCTGGGACACCAGGAAACACTATGCACTTC
GAGAATATCAGTTCACCAGAGAGCTCCCCGAGATCAAGCGCCGAACCTATTCCAGGAGGGCTACGA
TCGCTCTAGTACTATGCTGACCCTGGGGCCATTTTCGGAACCTCTAATCTGACAGAGCTGGGCCTGCAGG
AAATTAAGACAATCGGGTACACTAGTCCCAGATCAAGGACTGAAGTCAACCGCCAGTGTCTTGAGAA
AAAGAGCCAGCCTCCGACCTGCAGCTGGGCCTGGATGCAGTGGAGCCTACCGCCCTGCATAAGACACT
GGAGACTCCAGCTCACGACCGCGCAGAACCCAACTCTCAGCTGGATAGCACCCACTCCGGGCGGGGAA
CAATGTATTCAAGCTGGGTGAAGTCTCCCGACAGTACAGGCGTCAATTTCTCAGTGAACAGCAATCTG
CGGGATCTGACTCCACCACACCAGCTGGAAGTGGGAGGAGGCAGCCGGATCAGCGAGAGTAAGTGCCT
GATGCAGGACGATAACCAGGGCATGTTTCATGGAGACTACCGTGTTTTGTACAAGCGAAGACGGGCTGG
TCTCCGGCTTCGGGAGAACAGTGAACGACAATCTGATTGATGGAACTGCACTCCCCAGAATCCTCCA
CAGAAGAAAAAGGTGAGCCTGCTGGAATACCGCAAACGACAGCGGAAGGCCAGGAAATCAGGCAGCAA
GACCGAGAACTTTCCCCTGATCTCCGTGTCTCCTCATGCTAGTGGATCACTGAGCAATAACGGAGATG
GCTGCGCATCCTCTAACGACAATGGCGAGCAGGTGATCACACCGCCTCTCTGCCACTGCCAACCCCT
GCTACAGTGTACAACGCAACCTCAGAAGAGACAAGCAATAACTGTCCAGTCAAAGACGCCACAGCCAG
CGAGAAGAATGAACCCGAGGTGCAAGTGGACTGCCTCCACCTCTGTGAGCAGGTGAGAGAAAGGTCA
ATCAGAGAGCTCTGCTGCTGAGCGATCATAGGAAAGACAAGGATTCCGGCGGGGAGTCTCCATGCGTC
AGTTGTTTACCCAGCCACGTGCAGAGTTTACCCAGCTCCCATAGCAACCACATCCCTCAGCTGCAGGC
AAAGGGACCAGTGCCATCCTTCTCTGAACTGATGGAGGACCCTGATCCAGAAAACCCCGAGCCTACAA
CTACCAATGAGTGCCCAAGTCCCGACACTTCACAGAATACCTGTAAGTCAACCCCTAAGATGAGCAAA
CCAGGCTCCCCCTGGGTCTGTGATCCAGCACAGGCACATGGCAAAATCTTCACCAAGCCTGACCCACA
GTGGGATTCCACAGTCAGTGCCTCAGAAGCTGAGAACGGGGTGCACCTGAAAACCGAGCTGCAGCAGA
AGCAGCTGTCCAATAATAATCAGGCCCTGTCTAAGAACCATCCACCCAGACCCACGTGAGAAATTCT
AGTGAACAGCTGTCCAGAACTGCCATCTGTGCCACAAAGCTGCATTGTCTTCAAGCCCCCACCT
GGAGAACCCCCCTAAATCAAGCACACCTCATACTCCAGTGCAGCACGGGTACCTGAGTCCCAAGCCAC
CCTCACAGCAGCTGGGAAGCCCCCTATAGGCCCTACCATAGCCAGTCCCCTCAAGTGGGAACCCCTCAG
CGAGAGCCACAGCGGAATTTCTACCCTGCCGCTCAGAACCTGCCAGCCAATACACAGCAGGCTACCTC
CGGAACACTGTTTACCCAGACACCTTCCGGCCAGTCTCTGCCACTTATTCTCAGTTTAAACCAGCAGA
GCCTGAACAGCACCGCTCCTCCTCCTCCTCCACCCCCACCACCCAGTTCAAGCTACTATCAGAACCAG
CAGCCCAGCGCCAATTTCCAGAACTACAATCAGCTGAAGGGCTCTCTGAGTCAGCAGACCGTGTTTAC
CAGCGGACCAAACCAGGCTCTGCCTGGAACAATTTCCAGCAGACAGTCCCCGGCCACCATGTGACTC
CTGGGCATTTTTCTGCCAGCCAGAATCCTACTATTACCATCAGACCGCAGCCGCTGTCTGCTGCCACCT
CCTCCACCTCCACCTCCAGCACAGGACCTCACCTGGTCCAGCAGCCCAACTCCCATCAGCAGCACTC
TGTGGCACATGTCTGGGACAGTCCACGCACTGACTCCAGGCAGCCATATCCACTCCAGACCGCAG
GACACCATCTGCCTCCCCACCACCTCCACCAGGACCAGCACCATCACCTCCACCACACCCA
AGCACCGGACTGCAGGGACTGCAGGCTCAGCATCAGCACGTCGTGAACTCCGCACCACCTCCTCCTCC
TCCACCTCCACCATCCTCTGTGCTGGCCTCTGGGCATCACACCACAAGTGCTCAGGCACTGCATCACC
CTCCACATCAGGGACCCCTCTGTTCCCAAGTTTACGCCACCCACAGTGCCACCTACCCATCTCAG
GCTACTCATCAGTACCCTGGGGCCTGGACCACAGCATCAGCCTAGCGGAACCGGACCACACTGCC
ACTGCCTGTGACAGGACCACACCTGCAGCCACAGGGACCCAAACAGTATCCCAACTCCCACCGCATCAG
GATTTTGTCTCATCCAGGCTCTGTGCGCCTGCCTCACGGAGTGACGGGACCACAGCAGGCCAGCCCA
GTGCCTGGACAGATCCCCATTTCATCGGGCTCAGGTCCCCCCCCACATTTTCAAGATAACTATCACGGAAG
CGGCTGGCATTGAGGATCC

O plasmídeo pMEG-*KMT2E* foi sintetizado contendo o gene de interesse em forma de 4 µg de material purificado, sendo necessária a expansão do mesmo em *Escherichia coli*. A transformação bacteriana foi realizada por choque térmico utilizando o kit comercial *One Shot® TOP10 Chemically Competent Cells* (Invitrogen, EUA), segundo especificações do fabricante. Resumidamente, foram adicionados 100 ng de DNA plasmidial em tubos contendo as células *E. coli*. A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos seguido do choque térmico à 42°C por 30 segundos. As células bacterianas foram incubadas em meio SOC (pré-aquecido) a 37°C por 1 hora. Uma alíquota de 20 µL dessa mistura foi semeada em meio LB sólido contendo ampicilina (50 µg/mL), seguido de incubação *overnight* à 37°C. Colônias bacterianas individuais foram selecionadas e expandidas em meio LB líquido, sob agitação, à 37°C, para a extração de DNA plasmidial (midi-prep).

A midi-prep foi realizada utilizando o kit comercial *QIAFilter Plasmid Midi Kit* (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Uma alíquota do caldo bacteriano foi armazenada em glicerol 15% e estocada em freezer à -80°C. A cultura bacteriana foi precipitada e ressuspensa com tampão P1 (Tris-Cl, EDTA, RNase A) seguida de lise com tampão P2 (NaOH, SDS). A seguir, o lisado foi neutralizado com tampão P3 (acetato de potássio) pré-resfriado, seguido de filtração com seringa fornecida pelo kit e adicionado à coluna para purificação do DNA plasmidial. A seguir, a coluna foi lavada com tampão QC (NaCl, MOPS, isopropanol) e o DNA retido na mesma foi eluído com tampão QF (NaCl, Tris-Cl, isopropanol), precipitado com isopropanol e lavado com etanol 70%. Após centrifugação (25 minutos à 6.000 g), o precipitado foi seco por 10 minutos a temperatura ambiente e dissolvido em, aproximadamente, 100 µL de água *nuclease-free*. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro DeNovix DS-11 (EUA) e armazenadas a -20°C até o uso.

3.2.2. Digestão enzimática dos vetores

Os plasmídeos pMEG vazio, pMEG-*KMT2E*, pCMV-VSV-G e pCMV-ΔR8.2 (necessários para a transfecção viral) foram digeridos com enzimas de restrição específicas para cada um (Tabela 2), para confirmação do tamanho dos mesmos.

Para tanto, foi adicionado 1 µL de cada enzima (10 U/µL), 2 µL de tampão 10x, 1 µg de DNA e completado o volume da reação com água *nuclease-free* para 20 µL, seguidos de incubação à 37°C *overnight*. A Tabela 2 mostra as enzimas utilizadas para cada plasmídeo e o tamanho esperado dos mesmos.

Tabela 2 - Plasmídeos digeridos usados na transfecção viral. A tabela mostra as respectivas enzimas de restrição usadas para cada vetor e o tamanho esperado dos mesmos (pb).

Amostra	Enzima	Tampão	Tamanho esperado (em pb)
pMEG	EcoRI *	REact® 3 *	8256
pMEG-KMT2E	EcoRI e BamHI *	REact® 3 *	5589
pCMV-VSV-G	SpeI *	REact® 4 *	6363
pCMV-ΔR8.2	BamHI *	REact® 3 *	13463

*Invitrogen, EUA

Para a visualização dos fragmentos gerados, uma alíquota de 500 ng de cada digestão plasmidial foi separada e preparada com tampão de carregamento (solução aquosa de azul de bromofenol 0,09%, xilenocianol 0,09%, glicerol 60% e EDTA 60 mM). A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris acetato 40 mM e EDTA 1 mM pH 8) 1x corado com solução de Brometo de Etídio (10 mg/mL), em voltagem constante de 100 V (Figura 2).

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose dos DNA plasmidiais usados nos experimentos de transfecção. M: marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega, EUA). A: pMEG-*KMT2E* não digerido. B: pMEG-*KMT2E* digerido com BamHI e EcoRI, liberando o gene de interesse (banda de 5589 pb). C: pMEG vazio não digerido. D: pMEG vazio digerido com EcoRI (banda de 8256 pb). E: Δ R8.2 não digerido. F: Δ R8.2 digerido com BamHI (banda de 13463 pb). G: VSV-G não digerido. H: VSV-G digerido com SpeI (banda de 6363 pb).

3.2.3. Sequenciamento do gene *KMT2E* inserido no vetor

Para confirmar que não houve eventual mutação no gene *KMT2E* inserido no vetor pMEG, foram realizadas reações de sequenciamento de Sanger utilizando o kit comercial *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, EUA). Em um volume final de 10 μ L foram utilizados 300 ng de DNA, 2 μ L do tampão 5x, 2 μ L do mix *BigDye® Terminator*, 1 μ L de iniciador *forward* (2,5 μ M) e água *nuclease-free*. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, 25 ciclos a 95°C por 10 segundos, 51°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. As reações foram precipitadas no Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP/HC/FMRP/USP), onde também foi realizado o sequenciamento usando o equipamento ABI 3500XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EUA). As sequências dos iniciadores utilizados no procedimento encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores utilizados no sequenciamento do gene *KMT2E* inserido no vetor pMEG. Foram utilizados iniciadores no sentido *forward* da fita, cobrindo toda a sequência do gene e amplificando fragmentos com regiões que se sobrepõem entre si, para a realização da análise.

Sequência
5' GCC CTC AGC AGT TTC TAG 3'
5' GTC GTG GAG AAG AGC AAC 3'
5' CTA CTA CCA TCT CAA CAA GC 3'
5' ACA GAA TCA GGC GAC GAG 3'
5' GCA ATG ACA AGA AAG AAA TG 3'
5' CCT TCG ACT TTG ATT ATG G 3'
5' AAG ATG GAG GCC ATT CTG 3'
5' CCT GCA CAG GTT CAA TAG 3'
5' TGC AGG AAT GGC TAC AAG 3'
5' CCA ACT CTC AGC TGG ATA G 3'
5' TCT CCG TGT CTC CTC ATG 3'
5' ACC CAG CTC CCA TAG CAA C 3'
5' CCA TCT GTG CCC ACA AAG 3'
5' ACT GTT CAC CCA GAC ACC 3'
5' ACT CCC ATC AGC AGC ACT C 3'
5' ACC ACA GCA TCA GCC TAG C 3'
5' AAG TGA TGT CGT GTA CTG G 3'
5' CGT CTA GGT AAG TTT AAA GC 3'

A análise dos fragmentos gerados e seus respectivos cromatogramas foi realizada através do *software Sequencher®* 5.1. (www.genecodes.com). As sobreposições dos fragmentos gerados estão ilustradas na Figura 3.

Figura 3 - Sequenciamento do gene *KMT2E* inserido no plasmídeo pMEG. A imagem ilustra a sobreposição das sequências geradas pelo sequenciamento de Sanger. A análise da sequência adquirida não evidenciou mutação espontânea.

3.3. Verificação dos níveis de expressão basal do gene de interesse em linhagens de LMA

3.3.1. Extração de RNA das linhagens

Para a extração de RNA, foi utilizada técnica e protocolo já padronizados no laboratório, com o uso do reagente de TRIzol®. Aproximadamente, $3 \cdot 10^6$ de células de cada uma das linhagens celulares (U937, NB4, OCI-AML3, MV-4-11, Kasumi-1, K562 e THP-1) foram ressuspensas em 250 µL de PBS 1x (tampão fosfato-salino) e adicionados 750 µL de TRIzol® *LS Reagent*. A cada mistura, adicionou-se 200 µL de clorofórmio, seguido de agitação em vortex por 15 segundos e incubação a temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa transferida para um tubo novo, ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol para a precipitação do RNA. As amostras permaneceram a temperatura ambiente por 10 minutos e foram centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Após a remoção do sobrenadante, o precipitado de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% e centrifugado novamente a 7500 g por 5

minutos a 4°C. O precipitado permaneceu 10 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, foi dissolvido em 20 µL de água *nuclease-free* tratada com DEPC (0.1% diethylpyrocarbonate). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro DeNovix DS-11 (EUA) e armazenadas a -80°C.

3.3.2. Síntese de DNA complementar dupla fita (cDNA)

As amostras de RNA total, preservadas a -80°C, foram descongeladas em gelo e cerca de 1 µg de RNA foi utilizado para a síntese de DNA complementar dupla fita (cDNA) com o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems, EUA). As reações ocorreram em um volume final de 20 µL, contendo 1 µg de RNA total, 2,5 µL de tampão RT 10x, 1 µL de dNTP Mix (100 mM), 2,5 µL de RT *random primers*, 0,63 µL de inibidor de RNase, 1,25 µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/µL) e água tratada com DEPC 0,1% para completar o volume final. As reações foram incubadas em termociclador a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. Ao final da reação, foram adicionados às amostras 175 µL de água *nuclease-free*, para uma diluição na proporção 1:8, e as mesmas foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.3.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRq) para análise da expressão relativa do gene *KMT2E*

A amplificação em tempo real do gene *KMT2E* foi realizada no equipamento *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA) usando o reagente comercial *PowerSyber Green Master Mix* (Applied Biosystems, EUA). A concentração dos iniciadores foi definida em 300 nM, a partir de testes de eficiência. Como controles endógenos, foram empregadas as expressões dos genes *HPRT* (*Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*), *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-phosphate*

dehydrogenase) e *ACTB* (β -Actina). A padronização da concentração ideal dos mesmos (300 nM) foi realizada por Machado-Neto (2015). A quantificação relativa da expressão gênica de *KMT2E* foi calculada usando o método de Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para cada reação foi utilizado 0,36 μ L de iniciador *forward*, 0,36 μ L de iniciador *reverse*, 2,28 μ L de água *nuclease-free*, 6 μ L de *PowerSyber Green Master Mix* e 3 μ L de amostra de cDNA diluída 1:8. As sequências dos iniciadores encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real para análise da expressão do gene *KMT2E*. A sequência descrita como *KMT2E* basal analisa a expressão do gene presente naturalmente no DNA das linhagens. Os iniciadores denominados *KMT2E* otimizado são referentes à sequência enviada pela empresa GenScript (EUA).

Gene	Sequência dos iniciadores
<i>KMT2E</i> basal	FW: 5' CCA TCC CCA GAT ACT TCT CAA 3' REV: 5' TGT GCT TGA GCA GGA ATT ACA G 3'
<i>KMT2E</i> otimizado	FW: 5' CCA AGT CCC GAC ACT TCA CAG 3' REV: 5' GTG CCT GTG CTG GGA TCA C 3'
<i>ACTB</i>	FW: 5' AGG CCA ACC GCG AGA AG 3' REV: 5' ACA GCC TGG ATA GCA ACG TAC A 3'
<i>HPRT</i>	FW: 5' G CGT CTT GCT CG G T GTG 3' RW: 5' TCC GC GG TC GC G T 3'
<i>GAPDH</i>	FW: 5' GCC TCA AGA TCA TCA GCA ATG C 3' REV: 5' CAT GGA CTG TGG TCA TGA GTC CCT 3'

3.4. Superexpressão do gene *KMT2E* na linhagem U937

3.4.1. Transfecção da linhagem HEK 293T para geração de partículas virais

Para a realização do empacotamento viral foi utilizada a linhagem HEK 293T, cultivada em meio IMDM completo. O nível de biossegurança 2 é o sugerido para trabalhar com esses vetores, de acordo com o NIH (*National Institutes of Health*). Um dia antes do procedimento, $6 \cdot 10^6$ de células foram sedimentadas em placa de 100 mm x 20 mm em 10 mL de meio IMDM completo. Para a transfecção, o meio de cultura das placas foi removido totalmente e substituído por 5 mL de meio OptMEM (Life Technologies, EUA), sem soro e sem antibióticos, e incubado por 30 minutos à 37°C e 5% de CO₂. Durante esse período foi preparado um coquetel contendo 5 µg de pCMV-ΔR8.2, 2 µg de pCMV-VSV-G e 10 µg do vetor de interesse (pMEG ou pMEG-*KMT2E*) em um volume final de 500 µL de OptMEM para cada placa. Paralelamente, em outro tubo, adicionou-se 30 µL de lipofectamina (Lipofectamine 2000 - Invitrogen, EUA) e 470 µL de OptMEM para cada placa. Combinaram-se as duas soluções e ficaram em repouso 20 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi dispensada gota-a-gota sobre a cultura de HEK 293T e as placas foram incubadas por 4 horas à 37°C. Após esse período, adicionou-se 5 mL de OptMEM suplementado com 10% de FBS seguido de incubação à 37°C e 5% de CO₂ por 14-16 horas, quando o meio foi totalmente substituído por outros 10 mL de OptMEM completo. O sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado em 24 e 48 horas, pós-infecção. Os conteúdos dos dois pontos de coleta foram filtrados a 0,45 µm e combinados em um mesmo tubo, aonde foram adicionados 1 volume de solução concentradora *Lenti-X Concentrator* (Clontech Laboratories, EUA) para 3 volumes de suspensão viral. O tubo foi homogeneizado e incubado por 30 minutos em geladeira. A suspensão foi centrifugada a 1500 g por 45 minutos para a concentração das partículas virais. O sobrenadante foi descartado e o precipitado viral ressuspenso em 1 mL de meio RPMI completo. Uma alíquota de 50 µL foi armazenada para posterior titulação viral. As suspensões virais foram preservadas a -80°C até o momento da infecção.

3.4.2. Titulação viral do gene de interesse a partir da linhagem HT 1080

No dia anterior ao processo, $2 \cdot 10^5$ células HT-1080 foram sedimentadas em placas de 6 poços contendo 2 mL de meio α -MEM completo. Para a transfeccção da linhagem, retirou-se o meio por completo e adicionou-se 1 mL de solução de lentivírus diluídos em várias proporções (1:50, 1:100, 1:1000, 1:5000 e 1:10000) e 6 μ g/poço de *polybrene* (Sigma-Aldrich, EUA) seguido de troca de meio 24 horas depois. Dois dias após, o meio foi substituído por meio α -MEM completo contendo 1 μ g/mL de puromicina (Sigma-Aldrich, EUA), para a seleção das células transduzidas. Seguiu-se mais 1 semana de troca de meio α -MEM completo contendo puromicina, a cada 2 dias. Após a formação de colônias, as placas foram lavadas com PBS 1x e as células permaneceram por 10 minutos com 1 mL de violeta cristal 1% em solução 10% de etanol. As placas foram lavadas com água e as colônias foram contadas no poço de diluição 1:10000 (Figura 4). O número de partículas virais por mL de meio foi calculado multiplicando-se o número de colônias presentes no poço pelo fator de diluição do mesmo.

Figura 4 - Titulação dos lentivírus em células HT 1080, coradas com violeta cristal. A: ausência de lentivírus, B: diluição 1:50, C: diluição 1:100, D: diluição 1:1000, E: diluição 5000 e F: diluição 10000.

3.4.3. Transdução da linhagem U937 com o gene de interesse

A linhagem U937 foi utilizada para a transdução viral e superexpressão do gene de interesse. A técnica empregada foi a de inoculação por centrifugação, que consistiu em centrifugar (30 minutos a 1000 rpm) 2.10^5 células contendo 3 µg/mL de *polybrene* (Sigma-Aldrich, EUA) e quantidade de suspensão viral para um MOI de 3, em um volume total de 2 mL de meio RPMI completo. O precipitado celular foi ressuspenso no próprio sobrenadante e as células foram semeadas em placa de seis poços por 4 horas. Após nova centrifugação (5 minutos) as células foram ressuspendidas em 500 µL de meio RPMI completo e cultivadas em placa de 24 poços por 48 horas. Após esse período iniciou-se a seleção de células transduzidas utilizando 1 µg/mL de puomicina (Sigma-Aldrich, EUA). Os experimentos começaram posteriormente a seleção e morte total do controle não transduzido (U937 *wild type*, WT). As células passaram por citometria de fluxo em um FACSCalibur (Becton–Dickinson, EUA) para avaliação da expressão de GFP. Foram adquiridos 10000 eventos por condição e a análise feita no software FlowJo (v.7.6.5).

3.5. Característica imunofenotípica das células U937

As células WT, pMEG e pMEG-*KMT2E* foram marcadas com anticorpos humanos previamente descritos pelo site alemão DSMZ (www.dsmz.de) para caracterização imunofenotípica de células U937. Para cada condição individual foram utilizados quatro tubos de citometria contendo anticorpos diferentes em cada um (Figura 5). Em todos os tubos foi adicionado o anticorpo anti-CD45 APC-H7 (*APC-cyanine tandem dye*) uma vez que a análise foi realizada a partir da *gate* do mesmo. A presença de GFP foi considerada nas células pMEG e pMEG-*KMT2E*. Para a marcação, foram adicionadas 5.10^5 células em 700 µL de meio RPMI completo em cada tubo, as quais foram lavadas e ressuspendidas em 50 µL de PBS 1x. No tubo 1, foi adicionado apenas o marcador anti-CD45 APC-H7 (BD

Biosciences, EUA). No tubo 2 foram adicionados os marcadores anti-CD3 PerCP, anti-CD4 PE, anti-CD19 APC e anti-CD45 APC-H7 (BD Biosciences, EUA). No tubo 3 foram adicionados anti-CD4 PerCP-Cy5, anti-CD14 PE, anti-CD15 APC e anti-CD45 APC-H7 e no tubo 4, anti-CD33 APC, anti-CD34 PerCP-Cy5, anti-CD54 PE e anti-CD45 APC-H7 (BD Biosciences, EUA). As células contidas nos tubos foram incubadas na presença dos anticorpos por 15 minutos no escuro e, posteriormente, lavadas com PBS 1x, seguido de centrifugação a 2300 rpm por 5 minutos. O precipitado celular foi ressuspensionado em 300 µL de PBS 1x e os tubos armazenados em geladeira até o momento da leitura.

Figura 5 - Anticorpos utilizados na caracterização imunofenotípica das células U937 transduzidas. A análise foi realizada a partir da *gate* positiva para o anticorpo humano anti-CD45 APC-H7 (BD Biosciences, EUA). A cada tubo foi adicionado um grupo diferente de anticorpos humanos para a leitura no citômetro BD FACSCanto II (Becton–Dickinson, EUA).

3.6. Análise de expressão proteica

3.6.1. Extração de proteínas

Aproximadamente $10 \cdot 10^6$ células foram lavadas com PBS gelado por 3 vezes, centrifugadas a 300 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os pellets, contendo as proteínas do extrato total, foram ressuspensos no tampão de extração contendo Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton 1%, inibidores de fosfatase e proteases (Sigma, P1860). Foram feitos 3 ciclos de sonicação em sonificador de banho (UltraSonic Cleaner 750, Unique, Brasil) a 45 W por 5 minutos cada, intercalando-se a agitação em vórtex e resfriamento da amostra em banho de gelo. Não foi observado aquecimento da amostra. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante, contendo a mistura de proteínas, foi coletado e estocado em freezer - 80°C.

3.6.2. Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas foi feita utilizando-se o kit da Bio-Rad DC (Bio-Rad, Hercules, CA), baseado no método descrito por Bradford. O ensaio foi realizado em microplacas com volume total de 220 µL por poço, com faixa de linearidade 0,5 a 2,0 µg de proteínas. Foram utilizados 20 µL de amostra diluída em água Milli Q e 200 µL do reagente de Bradford. O volume total utilizado em cada poço da microplaca foi mantido constante (220 µL). Após 15 minutos de incubação, as absorbâncias foram lidas a 595 nm em leitor de Elisa (Versamarx Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, Estados Unidos). Uma curva padrão com 5 pontos em triplicata correspondentes à quantidades conhecidas de BSA (0,0 a 2,0 µg) foi feita a cada ensaio realizado. A concentração das amostras foi determinada

usando diferentes diluições em triplicata (1:50, 1:100, 1:200, v/v) para cada amostra. Os desvios padrões dos resultados obtidos nas triplicatas foram menores que 10%.

3.6.3. Western blotting

Cerca de 60 µg de extrato proteico total de cada amostra foram separados por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970; SOULIÉ et al., 1996) na concentração 7,5% de acrilamida e eletrotransferido para a membrana de PVDF (Hybond-P, GE). A transferência foi realizada em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% por 1 hora e 30 minutos a 100 V, 300 mA a 4°C. Para bloquear sítios não específicos, a membrana foi incubada em tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,6 (TBS-T) com 5% (m/v) de leite desnatado em pó por 1 hora. Depois a membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos com TBS-T. Feito isso, a membrana foi incubada com os anticorpos primários na diluição adequada overnight a 4°C ou por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação. Depois foi novamente lavada 4 vezes por 10 minutos com TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (#7074) conjugado à peroxidase (Cell Signaling) ou anti-IgG de mouse (#7076) conjugado à peroxidase (Cell Signaling) na diluição 1:2000. A detecção foi feita através do kit *ECL Prime western blotting Detection Reagents* (GE HealthCare), utilizado para a detecção baseada em sinal de quimiluminescência realizado com uma câmera CCD Chemilux (ImageQuant™, LAS 4000 mini, GE Healthcare, Suíça).

Tabela 5 - Características dos anticorpos utilizados na reação de western blotting.

Anticorpo	Fonte	P/M(*)	Código	Peso(kDa)	Fabricante	Diluição
MLL5	Mouse	M	sc-377182	205/196/69/99 /186/181/201	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	1:500
GAPDH	Coelho	M	#2118	37	Cell Signaling	1:1000

(*)P.: Policlonal; M.: Monoclonal

3.7. Ensaios funcionais das células U937 WT, pMEG e pMEG-KMT2E

3.7.1. Avaliação de ciclo celular

As células da linhagem U937 nas três condições estudadas foram semeadas na concentração de $5 \cdot 10^4$ células/poço em um volume de 500 μ L de meio RPMI completo em placa de 24 poços e incubadas por 48 horas (*population doubling*). Posteriormente, as células foram coletadas e marcadas usando o kit comercial *BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit* (BD Biosciences, EUA). Para tanto, após centrifugação para sedimentação das células em tubo de citometria, foi adicionado 80 μ L de solução A em cada tubo, para a digestão da membrana das células e de seu citoesqueleto, seguidos de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se 80 μ L da solução B para inibição da tripsina e digestão de RNA, seguindo o mesmo procedimento. Por fim, foram adicionados 80 μ L da solução C (iodeto de propídeo) e os tubos foram incubados por 15 minutos na geladeira. Realizou-se a leitura por citometria de fluxo em um FACSCalibur (Becton–Dickinson, EUA) e adquiridos 10000 eventos por condição. A análise feita no software FlowJo (v.7.6.5).

3.7.2. Análise de proliferação celular com o reagente MTT

Para análise de proliferação e viabilidade celular foi utilizado o ensaio de redução do sal de tetrazólio methylthiazoletetrazolium (MTT). As células WT, pMEG e pMEG-KMT2E foram semeadas na concentração de $1 \cdot 10^4$ células/poço em um volume de 100 μ L de meio RPMI completo em placa de 96 poços de fundo redondo e incubadas por 48 horas (*population doubling*). Adicionou-se 10 μ L de uma solução a 5 mg/mL de MTT e as células foram incubadas novamente por cerca de 4 horas a 37°C. A reação foi parada pela adição de 100 μ L de 0,1 N HCl Isopropanol para

dissolver os cristais formados da redução, e a viabilidade celular foi avaliada pela mensuração da absorbância a 570 nm, utilizando um leitor automático de placas. Todas as condições foram testadas em cinco replicatas.

3.7.3. Análise de proliferação celular por imuno-histoquímica para Ki-67

Foi realizada a análise de proliferação através da marcação com anticorpo anti-Ki-67 violeta brilhante (BD Biosciences, EUA). O antígeno Ki-67 é expresso no núcleo de células em divisão celular. Primeiramente, as células foram sincronizadas através de 24 horas de *starvation*, através da retirada do FBS do meio de cultura. Foram separadas 1.10^6 células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E* em tubos de citometria de fluxo. Foram centrifugadas a 2300 rpm por 5 minutos e os concentrados celulares foram ressuspensos em 3 mL de etanol 70% gelado em PBS 1x, gota por gota. As soluções celulares foram mantidas a temperatura ambiente por 20 minutos. As células foram centrifugadas a 2300 rpm por 5 minutos e os concentrados celulares lavados com 2 mL de PBS 1x FBS 1%. Após nova centrifugação e descarte dos sobrenadantes, foram adicionados 5 µL do reagente Ki-67 Violeta Brilhante (BD Biosciences, EUA) aos tubos contendo as células. Foi realizada nova incubação por 10 minutos na geladeira, longe da luz. As células foram lavadas com 2 mL de PBS 1x e os concentrados celulares ressuspensos em 300 µL de PBS 1x. Realizou-se a leitura por citometria de fluxo em um FACSCalibur (Becton–Dickinson, EUA) e adquiridos 10000 eventos por condição. Foram avaliadas as médias de intensidade de fluorescência das amostras. A análise feita no software FlowJo (v.7.6.5).

3.7.4. Análise de proliferação celular a partir da contagem em Câmara de Neubauer

Foi realizada a análise de proliferação e viabilidade celular através da contagem diária e sequencial das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E* em câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas em garrafa de 25 cm² na concentração de $0,2 \cdot 10^6$ células/mL e mantidas em cultivo para a contagem em 24, 48 e 72 horas. Para a análise de viabilidade, as células foram coradas com *Trypan Red*, que marca células mortas.

3.7.5. Avaliação de apoptose basal por marcação com anexina-V (APC) e PI

As células U937 WT, pMEG e pMEG-*KMT2E* foram semeadas na concentração de $5 \cdot 10^4$ células/poço em um volume de 500 µL de meio RPMI completo em placa de 24 poços e incubadas por 48 horas (*population doubling*). Posteriormente, as células foram coletadas, lavadas com tampão de ligação 1x (0,1 M Hepes pH 7,4, 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂), e marcadas com 3 µL de anexina-V APC (BD Biosciences, EUA) e 3 µL de 50 µg/mL de iodeto de propídeo (PI, do inglês *propidium iodide*) e incubadas no escuro por 15 minutos. Após esse período, adicionou-se 300 µL de tampão de ligação 1x. A leitura foi por citometria de fluxo em um FACSCalibur (Becton–Dickinson, EUA) e adquiridos 10000 eventos por condição. A análise feita no software FlowJo (v.7.6.5).

3.7.6. Análise de apoptose induzida

3.7.6.1. Cálculo da concentração de inibição média (IC₅₀) de Trióxido de Arsênico (ATO)

Para análise da influência do gene de interesse em eventos de apoptose, a mesma foi induzida através da droga Trióxido de Arsênico, ATO (Sigma-Aldrich, EUA) e de luz ultravioleta, UV. Primeiramente, calculou-se a concentração de inibição média (IC₅₀ do inglês, *half maximal inhibitory concentration*) de ATO, semeando 1.10⁶ células/mL da linhagem U937 em 500 µL de meio RPMI completo em placa de 24 poços. A cada poço foi adicionada uma concentração crescente de ATO (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 16,0 µM), seguido de incubação por 24 horas. As células foram coletadas e marcadas para análise de apoptose com anexina-V APC (BD Biosciences, EUA) e PI. A IC₅₀ foi encontrada com auxílio do *software CompuSyn* (CHOU; MARTIN, 2005) e determinada em 3 µM para um tratamento de 24 horas (Tabela 6). A solução de NaOH foi utilizada como controle nas mesmas proporções, uma vez que é o veículo para diluição da droga.

Tabela 6 - Cálculo da concentração de inibição média (IC₅₀) de Trióxido de Arsênico (ATO) em células U937 após tratamento de 24 horas. Tabela contendo os valores de ATO utilizados (µM) e os respectivos valores de porcentagem de células apoptóticas. Os valores de anexina-V positivos finais (presente na tabela) foram determinados fazendo a subtração entre as porcentagens de apoptose com ATO e os valores com o controle NaOH, respectivos. A IC₅₀ encontrada para o tratamento de 24 horas foi de 3 µM.

Doses de ATO (µM)	Porcentagem de células apoptóticas (anexina-V positiva)
0,5	19,51
1	33,82
2	33,91
4	53,26
16	81,32
IC ₅₀ = 3,05814 r = 0,98047	

3.7.6.2. Indução de apoptose por ATO e luz ultravioleta

Após o cálculo da IC_{50} de ATO, as células WT, pMEG e pMEG-*KMT2E* foram semeadas na concentração de 1.10^6 células/mL em 500 μ L de meio RPMI completo em placa de 24 poços. Em cada poço, foi adicionado 3 μ M de ATO ou 0,06% de NaOH (veículo controle). Para a indução por luz ultravioleta, as células WT, pMEG e pMEG-*KMT2E*, semeadas nas mesmas condições descritas, foram submetidas a uma única exposição na dose de radiação UV de 15000 μ J/cm² (padronizados anteriormente). As células foram coletadas em 24 horas de incubação após a exposição (ATO ou UV) e submetidas ao mesmo procedimento de avaliação de apoptose, utilizando marcação com anexina-V APC e PI.

3.7.7. Avaliação de diferenciação celular

As células U937 (WT, pMEG e pMEG-*KMT2E*) foram semeadas em placa de 6 poços na concentração de 5.10^5 células/poço, em um volume de 2 mL de meio RPMI completo na presença de 20 nM de 12-miristato 13-acetato de forbol (TPA) (Machado-Neto, 2015). Como controles foram utilizadas células não estimuladas com TPA ou estimuladas com seu veículo de diluição, DMSO (no mesmo volume da droga). Os tempos de incubação foram de 0, 48 e 72 horas. As células foram coletadas em tubos. Nos poços em que a droga estava presente, foi necessária uma tripsinização para soltar as células que aderiram devido à diferenciação monocítica. As células presentes nos tubos foram lavadas com PBS 1x e marcadas com 3 μ L dos anticorpos humanos anti-CD14 APC (clone M5E2, BD Biosciences, EUA) ou anti-CD11c APC (clone S-HCL-3, BD Biosciences, EUA), o qual mostrou o melhor padrão, e anti-CD11b PE (clone D12, BD Biosciences, EUA) para análise da diferenciação celular. Após 15 minutos de marcação, as células foram lavadas novamente e ressuspensas em 300 μ L de PBS 1x. Foram adquiridos 10000 eventos por condição em citômetro FACSCalibur (Becton–Dickinson, EUA) e a análise feita no software FlowJo (v.7.6.5).

3.7.8. Análise morfológica celular por citocentrifugação

A morfologia das células controle e transduzidas foram avaliadas por citocentrifugação (cito spin). A técnica possibilita concentrar as células em suspensão, as quais se depositam sobre uma região de 5 mm em lâminas de vidro, enquanto o meio é absorvido por papel absorvente próprio. Aproximadamente 100 μ L de meio RPMI completo contendo $5 \cdot 10^4$ células foram inseridos em citofunil previamente acoplado ao citoclipse e papel absorvente. Os aparatos foram centrifugados em citocentrífuga a 1000 rpm por 2 minutos. As lâminas foram secas em temperatura ambiente e coradas com corante de Leishman. As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus Bx50. O procedimento foi realizado após a transdução e após os ensaios de diferenciação.

3.7.9. Esterase não específica

Foi realizada esterase não específica para verificação de linhagem monocitária após procedimento de cito-spin das células WT, pMEG e pMEG-*KMT2E*. As lâminas foram fixadas por 1 minuto em solução fixadora gelada (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , água destilada, acetona de grau analítico, formaldeído 37%, pH 6,6) e lavadas com água corrente. A solução final, preparada a partir de soluções tampões de KH_2PO_4 e NaH_2PO_4 e preparações de α -naftil acetato e nitrito de sódio, foi mantida sobre os *spots* de células presentes nas lâminas por 2 horas. As lâminas foram coradas com *metil green* por 5 minutos e analisadas em microscópio Olympus Bx50. O procedimento foi realizado após a transdução e após os ensaios de diferenciação.

3.7.10. Ensaio Clonogênico

A formação de colônias foi realizada em placa de 12 poços contendo meio semissólido de metilcelulose ($1,5 \cdot 10^3$ células/mL; MethoCult 4230; StemCell Technologies Inc., Canadá). As colônias foram detectadas após 8 dias de cultura pela adição de 1 mg/mL de reagente MTT e as contagens foram realizadas com o auxílio do *Image J quantification software* (U.S. National Institutes of Health). Todas as condições foram testadas em duplicatas.

3.8. Ensaios *in vivo*

3.8.1. Indução de tumores em camundongos NSG

Os experimentos *in vivo* foram realizados em camundongos da linhagem NOD.CgPrkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG), oriundos do Laboratório de Estudos Experimentais em Animais (LEEA), da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais foram criados e mantidos em condição SPF (*Specimen Pathogen Free*) em mini-isoladores, com livre acesso a ração e água esterilizadas. Para os experimentos foram utilizados 13 animais de 8 a 12 semanas de idade e peso médio de 22 gramas. Para a indução de tumores, os animais foram anestesiados (isoflurano a 2,5%) e inoculados no subcutâneo da região dos flancos. No flanco direito foram inoculados 80 µL de uma suspensão de $1 \cdot 10^6$ células U937 pMEG e, no flanco esquerdo, o mesmo volume de uma suspensão de $1 \cdot 10^6$ células U937 pMEG-KMT2E. As células foram diluídas em PBS 1x estéril. Os animais foram observados diariamente para monitoramento do crescimento de massa tumoral.

3.8.2. Mensuração da massa tumoral

3.8.2.1. Dimensões e Peso

As dimensões das massas tumorais foram registradas com auxílio de paquímetro milimetrado, obtendo-se os valores de duas medições perpendiculares de extensão, por três dias seguidos. Os animais foram sacrificados por meio de sobredose anestésica, sendo aplicada uma solução de lidocaína 2% 5 mg/Kg via IP 2 minutos antes da injeção de Tiopental 150 mg/Kg via IP. Os tumores foram coletados, seguidos de dissecação e pesagem.

3.8.2.2. Corte histológico

Os tumores foram coletados cirurgicamente dos animais, dissecados e preservados em formol tamponado a 10%. As massas tumorais foram encaminhadas para o serviço de Patologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, sob os cuidados do Prof. Dr. Jorge Equiche León, e processadas para coloração com hematoxilina e eosina (HE) e marcação imuno-histoquímica para Ki-67 (Dako, EUA).

3.9. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando *GraphPad Prism 5* (www.graphpad.com). Primeiramente foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov (KS) para verificar se as amostras seguiam uma distribuição normal. Para os dados que não foram aceitos no teste de normalidade KS, foi aplicado o teste estatístico de

Kruskal-Wallis (KW) com pós-teste de Dunns, utilizado para análises não paramétricas. As amostras paramétricas foram verificadas usando Análise de Variância (ANOVA) *One-Way* com pós-teste de Bonferroni. Em alguns casos foi aplicado o teste t de *student* não pareado. Os resultados dos ensaios *in vivo* foram analisados por meio de teste t pareado. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Verificação do nível de expressão basal do gene *KMT2E* nas linhagens de LMA

As células NB4, Kasumi-1, K562, U937, MV4-11, OCI-AML3 e THP-1 foram analisadas por PCR em tempo real usando o reagente *PowerSyber Green Master Mix* (Applied Biosystems, EUA). Como mostrado na Figura 6, a linhagem NB4 foi a que apresentou o maior valor de expressão basal do gene *KMT2E*, sendo quase quatro vezes mais expresso nesta linhagem em comparação a U937. A linhagem U937 foi escolhida para a realização dos experimentos por ser uma linhagem estabelecida como modelo de LMA (DICKSON et al., 2013). Os dados de baixa expressão de *KMT2E* na mesma vieram de encontro ao objetivo de superexpressar esse gene nestas células.

Figura 6 - Expressão gênica de *KMT2E* entre linhagens de leucemia mieloide aguda. A expressão do gene *KMT2E* foi determinada nas células NB4, Kasumi-1, K562, U937, MV4-11, OCI-AML3 e THP-1 por PCR em tempo real usando o reagente *PowerSyber Green Master Mix* (Applied Biosystems, EUA). Os valores de expressão gênica de cada linhagem são relativos ao valor de expressão na linhagem U937.

4.2. Transdução das células da linhagem U937 com lentivírus contendo o gene *KMT2E*

As células U937 foram transduzidas com vetor lentiviral contendo a sequência de cDNA otimizada do gene *KMT2E* (pMEG-*KMT2E*) ou com vetor vazio (pMEG). Após a transdução, as células foram selecionadas através do cultivo em meio RPMI completo com 1 µg/mL de puromicina, por, aproximadamente, 1 semana. A eficiência de infecção lentiviral foi analisada por citometria de fluxo a partir da expressão de GFP, como mostra a Figura 7. Nota-se forte expressão do marcador na quase totalidade das células transduzidas com vetor pMEG vazio, e em praticamente 90% das células transduzidas com o gene *KMT2E*.

Figura 7 - Análise da expressão de GFP em células U937 após transdução com vetor lentiviral contendo o gene *KMT2E*. O primeiro histograma mostra as células WT, que não foram transduzidas, e, portanto, não apresentam sinal de GFP positivo. O segundo histograma mostra a expressão de GFP das células transduzidas com vetor vazio pMEG. O último histograma apresenta a expressão referente às células transduzidas com o vetor pMEG-*KMT2E*. Os valores acima e à direita indicam a porcentagem de células positivas.

A análise da expressão do gene *KMT2E* pós transdução lentiviral foi realizada por PCR quantitativo em tempo real. Os iniciadores utilizados na reação foram desenhados de forma a amplificar a sequência otimizada do gene, a qual foi inserida no plasmídeo pMEG. A expressão relativa do gene de interesse nas células U937

pMEG-*KMT2E* foi cerca de 1.000 vezes mais alta que as demais, mostrando que o gene foi inserido com sucesso no genoma da mesma (Figura 8).

Figura 8 - Imagem representativa da expressão do gene *KMT2E* a partir da sequência otimizada inserida no plasmídeo pMEG-*KMT2E* na linhagem U937. As células U937 não transduzidas (WT) ou transduzidas com o vetor vazio (pMEG) não apresentaram amplificação da sequência do gene inserido no vetor. As demais replicatas encontram-se no apêndice.

A análise de western blotting das células U937 pós transdução lentiviral demonstra um aumento da proteína KMT2E na isoforma 69 kDa nas células U937 pMEG-*KMT2E* em relação às demais (Figura 9).

Figura 9 - Detecção por western blotting da proteína *KMT2E* após transdução lentiviral nas células U937. As bandas são referentes aos extratos proteicos totais U937 WT (A), U937 pMEG (B), U937 pMEG-*KMT2E* (C), neutrófilos (D), representando o controle negativo, e HS-5 (E), representando o controle positivo. A proteína GAPDH foi usada como controle endógeno.

4.3. Análises de características morfológicas e imunofenotípicas das células U937 após transdução lentiviral

Para verificação da morfologia das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E*, aproximadamente 50 mil células foram separados e processados para a realização de preparação de citocentrífuga. As lâminas foram coradas usando coloração de Leishman para análise morfológica e a verificação de esterase não específica foi realizada por método citoquímico (Figura 10). A reação para esterase não específica é usada clinicamente para identificar a diferenciação monocítica, sendo fortemente positivas para monócitos. A presença da enzima é reconhecida por pontos marrom avermelhados no citoplasma celular.

Todas as células estudadas apresentaram morfologia monoblastóide. Esses monoblastos apresentam núcleo grande, arredondado, com cromatina frouxa e nucléolos evidentes. A relação núcleo citoplasma (N/C) foi alta, uma vez que o citoplasma é escasso. Em relação à esterase, as células dos três grupos apresentaram, no geral, 60% de sua população com reação de fraca intensidade. Foram consideradas positivas apenas as células com forte marcação marrom avermelhada no citoplasma. Foi realizada a contagem de blastos ou promonócitos (no caso das lâminas coradas com Leishman) e a contagem de células positivas ou negativas (para esterase) num número aproximado de 250 células. As diferenças detectadas não foram significativas ($P = 0,7$).

Figura 10 - Morfologia das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E* e reação citoquímica para esterase não específica. Preparações de citocentrífuga das células coradas com corante de Leishman (A). Reação citoquímica das células para esterase não específica (B).

O perfil imunofenotípico foi determinado usando a janela (*gate*) contendo células positivas para o antígeno CD45. As células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E* apresentaram o mesmo padrão de expressão desses marcadores, independente da modificação gênica (Figura 11). O que diferiu entre as células foi a ausência de GFP nas células WT e a presença da mesma nas células transduzidas. Portanto, a superexpressão do gene de interesse não causou modificações nas características imunofenotípicas das células.

Figura 11 - Perfil imunofenotípico das células U937 WT (A), U937 pMEG (B) e U937 pMEG-KMT2E (C). Q1 identifica as células com a marcação para o anticorpo descrito no eixo Y; Q2 identifica células com dupla marcação (anticorpos descritos nos eixos X e Y); Q3 identifica células com marcação descrita no eixo X e Q4 identifica as células não marcadas. No primeiro e segundo quadro de cada grupo de gráficos pode-se ver a seleção de células viáveis e a *gate* para células marcadas com anti-CD 45 APC-H7, respectivamente.

4.4. Análise da proliferação e ciclo celular das células U937 superexpressando ou não *KMT2E*

A Figura 12 mostra o estudo do ciclo celular. Tanto as células U937 WT quanto as células U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E* apresentaram distribuição similar das porcentagens de células nas diferentes fases do ciclo celular (Figura 11B). As diferenças não foram significativas (p G_0/G_1 = 0,6159; p S = 0,4208; p G_2/M = 0,7767).

Figura 12 - Ciclo celular das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E*. Histogramas representativos de um experimento em quadruplicata (A). Gráfico de barras mostrando a distribuição das porcentagens de células em cada fase do ciclo celular, segundo a expressão de *KMT2E* (B).

Para análise de proliferação e/ou viabilidade celular foram utilizados ensaio de redução do sal de tetrazólio MTT, análise de proliferação através da marcação com anticorpo anti-Ki-67 (BD Biosciences, EUA) e contagem diária sequencial em câmara de Neubauer. A marcação com o sal de tetrazólio MTT mostrou uma proliferação das células U937 WT ou transduzidas (pMEG e pMEG-*KMT2E*) similar entre si (Figura 13), não mostrando diferença significativa entre as porcentagens de células viáveis (p = 0,7326).

Figura 13 - Proliferação das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-KMT2E através de reagente MTT. A proliferação e/ou viabilidade celular foram determinadas após incubação das células por 48 horas.

A análise de proliferação através da marcação com anticorpo anti-Ki-67 (BD Biosciences, EUA), que é mais sensível, uma vez que é lido por citometria de fluxo, também não mostrou diferença significativa entre os grupos, como mostrado na Figura 14 ($p = 0,5769$). Foram avaliadas as médias de intensidade de fluorescência das amostras.

Figura 14 - Proliferação das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-KMT2E através da marcação do antígeno Ki-67. A proliferação celular foi determinada após 24 horas de *starvation*. MIF: média da intensidade de fluorescência.

A contagem em câmara de Neubauer corroborou com os outros resultados de proliferação e viabilidade celular (Figura 15), mostrando nenhuma diferença entre os grupos ($p = 0,9432$ e $p = 0,7379$, respectivamente).

Figura 15 - Proliferação e viabilidade das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-KMT2E através de contagem em câmara de Neubauer. Proliferação celular determinada através de contagem em 24, 48 e 72 horas (A). Viabilidade celular determinada através de contagem em 24, 48 e 72 horas e marcação com *Trypan Red* (B).

4.5. Análise de apoptose basal e induzida nas células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-KMT2E

A Figura 16 mostra a porcentagem de células apoptóticas (anexina-V positiva). As células U937 WT, U937 pMEG e U937 KMT2E apresentaram taxas de apoptose basal de, aproximadamente, 10%, não variando entre os grupos ($p = 0,9669$).

Figura 16 - Apoptose basal das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-KMT2E. Gráficos do tipo *dot plot* representativos de um experimento em triplicata (A). Q1 identifica porcentagem de células em necrose (células positivas para a marcação com PI); Q2 identifica porcentagem de células em apoptose tardia (células positivas para a marcação com anexina-V e PI); Q3 identifica porcentagem de células em apoptose inicial (células positivas para a marcação com anexina-V) e Q4 identifica porcentagem de células viáveis (células negativas para ambas as marcações). Gráfico de barras, mostrando a média e desvio padrão das porcentagens de células em apoptose (inicial e tardia) segundo a expressão de *KMT2E* (B).

A análise de apoptose celular também foi realizada a partir da indução através da droga trióxido de arsênico, ATO (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 3 μM (Figura 17) ou por luz ultravioleta, UV, na dose única de 15000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ (Figura 18). Depois de 24 dos estímulos, cerca de 50% das células entraram em apoptose (quadrantes Q2 e Q3) e menos de 1% em necrose (Q1). As diferenças encontradas entre a porcentagem de células apoptóticas não foram significativas ($p = 0,6335$).

Figura 17 - Apoptose induzida por trióxido de arsênico (ATO) nas células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-KMT2E. Gráficos do tipo *dot plot* representativos de um experimento em quintuplicata (A). Q1 identifica porcentagem de células em necrose (células positivas para a marcação com PI); Q2 identifica porcentagem de células em apoptose tardia (células positivas para a marcação com anexina-V e PI); Q3 identifica porcentagem de células em apoptose inicial (células positivas para a marcação com anexina-V) e Q4 identifica porcentagem de células viáveis (células negativas para ambas as marcações). Gráfico de barras, mostrando a média e desvio padrão das porcentagens de células em apoptose (inicial e tardia) segundo a expressão de *KMT2E* (B). ($p = 0,6335$).

Figura 18 - Apoptose induzida por luz ultravioleta (UV) nas células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-KMT2E. Gráficos do tipo *dot plot* representativos de um experimento em quadruplicata (A). Q1 identifica porcentagem de células em necrose (células positivas para a marcação com PI); Q2 identifica porcentagem de células em apoptose tardia (células positivas para a marcação com anexina-V e PI); Q3 identifica porcentagem de células em apoptose inicial (células positivas para a marcação com anexina-V) e Q4 identifica porcentagem de células viáveis (células negativas para ambas as marcações). Gráfico de barras, mostrando a média e desvio padrão das porcentagens de células em apoptose (inicial e tardia) segundo a expressão de *KMT2E* (B) ($p = 0,6677$).

4.6. Diferenciação celular a partir de tratamento com TPA

As células U937 (WT, pMEG e pMEG-KMT2E) foram cultivadas na presença de 20 nM de TPA, e, após 48 e 72 horas, foram marcadas com as células foram marcadas com anticorpo anti-CD11c APC (BD Biosciences, EUA) para análise da diferenciação celular. O tratamento com a droga em todas as células estudadas (WT, pMEG e pMEG-KMT2E) aumentou de forma significativa a expressão de CD11c após 72 horas de incubação. As células U937 contendo o gene de interesse tiveram uma maior intensidade de expressão do antígeno CD11c em comparação com as demais ($p = 0,0188$). Portanto, o gene *KMT2E* modulou a resposta das células U937 ao tratamento com TPA, favorecendo a diferenciação (Figura 19). O

mesmo resultado não foi observado quando as células foram marcadas com anticorpo anti-CD11b PE e anti-CD14 APC (BD Biosciences, EUA), não evidenciando diferença significativa na eficiência de diferenciação celular (gráficos presentes no apêndice deste trabalho).

Figura 19 - Análise de diferenciação celular induzida pelo tratamento com 20 nM de TPA nas células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-KMT2E. As amostras foram tratadas com a droga e incubadas por 48 e 72 horas e marcadas com anti-CD11c APC (A). A MIF de cada condição aumentou após o tratamento, mostrando que ocorreu a diferenciação monocítica. As células U937 contendo o gene *KMT2E* apresentaram um valor estatisticamente maior do que o valor dos dois controles no tempo de 72 horas (B).

A Figura 20 mostra as preparações de citocentrífuga coradas com Leishman ou pela reação citoquímica para esterase não específica das células após 72 horas de incubação com TPA. As células tratadas com TPA apresentaram alteração de morfologia, evidenciando uma quantidade maior de promonócitos. A relação núcleo citoplasma (N/C) diminuiu e a cromatina apresentou uma conformação um pouco mais condensada. As células tratadas com TPA apresentaram, em média, 86% de sua população positiva para a reação da esterase, evidenciando uma clara

diferenciação celular. A porcentagem de células positivas para esterase não diferiram significativamente entre grupos.

Figura 20 - Morfologia das células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-KMT2E e reação citoquímica para esterase não específica após 72 horas de incubação com TPA. Preparações de citocentrífuga das células coradas com corante de Leishman após tratamento com DMSO por 72 horas (A). Preparações de citocentrífuga das células coradas com corante de Leishman após tratamento com TPA por 72 horas (B). Reação citoquímica para esterase após tratamento com DMSO por 72 horas (C). Reação citoquímica para esterase após tratamento com TPA por 72 horas (D).

4.7. Ensaio clonogênico

A Figura 21 mostra o ensaio de formação de colônia dos grupos de células a partir do plaqueamento em meio semissólido de metilcelulose. As células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E* apresentaram o mesmo padrão de formação de colônias, não mostrando diferença significativa entre os grupos ($p = 0,5280$).

Figura 21 - Ensaio de formação de colônias. As células foram plaqueadas em meio semissólido de metilcelulose e incubadas por 8 dias. Após marcação com MTT para corar as colônias, as mesmas foram contadas. Os grupos não mostraram diferença significativa entre si, apresentando o mesmo padrão clonogênico.

4.8. Mensuração da massa tumoral *in vivo*

O volume da massa tumoral, formada pela injeção de células U937 transduzidas em camundongos NSG, foi acompanhado a partir de medições com paquímetro. A Figura 22 ilustra o aumento do volume dos tumores nas três medições realizadas. Tanto as massas tumorais formadas por células U937 contendo plasmídeo vazio quanto contendo o gene de interesse, apresentaram um padrão similar de crescimento, porém, há uma tendência significativa de maior volume das células U937 pMEG-*KMT2E* ($p = 0,0581$).

Figura 22 - Volume das massas tumorais formadas pelas células U937 pMEG e U937 pMEG-KMT2E. Os tumores apresentaram aumento diário de crescimento, sendo que os que continham o gene de interesse mostraram uma tendência de maior volume.

Os tumores foram retirados cirurgicamente e pesados. As massas tumorais formadas pelas células U937 pMEG-KMT2E apresentaram maior peso do que as formadas pelas células U937 pMEG, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0016$), conforme mostra a Figura 23.

Figura 23 - Peso das massas tumorais formadas pelas células U937 pMEG e U937 pMEG-KMT2E. Cada marcação representa um animal analisado. Os tumores formados pelas células U937 pMEG-KMT2E mostraram uma diferença significativa de peso em relação aos demais.

A morfologia celular apresentada pelas massas tumorais formadas pelas células U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E* não apresentaram diferenças entre si (dados não mostrados). A Figura 24 representa a análise da proliferação celular dos tumores a partir de marcação imuno-histoquímica para Ki-67 (Dako, EUA), mostrando que as células U937 pMEG-*KMT2E* proliferam menos do que as células controles ($p = 0,0273$).

Figura 24 - Análise de proliferação celular das massas tumorais formadas pelas células U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E*. Cada marcação representa um animal analisado. Os tumores formados pelas células U937 pMEG-*KMT2E* apresentaram uma tendência a proliferar menos em relação aos demais, uma vez que revelaram menos células positivas para o antígeno Ki-67.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, a indução da expressão do gene *KMT2E* na linhagem U937 foi feita através de um vetor lentiviral. Essa metodologia já foi usada com sucesso no estudo de diferentes genes associados à oncogênese e progressão tumoral (BORSOTTI; BORRONI; FOLLENZI, 2016; DENG; CHIU; STROMINGER, 2004; LUO et al., 2016; LUCENA-ARAUJO et al., 2017; SEBASTIAN et al., 2009). Com isso, pudemos estudar os efeitos do aumento da expressão do gene de interesse na proliferação, diferenciação, clonogenicidade e apoptose das células leucêmicas *in vitro*, bem como no crescimento tumoral *in vivo*. Nossos resultados demonstraram que *KMT2E* facilitou a diferenciação celular induzida por TPA. Também mostramos que o aumento da expressão desse gene favoreceu o crescimento dos tumores em modelo animal.

No nosso modelo, o mRNA do gene de interesse, nas células transduzidas, mostrou-se 1000 vezes mais expresso do que nas células selvagens, ao passo que a proteína teve um aumento mais discreto. Não sabemos exatamente o processo pelo qual isso ocorreu, mas sugerimos um mecanismo pós-transcricional. Outro ponto a ser considerado é que os níveis de expressão de *KMT2E* nas células selvagens e da sua proteína são moderados.

Nós avaliamos a influência do gene *KMT2E* sobre a diferenciação celular usando como estímulo a droga TPA. O TPA é conhecido por estimular a maturação em linhagem monocítica com aumento da aderência celular, diminuição da razão núcleo/citoplasma e aumento da expressão de marcadores monocíticos (DAIGNEAULT et al., 2010; GARCÍA et al., 1999; LUO et al., 2005; NILSSON et al., 1981). De fato, as células U937 tratadas com a droga mostraram mudança morfológica característica e aumento da adesão ao plástico, além do aumento da expressão dos marcadores CD11c, CD11b e CD14 independentemente da modificação genética. As células transduzidas com o gene *KMT2E* apresentaram uma maior diferenciação induzida por TPA em 72 horas, quando levada em consideração a marcação para o antígeno CD11c. O mesmo não foi observado quando as células foram marcadas para os antígenos CD11b e CD14.

O gene CD11c (*integrin subunit alpha X*) codifica para uma molécula membro da subfamília de integrinas $\beta 2$ de leucócitos (CD11a-c/CD18). O dímero CD11c/CD18 é encontrado em células mielóides, porém, é um dos antígenos específicos de diferenciação e maturação de monócitos (CORBÍ; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, 1997; PRIETO; EKLUND; PATARROYO, 1994). Nossos resultados mostraram uma maior expressão de CD11c nas células transduzidas após 72 h de estímulo com TPA. Como esse antígeno está diretamente associado à diferenciação monocítica, podemos inferir que a proteína KMT2E auxiliou na diferenciação e maturação nessa linhagem. Embora tenha ocorrido diferença na expressão do antígeno CD11c, não detectamos diferenças na morfologia e na citoquímica para esterase não específica entre as células contendo altos níveis do gene de interesse e as células controle. Possivelmente devido ao fato de que as células U937 selvagens já expressem níveis altos de esterase, uma vez que é uma linhagem monocítica.

Estudos mostraram que o silenciamento do gene *Kmt2e* causou uma diferenciação defeituosa em células de mioblastos murinos (Sebastian et al., 2009; KIM et al., 2010). A proteína KMT2E também se apresentou associada com a diferenciação celular em ensaios *in vivo*. Camundongos machos com o gene *Kmt2e* inativado apresentaram infertilidade, devido a defeitos na maturação tardia e mobilidade de seu esperma (YAP et al., 2011; MADAN et al., 2009). A falta da proteína KMT2E levou a uma diferenciação deficiente das células progenitoras mielóides e eritróides imaturas e a uma diminuição da capacidade das células tronco hematopoiéticas em repovoar o ambiente após irradiação, sob condições competitivas (HEUSER et al., 2009; ZHANG et al., 2009). No nosso estudo, o aumento da expressão do gene *KMT2E* modulou a resposta das células U937 ao tratamento com TPA, favorecendo a diferenciação.

A primeira hipótese para explicar como a expressão induzida de KMT2E favoreceria a diferenciação monocítica seria a ativação da transcrição de genes envolvidos nesse processo pela própria KMT2E. Porém, como previamente mencionado, a proteína KMT2E não possui o domínio de homologia a metiltransferase e nem A-T hooks presentes nas outras proteínas da família, portanto, a modulação da transcrição gênica seria de forma indireta, por meio de interações proteína-proteína através de seus domínios ativos, ao invés da ligação

direta ao DNA (EMERLING et al., 2002; KOUZARIDES et al., 2002). Entre os genes sabidamente regulados pela KMT2E estão genes codificadores de enzimas modificadoras de histonas, como LSD1 e SET7/9 (SEBASTIAN et al., 2009). Nós não fizemos experimentos de imunoprecipitação da cromatina uma vez que diferentes autores demonstraram que a proteína KMT2E é recrutada por mais de 15 mil regiões gênicas e se associa a diversas proteínas (ALI et al., 2013; CHENG et al., 2008; ZHOU, 2012), mostrando um papel diverso e multifuncional na manutenção genética.

KMT2E foi previamente descrito como um possível supressor tumoral, sendo esperado que o mesmo pudesse influenciar o andamento do ciclo celular (DENG; CHIU; STROMINGER, 2004; EMERLING et al., 2002). Estudos evidenciaram, de fato, uma regulação negativa do gene *KMT2E* sobre a divisão celular. A superexpressão de *KMT2E* foi capaz de inibir a progressão do ciclo na fase G₀/G₁ tanto em células transformadas (HEK 293T) quanto em células normais (C2C12) (DENG; CHIU; STROMINGER, 2004; SEBASTIAN et al., 2009). *Kmt2e* demonstrou um papel não só de regulador de proliferação, mas também de indutor de quiescência em mioblastos murinos (SAMBASIVAN; PAVLATH; DHAWAN, 2008). Essa influência sobre a divisão também ocorreu durante o silenciamento gênico de *KMT2E*. Foi demonstrado bloqueio da proliferação celular relacionado à parada do ciclo em células normais diploides e tumorais humanas (CHENG et al., 2008; ZHOU et al., 2013). Não é incomum que a superexpressão de um gene ou seu silenciamento possa causar efeitos análogos, pois demonstram multifunção na regulação do ciclo (CHENG et al., 2008). Em divergência aos estudos prévios, nós não evidenciamos bloqueio da proliferação e nem alteração do ciclo celular nos ensaios *in vitro*. Não há dados descritos na literatura utilizando modelo de leucemia mielóide aguda, portanto, podemos sugerir que a função do gene depende do tipo de célula.

Avaliamos, também, apoptose celular espontânea e induzida *in vitro*, porém, não observamos diferenças entre os grupos. Não há dados na literatura mostrando efeito do gene de interesse sobre a morte celular espontânea quando superexpresso. No presente estudo, a transdução gênica por si só não elevou a taxa de apoptose espontânea, e as células mantiveram uma ótima viabilidade durante todo o tempo em que foram cultivadas. Esse mesmo resultado foi descrito em

experimentos nos quais o gene *KMT2E* foi silenciado por RNA de interferência (CHENG et al., 2008). Por outro lado, estudos mostraram a ativação da via de apoptose associada ao silenciamento de *KMT2E*, sugerindo um possível papel protetor do mesmo na morte celular dependente de p53 (CHENG et al., 2011; NIN et al., 2015; Yew et al., 2011). Portanto, ainda não está claro se o gene *KMT2E* participa da regulação da apoptose. Nossos resultados sugerem que este não é o caso.

Para testar a influência da nossa manipulação genética na apoptose induzida, usamos dois estímulos: o ATO e a exposição à luz UV. O ATO é um composto genotóxico e clastogênico, ou seja, produz a quebra de cromossomos. Estudos demonstraram que o ATO é capaz de induzir apoptose de diferentes formas, dependendo da célula, como por meio de mutações genéticas (SORIANO; CREUS; MARCOS, 2008), quebra de DNA dupla fita (STEVENSON et al., 2010), ativação de p53 (JIANG et al., 2001; TCHOUNWOU; YEDJOU; DORSEY, 2003), indução de estresse oxidativo (ALARIFI et al., 2013), parada de ciclo celular e modulação de genes apoptóticos (ZHANG et al., 1998; CHEN et al., 1996) e diminuição do potencial de membrana da mitocôndria (CAI et al., 2003) assim como ativação da atividade de caspase 3 (KUMAR; YEDJOU; TCHOUNWOU, 2014). Já apoptose induzida por luz UV sabe-se estar amplamente associada ao dano ao DNA, que ativa a via de p53. Porém, também pode estar associado à ativação de ligantes relacionados à morte celular (KULMS; SCHWARZ, 2000). Neste trabalho, nós avaliamos a porcentagem do número de células apoptóticas após indução por droga e radiação *in vitro*. Não observamos diferença estatística no número de células apoptóticas entre as células controle e as células supreexpressando *KMT2E* após essa indução.

Quando as células transduzidas foram inoculadas em camundongos NSG, pudemos verificar uma baixa proliferação celular das células contendo altos níveis de *KMT2E*, comprovada pela porcentagem menor de células ki-67 positivas nas células manipuladas geneticamente. O processo de diferenciação está associado a menor proliferação, assim, é possível que o aumento da expressão de CD11c e a menor marcação para Ki-67 reflitam o mesmo processo celular. Porém, cumpre dizer que também *in vivo* não detectamos diferença na morfologia. *In vivo*, as células U937 modificadas geneticamente para maior expressão do gene *KMT2E* formaram

tumores significativamente mais pesados, assim como de maior volume em relação aos tumores originados das células contendo o plasmídeo vazio.

Podemos aventar algumas hipóteses para explicar as diferenças *in vitro* e *in vivo*: 1) as interações entre as células leucêmicas com a matriz extracelular (MEC) que ocorre apenas *in vivo* favoreceria o crescimento tumoral. Em concordância a essa primeira hipótese, a expressão de CD11c/CD18 aumenta continuamente durante a diferenciação celular monocítica, devido a um possível efeito direto da matriz extracelular sob a sua expressão, além de ser regulada pelos níveis de proliferação em que a célula se encontra (CORBÍ; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, 1997). A molécula CD11c está associada com a adesão celular à matriz extracelular. A adesão de células através desses receptores específicos à MEC estimula vias de sinalização que regulam a sobrevivência, proliferação, migração, polaridade e diferenciação celular (HOLLE; YOUNG; SPATZ, 2016). Essas interações medeiam uma importante vantagem de sobrevivência, em especial em nichos de células tumorais isoladas. ESTRUGO et al. (2007) mostrou também uma relação entre integrinas e a proteção celular contra a apoptose, devido a uma interação entre as integrinas $\beta 1$ e a MEC que inibe a ativação de procaspase-8. Tais fatos explicariam porque obtivemos um maior crescimento tumoral *in vivo*, porém, com baixa proliferação celular das células contendo a superexpressão de KMT2E. Nossa hipótese é que as células transduzidas tiveram uma tendência maior à diferenciação, aumentando os níveis de CD11c/CD18 devido a interação com a matriz extracelular e, portanto, proliferando menos e morrendo menos do que as células que não possuíam a superexpressão de KMT2E.

A segunda hipótese seria que fatores secretados pela célula modificada geneticamente modificariam o microambiente favorecendo o maior crescimento tumoral, por exemplo, aumentando a angiogênese, ou seja, a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Ao longo da mesma linha, outras moléculas liberadas no microambiente poderiam conferir vantagens às células modificadas, como por exemplo, fatores de crescimento (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016). Nós não analisamos especificamente tal processo, porém, as massas tumorais formadas pelas células U937 contendo a superexpressão de KMT2E aparentavam ser mais vascularizadas (dados não mostrados).

Nossos resultados mostram que, embora seja proposto um papel de supressor tumoral para o gene *KMT2E*, não detectamos diferenças em variáveis classicamente associadas à atividade supressora tumoral entre as células com diferentes níveis de expressão do mRNA e da proteína em questão. Ao contrário, pudemos verificar uma maior diferenciação monocítica das células transduzidas com o gene. Isso pode sugerir que a proteína KMT2E regula positivamente a diferenciação celular e é possível que altos níveis de expressão gênica possam facilitar a ação de drogas indutoras de diferenciação monocítica. Nós também mostramos que as células U937 contendo superexpressão de *KMT2E*, quando inoculadas em camundongos, formaram tumores mais pesados e de maior volume, porém, possuíam uma menor marcação para Ki-67, um antígeno associado diretamente à proliferação celular. Tal resultado sugere que o aumento da quantidade de proteína KMT2E confere vantagem à célula geneticamente modificada. Como esse achado foi detectado somente *in vivo*, nossa hipótese é que decorra da interação com meio ambiente, seja tipo célula-matriz extracelular ou através de fatores parácrinos. Estamos conduzindo experimentos para verificar a porcentagem de células apoptóticas e de células expressando marcadores monocíticos/macrofágicos nas massas tumorais obtidas dos camundongos inoculados.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Nossos resultados demonstraram que a superexpressão do gene *KMT2E* na linhagem U937 de LMA não afetou a apoptose, espontânea ou induzida, proliferação, viabilidade, ciclo celular e capacidade de formação de colônias *in vitro*;
- A superexpressão do gene *KMT2E* causou aumento na expressão de CD11c, a qual pode estar associada a uma maior diferenciação celular induzida por TPA;
- A inoculação de células U937 superexpressando KMT2E produziu tumores significativamente mais pesados e com volumes maiores do que a inoculação de células controle em camundongos NSG.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-DUHIER, F. M. et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. **British journal of haematology**, v. 111, n. 1, p. 190-195, 2000.
- ANTONSON, Per; XANTHOPOULOS, Kleanthis G. Molecular cloning, sequence, and expression patterns of the human gene encoding CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α). **Biochemical and biophysical research communications**, v. 215, n. 1, p. 106-113, 1995.
- ALARIFI, Saud et al. Arsenic trioxide-mediated oxidative stress and genotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. **Onco Targets Ther**, v. 6, n. 2, p. 75-84, 2013.
- ALI, M. et al. Molecular basis for chromatin binding and regulation of MLL5. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 28, p. 11296-11301, 2013.
- ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, p. blood-2016-03-643544, 2016.
- BALDUS, C. D. et al. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. **Blood**, v. 102, n. 5, p. 1613-8, 2003.
- BERGMANN, L. et al. High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. **Blood**, v. 90, n. 3, p. 1217-25, 1997.
- BOHLANDER, S. K. et al. Molecular analysis of the CALM/AF10 fusion: identical rearrangements in acute myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma patients. **Leukemia**, v. 14, n. 1, p. 93, 2000.
- BORSOTTI, Chiara; BORRONI, Ester; FOLLENZI, Antonia. Lentiviral vector interactions with the host cell. **Current Opinion in Virology**, v. 21, p. 102-108, 2016.
- BYRD, J. C. et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4325-36, 2002.
- CAI, X. et al. Arsenic trioxide-induced mitotic arrest and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. **Leukemia**, v. 17, n. 7, p. 1333-1337, 2003.
- CHENG, F. et al. RNA interference against mixed lineage leukemia 5 resulted in cell cycle arrest. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 11, p. 2472-2481, 2008.
- CHENG, F. et al. Camptothecin-induced downregulation of MLL5 contributes to the activation of tumor suppressor p53. **Oncogene**, v. 30, n. 33, p. 3599-3611, 2011.
- CHEN, Guo-Qiang et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell

apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. **Blood**, v. 88, n. 3, p. 1052-1061, 1996.

CHOU, T. C.; MARTIN, N. CompuSyn for drug combinations: PC software and user's guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values. **ComboSyn, Paramus, NJ**, 2005.

CORBÍ, Angel L.; RODRÍGUEZ, Cristina López. CD11c integrin gene promoter activity during myeloid differentiation. **Leukemia & lymphoma**, v. 25, n. 5-6, p. 415-425, 1997.

DAIGNEAULT, M. et al. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. **PloS one**, v. 5, n. 1, p. e8668, 2010.

DAMM, F. et al. Prognostic importance of histone methyltransferase MLL5 expression in acute myeloid leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 6, p. 682-689, 2011.

DEGOS, Laurent et al. All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia [see comments]. **Blood**, v. 85, n. 10, p. 2643-2653, 1995.

DENG, L.; CHIU, I.; STROMINGER, J. L. MLL5 protein forms intranuclear foci, and overexpression inhibits cell cycle progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 3, p. 757-762, 2004.

DICKSON, G. J. et al. HOXA/PBX3 knockdown impairs growth and sensitizes cytogenetically normal acute myeloid leukemia cells to chemotherapy. **Haematologica**, p. haematol. 2012.079012, 2013.

DÖHNER, K. et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3740-3746, 2005.

DREYLING, M. H. et al. The t (10; 11)(p13; q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 10, p. 4804-4809, 1996.

EMERLING, B. M. et al. MLL5, a homolog of Drosophila trithorax located within a segment of chromosome band 7q22 implicated in myeloid leukemia. **Oncogene**, v. 21, n. 31, p. 4849-4854, 2002.

ERNST, P. et al. Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. **Developmental cell**, v. 6, n. 3, p. 437-443, 2004.

ESTEY, E.; DÖHNER, H. Acute myeloid leukaemia. **The Lancet**, v. 368, n. 9550, p. 18, 2006.

ESTRUGO, D. et al. Ligand bound $\beta 1$ integrins inhibit procaspase-8 for mediating cell adhesion-mediated drug and radiation resistance in human leukemia cells. **PLoS One**, v. 2, n. 3, p. e269, 2007.

FALINI, B. et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 3, p. 254-266, 2005.

FIELDING, Adele K. et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 944-950, 2007.

FUJIKI, R. et al. GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 455-459, 2009.

GARCÍA, A. et al. Differential effect on U937 cell differentiation by targeting transcriptional factors implicated in tissue-or stage-specific induced integrin expression. **Experimental hematology**, v. 27, n. 2, p. 353-364, 1999.

GEISLER, Sarah J.; PARO, Renato. Trithorax and Polycomb group-dependent regulation: a tale of opposing activities. **Development**, v. 142, n. 17, p. 2876-2887, 2015.

GILLILAND, D. G.; GRIFFIN, J. D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1532-1542, 2002.

GRIMWADE, D. et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. **Blood**, v. 92, n. 7, p. 2322-2333, 1998.

HARNED, Theresa M.; GAYNON, Paul S. Relapsed acute lymphoblastic leukemia: current status and future opportunities. **Current oncology reports**, v. 10, n. 6, p. 453-458, 2008.

HE, Li-Zhen et al. Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RAR α transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 10, p. 5302-5307, 1997.

HEUSER, M. et al. High meningeoma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. **Blood**, v. 108, n. 12, p. 3898-3905, 2006.

HEUSER, M. et al. Loss of MLL5 results in pleiotropic hematopoietic defects, reduced neutrophil immune function, and extreme sensitivity to DNA demethylation. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1432-1443, 2009.

HOLLE, Andrew W.; YOUNG, Jennifer L.; SPATZ, Joachim P. In vitro cancer cell-ECM interactions inform in vivo cancer treatment. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 270-279, 2016.

HUBERT, A. et al. Epigenetic regulation of planarian stem cells by the SET1/MLL family of histone methyltransferases. **Epigenetics**, v. 8, n. 1, p. 79-91, 2013.

Instituto Nacional de Câncer. Acesso em outubro, 2016.
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>

JIANG, Xiao-Hua et al. Arsenic trioxide induces apoptosis in human gastric cancer cells through up-regulation of P53 and activation of caspase-3. **International journal of cancer**, v. 91, n. 2, p. 173-179, 2001.

KANDOTH, C. et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. **Nature**, v. 502, n. 7471, p. 333-339, 2013.

KANSAL, Rina. Acute myeloid leukemia in the era of precision medicine: recent advances in diagnostic classification and risk stratification. **Cancer biology & medicine**, v. 13, n. 1, p. 41, 2016.

KIM, M. J. et al. α -Syntrophin modulates myogenin expression in differentiating myoblasts. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e15355, 2010.

- KOUZARIDES, T. Histone methylation in transcriptional control. **Current opinion in genetics & development**, v. 12, n. 2, p. 198-209, 2002.
- KOSCHMIEDER, S. et al. Dysregulation of the C/EBP α differentiation pathway in human cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 4, p. 619-628, 2009.
- KOTTARIDIS, P. D. et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1752-1759, 2001.
- KULMS, D.; SCHWARZ, T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 16, n. 5, p. 195-201, 2000.
- KUMAR, Sanjay; YEDJOU, Clement G.; TCHOUNWOU, Paul B. Arsenic trioxide induces oxidative stress, DNA damage, and mitochondrial pathway of apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 33, n. 1, p. 42, 2014.
- LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEVIS, M.; SMALL, D. FLT3: ITDoes matter in leukemia. **Leukemia**, v. 17, n. 9, p. 1738-1752, 2003.
- LÖWENBERG, B.; GRIFFIN, J. D.; TALLMAN, M. S. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. **ASH Education Program Book**, v. 2003, n. 1, p. 82-101, 2003.
- LIU, H.; WESTERGARD, T. D.; HSIEH, J. J.-D. MLL5 governs hematopoiesis: a step closer. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1395-1396, 2009.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LUCENA-ARAUJO, A. R. et al. Prognostic impact of KMT2E transcript levels on outcome of patients with acute promyelocytic leukaemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy: an International Consortium on Acute Promyelocytic Leukaemia study. **British journal of haematology**, v. 166, n. 4, p. 540-549, 2014.
- LUCENA-ARAUJO, Antonio R. et al. $\Delta Np73$ overexpression promotes resistance to apoptosis but does not cooperate with PML/RARA in the induction of an APL-leukemic phenotype. **Oncotarget**, 2016.
- LUNA-FINEMAN, S.; SHANNON, K. M.; LANGE, B. J. Childhood monosomy 7: epidemiology, biology, and mechanistic implications. **Blood**, v. 85, n. 8, p. 1985-1999, 1995.
- LUO, Y. et al. Molecular mechanism of differentiation and apoptosis of U937 cells induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Chinese Journal of Clinical Oncology**, v. 2, n. 2, p. 553-557, 2005.
- LUO, L. et al. Lentiviral-mediated overexpression of KCTD12 inhibits the proliferation of human uveal melanoma OCM-1 cells. **Oncology Reports**, v. 37, n. 2, p. 871-878, 2017.

MACHADO-NETO, J. A. **Investigação funcional de ankhd1 e proteínas relacionadas em neoplasias hematológicas**. 2015. 160 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

MADAN, V. et al. Impaired function of primitive hematopoietic cells in mice lacking the Mixed-Lineage-Leukemia homolog MLL5. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1444-1454, 2009.

MARCUCCI, G. et al. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. **Journal of clinical oncology**, v. 25, n. 22, p. 3337-3343, 2007.

MESHINCHI, S. et al. Prevalence and prognostic significance of FIt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 89-94, 2001.

MINUCCI, S. et al. PML-RAR induces promyelocytic leukemias with high efficiency following retroviral gene transfer into purified murine hematopoietic progenitors. **Blood**, v. 100, n. 8, p. 2989-2995, 2002.

MILNE, Thomas A. et al. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. **Molecular cell**, v. 10, n. 5, p. 1107-1117, 2002.

MRÓZEK, K.; HEINONEN, K.; BLOOMFIELD, C. D. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 14, n. 1, p. 19-47, 2001.

National Cancer Institute. Acute myeloid leukemia. Acesso em outubro, 2016.
(<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>)

NARITA, Masami et al. Consistent detection of CALM-AF10 chimaeric transcripts in haematological malignancies with t (10; 11)(p13; q14) and identification of novel transcripts. **British journal of haematology**, v. 105, n. 4, p. 928-937, 1999.

NILSSON, K. et al. Surface characteristics of the U-937 human histiocytic lymphoma cell line: specific changes during inducible morphologic and functional differentiation in vitro. In: **Modern Trends in Human Leukemia IV**. Springer Berlin Heidelberg, 1981. p. 215-221, 1981.

NIN, D. S. et al. Targeted silencing of MLL5 β inhibits tumor growth and promotes gamma-irradiation sensitization in HPV16/18-associated cervical cancers. **Molecular cancer therapeutics**, v. 13, n. 11, p. 2572-2582, 2015.

OU, D. M.; LIU, G. X.; YAN, J. Y. CALM-AF10 fusion transcripts in primary leukemia with t (10; 11) and in vitro chemotherapy sensitivity of leukemic cells with t (10; 11). **Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi/Zhongguo bing li sheng li xue hui= Journal of experimental hematology/Chinese Association of Pathophysiology**, v. 12, n. 6, p. 770-773, 2004.

POGODA, J. M. et al. Smoking and risk of acute myeloid leukemia: results from a Los Angeles County case-control study. **American journal of epidemiology**, v. 155, n. 6, p. 546-553, 2002.

POPPE, B. et al. Expression analyses identify MLL as a prominent target of 11q23 amplification and support an etiologic role for MLL gain of function in myeloid malignancies. **Blood**, v. 103, n. 1, p. 229-235, 2004.

POYNTER, Steven T.; KADOCH, Cigall. Polycomb and trithorax opposition in development and disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 5, n. 6, p. 659-688, 2016.

PRIETO, Jacqueline; EKLUND, Anders; PATARROYO, Manuel. Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. **Cellular immunology**, v. 156, n. 1, p. 191-211, 1994.

RAO, Rajesh C.; DOU, Yali. Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 6, p. 334-346, 2015.

REBOUÇAS, Juliana de Souza; SANTOS-MAGALHÃES, Nereide Stela; FORMIGA, Fabio Rocha. Cardiac regeneration using growth factors: advances and challenges. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 271-275, 2016.

SAMBASIVAN, R.; PAVLATH, G. K.; DHAWAN, J. A gene-trap strategy identifies quiescence-induced genes in synchronized myoblasts. **Journal of biosciences**, v. 33, n. 1, p. 27-44, 2008.

SEBASTIAN, S. et al. MLL5, a trithorax homolog, indirectly regulates H3K4 methylation, represses cyclin A2 expression, and promotes myogenic differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 12, p. 4719-4724, 2009.

SCHLENK, R. F. et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 18, p. 1909-1918, 2009.

SCHUETTENGROBER, Bernd et al. Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 12, n. 12, p. 799-814, 2011.

SLOVAK, M. L. et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. **Blood**, v. 96, n. 13, p. 4075-4083, 2000.

SMITH, S. M. et al. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. **Blood**, v. 102, n. 1, p. 43-52, 2003.

SORIANO, Carolina; CREUS, Amadeu; MARCOS, Ricard. Arsenic trioxide mutational spectrum analysis in the mouse lymphoma assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 646, n. 1, p. 1-7, 2008.

SOULIÉ, Stéphanie et al. Urea reduces the aggregation of membrane proteins on sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical biochemistry**, v. 236, n. 2, p. 363-364, 1996.

STEVENS, Jacqueline J. et al. The effects of arsenic trioxide on DNA synthesis and genotoxicity in human colon cancer cells. **International journal of environmental research and public health**, v. 7, n. 5, p. 2018-2032, 2010.

STIREWALT, D. L. et al. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 97, n. 11, p. 3589-3595, 2001.

STONE, R. M.; O'DONNELL, Margaret R.; SEKERES, Mikkael A. Acute myeloid leukemia. **ASH Education Program Book**, v. 2004, n. 1, p. 98-117, 2004.

- STROM, Sara S. et al. De novo acute myeloid leukemia risk factors. **Cancer**, v. 118, n. 18, p. 4589-4596, 2012.
- SWERDLOW, S. et al. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues 4th Ed.(2008). 2008.
- TALLMAN, M. S.; GILLILAND, D. Gary; ROWE, Jacob M. Drug therapy for acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1154-1163, 2005.
- THIEDE, C. et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. **Blood**, v. 99, n. 12, p. 4326-4335, 2002.
- TCHOUNWOU, P. B.; YEDJOU, C. G.; DORSEY, W. C. Arsenic trioxide-induced transcriptional activation of stress genes and expression of related proteins in human liver carcinoma cells (HepG2). **Cellular and molecular biology** (Noisy-le-Grand, France), v. 49, n. 7, p. 1071-1079, 2003.
- VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937-51, 2009.
- ZAGO, M. A. et al. Tratado de Hematologia. **Editora: Atheneu, São Paulo**, 2013.
- ZHANG, W. et al. The induction of apoptosis and cell cycle arrest by arsenic trioxide in lymphoid neoplasms. **Leukemia (08876924)**, v. 12, n. 9, 1998.
- ZHANG, Y. et al. MLL5 contributes to hematopoietic stem cell fitness and homeostasis. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1455-1463, 2009.
- ZHOU, J. Arsenic trioxide: an ancient drug revived. **Chinese medical journal**, v. 125, n. 19, p. 3556-3560, 2012.
- ZHOU, P. et al. Mixed lineage leukemia 5 (MLL5) protein regulates cell cycle progression and E2F1-responsive gene expression via association with host cell factor-1 (HCF-1). **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 24, p. 17532-17543, 2013.
- WHITMAN, S. P. et al. Absence of the Wild-Type Allele Predicts Poor Prognosis in Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia with Normal Cytogenetics and the Internal Tandem Duplication of FLT3 A Cancer and Leukemia Group B Study. **Cancer research**, v. 61, n. 19, p. 7233-7239, 2001.
- WU, Y. et al. Abnormal expression of TGF-beta type II receptor isoforms contributes to acute myeloid leukemia. **Oncotarget**, 2016. No prelo.
- YAP, D. B. et al. Mll5 is required for normal spermatogenesis. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27127, 2011.
- YEW, C. W. et al. A novel MLL5 isoform that is essential to activate E6 and E7 transcription in HPV16/18-associated cervical cancers. **Cancer research**, v. 71, n. 21, p. 6696-6707, 2011.

APÊNDICE

Figura 25 - Replicatas da análise da expressão do gene *KMT2E* a partir da sequência otimizada inserida no plasmídeo pMEG-*KMT2E* na linhagem U937. Ambos os gráficos representam as outras duas replicatas experimentais realizadas além do gráfico exposto nos resultados desse trabalho.

Figura 26 - Análises de diferenciação celular induzida pelo tratamento com 20 nM de TPA nas células U937 WT, U937 pMEG e U937 pMEG-*KMT2E* através da marcação com anticorpos anti-CD11b e anti-CD14. As amostras foram tratadas com a droga e incubadas por 48 e 72 horas e marcadas com anti-CD11b (PE) e anti-CD14 APC (BD Biosciences, EUA). A média de intensidade de fluorescência dos grupos não alterou para esses marcadores, não mostrando diferença significativa de eficiência de diferenciação.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Análise funcional da proteína KMT2E na Leucemia Mieloide Aguda*”, registrado com o número **172/2016**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 31 de outubro de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 20 camundongos machos NUDE, pesando 22g, oriundos do Laboratório de Estudos Experimentais em Animais (LEEA) de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 31/10/2016 a 23/11/2017.

We certify that the Protocol *nº 172/2016*, entitled “*Functional analysis of KMT2E protein in Acute Myeloid Leukemia*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *10/31/2016*. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 20 male NUDE mice weighing 22g from the Laboratory of Experimental Studies in Animals of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 11/23/2017.

Ribeirão Preto, 31 de outubro de 2016

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP