



Universidade de Brasília – UnB

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

ELIZABETE CRISTINA ISEKE BISPO

INFLUÊNCIA DE EHMT1 E EHMT2 NA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

BRASÍLIA

2019

ELIZABETE CRISTINA ISEKE BISPO

INFLUÊNCIA DE EHMT1 E EHMT2 NA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

Co-orientadora: Ma. Amandda Évelin Carvalho

BRASÍLIA

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir concluir mais uma etapa na minha vida e por ter me dado resiliência para que a concluísse.

À minha família que me apoiou durante essa caminhada, que esteve ao meu lado nos momentos em que achei que não fosse ser possível chegar onde cheguei.

Aos meus colegas de curso, que fizeram dessa caminhada árdua, prazerosa. Quero deixar aqui, meu agradecimento especial à minha melhor amiga e irmã de coração Adriana, que me ofereceu suporte para enfrentar os problemas encontrados durante a graduação, bem como os problemas trazidos pela vida.

Aos servidores da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, lotados na Gerência de Avaliação de Tecnologia de Registro de Medicamentos Sintéticos (GRMED), aos servidores da Farmácia Escola do HUB e aos funcionários da Drogaria Rosário, filial 38 que me proporcionaram as melhores experiências de estágio, além de muito terem me ensinado.

À Universidade de Brasília, que me proporcionou o amadurecimento durante esses 5 anos de graduação, que me mostrou novos ares e conhecimentos. Quero agradecer a todos os professores da graduação, por me agraciar com seu conhecimento e por me prepararem para a nova fase da minha vida. Um agradecimento especial ao professor Felipe Saldanha por ter aceitado me orientar na elaboração deste trabalho.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha co-orientadora Amandda, que me ajudou durante a elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS.....	10
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 - Fisiopatologia e Epidemiologia	12
1.2 - Diagnóstico	14
1.3 - Prognóstico.....	15
1.4 – Tratamento	16
1.5 – Epigenética e Câncer.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivos gerais.....	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. METODOLOGIA	22
3.1 – Casuística.....	22
3.2 – Isolamento das células mononucleares do sangue periférico	22
3.3 Extração de RNA e síntese do cDNA.....	23
3.4 - PCR em tempo real.....	23
3.5 - Análise Estatística	23

4. RESULTADOS	24
4.1 – Perfil clínico e demográfico dos pacientes com LMC	24
4.2 – Perfil de expressão de EHMT1 e EHMT2 em pacientes com LMC	25
4.3 –Expressão de EHMT1 e EHMT2 nas diferentes fases da LMC	26
4.4 – Expressão de EHMT1 e EHMT2 em pacientes com LMC não influencia na resposta ao tratamento com Mesilato de Imatinibe	27
4.5 –Expressão de EHMT1 e EHMT2 não apresenta associação com o prognóstico na LMC	28
4.6 – Correlação entre a expressão de EHMT1 e EHMT2 em pacientes com LMC	29
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS	34

RESUMO

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa caracterizada por uma desordem clonal da célula-tronco hematopoiética, cuja patogênese está ligada ao cromossomo *Philadelphia* (Ph). Esse cromossomo deriva da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 (Cr9-q) e 22 (Cr22-q) dando origem ao gene híbrido *BCR-ABL*. Apesar de possuir um curso clínico heterogêneo, a LMC pode ser classificada em três fases: crônica, acelerada e blástica, sendo o diagnóstico estabelecido por exames citogenéticos e moleculares. Por muitos anos, a taxa de sobrevivência desses pacientes era relativamente baixa, contudo, um avanço significativo foi observado nesse campo com a aprovação do Mesilato de Imatinibe e outros inibidores de tirosina quinase de segunda e terceira geração. Estudos apontam que além do cromossomo Ph, mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos no desenvolvimento, progressão, prognóstico e resistência ao tratamento no câncer. Utilizando a metodologia de PCR em tempo real, buscamos nesse estudo avaliar a influência da expressão de duas enzimas da classe das histonas metiltransferases (EHMT1 e EHMT2) na LMC. Apesar dos relatos descritos na literatura sobre influência dessas enzimas em outros tipos de câncer, não observamos diferença significativas na sua expressão em amostras de LMC quando comparado a expressão apresentada por indivíduos saudáveis. Também não encontramos associações significativas dessas enzimas com a progressão da doença, fatores prognósticos e resistência ao tratamento. Nossos dados não indicam impacto de EHMT1 e EHMT2 na LMC, pelo menos, nos que diz respeito aos parâmetros investigados, entretanto, novos estudos, com maior número de casos, são necessários nesse campo para melhor elucidar a relação de EHMT1 e EHMT2 na LMC.

Palavras-chave: Leucemia Mieloide Crônica, EHMT1, EHMT2, epigenética, histonas metiltransferases.

ABSTRACT

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a myeloproliferative disease characterized by clonal hematopoietic stem cell disorder, which its pathogenesis is attached to the Philadelphia (Ph) chromosome. This chromosome derives from the translocation of the long arms of the chromosomes 9 (Cr9-q) and 22 (Cr22-q) giving rise to the hybrid gene BCR-ABL. Despite having a heterogenous clinical course, CML can be classified in three phases: chronic, accelerated and blastic, and its diagnostic is established by cytogenetics and molecular exams. For many years, the survival rate of these patients was relatively low, however, a significant advance was observed in this field with the approval of Imatinib Mesylate and second and third generation of tyrosine kinase inhibitors. Studies show that beyond Ph chromosome, epigenetic mechanisms are involved in the development, progression, prognosis and treatment resistance on cancer. Using real time PCR methodology, in this study, we sought to evaluate the influence of two enzymes of the histone methyltransferase class (EHMT1 and EHMT2) in CML. Even though the literature reports about the influence of these enzymes in other types of cancer, we didn't find significant differences in their expression in CML samples when compared to the expression presented by healthy individuals. Also, we didn't find significant association with disease progression, prognostic factors and treatment resistance. Our data do not indicate impact of EHMT1 and EHMT2 in CML, at least regarding to the investigated parameters. However, new studies, with a large number of cases, are necessary in this field to elucidate the relation of EHMT1 and EHMT2 in CML.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia, EHMT1, EHMT2, epigenetic, histone methyltransferases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cromossomo Philadelphia.....	12
Figura 2 - Modificações das Histonas.	19
Figura 3 - Perfil de expressão de EHMT1 e EHMT2 em pacientes com LMC..	26
Figura 4 - Perfil de expressão de EHMT1 e EHMT2 nas fases da LMC.	27
Figura 5 - Perfil de expressão de EHMT1 e EHMT2 na resposta ao tratamento dos pacientes com LMC em uso de MI.....	28
Figura 6 - Perfil de expressão de EHMT1 e EHMT2 em relação ao prognóstico da LMC.	29
Figura 7 - Correlação entre a expressão de EHMT1 e EHMT2 em pacientes com LMC.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Índices de Prognósticos estabelecidos na LMC	16
Tabela 2 – Resposta ao tratamento da LMC	17
Tabela 3 – Perfil clínico e demográfico dos pacientes	25

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

α = alfa

μL = Microlitros

ATP = Adenosina Trifosfato

SBTMO = Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea

CCyR = Resposta Citogenética Completa LMC

cDNA = DNA complementar

CHR = Resposta Hematológica Completa

cm = Centímetro

CMR = Resposta Molecular Completa

CMSP = Células Mononucleares do Sangue Periférico

Cr = Cromossomo

CyR = Resposta Citogenética

DDCT = Metodologia “delta delta CT”

EHMT1 = do inglês “*Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 1*”

EHMT2 = do inglês “*Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 2*”

EUTOS = do inglês “*European Treatment and Outcome Study*”

FISH = Hibridização Fluorescente *In Situ*

H3K9= Metilação da Lisina 9 da histona 3

HKMT = Histona Lisina Metiltransferase

IFN = Interferon

L = Litro

LMC = Leucemia Mieloide Crônica

MI = Mesilato de Imatinibe

MMR = Resposta Molecular Maior

PBS = Tampão Fosfato-Salino

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase

Ph = Filadélfia

Ph⁺ = Filadélfia Positivo

q = Braço Longo Cromossômico

RNA = Ácido Ribonucleico

RT-PCR = Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa

TCLE = Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TKI = Inibidores de Tirosina Quinase

TMO = Transplante de Medula Óssea

x g = Força g

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Fisiopatologia e Epidemiologia

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa caracterizada por uma desordem clonal da célula-tronco hematopoiética e cuja patogênese está ligada ao cromossomo *Philadelphia* (Ph). Esse cromossomo deriva da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 (Cr9-q) e 22 (Cr22-q) - t (9;22), dando origem ao gene híbrido BCR-ABL (figura 1) que codifica a proteína BCR-ABL1 (ROWLEY, 1973; APPERLEY, 2015). Essa, por sua vez, é capaz de sofrer autofosforilação, descontrolando assim, a sinalização de uma grande quantidade de proteínas responsáveis pela regulação da proliferação celular (APPERLEY, 2015; RABELLO *et al.*, 2018).

Essa oncoproteína aumenta a expressão de BCL-XL, MCL-13 e diminui a expressão de TRAIL e de WASP, proteínas envolvidas na apoptose celular (PEREIRA, *et al.*, 2017), além disso, ela também estimula a expressão das proteínas responsáveis pelo mecanismo de proliferação celular, como as proteínas das vias de sinalização celular JAK/STAT, RAS/MAPK e PI3K/AKT (KURODA *et al.*, 2013).

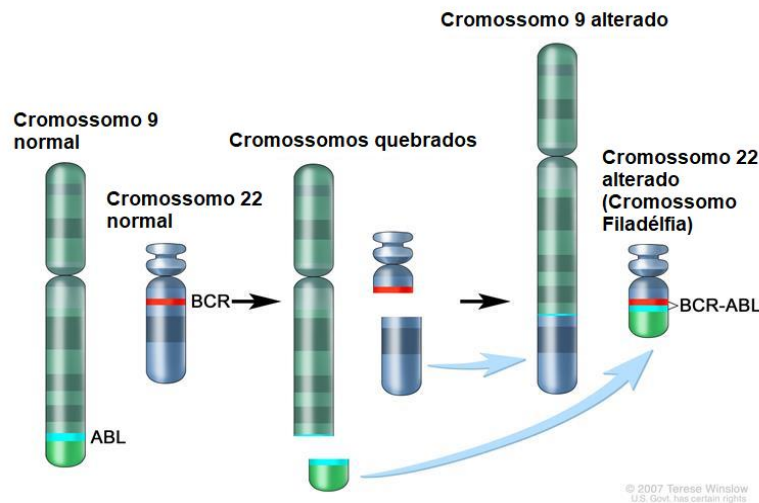


Figura 1 - Cromossomo Philadelphia. Um pedaço do cromossomo 9 e um pedaço do cromossomo 22 se desprendem e sofrem translocação. O gene BCR-ABL é formado no cromossomo 22, na qual o pedaço do cromossomo 9 se liga. O cromossomo 22 modificado é chamado de cromossomo Filadélfia (adaptado de (<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/bcr-abl-fusion-gene>)).

Cerca de 15% dos casos de leucemia em adultos são de LMC e sua predominância é ligeiramente superior em homens (GREENBERG; PROBOST, 2013; APPERLEY, 2015). A incidência é de aproximadamente 1 a cada 100.000 pessoas por ano (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI 2007; APPERLEY, 2015; HÖGLUND; SANDIN; SIMONSSON, 2015). A mediana de idade ao diagnóstico é de 55 a 60 anos, com menos de 10% dos casos em pacientes com menos de 20 anos (TEFFERI *et al.*, 2005).

Embora a doença esteja relacionada à presença de uma única alteração gênica, o quadro clínico é heterogêneo, tanto na apresentação clínica quanto na evolução. Classicamente, a LMC pode ser classificada em três fases: Crônica, Acelerada e Blástica. No início da fase crônica, alguns pacientes são assintomáticos. Quando há presença de sintomas, eles envolvem fadiga, perda de peso, mal-estar, saciedade fácil e/ou dores de cabeça (BORTOLHEIRO; CHIATTONE, 2008).

Segundo a OMS, a fase acelerada da LMC deve ser identificada pela: presença de 10-19% de blastos no sangue periférico ou medula óssea; presença de no mínimo 20% de basófilos em sangue periférico; contagem de plaquetas inferior a $100 \times 10^9/L$ (não atribuída ao tratamento) ou superior a $1000 \times 10^9/L$ (incontrolável durante tratamento); presença de alterações cromossômicas adicionais; elevação na contagem de leucócitos e aumento da esplenomegalia (VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002).

A fase blástica é a de pior prognóstico, sendo caracterizada pela presença de mais de 20% de blastos no sangue periférico ou na medula óssea, pela presença de aglomerados de blastos na medula óssea ou pela presença de doenças extramedulares com células imaturas. Além disso, nessa fase o paciente pode apresentar agravamento dos sintomas constitucionais como fadiga, perda de peso, mal-estar, saciedade fácil e plenitude do copo superior esquerdo ou dor, sangramento, febre e infecções (VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002; JABBOUR; KANTARJIAN, 2018; SCHIFFER, 2018). A progressão do

paciente para a fase blástica também pode ocorrer em uma média de 2 a 5 anos após o início da fase crônica (SCHIFFER, 2018).

1.2 - Diagnóstico

Atualmente, a maioria dos casos de LMC são identificados por meio de exames de sangue de rotina nos quais se identificam, de forma inexplicável, a presença persistente de leucocitose (GREENBERG; PROBST, 2013). A confirmação do diagnóstico na LMC se dá pela identificação do cromossomo Ph por citogenética ou pela metodologia de hibridização fluorescente *in situ* (FISH). O diagnóstico também pode ser feito pela identificação do gene híbrido BCR-ABL por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), na qual se amplifica a região próxima ao *splicing* de junção entre o BCR e o ABL (JABBOUR; KANTARJIAN, 2014). Além da análise qualitativa, a quantificação dos transcritos de BCR-ABL1 tem sido utilizada como estratégia de monitoramento de doença residual mínima (SCHOCH *et al.*, 2002; KANTARJIAN *et al.*, 2008).

O cromossomo Ph está presente em mais de 90% dos casos, entretanto, alterações cromossômicas adicionais podem ser encontradas como trissomia do 8 e isocromossomo 17. Também podem ser observadas translocações variantes envolvendo os cromossomos 9 e 22. Apesar das mudanças no cariótipo, estudos demonstram que pacientes com variantes do cromossomo Ph apresentam resposta à terapia e prognóstico similares àqueles com o Ph clássico (JABBOUR; KANTARJIAN, 2018).

Esses exames são importantes tanto na determinação da fase da doença e do prognóstico, bem como podem ajudar no monitoramento do tratamento (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI 2007; APPERLEY, 2015; MOLICA; MASSARO; BRECCIA, 2017; SCHIFFER, 2018).

1.3 - Prognóstico

O estabelecimento do prognóstico dos pacientes com LMC pode ser realizado com base em características como idade, grau de esplenomegalia, porcentagem de blastos e número de plaquetas. Esses fatores combinados em uma fórmula matemática são capazes de estabelecer pontuações. Dessa forma, é possível classificá-los quanto ao risco (PFIRRMANN *et al.*, 2015). Atualmente, 3 índices podem ser utilizados: Sokal, Euro e EUTOS (European Treatment and Outcome Study) (tabela 1). O índice de Sokal foi o primeiro a ser desenvolvido. Ele classifica os pacientes em três grupos, prevendo as diferentes probabilidades de desfechos para o tratamento quimioterápico (PFIRRMANN *et al.*, 2015).

O Euro score foi desenvolvido para avaliar os pacientes em tratamento com interferon, pois o índice de Sokal não é eficiente para analisar este tipo de tratamento (PFIRRMANN *et al.*, 2015). O estudo desenvolvido por Bonifazi *et al.* (2000) fez uma avaliação multivariada, comparando os dois índices e chegou à conclusão de que o Euro score foi mais acurado, identificando mais pacientes de baixo risco, deixando apenas um pequeno número de casos no grupo de alto risco. O Euro score também é eficaz para prever os desfechos dos pacientes tratados com hidroxiureia. (PFIRRMANN *et al.*, 2015).

O EUTOS risk score foi desenvolvido pela *European Leukemia Network* para prever a resposta citogenética completa e a sobrevida dos pacientes sem que ocorra a progressão da doença. Esse índice de prognóstico foi criado devido à descoberta da nova classe de fármacos utilizados no tratamento da LMC, os inibidores de tirosina quinase (HOFFMAN *et al.*, 2013).

Tabela 1 - Índices de prognósticos estabelecidos na LMC

Índice	Fórmula	Grupo de Risco
Sokal	$\text{SOKAL} = 0.0116 \times (\text{idade [em anos]} - 43.4) + 0.0345 \times (\text{tamanho do baço [cm abaixo da margem costal]} - 7.51) + 0.1880 \times (\text{contagem de plaquetas } [10^9/\text{L}]/700)^2 - 0.563) + 0.0887 \times (\text{blastos } [\% \text{ no sangue periférico}] - 2.10)$	Baixo Risco <0.8 Risco Intermediário ≥ 0.8 e ≤ 1.20 Alto Risco > 1.20
Euro	$\text{Euro} = (0.6666 \times \text{idade [0 quando idade <50 anos; 1 caso contrário]} + 0.0420 \times \text{tamanho do baço [cm abaixo da margem costal]} + 0.0584 \times \text{blastos } [\% \text{ no sangue periférico}] + 0.0413 \times \text{eosinófilos } [\% \text{ porcentagem no sangue periférico}] + 0.02039 \times \text{basófilos [0 quando \% no sangue periférico for <3; 1 caso contrário]} + 1.0956 \times \text{contagem de plaqueta } (10^9/\text{L}) [0 \text{ quando for <1,500; 1 caso contrário}]) \times 1000$	Baixo Risco ≤ 780 Risco Intermediário > 780 e ≤ 1480 Alto Risco > 1480
EUTOS	$\text{EUTOS} = 7 \times \text{basófilos } [\% \text{ no sangue periférico}] + 4 \times \text{tamanho do baço [cm abaixo da margem costal]}$	Baixo Risco ≤ 87 Alto Risco > 87

(Adaptado de PFIRRMANN *et al.*, 2015)

1.4 – Tratamento

Há alguns anos as condições para o tratamento da LMC eram muito limitadas. Entretanto, o progresso científico tem permitido mudanças nos níveis de resposta ao tratamento, na qualidade de vida e na sobrevida desses pacientes. Entre as terapias disponíveis estão o transplante de medula óssea (TMO), os agentes citostáticos como hidroxiureia e bussulfan, o α -interferon (α -IFN) e mais recentemente os inibidores de tirosina quinase (TKI) (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007).

A Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea (SBTMO), em sua diretriz de 2012, preconiza o TMO como terapia inicial ao tratamento da LMC em pacientes pediátricos, nos casos em que há presença da mutação T315I que causa resistência a todos os TKI, em pacientes jovens com doador HLA-idêntico do sexo masculino ou em casos de pacientes com LMC em fases avançadas. Para a realização do TMO, os pacientes devem ser classificados como jovens de baixo risco pelo EUTOS score.

Dessa forma, a aprovação dos inibidores de tirosina quinase foi um marco importante no manejo dos pacientes com LMC e, atualmente, se mantém como primeira linha de

tratamento, sendo o mesilato de Imatinibe (MI), o principal representante dos inibidores de tirosina quinase de primeira geração. Seu mecanismo de ação consiste em inibir de forma competitiva o sítio de ligação de ATP da proteína BCR-ABL1, (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007; JABBOUR; KANTARJIAN, 2014) resultando na inibição da fosforilação das proteínas envolvidas na transdução do sinal celular (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007).

O resultado da eficácia do tratamento pode ser monitorado por avaliação cariotípica associada à análise dos transcritos do gene BCR-ABL. A resposta citogenética ao tratamento com inibidores de tirosina quinase consiste em avaliar o percentual de cromossomos Ph⁺ em células metafásicas e pode ser dividida em completa, parcial e menor (tabela 2) (TALATI *et al.*, 2015).

Tabela 2 - Resposta ao tratamento da LMC.

Resposta	Definição
CHR	Leucócitos < 10 x 10 ⁹ /L, basófilos < 5%, plaquetas < 450 x 10 ⁹ /L, ausência de granulócitos e baço inapalpável.
Menor CyR	36% - 95% Ph ⁺ em células metafásicas da medula óssea
Parcial CyR	≤ 35% Ph ⁺ em células metafásicas da medula óssea
CCyR	0% Ph ⁺ em células metafásicas da medula óssea
MMR	≤ 0.01% BCR-ABL na escala internacional
CMR	BCR-ABL indetectável com métodos de sensibilidade ≥ 4.5 ou 5 logaritmos
CHR = Resposta Hematológica Completa, CyR = Resposta Citogenética, CCyR = Resposta Citogenética Completa, MMR = Resposta Molecular Maior, CMR = Resposta Molecular Completa	

(Adaptado de JABBOUR; KANTARJIAN 2014)

Por meio do monitoramento do tratamento é possível identificar quando há falhas terapêuticas. Alguns casos de falha no uso do MI ocorrem devido ao desenvolvimento de resistência (BACCARANI *et al.*, 2009). Essa resistência é dividida em primária e secundária, sendo que a primária ocorre quando o objetivo do tratamento não é atingido e a secundária caracteriza-se quando em um primeiro momento há resposta ao tratamento e em seguida,

essa resposta é perdida (TALATI *et al.*, 2015). Os mecanismos de resistência aos inibidores de tirosina quinase em cerca de 50% dos casos são devido ao desenvolvimento de mutações (BACCARANI *et al.*, 2009, TALATI *et al.*, 2015).

1.5 – Epigenética e Câncer

Além das lesões genéticas, os mecanismos epigenéticos desempenham um papel importante na oncogênese (GUIÈZE; WU, 2015). A epigenética estuda alterações nas funções dos genes que são herdadas por meio da divisão celular e não envolvem mudanças na sequência de DNA (BISWAS; RAO, 2017), podendo levar a modificação no fenótipo sem alterar o genótipo de uma célula (ZAIDI *et al.*, 2012).

O DNA é armazenado dentro das células nos cromossomos, por meio do seu enovelamento nos chamados nucleossomos (AUDIA; CAMPBELL, 2016). Estes, por sua vez, são constituídos por duas cópias das quatro histonas principais H2A, H2B, H3 e H4, associados à histona de ligação H1, formando um octâmero que envolve as fitas de DNA (AUDIA; CAMPBELL, 2016, BISWAS; RAO, 2017, CASTILLO; LÓPEZ-RODAS; FRANCO, 2017).

Modificações pós-traducionais na porção N-terminal nas caudas de histonas são capazes de impactar a transcrição, replicação e estabilidade da cromatina (BISWAS; RAO, 2017), influenciando assim, a disponibilidade do gene para a transcrição. As principais modificações das histonas encontradas nas neoplasias são a metilação e a acetilação (AUDIA; CAMPBELL, 2016). Entretanto, outras duas modificações bastante comuns envolvidas no processo de regulação celular são a fosforilação e a ubiquitinação (figura 2) (JENUWEIN; ALLIS, 2001; BIRAN; MESHORER, 2012; BISWAS; RAO, 2017).

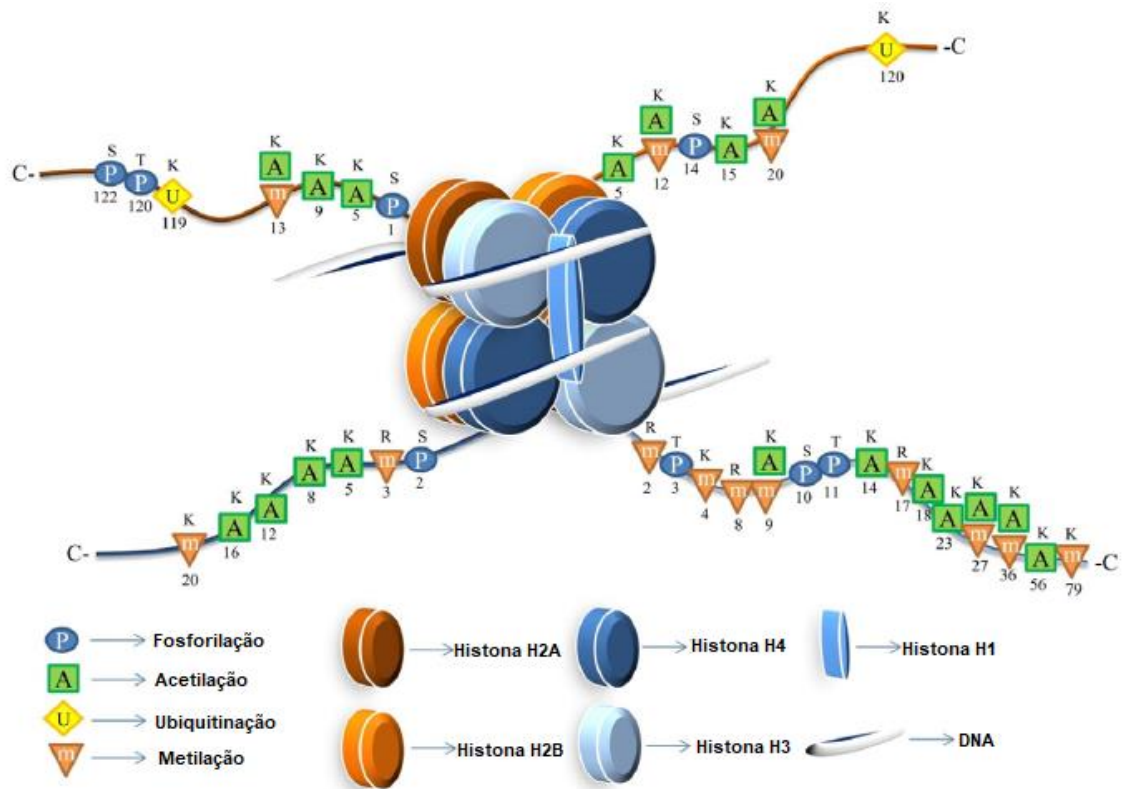


Figura 2 - Modificações das Histonas. Os nucleossomos são a unidade básica da embalagem de DNA em eucariotos e cada um consiste em um octâmero de proteínas histonas incluindo H2A, H2B, H3 e H4. É montado como um tetrâmero de duas cópias de H3 e H4 e um dímero de dois H2A e H2B. A histona ligante H1 mantém o DNA no lugar. Diversas modificações nos diferentes resíduos da cauda das histonas estão sendo mostradas aqui. S, T, K e R representam Serina, Treonina, Lisina e Arginina respectivamente (Adaptado de BISWAS; RAO, 2017).

Nessa linha, mecanismos de metilação de histonas já demonstraram associações a diversas funções, incluindo formação de heterocromatina, inativação cromossômica, reparo de DNA e diferenciação celular. Dentre as metiltransferases, diversos estudos têm demonstrado a importância das enzimas EHMT1 (GLP) e EHMT2 (G9a) em processos neoplásicos (CASCIELLO *et al.*, 2015, SALZBERG *et al.*, 2017, ALVES-SILVA *et al.*, 2018).

EHMT1 e EHMT2 pertencem à família da histona lisina metiltransferase (HKMTs), subgrupo Suv39h do *SET domain-containing*, responsáveis pela mono e dimetilação da histona 3 lisina 9 (H3K9) (SHINKAI; TACHIBANA, 2011). Essas duas enzimas possuem papéis importantes na regulação do ciclo celular, diferenciação celular, desenvolvimento de células germinativas e regulação de alguns aspectos do sistema nervoso central (SHINKAI;

TACHIBANA, 2011, RAO; PAL; TANEJA, 2017). A forma ativa da metiltransferase *in vivo* é o heterodímero formado por EHMT1 e EHMT2 (CASCIELLO *et al.*, 2015), sendo então responsável pela mono e di-metilação da H3K9 na eucromatina (FRITSCH *et al.*, 2010).

A instabilidade cromossômica representa uma marca importante na progressão da LMC. Atualmente, diversos estudos têm investigado as possíveis bases moleculares envolvidas nesse processo e até o momento, inexistem dados relacionando a expressão dessas metiltransferases com o curso da LMC. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da expressão de EHMT1 e EHMT2 na LMC.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Avaliar a influência da expressão de EHMT1 e EHMT2 na Leucemia Mieloide Crônica

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão de EHMT1 e EHMT2 em amostras de pacientes com LMC e de indivíduos saudáveis;
- Avaliar se a expressão de EHMT1 e EHMT2 está associada à progressão da LMC;
- Avaliar se a expressão de EHMT1 e EHMT2 impacta na resposta ao tratamento com Mesilato de Imatinibe;
- Avaliar se expressão de EHMT1 e EHMT2 exerce influência no prognóstico dos pacientes com LMC;
- Estabelecer a correlação entre a expressão de EHMT1 e EHMT2 em pacientes com LMC.

3. METODOLOGIA

3.1 – Casuística

Nesse estudo foram utilizadas 49 amostras de pacientes diagnosticados com LMC, atendidos no serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo. O diagnóstico da doença foi realizado por meio da persistência de leucócitos no sangue periférico dos pacientes e pela presença do cromossomo Ph detectado por citogenética, pela detecção do oncogene BCR-ABL pelo método de *FISH* ou por meio de testes moleculares. A classificação dos pacientes quanto a “resistentes” ou “sensíveis” ao fármaco Mesilato de Imatinibe (MI) foi definido de acordo com a análise da resposta ao tratamento, além da presença de mutações responsáveis pelo desenvolvimento de resistência (BACCARANI *et al.*, 2015; HOCHHAUS *et al.*, 2017). Adicionalmente, foram obtidas amostras de 29 doadores saudáveis de forma a compor um grupo controle.

O uso científico das amostras foi aprovado pelo comitê de ética local e todos os pacientes e voluntários foram submetidos a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.2 – Isolamento das células mononucleares do sangue periférico

As Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) dos pacientes com LMC e dos indivíduos saudáveis foram isoladas por uso do gradiente de densidade Ficoll- Paque (Amersham Biosciences). Em suma, tubos cônicos de 15 mL foram preenchidos com 3 mL de Ficoll, 4 mL de sangue total e 4 mL de tampão PBS, estando todos os reagentes em temperatura ambiente. Os tubos cônicos foram centrifugados a 360xg por 25 minutos. Após esse período, o halo de células mononucleares foi coletado com auxílio de uma pipeta *pasteur*, transferido para um tubo cônico de 50 mL e lavado três vezes com tampão PBS. Após o processo de lavagem, foi realizada a contagem celular.

3.3 Extração de RNA e síntese do cDNA

Após o isolamento das CMSP, todas as amostras foram submetidas à extração de RNA pelo método de TRIZOL-LS conforme instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Após a obtenção do RNA, procedemos com a análise da quantidade e da qualidade desse material utilizando o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

Posteriormente, foi realizada a síntese do cDNA por uso do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) conforme instruções do fabricante.

3.4 - PCR em tempo real

A análise quantitativa da expressão dos genes *EHMT1* e *EHMT2* nas amostras dos pacientes com LMC e dos indivíduos saudáveis foi realizada por PCR em tempo real, utilizando a metodologia TaqMan (Thermo Fisher) cujos primers e sondas foram adquiridos pelo sistema *AssayOnDemand* (Hs00226978-EHMT1 e Hs00198710- EHMT2).

O gene calibrador utilizado foi a B-actina (Hs99999903), cuja eficiência de amplificação é a mesma dos genes alvos, o que possibilitou a análise pela metodologia DDCT (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001).

3.5 - Análise Estatística

Para as análises estatísticas, foi utilizado o software Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Devido à distribuição não Gaussiana da população, todos os testes aplicados foram não paramétricos. Para as comparações envolvendo dois grupos foi utilizado o teste Mann-Whitney e para três grupos, o Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5% (CI 95%).

4. RESULTADOS

4.1 – Perfil clínico e demográfico dos pacientes com LMC

No presente estudo, foram utilizadas amostras de 49 pacientes com LMC. A distribuição por gênero mostra que desses 49 pacientes, 24 são do sexo masculino (48,98%) e 25 do sexo feminino (51,02%). A mediana das idades desses pacientes foi 45 anos, variando de 18-69 anos. Com relação à fase da doença, 31 pacientes (63,27%) estavam na fase crônica, 8 (6,33%) na fase acelerada e 10 (20,40%) na fase blástica.

No que diz respeito à resposta ao tratamento com mesilato de imatinibe, 23 pacientes (46,94%) demonstraram resistência e 17 (34,69%) foram sensíveis ao fármaco. 8 pacientes (16,33%) ainda não tinham iniciado o tratamento pois a amostra foi obtida na época do diagnóstico e 1 deles (2,04%) não possuía informação sobre a resposta ao tratamento. O prognóstico desses pacientes foi estabelecido com base no índice de Sokal, onde 20 pacientes (40,82%) pacientes foram classificados como alto risco, 16 (32,65%) como risco intermediário, 10 (20,40%) como sendo de baixo risco e 3 pacientes (6,12%) não possuíam a informação (Tabela 3).

Tabela 3 – Perfil clínico e demográfico dos pacientes

Características	Nº pacientes	Porcentagem
Total de Pacientes	49	100%
Gênero		
Homens	24	48,98%
Mulheres	25	51,02%
Idade		
Adulto Jovem (18 - 40 anos)	22	44,90%
Meia Idade (41 - 65 anos)	26	53,06%
Idoso (> 65 anos)	1	2,04%
Mediana das idades	45	
Fases da LMC		
Crônica	31	63,27%
Acelerada	8	16,33%
Blástica	10	20,41%
Resposta ao tratamento		
Resistente	23	46,94%
Sensível	17	34,69%
Pacientes recentes ao diagnóstico	8	16,33%
Sem Informações	1	2,04%
Índice de Sokal		
Baixo Risco	10	20,41%
Risco Intermediário	16	32,65%
Alto Risco	20	40,82%
Sem Informação	3	6,12%

4.2 – Perfil de expressão de EHMT1 e EHMT2 em pacientes com LMC

Das 49 amostras avaliadas, não foram detectadas a expressão de EHMT1 e EHMT2 em 22 e 27 amostras, respectivamente. Em um primeiro momento, avaliamos os níveis de expressão de EHMT1 e EHMT2 entre os grupos. Entretanto, não observamos diferenças

significativas no que diz respeito à expressão de EHMT1 e EHMT2 nas amostras dos pacientes com LMC quando comparadas com o grupo controle ($p = 0,2$ e $p = 0,7$, respectivamente) (figura 3).

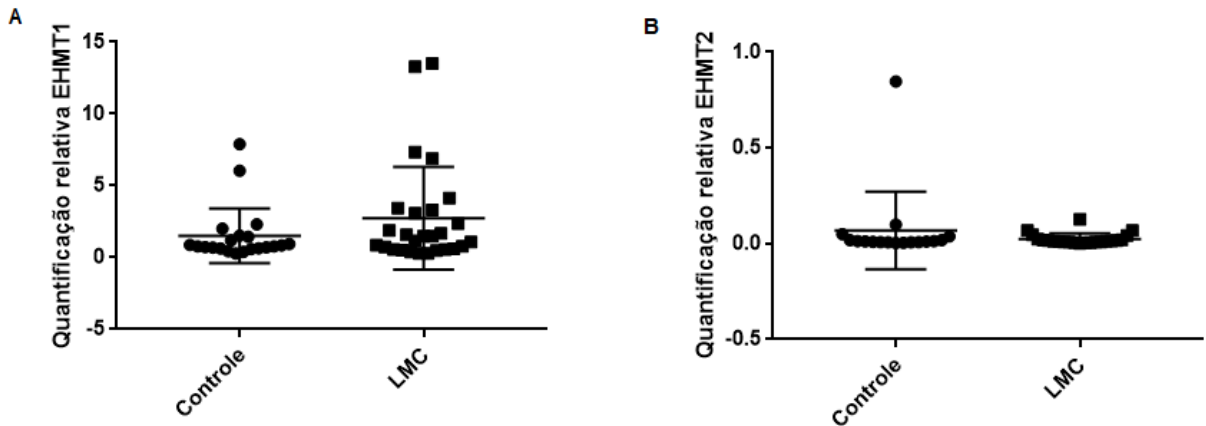


Figura 3 - Perfil de expressão de EHMT1 e EHMT2 em pacientes com LMC. **A** expressão de EHMT1 em amostras controle comparadas com amostras de LMC (teste de Mann-Whitney, $p = 0,2$). **B** expressão de EHMT2 em amostras controle comparadas com amostras de LMC (teste de Mann-Whitney, $p = 0,7$). Não detectamos expressão de EHMT1 em 22 amostras e de EHMT2 em 27 casos.

4.3 – Expressão de EHMT1 e EHMT2 nas diferentes fases da LMC

Não detectamos a expressão de EHMT1 e EHMT2 na fase crônica em 15 e 19 amostras, respectivamente. Na fase acelerada, não foi detectada a expressão de EHMT1 e EHMT2 em 5 e 6 amostras, respectivamente. Na fase blástica não detectamos a expressão de EHMT1 em uma amostra e EHMT2 em duas amostras. Analisamos, então, nas amostras em que apresentaram expressão, se EHMT1 e EHMT2 eram diferentemente expressos durante as fases da LMC. Porém, não foram observadas diferenças significativas na expressão dessas metiltransferases entre os grupos ($p = 0,2$ e $p = 0,6$, respectivamente) (figura 4).

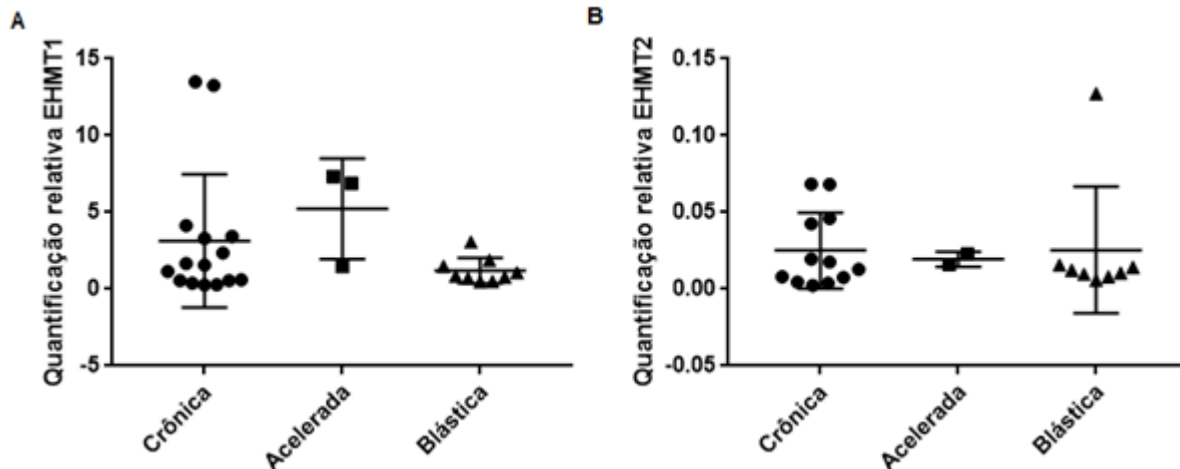


Figura 4 - Perfil de expressão de EHMT1 e EHMT2 nas fases da LMC. **A** Dados da análise da expressão de EHMT1 em amostras de pacientes de LMC em relação às fases da LMC (Teste de Kruskal-Wallis, $p= 0,2$). **B** Dados da análise da expressão de EHMT2 em amostras de pacientes de LMC em relação às fases da LMC (Teste de Kruskal-Wallis, $p= 0,6$).

4.4 – Expressão de EHMT1 e EHMT2 em pacientes com LMC não influencia na resposta ao tratamento com Mesilato de Imatinibe

Dos pacientes classificados em sensíveis, não detectamos a expressão de EHMT1 e EHMT2 em 9 e 11 amostras, respectivamente. Já nos pacientes classificados em resistentes, não detectamos a expressão de EHMT1 e EHMT2 em 11 e 7 amostras. Para investigar se a expressão gênica dessas metiltransferases poderia influenciar na resposta ao tratamento com Mesilato de Imatinibe, os pacientes foram classificados como sensíveis ou resistentes. A análise dos dados não mostrou diferenças significativas na expressão de EHMT1 ($p = 0,7$) e EHMT2 ($p = 0,5$) entre os grupos (figura 5).

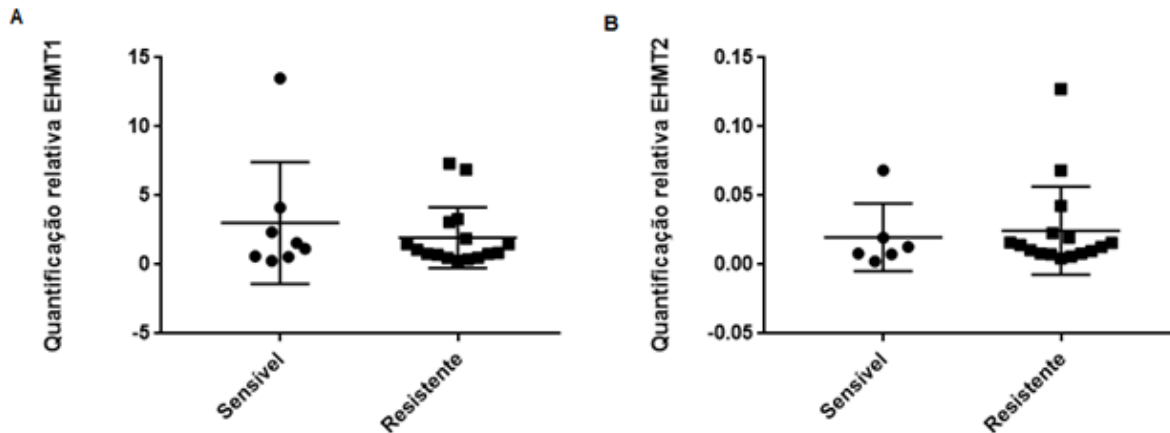


Figura 5 - Perfil de expressão de EHMT1 e EHMT2 na resposta ao tratamento dos pacientes com LMC em uso de MI. **A** Dados da análise da expressão de EHMT1 em amostras de pacientes com LMC em relação à resposta ao tratamento com MI (Teste de Mann-Whitney, $p=0,7$). **B** Dados da análise da expressão de EHMT2 em amostras de pacientes de LMC em relação à resposta ao tratamento com MI (Teste de Mann-Whitney, $p=0,5$).

4.5 – Expressão de EHMT1 e EHMT2 não apresenta associação com o prognóstico na LMC

Avaliamos se a expressão de EHMT1 e EHMT2 estava relacionada com o prognóstico da doença. Para isso, o risco foi estabelecido de acordo com o índice de Sokal. Dos pacientes classificados em baixo risco, não detectamos a expressão de EHMT1 e EHMT2 em 4 e 2 amostras, respectivamente. Nos pacientes classificados em risco intermediário não detectamos a expressão de EHMT1 e EHMT2 em 9 e 12 amostras, respectivamente. Entretanto, não observamos diferenças significativas entre os grupos ($p=0,7$ e $p=0,6$, respectivamente) (figura 6).

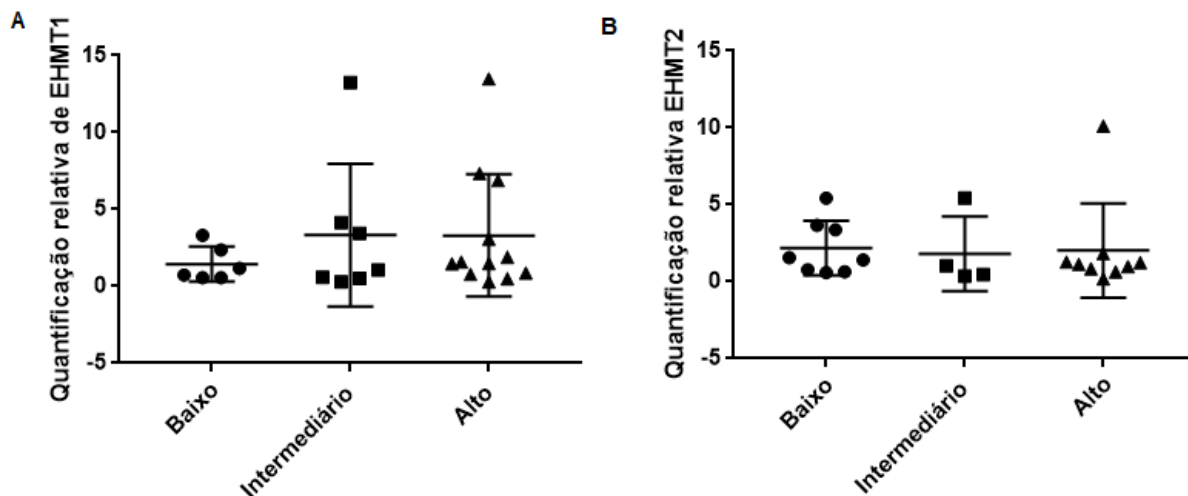


Figura 6 - Perfil de expressão de EHMT1 e EHMT2 em relação ao prognóstico da LMC. **A** Dados da análise da expressão de EHMT1 em amostras de pacientes de LMC em relação ao índice de Sokal. **B** Dados da análise da expressão de EHMT2 em amostras de pacientes de LMC em relação ao índice de Sokal.

4.6 – Correlação entre a expressão de EHMT1 e EHMT2 em pacientes com LMC

Avaliamos ainda se havia alguma correlação entre a expressão de EHMT1 e EHMT2 nos pacientes com LMC. Observamos que há uma correlação positiva entre a expressão dos dois genes ($p=0,0002$ e $r=0,75$) (figura 7).

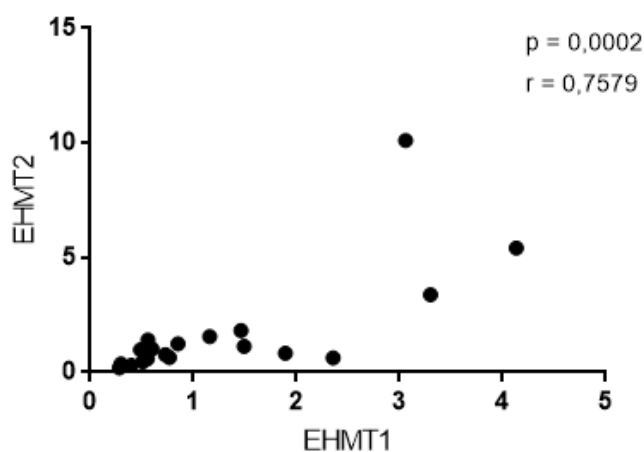


Figura 7 - Correlação entre a expressão de EHMT1 e EHMT2 em pacientes com LMC (Teste de Spearman, $p = 0,0002$ e $r = 0,7$).

5. DISCUSSÃO

A instabilidade cromossômica representa um ponto crucial na progressão da LMC. Além das lesões genéticas, os mecanismos epigenéticos também desempenham um papel importante na oncogênese. Dentre estes, os processos de metilação de histonas já demonstraram associações a diversas funções, incluindo formação de heterocromatina, inativação cromossômica, reparo de DNA e diferenciação celular (SHINKAI; TACHIBANA, 2011; RAO; PAL; TANEJA., 2017). No presente estudo, buscamos investigar a influência da expressão das metiltransferases EHMT1 e EHMT2 na LMC e sua associação com a evolução da doença, prognóstico e resposta terapêutica.

Apesar de dados na literatura demonstrarem hiperexpressão de EHMT1 e EHMT2 em alguns tipos de câncer como carcinoma de células escamosas de esôfago (GUAN *et al.*, 2014), carcinoma colorretal (QIN *et al.*, 2018), carcinoma gástrico (LIN *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2018), dentre outros (LINK *et al.*, 2009, LU *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2017; WEI *et al.*, 2017), não observamos no nosso estudo diferenças significativas nos níveis de expressão gênica dessas enzimas quando comparadas aos pacientes controle. Achados similares foram evidenciados em experimentos realizados com células de câncer de pulmão, no qual não havia diferença na expressão de EHMT1 quando comparadas com células de tecidos saudáveis (CHEN *et al.*, 2010). Na leucemia linfóide crônica foi evidenciada uma diferença na expressão de EHMT1 quando comparada com as células normais, entretanto não houve diferença com relação à expressão de EHMT2 (ALVES-SILVA *et al.*, 2018).

Níveis elevados de EHMT2 são geralmente associados com altos níveis de metilação, o que pode levar à supressão de genes supressores de tumor, como p53 (HUANG *et al.*, 2010). Em um estudo conduzido por Chen *et al.* (2010), foram observados níveis elevados de EHMT2 em adenocarcinoma de pulmão e essa hiperexpressão estava relacionada com mau prognóstico e formação de tumores mais invasivos. Estudos posteriores evidenciaram

achados similares no câncer de mama, onde a hiperexpressão de EHMT2, estava relacionada com pior prognóstico, além da progressão e metástase da doença. (WANG *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018), bem como no câncer de ovário (HUA *et al.*, 2014). Dentro do grupo de desordens de origem hematológica, um estudo realizado por Lehnertz *et al.* (2014) demonstrou que EHMT2 possui relação com o aumento rápido de progenitores mieloides na leucemia mieloide aguda, levando ao aumento da agressividade da doença e, segundo Alves-Silva *et al.* (2018), a superexpressão de EHMT1 na leucemia linfóide crônica está relacionada ao pior prognóstico dos pacientes. Contudo, em nosso estudo não observamos nenhuma relação entre a expressão de EHMT1 e EHMT2 com a progressão da doença e com os fatores prognósticos. Embora a metilação da H3K9 esteja relacionada com a formação de heterocromatina e impacte diretamente na progressão e desenvolvimento de vários tipos de câncer (FRITSCH *et al.*, 2010; SALZBERG *et al.*, 2017), essas enzimas parecem não estar envolvidas com esse desfecho na LMC.

Mutações e modificações epigenéticas são fatores importantes no desenvolvimento de resistência a drogas, uma vez que são capazes de interferir no padrão de expressão gênica dos tumores, alterando assim, sua resposta aos agentes terapêuticos (HOEY, 2010; BROWN *et al.*, 2014). Nesse contexto, um trabalho conduzido por Liu *et al.* (2017) mostrou que elevados níveis de EHMT2 estão associados à resistência à cisplatina no carcinoma de cabeça e pescoço. Pan *et al.* (2016) também observaram uma correlação entre a hiperexpressão dessa enzima com a resistência à gencitabina no câncer de pâncreas. A hiperexpressão de EHMT2 também está relacionada à resistência a quimioterapia no sarcoma de Ewing (LIAO *et al.*, 2018) e com a radioquimioterapia no câncer de cólon (LUO *et al.*, 2017).

Apesar de a literatura oferecer dados que mostram que níveis elevados de EHMT2/EHMT1 estabelecem uma relação direta com a resistência ao tratamento no câncer, nossos dados sugerem que essas enzimas não estão envolvidas no desenvolvimento de

resistência ao tratamento da LMC com mesilato de imatinibe. Entretanto já foi demonstrado que a inibição de EHMT1 e EHMT2 na LMC sensibiliza essas células ao tratamento com interferon do tipo I (LOH *et al.*, 2014).

Observamos em nosso estudo que existe uma correlação positiva entre a expressão dessas enzimas, sugerindo que pode haver um mecanismo de regulação comum entre as duas na LMC. Em uma análise feita no banco de dados GENE CARDS[®], identificamos que essas duas enzimas possuem um fator de transcrição em comum, o ativador do fator de transcrição 2 (ATF-2). Tachibana *et al.* (2005) também evidenciaram através de ensaios bioquímicos e moleculares que as enzimas EHMT1 e EHMT2 possuem relação entre si e atuam por meio da formação de complexos homo e heteroméricos estequiométricos *in vivo*. Esse estudo também mostrou que EHMT2 se torna mais estável quando presente no complexo EHMT1/EHMT2 do que quando ela é expressa sozinha. Esse complexo atua na grande maioria das funções exercidas por essas enzimas e elas são dependentes uma da outra para realizar funções relacionadas ao reparo do DNA (GINJALA *et al.*, 2017).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que não há alterações na expressão de EHMT1 e EHMT2 na leucemia mieloide crônica e que os mecanismos de metilação de H3K9 por essas enzimas não possui relação com a progressão da doença, prognóstico e resposta ao tratamento com Imatinibe. Entretanto, para validar nossos achados seria importante o desenvolvimento de novos estudos, considerando um maior número de casos e diferentes populações.

7. REFERÊNCIAS

ALVES-SILVA, Juliana C., *et al.* GLP overexpression is associated with poor prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia and its inhibition induces leukemic cell death. **Investigational New Drugs**, v. 36, n. 5, p. 955–960, 2018.

APPERLEY, Jane F. Chronic myeloid leukaemia. **The Lancet**, v. 385, n. 9976, p. 1447-1459, 2015.

AUDIA, James E.; CAMPBELL, Robert M. Histone modifications and cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 8, n. 4, p. a019521, 2016.

BACCARANI, Michele *et al.* Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. **Journal of clinical oncology**, v. 27, n. 35, p. 6041, 2009.

BACCARANI, Michele *et al.* A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. **Annals of hematology**, v. 94, n. 2, p. 141-147, 2015.

BIRAN, Alva; MESHORER, Eran. Concise review: chromatin and genome organization in reprogramming. **Stem Cells**, v. 30, n. 9, p. 1793-1799, 2012.

BISWAS, Subhankar; RAO, C. Mallikarjuna. Epigenetics in cancer: fundamentals and beyond. **Pharmacology & therapeutics**, v. 173, p. 118-134, 2017.

BONIFAZI, Francesca *et al.* Testing Sokal's and the new prognostic score for chronic myeloid leukaemia treated with α -interferon. **British Journal of Hematology**, v.111, n. 2, p. 587-595, 2000.

BORTOLHEIRO, Teresa Cristina; CHIATTONE, Carlos S. Leucemia mielóide crônica: história natural e classificação. **Revista brasileira hematologia e hemoterapia**, v. 30, n. Suppl 1, p. 3-7, 2008.

BROWN, Robert *et al.* Poised epigenetic states and acquired drug resistance in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 747, 2014.

CASCIELLO, Francesco *et al.* Functional role of G9a histone methyltransferase in cancer. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 487, 2015.

CASTILLO, Josefa; LÓPEZ-RODAS, Gerardo; FRANCO, Luis. Histone post-translational modifications and nucleosome organisation in transcriptional regulation: some open questions. In: **Protein Reviews**. Springer, Singapore, 2017. p. 65-92.

CHEN, Min-Wei *et al.* H3K9 histone methyltransferase G9a promotes lung cancer invasion and metastasis by silencing the cell adhesion molecule Ep-CAM. **Cancer research**, v. 70, n. 20, p. 7830-7840, 2010.

FRITSCH, Lauriane *et al.* A subset of the histone H3 lysine 9 methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 participate in a multimeric complex. **Molecular cell**, v. 37, n. 1, p. 46-56, 2010.

GENE CARDS: THE HUMAN GENETIC DATABASE. **GeneCards®**, c1996-2019 Disponível em: <https://www.genecards.org/>. Acesso em: 04 de junho de 2019

GINJALA, Vasudeva *et al.* Protein-lysine methyltransferases G9a and GLP1 promote responses to DNA damage. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 16613, 2017.

GREENBERG, Edythe M. Lyn; PROBST, Alexandra. Chronic Leukemia. **Critical Care Nursing Clinics**, v. 25, n. 4, p. 459-470, 2013.

GUIÈZE, Romain; WU, Catherine J. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 126, n. 4, p. 445-453, 2015.

GUAN, Xiaojiao *et al.* Analysis of EHMT1 expression and its correlations with clinical significance in esophageal squamous cell cancer. **Molecular and clinical oncology**, v. 2, n. 1, p. 76-80, 2014.

HEHLMANN, Rüdiger; HOCHHAUS, Andreas; BACCARANI, Michele. Chronic myeloid leukaemia. **The Lancet**, v. 370, n. 9584, p. 342-350, 2007.

HOEY, Timothy. Drug resistance, epigenetics, and tumor cell heterogeneity. **Science translational medicine**, v. 2, n. 28, p. 28ps19-28ps19, 2010.

HOCHHAUS, Andreas *et al.* Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 28, n. suppl_4, p. iv41-iv51, 2017.

HOFFMANN, V. S. *et al.* The EUTOS prognostic score: Review and validation in 1288 patients with CML treated frontline with imatinib. **Leukemia**, v. 27, n. 10, p. 2016–2022, 2013.

HÖGLUND, Martin; SANDIN, Fredrik; SIMONSSON, Bengt. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. **Annals of hematology**, v. 94, n. 2, p. 241-247, 2015.

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

HUA, Kuo-Tai *et al.* The H3K9 methyltransferase G9a is a marker of aggressive ovarian cancer that promotes peritoneal metastasis. **Molecular cancer**, v. 13, n. 1, p. 189, 2014.

JABBOUR, Elias; KANTARJIAN, Hagop. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. **American journal of hematology**, v. 89, n. 5, p. 547-556, 2014.

JABBOUR, Elias; KANTARJIAN, Hagop. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. **American Journal of Hematology**, v. 93, n. 3, p. 442–459, 2018.

JENUWEIN, Thomas; ALLIS, C. David. Translating the histone code. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1074-1080, 2001.

KANTARJIAN, Hagop *et al.* Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 1774-1780, 2008.

KIM, Kwangho *et al.* EHMT2 is a metastasis regulator in breast cancer. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 496, n. 2, p. 758-762, 2018.

KURODA, Junya. *et al.* Multifaceted mechanisms for cell survival and drug targeting in chronic myelogenous leukemia. **Current cancer drug targets**, v. 13, n. 1, p. 69-79, 2013.

LEHNERTZ, Bernhard *et al.* The methyltransferase G9a regulates HoxA9-dependent transcription in AML. **Genes & development**, v. 28, n. 4, p. 317-327, 2014.

LIAO, Hongyi *et al.* Identification of driver genes associated with chemotherapy resistance of Ewing's sarcoma. **OncoTargets and therapy**, v. 11, p. 6947, 2018.

LIN, Xiaolei *et al.* Depletion of G9a gene induces cell apoptosis in human gastric carcinoma. **Oncology reports**, v. 35, n. 5, p. 3041-3049, 2016.

LINK, Petra A. *et al.* Distinct roles for histone methyltransferases G9a and GLP in cancer germ-line antigen gene regulation in human cancer cells and murine embryonic stem cells. **Molecular Cancer Research**, v. 7, n. 6, p. 851-862, 2009.

LIU, Chia-Wen *et al.* Histone methyltransferase G9a drives chemotherapy resistance by regulating the glutamate–cysteine ligase catalytic subunit in head and neck squamous cell carcinoma. **Molecular cancer therapeutics**, v. 16, n. 7, p. 1421-1434, 2017.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas 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.

LOH, Sheng Wei *et al.* Inhibition of euchromatic histone methyltransferase 1 and 2 sensitizes chronic myeloid leukemia cells to interferon treatment. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e103915, 2014.

LU, Ziyang *et al.* Histone lysine methyltransferase EHMT2 is involved in proliferation, apoptosis, cell invasion and DNA methylation of human neuroblastoma cells. **Anti-cancer drugs**, v. 24, n. 5, p. 484, 2013.

LUO, Chi-Wen *et al.* G9a governs colon cancer stem cell phenotype and chemoradioresistance through PP2A-RPA axis-mediated DNA damage response. **Radiotherapy and Oncology**, v. 124, n. 3, p. 395-402, 2017.

MOLICA, Matteo; MASSARO, Fulvio; BRECCIA, Massimo. Diagnostic and prognostic cytogenetics of chronic myeloid leukaemia: an update. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 17, n. 11, p. 1001-1008, 2017.

PAN, Mei-Ren *et al.* The histone methyltransferase G9a as a therapeutic target to override gemcitabine resistance in pancreatic cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 38, p. 61136, 2016.

PEREIRA, Welbert O. *et al.* BCR–ABL1-induced downregulation of WASP in chronic myeloid leukemia involves epigenetic modification and contributes to malignancy. **Cell death & disease**, v. 8, n. 10, p. e3114, 2017.

PFAFFL, Michael W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.

PFIRRMANN, Markus *et al.* Prognostic scores for patients with chronic myeloid leukemia under particular consideration of competing causes of death. **Annals of Hematology**, v. 94, n. 2, p. 209–218, 2015.

QIN, Jian *et al.* Clinicopathological significance of G9A expression in colorectal carcinoma. **Oncology letters**, v. 15, n. 6, p. 8611-8619, 2018.

RABELLO, Doralina D. A. *et al.* MLL2/KMT2D and MLL3/KMT2C expression correlates with disease progression and response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. **Cancer cell international**, v. 18, n. 1, p. 26, 2018.

RAO, Vinay Kumar; PAL, Ananya; TANEJA, Reshma. A drive in SUVs: From development to disease. **Epigenetics**, v. 12, n. 3, p. 177-186, 2017.

ROWLEY, Janet D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, v. 243, n. 5405, p. 290, 1973.

SALZBERG, Anna C. *et al.* Genome-wide mapping of histone H3K9me2 in acute myeloid leukemia reveals large chromosomal domains associated with massive gene silencing and sites of genome instability. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0173723, 2017.

SCHIFFER, Charles. A. Diagnosis and treatment of chronic myeloid leukemia. **Neoplastic Diseases of the Blood**, v. 90, n. 10, p. 49–68, 2018.

SCHOCH, Conrad. *et al.* Comparison of chromosome banding analysis, interphase-and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. **Leukemia**, v. 16, n. 1, p. 53, 2002.

SHINKAI, Yoichi; TACHIBANA, Makoto. H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. **Genes & development**, v. 25, n. 8, p. 781-788, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea**. Angra dos Reis, Rio de Janeiro, 2012, p.63 – 81.

TACHIBANA, Makoto *et al.* Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. **Genes & development**, v. 19, n. 7, p. 815-826, 2005.

TALATI, Chetasi *et al.* How we will treat chronic myeloid leukemia in 2016. **Blood reviews**, v. 29, n. 2, p. 137-142, 2015.

TEFFERI, Ayalew *et al.* Chronic myeloid leukemia: current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, p. 390-402, 2005.

VARDIMAN, James W.; HARRIS, Nancy Lee; BRUNNING, Richard D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2292-2302, 2002.

WANG, Ya-fang *et al.* G9a regulates breast cancer growth by modulating iron homeostasis through the repression of ferroxidase hephaestin. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 274, 2017.

WEI, Lai *et al.* Histone methyltransferase G9a promotes liver cancer development by epigenetic silencing of tumor suppressor gene RARRES3. **Journal of hepatology**, v. 67, n. 4, p. 758-769, 2017.

YANG, Yao *et al.* Euchromatic histone lysine methyltransferase 1 regulates cancer development in human gastric cancer by regulating E-cadherin. **Oncology letters**, v. 15, n. 6, p. 9480-9486, 2018.

ZAIDI, Sayyed K. *et al.* Epigenetic mechanisms in leukemia. **Advances in biological regulation**, v. 52, n. 3, p. 369-376, 2012.