

# Clonagem molecular do oncogene *EZH2* de leucemia mieloide crônica e perspectivas terapêuticas<sup>#</sup>

## Molecular cloning of *EZH2* oncogene in chronic myeloid leukemia and therapeutic prospects

Juliana Costa Gaspar\*

Lucas Santos de Santana\*\*

Camila Menezes Freire de Souza\*\*\*

Marcos Montani Caseiro\*\*\*\*

Rosane Rezende de Souza Giuliani\*\*\*\*\*

Cleide Barbieri de Souza\*\*\*\*\*

307

Artigo Original • Original Paper  
O Mundo da Saúde, São Paulo - 2015;39(3):307-315

### Resumo

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa originada, em 95% dos casos, por uma anormalidade citogenética que se caracteriza pela translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 t(9; 22) (q34; q11), resultando no cromossomo Philadelphia (Ph). Considerando que a cura da LMC só é possível com um transplante de medula óssea bem-sucedido e que existem casos de resistência ao inibidor de tirosina quinase Mesilato de Imatinibe, fármaco de primeira escolha para o tratamento, é importante que se conheça detalhadamente os genes e proteínas alterados na LMC, favorecendo a efetividade de estratégias terapêuticas, a otimização do diagnóstico e a detecção de doença residual mínima. Dentre as novas abordagens terapêuticas para a LMC está a terapia gênica, que dependendo do gene alvo, pode também ser eficiente para o tratamento de outras neoplasias. Dentro deste contexto, os objetivos do trabalho foram: realizar a clonagem molecular de um fragmento de DNA do gene *EZH2*, alvo promissor da terapia gênica, que provoca alteração epigenética na LMC e em diversas neoplasias; bem como contribuir para outros trabalhos de manipulação gênica interespecies, os quais tem grande contribuição para a área da saúde. Para isso, o gene *EZH2* foi isolado a partir do DNA genômico de sangue periférico de pacientes com LMC e posteriormente clonado em sistemas procariotos. Dessa forma, foram realizados, definidos e comprovados os procedimentos de manipulação gênica interespecies e discutido o futuro da biotecnologia no auxílio a pesquisas e a tratamentos, com foco na LMC.

**Palavras-chave:** Biotecnologia. Leucemia Mieloide Crônica. Clonagem Molecular. Terapia Gênica.

### Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasia, caused in 95 % of the cases by a cytogenetic abnormality characterized by the reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22 t(9; 22) (q34; q11), resulting in Philadelphia chromosome (Ph). Considering that CML cure is only possible with a successful bone marrow transplantation and that there are resistance cases to the tyrosine kinase inhibitor Imatinib Mesylate, prescribed in first line drug treatment; it is important to know in detail the genes and proteins that are possibly altered in CML, favoring effective therapeutic strategies, optimized diagnosis and minimal residual disease detection. Among the new therapeutic approaches to CML is gene therapy, which, depending on the target gene, can be efficient to other neoplasms treatment. In this context, the aims of this work were: to proceed the molecular cloning of a DNA fragment from *EZH2* gene, potential target for gene therapy, that promotes epigenetic alteration in CML and in many neoplasms; as well as to contribute to studies related to interspecies gene transfer that have high contribution to health. For this reason, the *EZH2* gene was isolated from peripheral blood genomic DNA from CML patients and cloned in prokaryotic systems. Therefore, in this study, we proceed, defined and proved the interspecies gene transfer procedures and discussed the future of biotechnology in researches and treatments, especially in CML.

**Keywords:** Biotechnology. Chronic Myelogenous Leukemia. Molecular Cloning. Gene Therapy.

DOI: 10.15343/0104-7809.20153903307315

<sup>#</sup> Trabalho proveniente do Trabalho de Conclusão de Curso e Iniciação Científica do primeiro autor.

\* Centro Universitário Lusíada (UNILUS) – Laboratório de Biologia Molecular – UNILUS, Campus II – Santos, SP – Brasil. E-mail: julianacosta7@hotmail.com

\*\* Unidade de Endocrinologia Genética – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo – SP – Brasil.

\*\*\* Instituto Butantan – São Paulo, SP – Brasil

\*\*\*\* Laboratório de Biologia Molecular – UNILUS, Campus II – Santos, SP – Brasil.

\*\*\*\*\* Hospital Guilherme Álvaro – Santos, SP – Brasil.

\*\*\*\*\* Laboratório de Biologia Molecular – UNILUS, Campus II – Santos, SP – Brasil.

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## INTRODUÇÃO

A biotecnologia, que pela sua origem grega significa o conjunto de teorias e técnicas que permitem o aproveitamento do conhecimento científico aplicado à vida, é a ciência que aplica sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados, para criar ou modificar produtos e processos, abrangendo desde as técnicas simples e tradicionais como o processo de fermentação até as técnicas de manipulação genética, estabelecidas após os avanços da biologia molecular<sup>1,2</sup>.

Na área da saúde ela contribui de forma efetiva para o diagnóstico, tratamento e o estudo de diversas doenças, tendo como uma das ferramentas principais de trabalho a tecnologia do DNA recombinante, uma vez que permite a produção de biofármacos, o desenvolvimento de vacinas de DNA, a produção de reagentes para diagnóstico, o estudo da proteômica e o estabelecimento de novas terapias, como a terapia molecular ou gênica e a terapia celular<sup>1,3</sup>.

A farmacologia busca a cada dia, desenvolver fármacos que resultem em uma terapêutica efetiva e com menos efeitos colaterais, e para isso têm tido como alvo moléculas específicas (citocinas, quimiocinas, fatores de transcrição e moléculas expressas na superfície celular) que tenham papel funcional na patogênese das doenças<sup>4</sup>.

Neste contexto, a terapia gênica, que consiste na transferência de material genético para as células de um indivíduo com objetivo terapêutico, é uma alternativa biotecnológica promissora para restabelecer as respostas celulares normais de uma célula. Essa alternativa tem sido abordada não só em doenças hereditárias monogênicas, como naquelas em que diversas vias metabólicas estão alteradas, como as neoplasias<sup>3</sup>.

O silenciamento gênico por RNA de interferência – RNAi, por exemplo, é uma promissora vertente da terapia gênica, surgindo como uma alternativa no tratamento das doenças neoplásicas e que visa retardar o desenvolvimento do tumor de forma menos invasiva e mais eficiente, aproveitando-se de um mecanismo biológico pré-existente no organismo<sup>5,6</sup>.

O RNAi é um mecanismo celular de regulação genética que suprime a expressão de um gene a partir de moléculas de RNA dupla fita (RNA<sub>df</sub>) complementares a um RNA mensageiro alvo (RNA<sub>m</sub> alvo)<sup>7,8</sup>. Naturalmente esse mecanismo tem por função combater RNA's anômalos, transposons e vírus em organismos eucariotos<sup>9</sup>. Pelo mesmo mecanismo, a introdução de moléculas de RNA<sub>df</sub> sintetizadas *in vitro* pode inibir um oncogene e reverter a apoptose em células tumorais<sup>10</sup>.

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa originada, em 95% dos casos, por uma anormalidade citogenética que se caracteriza pela translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 t(9; 22) (q34; q11), resultando em um pequeno cromossomo 22 (22q-) conhecido como cromossomo Philadelphia (Ph) e em um derivativo do cromossomo 9 (9q+). O proto-oncogene *ABL* (*Abelson Leukemia virus*) do cromossomo 9 é fundido com o gene *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*) no cromossomo 22, formando o oncogene conhecido como *BCR-ABL*, que expressa constitutivamente uma proteína alterada, com atividade de tirosina quinase<sup>11, 12, 13</sup>. A proteína tirosina quinase formada ativa vias metabólicas nas células progenitoras da medula óssea, promovendo hematopoese exacerbada e alterações como redução da dependência de fatores de crescimento, interação anormal com a matriz extracelular da medula óssea e resistência a apoptose; todos dependentes do oncogene *BCR-ABL*<sup>12, 14</sup>.

O gene *Enhancer of Zest Homolog 2* (*EZH2*) é localizado no cromossomo 7 e codifica uma proteína envolvida na regulação epigenética. Esta proteína apresenta-se desregulada e mutada na neoplasia prostática, nos linfomas não-Hodgkins, na leucemia mieloide crônica, nos carcinomas mamário, endometrial e de bexiga, no adenocarcinoma pancreático e no melanoma cutâneo; evidenciando a importância das alterações epigenéticas na carcinogênese<sup>15</sup>. Na LMC, foi demonstrado que o recrutamento de *EZH2*, para reprimir a expressão de genes supressores tumorais, é realizado por uma proteína chamada *PRAME* (*Preferentially Expressed*

*Antigen of Melanoma*), a qual é expressa gradativamente com a progressão da doença<sup>14</sup>.

Dentro do complexo repressivo 2 (PRC2), EZH2 interage e modula as enzimas DNA metiltransferase DNMT1, DNMT3a e DNMT3b, regulando a ligação destas à promotores gênicos e reprimindo a transcrição. Ela também possui atividade de histona metiltransferase ao metilar a lisina (K)-27 da histona H3 (H3K27), modificando a conformação da cromatina e promovendo repressão gênica. Além disso, ainda interage com as histonas desacetilases (HDAC) 1 e 2 através da proteína EED (*embryonic ectoderm development*) e pode metilar a lisina 9 da histona 3 (H3K9)<sup>16, 17</sup>.

A proteína EZH2 é necessária na medula óssea para progressão de células pro-B em células pre-B e células B imaturas, com possível função nas fases iniciais da diferenciação das células B. Muitos grupos têm demonstrado que EZH2 participa na manutenção das células-tronco hematopoiéticas e das células progenitoras. Por estar hiperexpressa em células-tronco, ela pode contribuir para aquisição da capacidade de auto-renovação, para o potencial de repopulação e para resistência ao estresse replicativo<sup>18</sup>.

Considerando que, a cura da LMC só é possível com um transplante de medula óssea bem-sucedido e que existem casos de resistência ao inibidor de tirosina quinase Mesilato de Imatinibe, fármaco de primeira escolha para o tratamento, é importante que se conheça detalhadamente os genes e proteínas alterados na LMC, como *EZH2*. Isso favorecerá o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, a otimização do diagnóstico e a detecção de doença residual mínima. Dentre as novas abordagens terapêuticas para o tratamento da LMC está a terapia gênica, que dependendo do gene alvo, pode também ser eficiente para o tratamento de outras neoplasias<sup>12, 14, 19</sup>.

Toda neoplasia caracteriza-se pelo acúmulo de mutações em um longo período de tempo, que juntas, induzem a célula a um comportamento fenotípico anômalo. A célula adquire novas vias metabólicas, passa a expressar certas proteínas e a inibir o papel de outras, de forma

que a análise dos aspectos moleculares e bioquímicos próprios das linhagens neoplásicas abre caminho para a classificação funcional dos tumores, para o diagnóstico e para o desenvolvimento de novas drogas, capazes de modular genes e moléculas específicas; individualizando a terapêutica, tornando-a mais eficaz e com menos efeitos colaterais<sup>11</sup>.

Este trabalho teve como objetivo realizar a clonagem molecular de um fragmento do gene *EZH2*, alvo promissor da terapia gênica, em vetores de clonagem plasmidiais, contribuindo para outros trabalhos de manipulação gênica interespecies e para a discussão sobre o futuro da biotecnologia no auxílio a pesquisas e a tratamentos e/ou a alternativas terapêuticas, como o RNAi, com foco na LMC.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1) Isolamento gênico

A extração de DNA total foi procedida conforme o protocolo do kit QIAMP® DNA Blood Mini Kit, da empresa QIAGEN®, a partir de amostras de buffy coat estocadas no laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário Lusíada (Registro 493/12, data de aprovação: 12/03/2012), provenientes de pacientes com LMC.

A partir do DNA total extraído do buffy-coat da amostra nomeada J-H, prosseguiu-se a amplificação gênica por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase – PCR, com o seguinte protocolo: 5 µL de buffer 5x (INVITROGEN®); 2 µL do DNA total extraído; 3 µL do primer reverso; 3 µL do primer forward; 2 µL do mix de dNTP's (solução com 5 µL de dATP, de dCTP, ddTTP e de dGTP; 10mM) (INVITROGEN®); 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (INVITROGEN®) e por último 0,5 µL da enzima Taq DNA Polimerase (INVITROGEN®). O volume final foi ajustado para 50 µL com a adição de 34 µL de água ultra pura (INVITROGEN®).

Os seguintes primers para *EZH2* (NG\_032043.1) foram utilizados: 5'-CTGACTGGCATTCCACAGAC-3' (forward) e 5'-AAGTGTAGTGGCTCATCCGC-3' (reverso), ambos sintetizados pela empresa INVITROGEN®<sup>18</sup>.

No termociclador (GeneAmp® PCR System – Applied Biosystems®), a reação da PCR foi submetida às seguintes alternâncias de temperaturas/tempo, sequencialmente: 94°C por 5 min, 95°C por 1 min, 60°C por 2 min, 72°C por 3 min, 72°C por 15 min, e 4°C por tempo infinito.

O procedimento foi feito em duplicata, sendo os amplicons denominados J-HI e J-III. Para comprovar a amplificação foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% (1,0 g de agarose foi liquefeito em 100 mL de tampão Tris-ácido bórico – EDTA na diluição de 0,5X) suplementado com brometo de etídio (INVITROGEN®).

## 2) Clonagem bacteriana

Do gel de eletroforese foi excisada a banda de interesse e eluído o DNA, segundo o protocolo do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA®), de maneira a retirar interferentes do processo da clonagem, como bandas inespecíficas, sais, primers e nucleotídeos.

Para construção da molécula de DNA recombinante, foi preparada uma mistura de ligação entre o inserto (DNA isolado) e um plasmídeo bacteriano comercial (vetor), conforme protocolo do kit TOPO® TA Cloning. Uma vez construída a molécula de DNA recombinante, por eletroporação 1,5 µL da mistura de ligação foi incorporada a uma suspensão de 40 µL de bactérias *Escherichia coli* eletrocompetentes, da linhagem DH5α, genótipo: F' endA1 hsdR17 (rK- mK+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nalr) relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR (Φ80dlac Δ(LacZ) M15). Imediatamente após o processo de eletroporação, as células transformadas foram ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura LB líquido, para sua recuperação, e incubadas a 37°C, em shaker, a 180 rpm, por 1 hora, para expressão dos genes de resistência a antibióticos.

Para o plaqueamento, foi utilizado o meio de cultura LB-ampicilina (amp') sólido, preparado com 1 % de triptona, 1 % de NaCl, 0,5 % de extrato de levedura e 2 % de ágar, avolumado para 100 mL com água destilada. Para esterilização, este foi autoclavado por 15 min a 121°C. Após o resfriamento, até aproximadamente 50 a 60 °C, este foi suplementado com uma concentração

final de 100 µg/mL do antibiótico ampicilina. Este meio foi utilizado na preparação de placas de cultura. Após a solidificação do meio na placa, foram adicionados os seguintes componentes: 100 µL de isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração de 100 mM; 20 µL de X-gal na concentração de 50 mg/mL e 200 µL da cultura de células recém-eletroporadas. As placas foram incubadas a 37°C, em estufa, por 16 a 24 h (*overnight*).

Uma vez que o vetor TOPO® apresenta o sistema de seleção azul e branco, após a incubação *overnight*, selecionamos os clones que passariam para a etapa de análise de restrição, inoculando seis colônias brancas aleatórias em tubos de ensaio contendo 1 mL de meio LB líquido e suplementado com ampicilina (pré-inóculo). Os tubos do pré-inóculo foram identificados como JT1, JT2, JT3, JT4, JT5 e JT6. Incubamos *overnight* a 37°C.

Os pré-inóculos que se tornaram turvos (JT1, JT2, JT3, JT4, JT5 e JT6), ou seja, que apresentaram proliferação bacteriana; foram submetidos ao processo de extração plasmidial e a um tratamento com a enzima de restrição *EcoRI* (INVITROGEN®): 1,5 µL de buffer 10 x; 2 µL de DNA plasmidial; 0,5 µL de enzima *EcoRI*; e, água Milli-Q autoclavada para completar até o volume final 15 µL. A mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C por 2 horas e submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para análise de restrição e confirmação da clonagem.

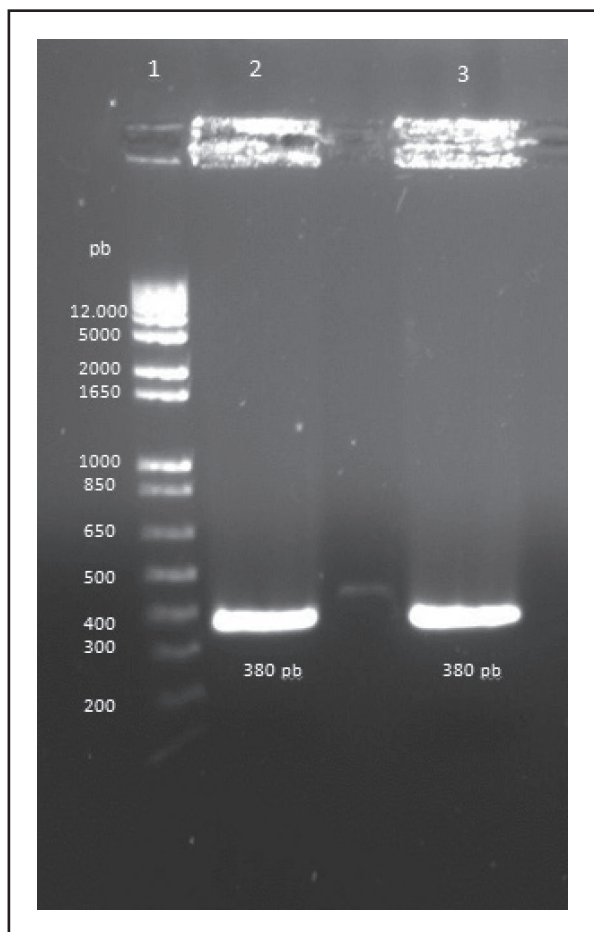
## RESULTADOS

Após a primeira etapa do trabalho, onde foi realizada a extração de DNA total, um fragmento de 380 pb, representando o gene *EZH2*, foi efetivamente amplificado por PCR nas duplicatas da amostra J-H: J-HI e J-III. Essa amplificação foi confirmada pela visualização sob luz ultravioleta de uma banda com tamanho de 380 pb após corrida eletroforética em gel de agarose a 1% suplementado com brometo de etídio (Figura 1).

A molécula recombinante foi inserida nas bactérias DH5α eletrocompetentes através do método de eletroporação, que apresentou uma constância de 4,3 de eficiência de transformação.

Após incubação das células transformadas, formaram-se colônias azuis e brancas na placa, indicando que a transformação celular foi bem-sucedida, uma vez que só células com plasmídeo, que confere resistência à ampicilina, cresceriam na placa.

**Figura 1.** Perfis de fragmentos de DNA amplificados por PCR analisados em gel de agarose 1% suplementado com brometo de etídio visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador.

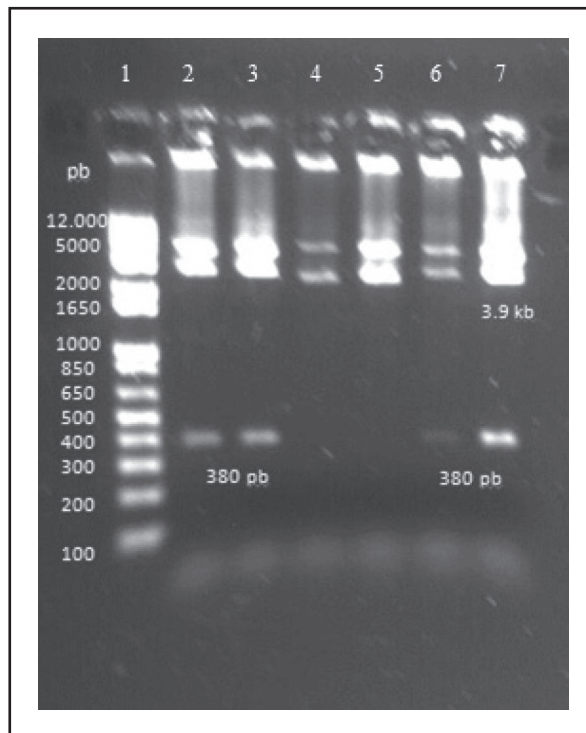


Legenda:

- 1) Marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder.
- 2) 42 µL da amostra J-I com 380 pb.
- 3) 42 µL da amostra J-II com 380 pb.

Após o processo de extração de DNA plasmidial dos pré-inóculos contendo crescimentos celulares dos clones brancos, o DNA tratado com a enzima de restrição *EcoRI*, apresentou-se apenas parcialmente digerido em todas as amostras (de JT1 a JT6) (Figura 2).

**Figura 2.** Perfis de fragmentos de DNA tratados com enzima de restrição *EcoRI*, analisados em gel de agarose 1% suplementado com brometo de etídio visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador, após 40 min de corrida eletroforética.



Legenda:

- 1) Marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder.
- 2) Amostra JT1: plasmídeo digerido e inserto.
- 3) Amostra JT2: plasmídeo digerido e inserto.
- 4) Amostra JT3: plasmídeo digerido; sem inserto.
- 5) Amostra JT4: plasmídeo digerido, sem inserto.
- 6) Amostra JT5: plasmídeo digerido e inserto.
- 7) Amostra JT6: plasmídeo digerido e inserto.

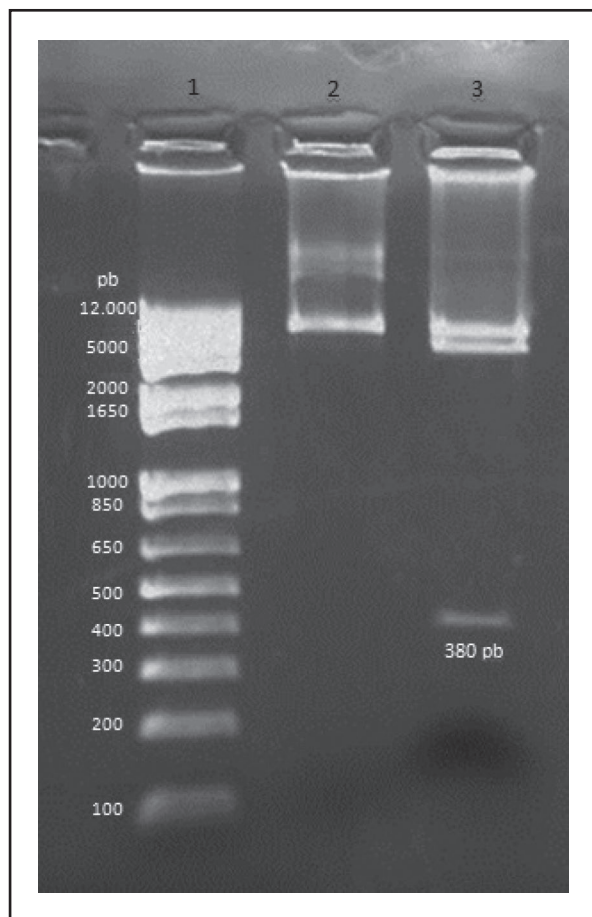
A digestão foi parcial possivelmente pela baixa concentração de enzima utilizada. No entanto, a repetição do processo de digestão na amostra JT1, utilizando uma concentração ideal de enzima, desencadeou uma digestão total (Figura 3).

Nas amostras JT3 e JT4 (Figura 2), porém, não houve nenhuma banda correspondente ao inserto (aproximadamente 380 pb).

Nas amostras JT1, JT2, JT5 e JT6, as bandas correspondentes ao plasmídeo parcialmente digerido e ao inserto são evidentes, comprovando que foram obtidas bactérias eletrocompetentes bastante eficientes; construída uma molécula DNA recombinante; e, realizada a transforma-

ção bacteriana com sucesso, realizando assim a clonagem molecular do oncogene humano *EZH2* em células bacterianas.

**Figura 3.** Perfis de fragmentos de DNA tratados com enzima de restrição *EcoRI*, pela segunda vez, analisados em gel de agarose 1% suplementado com brometo de etídio visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador após 50 min de corrida eletroforética.



Legenda:

- 1) Marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder.
- 2) Plasmídeo recombinante não digerido.
- 3) Amostra JT1: plasmídeo completamente digerido e inserto.

## DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou a real possibilidade, já bem estabelecida na literatura, de manipulação genética entre dois organismos (procarioto e eucarioto), a qual é base para qualquer trabalho biotecnológico<sup>1,2</sup>.

Os primers utilizados, apresentados por McCabe *et al.* (2012) para amplificação e sequenciamento genético do gene *EZH2* em seu estudo, foram também específicos e eficientes em nossos experimentos, amplificando um fragmento que se inicia no nucleotídeo 61911 e termina no nucleotídeo 62290 do gene *EZH2*, com 380 pb<sup>20</sup>.

Após a clonagem, o crescimento tanto de colônias azuis, contendo plasmídeo vazio, como de colônias brancas, contendo DNA recombinante com o inserto de *EZH2*, evidencia a degradação de X-gal, formando um cromógeno azul, em células que não receberam o inserto e, portanto expressaram a enzima  $\beta$ -galactosidase; enquanto nas colônias brancas não houve degradação de X-gal, por terem recebido o inserto, que bloqueou a expressão do gene Lac-Z e a expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase.

Mesmo utilizando-se da seleção azul e branco, algumas amostras, JT3 e JT4, não apresentaram fragmentos correspondentes ao inserto. Os plasmídeos foram digeridos parcialmente, indicando que nestas amostras o plasmídeo estava presente, o que conferiu resistência à ampicilina, porém recircularizado (vazio). Isso é corroborado ao compararmos o perfil de eletroforese dessas amostras (Figura 2) com o segundo poço da figura 3, que apresenta a banda de um plasmídeo vazio totalmente digerido. Esse resultado ocorreu, possivelmente, pela contaminação de colônias brancas com colônias satélites e colônias azuis no momento da realização do pré-inóculo.

Apesar da grande maioria dos estudos já desenvolverem experimentos em células de mamíferos, o estudo em sistemas procariotos têm suas vantagens: são simples, rápidos, de baixo custo e eficientes, sendo uma maneira de esclarecer possíveis questões e orientar estudos e pesquisas, antes da avaliação direta em sistemas eucarióticos<sup>21</sup>.

Entre os próximos passos dessa clonagem, estaria o sequenciamento do DNA recombinante construído, a fim de investigar se o fragmento foi inserido no sentido *sense* ou *antissense*. Ainda, uma subclonagem do gene *EZH2* em um vetor

de expressão, para síntese proteica, aprofundaria os estudos de estrutura, função, purificação e identificação da proteína EZH2<sup>11, 15, 22</sup>.

Uma vez a estrutura da molécula de EZH2 bem estudada, há potencial para que ela seja utilizada no desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos, visando o desenvolvimento de kits diagnósticos baseados em imunoenaios, para uma possível aplicação dessa molécula como marcador tumoral<sup>11, 15, 22</sup>.

É importante ressaltar que a utilização do produto transcricional do gene (RNAm) em trabalhos futuros é de grande importância, pois é a base para o desenvolvimento de pesquisas que visam o bloqueio da expressão de *EZH2* por meio da terapia gênica, utilizando por exemplo a metodologia de silenciamento do RNA de interferência (RNAi). A construção de moléculas de RNA de interferência contra o RNA mensageiro de *EZH2* seria promissora para o entendimento dos mecanismos moleculares em que ela está envolvida e para uma possível estratégia terapêutica, associando o silenciamento de *EZH2* com a radioterapia ou com inibidores de histona desacetilase<sup>11, 15, 22</sup>.

Através da construção de moléculas de RNAi, por exemplo, foi elucidado que na LMC o recrutamento de EZH2, para reprimir a expressão de genes supressores tumorais com TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand* ou Apo2L) é realizado por uma proteína chamada PRAME (*Preferentially Expressed Antigen of Melanoma*), a qual é expressa gradativamente com a progressão da doença<sup>14</sup>.

Pesquisas intensivas e desenvolvimento de drogas estão em andamento com o objetivo de desenvolver moléculas pequenas inibitórias da atividade de EZH2. Dados pré-clínicos sugerem que o inibidor S-adenosilhomocisteína hidrolase 3-deazaneplanocin A (DZnep) pode provocar uma depleção nos níveis de EZH2 e reduzir os níveis globais de H3K27me3<sup>23</sup>. Porém, este inibidor também reduz outros modificadores de histona, sugerindo que esta molécula atua como um inibidor global de metilação de histonas, destacando a importância do desenvolvimento de inibidores de *EZH2* mais específicos.

Nesse sentido, já existem alguns inibidores de *EZH2* em desenvolvimento, alguns em fase clínica em linfomas de células B<sup>24, 25</sup>.

Em um estudo, Xia e colaboradores (2012), ao submeter linhagens celulares de carcinoma de pulmão células não pequenas a um tratamento com silenciamento gênico de EZH2 por RNA de interferência (RNAi), observou bloqueio do crescimento celular nas fases G0 e G1, atraso da progressão do ciclo celular, efetiva inibição da proliferação celular, maior número de células apoptóticas e redução do tamanho do tumor, quando comparado a um tratamento isolado com radioterapia. O mesmo efeito do RNAi sobre a proliferação celular foi visto em células de carcinoma mamário<sup>22</sup>.

Ainda, a redução eficiente no crescimento de muitos tipos de células tumorais através da inibição específica de *EZH2* por *short hairpin* RNA faz dele um alvo terapêutico atrativo para alguns tipos de câncer<sup>24, 25</sup>.

No entanto, mesmo diante do crescimento e aperfeiçoamento das técnicas biomoleculares atualmente disponíveis, muito ainda precisa ser feito antes da solidificação da terapia gênica como uma substituta as intervenções farmacológicas na LMC. Evidências de mutações com inativação de *EZH2* em doenças mielóides indicam também uma possível função de *EZH2* como supressor tumoral na linhagem mielóide, o que significa que inibidores devem ser aplicados com cautela<sup>24</sup>.

São necessários também estudos da expressão de EZH2 e de seus padrões de metilação na presença do fármaco imatinibe, para o esclarecimento das vias moleculares envolvidas que se mostram resistentes, nas quais a proteína EZH2 pode estar presente<sup>19</sup>.

## CONCLUSÃO

Diversas metodologias foram desenvolvidas ao longo de anos pela biotecnologia e atualmente permitem o desenvolvimento de fármacos jamais imaginados, de estudos aprofundados e de diagnósticos mais sensíveis; sem contar a superação dos métodos terapêuticos convencionais, gerando perspectivas para curas até então inalcançáveis.

A continuidade desse trabalho, com o desenvolvimento da proteína recombinante EZH2, após sua clonagem em vetor de expressão, aprofundaria os estudos de sua estrutura, função, purificação e identificação, bem como de

anticorpos contra ela e isso poderia ser útil não só para o entendimento dos mecanismos moleculares em que ela está envolvida, mas para o desenvolvimento de métodos diagnósticos e de novas estratégias terapêuticas.

AGRADECIMENTOS: À Dra. Elisabete José Vicente por disponibilizar os laboratórios do Departamento de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP).

## REFERÊNCIAS

1. Reis C, Capanema LXL, Palmeira-Filho PL, Pieroni JP, Barros JO, Silva LG. Biotecnologia para Saúde Humana: Tecnologias, Aplicações e Inserção na Indústria Farmacêutica. BNDES Setorial, Rio de Janeiro. 2009; (29):359-392.
2. Ferro ES. Biotecnologia translacional: hemopressina e outros peptídeos intracelulares. Estudos Avançados. 2010; 70 (24):109-121.
3. Linden R. Terapia Gênica: o que é, o que não é e o que será. Estudos Avançados. 2010; 24 (70):31-69.
4. Barbosa AS, Lin CJ. Silenciamento de genes com RNA interferência: um novo instrumento para investigação da fisiologia e fisiopatologia do córtex adrenal. Arq Bras Endocrinol Metab. 2004; 48(5):612-619.
5. Choudhury A Charo J, Parapuram SK, Hunt RC, Hunt DM, Seliger B, Kiessling R. Small interfering RNA (siRNA) inhibits the expression of the Her2/neu gene, upregulates HLA Class I and induces apoptosis of Her2/neu positive tumor cell lines. International Journal of Cancer. 2004; 108(1):71-77.
6. Faltus T, Yuan J, Zimmer B, Kramer A, Loibl S, Kaufmann M, Strebhardt K. Silencing of the HER2/neu Gene by siRNA inhibits Proliferation and induces apoptosis in HER2/neu – Overexpressing Breast Cancer Cells. Neoplasia. 2004; 6(6):786-795.
7. Cohen HC, Xiong MP. Non-cell-autonomous RNA interference in mammalian cells: Implications for in vivo cell-based RNAi delivery. Journal Of Rnai And Gene Silencing, 2011;7:456-463.
8. Premsrirut K. A Rapid and Scalable System for Studying Gene Function in Mice Using Conditional RNA Interference. Cell. 2011; 145(1):145-158.
9. Barbosa AS, Lin CJ. Silenciamento de genes com RNA interferência: um novo instrumento para investigação da fisiologia e fisiopatologia do córtex adrenal. Arq Bras Endocrinol Metab. 2004;48(5):612-619.
10. Tiemann K, Rossi JJ. RNAi-based therapeutics—current status, challenges and prospects. EMBO Molecular Medicine. 2009; 1:142-151.
11. Alberto FL. Avaliação do transcriptoma da leucemia mieloide crônica por ORESTES [tese]. Campinas, SP: Unicamp; 2002. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000413592&fd=y>
12. Redaelli A, Bell C, Casagrande J, Stephens J, Botteman M, Laskin B, Pashos C. Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. Expert Rev. Anticancer Ther. 2004;4(1):85-96.
13. Melo JV, Barners DJ. Chronic myeloid leukemia as a model of disease evolution in human cancer. Nature Reviews Cancer. 2007;7:441-453.
14. De Carvalho DD, Binato R, Pereira WO, Leroy JM, Colassanti MD, Proto-Siqueira R, Bueno-Da-Silva AE, Zago MA, Zanichelli MA, Abdelhay E, Castro FA, Jacysyn JF, Amarante-Mendes GP. BCR–ABL-mediated upregulation of PRAME is responsible for knocking down TRAIL in CML patients. Oncogene. 2011;30:223-233.
15. Fiskus W, Pranpat M, Balasis M, Heger B, Rao R, Chinnaiyan A, Atadja P, Bhalla K.. Histone deacetylase inhibitors deplete enhancer of zeste 2 and associated polycomb repressive complex 2 proteins in human acute leukemia cells. Molecular Cancer Therapeutics.2006; 5(12):3096-3104.
16. Mascarenhas J, Roper N, Chaurasia P, Hoffman R. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies. Clin Epigenet. 2011; 2:197-212.
17. Yoo KH, Hennighausen L. EZH2 Methyltransferase and H3K27 Methylation in Breast Cancer. International Journal Of Biological Sciences. 2012;8(1):59-65.
18. McCabe MT, Graves AP, Ganji G, Diaz E, Halsey WS, Jiang Y, Smitheman KN, Ott HM, Pappalardi MB, Allen KE, Chen SB, Della Pietra A 3rd, Dul E, Hughes AM, Gilbert SA, Thrall SH, Tummino PJ, Kruger RG, Brandt M, Schwartz B, Creasy CL.. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). Proceedings Of The National Academy Of Sciences.2012;109(8):2989-2994.
19. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Udaka K, Yokoyama A. Imatinib causes epigenetic alterations of PTEN gene via upregulation of DNA methyltransferases and polycomb group proteins. Blood Cancer Journal. 2011;1(48):1-9.
20. ncbi.nlm.nih.gov [internet]. National Center for Biotechnology Information – NCBI. Homo sapiens chromosome 7, GRCh37.p9 Primary Assembly. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_000007.13?report=genbank&from=148504464&to=148581441&strand=true](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000007.13?report=genbank&from=148504464&to=148581441&strand=true)>.



21. Bhopale GM, Nanda R K. Recombinant DNA expression products for human therapeutic use. *Current Science*. 2005;89(4):614-622.
22. Xia H, Yu CH, Zhang Y, Yu J, Li J, Zhang W, ZHANG B, Li Y, Guo N. EZH2 silencing with RNAi enhances irradiation-induced inhibition of human lung cancer growth in vitro and in vivo. *Oncology Letters, China*, v. 4, p.135-140, 2012.
23. Zhou J, Bi C, Cheong LL, Mahara S, Liu SC, Tay KG, Koh TL, Yu Q, Chng WJ. The histone methyltransferase inhibitor, DZNep, up-regulates TXNIP, increases ROS production, and targets leukemia cells in AML. *Blood*. 2011; 8;118(10):2830-9. doi: 10.1182/blood-2010-07-294827. Epub 2011 Jul 6.
24. Lund K, Adams PD, Copland M. EZH2 in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2014;28:44–49. doi:10.1038/leu.2013.288; published online 1 November 2013
25. Kondo Y. Targeting histone methyltransferase EZH2 as cancer treatment. *J Biochem*. 2014;156(5):249-57. doi: 10.1093/jb/mvu054. Epub 2014 Aug 31.