

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DANIEL FREITAS DA COSTA**

**IMPACTO PROGNÓSTICO DOS GENES *LSD1* E *LSD2* NA LEUCEMIA  
LINFÓIDE CRÔNICA**

**BRASÍLIA  
2021**

Daniel Freitas da Costa

IMPACTO PROGNÓSTICO DOS GENES LSD1 E LSD2 NA LEUCEMIA LINFÓIDE  
CRÔNICA

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

Orientador(a): Felipe Saldanha de Araújo.

**Brasília**

**2021**

## Ficha catalográfica

Costa, Daniel Freitas da.

IMPACTO PROGNÓSTICO DOS GENES *LSD1* E *LSD2* NA LEUCEMIA LINFÓIDE CRÔNICA / Daniel Freitas da Costa; orientador Felipe Saldanha de Araújo. Brasília, 2021. 59 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Brasília, 2021.

1. Leucemia linfóide crônica. 2. *LSD1*. 3. *LSD2*. 4. Desmetilases. 5. Cariótipo. 6. prognóstico.

I. Saldanha de Araújo, Felipe, orient. II. Título.

DANIEL FREITAS DA COSTA

**IMPACTO PROGNÓSTICO DOS GENES *LSD1* E *LSD2* NA LEUCEMIA  
LINFÓIDE CRÔNICA**

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

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo - Universidade de Brasília

Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Danyelle Romana Alves Rios – Universidade Federal de São João del-Rei

Suplente: Prof. Dr. Fabiana Brandão Alves Silva - Universidade de Brasília

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha família que sempre me apoiou em todas as etapas da vida. Ao meu pai, que serviu de exemplo sobre como alguém deve ser portar perante a vida. À minha mãe, que me ensinou o significado de gentileza e perseverança. Aos meus avós, que cuidaram de mim de um jeito que eu nunca seria capaz de retribuir e ao meu irmão com quem tive o prazer de poder conviver todos esses anos.

Sou grato às minhas colegas de laboratório Amandda, Luma, Gabriela, Marielly e Natália, que sempre me ajudaram prontamente nos desafios apresentados pelo mestrado. Aos meus amigos da faculdade e da vida, porque sem eles minha jornada certamente seria mais triste!

Agradeço ao laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília pelo auxílio a realização deste mestrado.

Gostaria de agradecer ao Professor Felipe Saldanha de Araújo que me aceitou como aluno deste projeto, sempre disposto a esclarecer minhas dúvidas, me ensinando como um profissional deve ser.

Finalmente, quero agradecer a CAPES pelo auxílio a realização do projeto e aos pacientes que nos doaram as amostras necessárias para o estudo.

## SUMÁRIO

ABSTRACT .....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	12
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b> Leucemias .....	14
<b>1.2</b> Leucemia Linfóide Crônica .....	15
<b>1.3</b> Epidemiologia.....	16
<b>1.4</b> Fisiopatologia.....	16
<b>1.5</b> Diagnóstico .....	19
<b>1.6</b> Estadiamento Clínico .....	20
<b>1.7</b> Marcadores prognósticos .....	21
<b>1.8</b> Epigenética.....	23
<b>1.9</b> Modificações de histona .....	23
<b>1.10</b> LSD1 .....	23
<b>1.11</b> LSD2 .....	25
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b> Geral.....	27
<b>2.2</b> Específicos .....	27
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b> Casuística .....	28
<b>3.2</b> Isolamento das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP).....	28
<b>3.3</b> Isolamento das células B saudáveis por seleção imunomagnética .....	29
<b>3.4</b> Citometria de Fluxo .....	29
<b>3.5</b> Citogenética .....	30
<b>3.6</b> Extração do RNA e transcrição reversa .....	30
<b>3.7</b> PCR em tempo real .....	31
<b>3.8</b> Análise <i>In Silico</i> da expressão dos genes <i>LSD1</i> e <i>LSD2</i> na LLC .....	32
<b>3.9</b> Ensaio de inibição de LSD1/LSD2 .....	32
<b>3.10</b> Análise Estatística.....	33
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b> Características clínico-laboratoriais .....	34
<b>4.2</b> Expressão de LSD1 e LSD2 na LLC .....	35
<b>4.3</b> A baixa expressão dos genes <i>LSD1</i> e <i>LSD2</i> está associada à aumento do número de leucócitos na LLC .....	36

4.4 A expressão dos genes <i>LSD1</i> e <i>LSD2</i> está associada a alterações do cariótipo e a pior prognóstico .....	38
4.5 Análise in silico da expressão de <i>LSD1</i> e <i>LSD2</i> na LLC.....	39
4.6 Análise da expressão dos genes <i>BAX</i> , <i>p53</i> , <i>casp3</i> e <i>tp73</i> em amostras inibidas por GSK-LSD1.....	40
5. DISCUSSÃO .....	42
6. CONCLUSÃO .....	49
7. REFERÊNCIAS .....	50

## Resumo

A leucemia linfóide crônica (LLC) é caracterizada pelo acúmulo de linfócitos na medula óssea e em tecidos linfóides secundários como gânglios cervicais, axilares e inguinais, fígado e baço, o que resulta em manifestações clínicas variadas. A LLC é uma doença altamente heterogênea e tem prevalência maior no ocidente, em homens de aproximadamente 60 anos. Apesar da fisiopatologia da LLC não ter sido completamente esclarecida, é possível utilizar certos marcadores prognósticos para avaliar o desenvolvimento dessa doença nos pacientes, como a expressão de ZAP-70 e a presença de alterações citogenéticas recorrentes. Recentemente diversos estudos têm demonstrado uma associação entre mecanismos epigenéticos e a fisiopatologia de diferentes formas de câncer. Nessa linha, as desmetilases de histonas são enzimas capazes de funcionar como silenciador ou ativador de genes ao atuar sobre os resíduos de lisinas presentes nas histonas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão gênica das desmetilases de histona *LSD1* e *LSD2* na LLC e correlacionar os achados com fatores clínicos e laboratoriais envolvidos na progressão desse câncer. Nesse estudo, não encontramos alteração na expressão de *LSD1* nas amostras de LLC, comparando com as amostras controles. Por outro lado, os pacientes com LLC apresentaram expressão reduzida de *LSD2*. Mais importante, observamos que a baixa expressão tanto de *LSD1*, como de *LSD2*, se associou a um pior prognóstico na LLC, acompanhado de aumento do número de leucócitos e acúmulo de alterações citogenéticas. Por fim, realizamos um ensaio de inibição proteica com GSK-LSD1 e identificamos que a inibição de LSD1 reduz a expressão de BAX. A menor produção desse fator pró-apoptótico corrobora com o acúmulo de células observado nas amostras que possuem menor expressão de *LSD1*. Em conjunto, esses achados indicam que LSD1 e LSD2 podem ter papel importante na fisiopatologia da LLC, mas estudos adicionais são necessários para esclarecer molecularmente os mecanismos pelo quais essas desmetilases impactam no acúmulo de células malignas e na instabilidade genômica dessa leucemia.

**Palavras-chave:** Leucemia linfóide crônica, LSD1, LSD2, Desmetilases, cariótipo, prognóstico.



## Abstract

Chronic lymphoid leukemia (CLL) is characterized by the accumulation of lymphocytes in the bone marrow, peripheral blood and in secondary lymphoid tissues such as cervical, axillary, and inguinal ganglia, liver, and spleen, which results in varied clinical manifestations. CLL is a highly heterogeneous disease and has a higher prevalence in the west, among men aged approximately 60 years. Although the pathophysiology of CLL has not been completely clarified, it is possible to use certain prognostic markers to assess the development of this disease, such as the expression of ZAP-70 and the presence of recurrent cytogenetic changes. Recently, several studies have demonstrated an association between epigenetic mechanisms and the pathophysiology of different types of cancer. In this line, histone demethylases are enzymes capable of functioning as a silencer or activator of genes when acting on lysine residues present in histones. This study aimed to evaluate the gene expression of histone demethylases *LSD1* and *LSD2* in the CLL and to correlate the findings with clinical and laboratory factors involved in the progression of this cancer. In this study, we found no change in the expression of *LSD1* in CLL, compared to the control samples. On the other hand, patients with CLL showed reduced expression of *LSD2*. More importantly, we observed that the low expression of both *LSD1* and *LSD2* was associated with a worse prognosis in CLL, accompanied by an increase in the number of leukocytes and an accumulation of cytogenetic changes. Finally, we performed a protein inhibition assay with GSK-LSD1 and identified that the inhibition of LSD1 reduces BAX expression, which could explain partially the accumulation of cells observed in CLL samples that have reduced expression of *LSD1*. Together, these findings indicate that LSD1 and LSD2 may play an important role in the pathophysiology of CLL, but further studies are needed to clarify molecularly the mechanisms by which these demethylases impact the accumulation of malignant cells and the genomic instability of CLL.

**Keywords:** Chronic Lymphoid Leukemia, LSD1, LSD2, Demethylases, karyotype, prognosis.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Sinalização do BCR.....	Pág 18.
<b>Figura 2.</b> Estrutura da LSD1.....	Pág 24.
<b>Figura 3.</b> Esquema da LSD1 como ativador ou repressor.....	Pág 25.
<b>Figura 4.</b> Estrutura da LSD2.....	Pág 26.
<b>Figura 5.</b> Expressão dos genes <i>LSD1</i> e <i>LSD2</i> na LLC.....	Pág 36.
<b>Figura 6.</b> Associação do impacto da expressão de <i>LSD1</i> (a) e <i>LSD2</i> (b) nos valores leucométricos de pacientes com LLC.....	Pág 36.
<b>Figura 7.</b> Associação da expressão de <i>LSD1</i> com número de plaquetas (a), porcentagem de linfócitos (b) e expressão de ZAP-70(c).....	Pág 37.
<b>Figura 8.</b> Associação da expressão de <i>LSD2</i> com número de plaquetas (a), porcentagem de linfócitos (b) e expressão de ZAP-70(c).....	Pág 37.
<b>Figura 9.</b> Associação da expressão dos genes <i>LSD1</i> (a) e <i>LSD2</i> (b) no número de alterações cromossômicas de pacientes com LLC.....	Pág 38.
<b>Figura 10.</b> Associação da expressão dos genes <i>LSD1</i> (a) e <i>LSD2</i> (b) nas categorias de prognóstico.....	Pág 39.
<b>Figura 11.</b> Expressão dos genes <i>LSD1</i> e <i>LSD2</i> em amostras de pacientes com LLC e grupo controle provenientes do Bloodspot.....	Pág 40.
<b>Figura 12.</b> Expressão dos genes <i>BAX</i> , <i>p53</i> , <i>CASP3</i> e <i>tp73</i> em amostras de pacientes com LLC com alta expressão de <i>LSD1</i> e <i>LSD2</i> .....	Pág 40.

## Lista de tabelas

- Tabela 1.** Categoria da LLC na classificação da OMS.....Pág 14.
- Tabela 2.** Critérios diagnósticos da LLC.....Pág 21.
- Tabela 3.** Sistema de estadiamento de Rai.....Pág 21.
- Tabela 4.** Sistema de estadiamento de Binet.....Pág 35.
- Tabela 5.** Características clínico-laboratoriais da coorte.....Pág 35.

## Lista de abreviaturas e siglas

AO: Amino-oxidase

APRIL: Ligante indutor de proliferação

ATM: ataxia telangiectasia mutada

BCR: Receptor de células B

BLNK: *B cell-linker Protein*

BTK: Tirosina Quinase de Bruton

BAFF: Fator de ativação de células B

CD: *Cluster of differentiation*

CTM: Células tronco mesenquimais

CXCL12: Ligante 12 de quimiocina motif C-X-C

CXCL13: Ligante 13 de quimiocina motif C-X-C

CXCR4: Receptor tipo 4 de quimiocina C-X-C

CXCR5: Receptor tipo 5 de quimiocina C-X-C

Del: Deleção

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EMT: Transição epitelial mesenquimal

HLA-G: Antígeno leucocitário humano G

IgVH: Região variável da cadeia pesada na imunoglobulina

LL: Linfoma linfocítico

LLA: Leucemia Linfóide Aguda

LLC: Leucemia Linfóide Crônica

LMA: Leucemia Mielóide Aguda

LMC: Leucemia Mielóide Crônica

LSD1: Desmetilase específica de lisina 1

LSD2: Desmetilase específica de lisina 2

MO: Medula óssea

NF- $\kappa$ B: Fator nuclear kappa B

NK: *Natural Killers*

NLC: *Nurse-like cells*

NuRD: *Nucleosome Remodeling Deacetylase*

PI3K: fosfoinositol 3-quinase

PLC $\gamma$ 2: Fosfolipase C $\gamma$ 2

SYK: Tirosina Cinase Esplênica

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

VCAM: Proteína 1 de adesão celular e vascular

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

## 1. Introdução

### 1.1 Leucemias

As leucemias correspondem a um processo maligno, de características heterogêneas, que se manifestam a partir da proliferação anormal de leucócitos ou outras células sanguíneas. As leucemias podem ser divididas em várias entidades específicas e o princípio da classificação decorre de uma combinação de morfologia, imunofenotipagem, genética, biologia molecular e fatores clínicos. (SWERDLOW et al., 2008). De acordo com a classificação da OMS, a LLC se encontra na categoria de neoplasias de células linfóides B maduras (Tabela 1).

**Tabela 1.** Categoria da LLC na classificação da OMS.

<b>Mature B-cell neoplasms</b>
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
Monoclonal B-cell lymphocytosis*
B-cell prolymphocytic leukemia
Splenic marginal zone lymphoma
Hairy cell leukemia
<i>Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable</i>
<i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma</i>
<i>Hairy cell leukemia-variant</i>
Lymphoplasmacytic lymphoma
Waldenström macroglobulinemia
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgM*
μ heavy-chain disease
γ heavy-chain disease
α heavy-chain disease
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgG/A*
Plasma cell myeloma
Solitary plasmacytoma of bone
Extraosseous plasmacytoma
Monoclonal immunoglobulin deposition diseases*
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
Nodal marginal zone lymphoma
<i>Pediatric nodal marginal zone lymphoma</i>
Follicular lymphoma
In situ follicular neoplasia*
Duodenal-type follicular lymphoma*
Pediatric-type follicular lymphoma*
<i>Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement*</i>
Primary cutaneous follicle center lymphoma
Mantle cell lymphoma
In situ mantle cell neoplasia*
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS

Germinal center B-cell type*
Activated B-cell type*
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)
Primary cutaneous DLBCL, leg type
EBV+ DLBCL, NOS*
<i>EBV+ mucocutaneous ulcer*</i>
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK+ large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Primary effusion lymphoma
<i>HHV8+ DLBCL, NOS*</i>
Burkitt lymphoma
<i>Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*</i>
High-grade B-cell lymphoma, with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements*
High-grade B-cell lymphoma, NOS*
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma

Entidades provisórias estão em itálico.

\* Alterações da classificação de 2008.

Adaptado de Swerdlow et al (2016)

## 1.2 Leucemia linfoide crônica

A LLC é uma neoplasia que apresenta acúmulo de linfócitos de aparência madura na medula óssea, sangue periférico e tecidos linfoides secundários. Esse câncer se encontra classificado como uma neoplasia de células B linfóides maduras juntamente ao linfoma linfocítico (LL), que se diferenciam pela presença de linfadenopatia quando as células B monoclonais se apresentam com contagem inferior a 5000/uL no sangue periférico. De acordo com a OMS, praticamente todos os casos de LLC/ LL têm como precursor a linfocitose de células B monoclonais (MBL) que consiste no achado laboratorial de linfócitos B monoclonais até 5000/uL sem sintomas ou linfonodomegalia presente (SWERDLOW et al., 2016). Tradicionalmente, a LLC ainda pode ser dicotomizada em duas subcategorias com progressões clínicas diferentes, em células que apresentam ou não uma mutação no gene da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (IGHV) (HAMBLIN et al., 1999).

### **1.3 Epidemiologia**

A LLC é uma doença mais comumente encontrada em homens, com razão de 1,25:1 quando se compara ao sexo feminino, e é o tipo de leucemia mais frequentemente diagnosticado em adultos no ocidente, sendo menos frequente em pessoas com ancestralidade asiática ou do oriente-médio (RODRIGUES et al., 2016). O INCA (2020) (Instituto Nacional de Câncer) estimou 10.810 novos casos para 2020 no Brasil, sendo 5.920 homens e 4.890 mulheres.

De acordo com o *National Cancer Institute (NCI)* (2019), com os dados obtidos pelo registro de SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*), nos Estados Unidos, foi encontrada média de idade de 70 anos para o diagnóstico desse câncer, assim como uma incidência anual de 4,9 casos para cada 100.000 habitantes.

Cabe ressaltar que as estatísticas relacionadas a essa doença podem estar subestimadas na literatura devido às suas próprias características de manifestação, por ser assintomática muitas vezes e, em muitos casos, ser diagnosticada por coincidência em exames de sangue esporádicos (MOLICA, 2006).

### **1.4 Fisiopatologia**

Os mecanismos que originam e comandam o desenvolvimento da LLC estão relacionados com fatores genéticos, como alterações cromossômicas e modificações epigenéticas; com a sinalização de células B e do receptor de células B (BCR); e com o microambiente tumoral (KIPPS et al., 2017).

Aproximadamente 80% dos pacientes com LLC apresentam pelo menos uma das quatro alterações cromossômicas mais comuns: a trissomia do 12, deleção del(13q), del(11q) ou del(17p). A alteração mais frequente é a del(13q), encontrada em 50% dos pacientes, em que há deleção do cluster *DLEU2-mir-15-16*. Essa região está envolvida na regulação da expressão



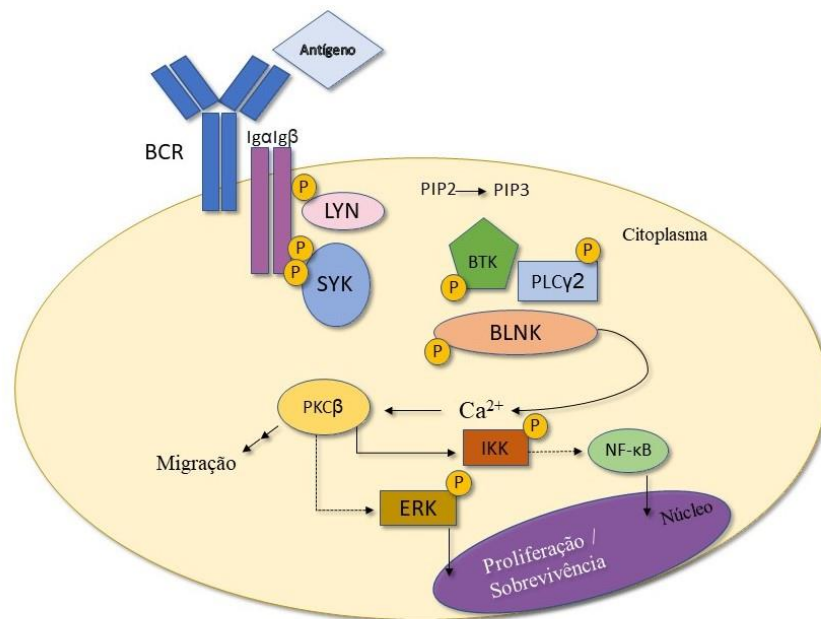
de proteínas que inibem a apoptose ou estão envolvidas na progressão do ciclo celular (AUTORE et al., 2018; KIPPS et al., 2017).

A trissomia do 12 é a segunda aberração genética mais diagnosticada na LLC e está relacionada a um prognóstico intermediário. Pacientes que possuem essa mutação raramente apresentam alguma alteração em TP53, entretanto, é frequente a presença de mutações em NOTCH1, o que resulta em pior prognóstico (AUTORE et al., 2018). A deleção 17p, encontrada em até 25% dos casos, é relacionada a perda do gene *TP53*, que codifica a proteína supressora tumoral p53 e está associada à prognóstico adverso (CAMPO et al., 2018). A deleção 11p envolve alterações no gene supressor tumoral *ATM* (ataxia telangiectasia mutated), que codifica uma proteína de reparo do DNA e está associada também a um prognóstico adverso (KIPPS et al., 2017; DOHNER et al., 2000).

A LLC possui um alto grau de variabilidade genética e estudos como o de Fabbri et al., (2011) e Wang (2011) mostram mutações somáticas recorrentes que acarretam em modificações importantes como nos mecanismos de reparo de DNA (TP53 e ATM), de sinalização inflamatória (MYD88), sinalização NOTCH e WNT, e processamento de mRNA (SF3B1).

O BCR é composto por imunoglobulinas como: IgM, IgG, IgD, IgA, IgE, CD79a, CD79b e possui um papel fundamental na cascata de transdução de sinal para a proliferação e sobrevivência dos linfócitos B maduros (HERISHANU et al., 2011). Após a ligação do antígeno e agregação do BCR, a família de quinases SRC (LYN, BLK e FYN) assim como as tirosinas-quinase SYK e BTK são ativadas, promovendo a formação de um “signalossoma” composto pelas quinases mencionadas, enzimas sinalizadoras como a fosfolipase C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) e a fosfoinositol 3-quinase (PI3K), e proteínas adaptadoras como a B cell-linker protein (BLNK) e CD19. Os sinais emitidos por esse “signalossoma” alteram o metabolismo celular e a expressão

genética, influenciando nos quesitos de sobrevivência, anergia, apoptose, proliferação e diferenciação (KUROSAKI, SHINOHARA, BABA, 2010; DAL PORTO et al., 2004). No caso das células leucêmicas, esses receptores são capazes de se ativar através de autoantígenos. Há ainda a ativação das proteínas quinase ZAP70, SYK, LYN E BTK que acarretam a ativação das vias de sinalização MEK/ERK, MAPK, PI3K/AKT e NF- $\kappa$ B (Figura 1) (DUHREN-VON MINDEN et al., 2012; FRENZEL; REINHARDT; PALLASCH, 2016).



**Figura 1. Sinalização do BCR.** Ao ser estimulado por um antígeno, a sinalização do BCR induz a fosforilação de LYN e SYK o que inicia uma cascata de sinalização e ativa BTK. O BTK é fosforilado e induz a liberação de cálcio e subsequentemente inciam-se cascatas de sinalização relacionadas com proliferação e sobrevivência da célula. Adaptado de Sivina, Kreitman, Arons et al., 2014

O microambiente tumoral, no caso de órgãos linfoides secundários, também se apresenta como um fator fundamental para o desenvolvimento da LLC. Através da interação com as *nurse-like cells* (NLC), células-tronco mesenquimais (CTM), *natural killers* (NK) e linfócitos T, a célula leucêmica consegue proliferar e sobreviver. Essas interações são mediadas por

moléculas de adesão, como VCAM; receptores de quimiocinas, como o CXCR4 e o CXCR5; e citocinas, como o TNF- $\alpha$  (TEN HACKEN, BURGER, 2016).

As NLC são células de origem monocítica que se mostraram capazes de ativar o BCR e o NF- $\kappa$ B das células de LLC, podendo induzir quimiotaxia, sobrevivência e proliferação celular, por meio da liberação das quimiocinas CXCL12 e CXCL13, fatores de ativação de células B (BAFF) e um ligante indutor de proliferação (APRIL) (BURGER et al., 2009; BURKLE et al., 2007). As CTM possuem um papel de suporte às células progenitoras na hematopoese fisiológica e são encontradas em diversos tecidos, inclusive nos tecidos linfáticos de pacientes com LLC. Essa comunicação entre as CTM e as células leucêmicas por meio de contato direto e secreção de quimiocinas, ocasiona, não só a proteção dessas células contra a apoptose induzida por quimioterápicos, mas afeta também a migração das células leucêmicas para o tecido (RUAN et al., 2006; BURGER, GHIA, ROSENWALD et al., 2009). Ainda no contexto da LLC, os linfócitos TCD4<sup>+</sup> interagem com esses clones, utilizando o ligante de CD40 (CD40L) e promovem a sobrevivência celular. Apesar da linfocitose presente no sangue periférico, os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> aparentam estar com sua funcionalidade prejudicada. Como demonstrado por Rizzo et al., (2014), as células NK também tem sua função reduzida. A molécula de antígeno leucocitário humano G (HLA-G) presente nos pacientes com LLC encontra-se com expressão elevada, o que induz à célula NK à apoptose e diminui sua atuação citotóxica. Desta forma pode-se observar que quando a célula leucêmica interage com esses dois tipos celulares, ela reduz suas funções efetoras e consegue evadir a resposta imunológica.

### **1.5 Diagnóstico**

O diagnóstico da LLC se dá a partir do hemograma e da imunofenotipagem. Os achados característicos consistem na linfocitose persistente, que de acordo com o NCI, deve apresentar um valor maior que 5000/uL de linfócitos B por mais de 3 meses, na visualização microscópica

de linfócitos pequenos de cromatina densa e citoplasma escasso com presença de manchas de gumprecht, além de uma infiltração medular com presença de pelo menos 30% de linfócitos. Ademais, os linfócitos B circulantes são clonais e apresentam marcadores celulares específicos, demonstrados por citometria de fluxo (Tabela 3) (HALLEK, 2020). Vale mencionar que na última atualização da classificação realizada pela OMS (SWERDLOW et al., 2016), três aspectos diagnósticos foram modificados: citopenias ou sintomas relacionados a doença agora são insuficientes para diagnosticar a LLC quando linfócitos B monoclonais se apresentarem menores que 5000/uL no sangue periférico; centros proliferativos com alta proliferação ou confluência são indicadores de prognóstico adverso; mutações de possível relevância clínica como TP53, NOTCH1, SF3B1, ATM e BIRC3 foram reconhecidas.

**Tabela 2.** Critérios diagnósticos da LLC.

<b>1. Linfocitose no sangue periférico</b>
>5000/uL linfócitos B (NCI)
<b>2. Predominância de linfócitos pequenos e maduros</b>
<b>3. Características imunofenotípicas</b>
CD5+, CD19+, CD20+, mlg+/-
CD22 <sup>+/-</sup> , FMC7 <sup>+/-</sup> , CD79b <sup>-</sup> , CD200 <sup>+</sup>

Adaptado de Zago, Falcão, Pasquini 2013.

### 1.6 Estadiamento Clínico

Os sintomas relacionados à LLC envolvem perda de peso involuntária de pelo menos 10% do peso corporal, sudorese noturna sem causa aparente, fadiga considerável e febre persistente de aproximadamente 38°C. No entanto, vários pacientes com LLC se mostram assintomáticos e acabam sendo diagnosticados a partir de exames de sangue de rotina (PARIKH, 2018).

O estadiamento da LLC leva em conta manifestações clínicas e hematológicas resultantes da infiltração de células leucêmicas nos tecidos linfáticos, medula óssea, baço e

fígado. Os dois sistemas de estadiamento mais amplamente utilizados são o de Rai e o de Binet. O de Rai (1975), que sofreu uma atualização em 1987, classificou os pacientes em 3 grupos: baixo risco (estádio 0), risco intermediário (estádios I e II) e alto risco (estádios III e IV). O de Binet (1981), conta com 3 estágios baseados no número de áreas envolvidas, considerando organomegalias e linfonodomegalias (Tabela 2).

**Tabela 3.** Sistema de estadiamento de Rai.

<b>Estádio</b>	<b>Características Clínicas</b>	<b>Sobrevida mediana (meses)</b>
0	Linfocitose no sangue e medúla óssea	>150
I	Linfocitose + linfonodomegalia	101
II	Linfocitose + esplenomegalia e/ou hepatomegalia	71
III	Linfocitose + anemia	19
IV	Linfocitose + trombocitopenia e presença ou não de organomegalia e anemia	19

Adaptado de Zago, Falcão, Pasquini 2013.

**Tabela 4.** Sistema de estadiamento de Binet.

<b>Estádio</b>	<b>Características Clínicas</b>	<b>Sobrevida mediana (anos)</b>
A	Menos de 3 áreas de envolvimento linfoide*, sem anemia ou trombocitopenia	>10
B	3 ou mais áreas de envolvimento linfoide, sem anemia ou trombocitopenia	7
C	Hemoglobina menor ou igual a 10g/dL ou plaquetas menores ou igual a 100.000/L	2

\* Áreas de envolvimento linfoide: gânglios cervicais, axilares e inguinais (unilateral ou bilateral); fígado e baço. Adaptado de Binet (1981).

### 1.7 Marcadores prognósticos

De modo a avaliar a progressão de uma doença altamente heterogênea e a resposta ao tratamento dos pacientes, certos marcadores são utilizados como o tempo de duplicação do número de linfócitos no sangue periférico e a contagem de linfócitos. No entanto, outros fatores

também apresentam valor prognóstico como a B2 microglobulina, o estado mutacional do IGHV e a expressão do ZAP-70 e CD38 (MUÑOZ-NOVAS et al., 2018).

A proteína ZAP-70 é uma tirosina cinase normalmente encontrada nos linfócitos T humanos e possui um papel de ativação celular, porém se mostra presente nas células B da LLC. Estudos determinaram que essa proteína também tem um envolvimento com a sinalização do BCR, atuando no recrutamento de cinases como a SYK (WANG et al., 2010). A expressão dessa proteína em pacientes que não possuem mutação no IGHV está relacionada a um pior prognóstico e sobrevida diminuída (GOMES et al., 2017). Já o CD38, uma ecto-enzima capaz de hidrolisar NAD, é expresso nos linfócitos B e T e sua expressão elevada tem sido associada a uma progressão pior da doença, assim como uma refratariedade a quimioterapia por parte das células leucêmicas (HARTMAN et al., 2010).

Outro marcador passível de avaliação é a B2 microglobulina sérica, que é uma proteína pequena de 11,800 Dalton identificável em diversas células nucleadas e envolvida na regulação de proliferação, apoptose e, segundo Li, L. et al. (2016), na metástase de diferentes tipos de câncer.

O estado mutacional do gene IGHV é outro marcador importante para a análise da progressão da doença, já que pacientes com células leucêmicas que não expressam mutação no IGHV tem um desenvolvimento mais agressivo da LLC quando comparados a outros pacientes portadores de IGHV mutado. É importante ressaltar que as mutações somáticas sofridas pelo IGHV são um processo fisiológico da maturação de anticorpos que acontece também com células B normais (KIPPS et al., 2017).

## **1.8 Epigenética**

A epigenética se refere a modificações na regulação da expressão do DNA de caráter hereditário sem alterações na sequência genética e decorre dos seguintes mecanismos: metilação de DNA, modificação de histonas e micro-RNA (LIU et al., 2020).

O DNA das células é empacotado em forma de cromatina e sua primeira subunidade se denomina nucleossomo. Esse nucleossomo é composto por um octâmero de proteínas histona (H2A, H2B, H3 e H4) e as modificações estruturais relacionadas a esse complexo é o que define a epigenética (LIU et al., 2020; WEAVER, MORRISON, MUSSELMAN, 2018).

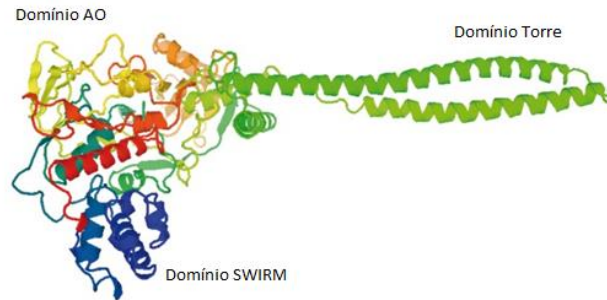
## **1.9 Modificações de histona**

As modificações nas histonas podem ocorrer pelos processos de metilação, acetilação, ubiquitilação, sumoilação e fosforilação. Inicialmente acreditava-se que a metilação da cauda de histona era irreversível, contudo, foi descoberta a desmetilase lisina específica 1 (LSD1 ou KDM1A), uma desmetilase que remove metilações da histona H3 na lisina 4 (H3K4) por meio da atividade de seu domínio amina-oxidase, utilizando FAD como cofator (DIMITROVA, TURBERFIELD, KLOSE, 2015). As desmetilases são divididas em dois subgrupos: as FAD-dependentes LSD1 e LSD2 e JMJD contendo o domínio JmjC.

## **1.10 LSD1**

O gene *LSD1* codifica um repressor epigenético transcricional que desmetila os resíduos de lisina mono ou dimetilados das caudas das histonas (H3K4me1/me2 ou H3K9 me1/2) (MAGLIULO, BERNARDI, MESSINA, 2018). LSD1 é uma proteína de 90kDa que contém um domínio SWIRM e um domínio amina-oxidase (AO), sendo que essa região é bilobulada, um lobo de ligação do FAD e outro para ligação com substrato, além de uma inserção no seu domínio AO denominado domínio torre que interage com o domínio SANT2 do CoREST

(Figura 2). A desmetilação apenas por LSD1 é possível em peptídeos de histona, mas apenas o complexo LSD1/CoREST é capaz de desmetilar no nucleossomo (YANG et al., 2006).



**Figura 2. Estrutura da proteína LSD1.** Demonstrando os domínios Torre, amina-oxidase e SWIRM. Adaptado de Biasini M (2014).

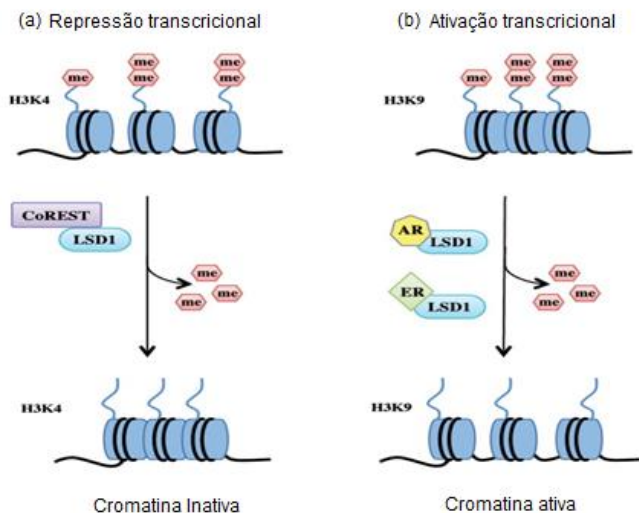
A metilação H3K4 é relacionada à ativação gênica, portanto a LSD1 normalmente está associada ao silenciamento genético, mas também pode atuar como ativador (Figura 3). Após ligação com certos substratos como o receptor de estrogênio ou receptor de androgênio, LSD1 promove a ativação transcricional ao desmetilar o resíduo de lisina 9 na histona 3 (H3K9) (MAGLIULO, BERNARDI, MESSINA, 2018).

Através de sua ação catalítica em histonas e proteínas não histonas, a LSD1 tem demonstrado cada vez mais uma participação ativa em processos celulares diversos como a proliferação celular, transição epitelial-mesenquimal (EMT), segregação cromossômica, metabolismo, desenvolvimento embrionário, entre outros (GU et al., 2020). A desregulação dessa enzima tem sido associada com vários tumores malignos como o câncer de próstata, bexiga e pulmão (AMENTE, LANIA, MAJELLO, 2013).

O gene *LSD1* se encontra hiperexpresso em diversos tipos de câncer como leucemias, linfomas e tumores sólidos. Apesar de seu papel não estar totalmente esclarecido no



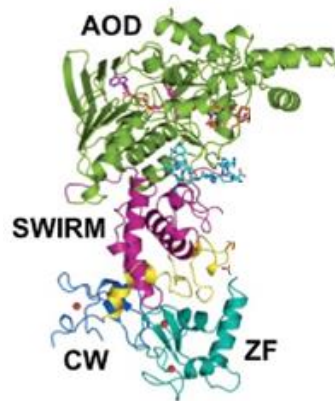
desenvolvimento dessas patologias, LSD1 aparenta possuir funções oncogênicas diferentes (HOSSEINI, MINUCCI, 2017).



**Figura 3. Representação da LSD1 como ativador ou repressor.** Como co-repressor, a LSD1 se liga com o complexo CoREST (a) e como ativador se ligar com receptores de estrogênio e androgênio (b). Adaptado de Magliulo, D., Bernardi, R., Messina, S. (2018).

### 1.11 LSD2

O LSD2, ou KDM1B, codifica uma desmetilase que atua sobre a histona H3K4, assim como o LSD1. Outra semelhança entre as duas desmetilases são os sítios AO e SWIRM, no entanto ela não apresenta o domínio Torre, mas sim um domínio CW-tipo *zincfinger* (Figura 4) e essa diferença estrutural parece ser o motivo pelas propriedades bioquímicas divergentes entre as proteínas (ZHANG et al., 2013). Semelhante a LSD1, o LSD2 tem especificidade para histona H3K4me1/2, apesar disso ela atua notadamente na região codante do seu gene alvo. LSD2 se localiza no cromossomo 6p22, uma região gênica com alta incidência de translocações, deleções e ampliações em vários tipos de câncer (FANG et al. 2010). Em contraste com a LSD1, sua atividade ótima de desmetilase não requer um cofator.



**Figura 4. Estrutura da proteína LSD2.** Demonstrando os domínios amina-oxidase, SWIRM e *zincfinger*. Adaptado de Niwa, H., Umehara, T. (2017).

A enzima LSD2 foi associada a diferentes funções importantes na célula como o *imprinting* genômico, regulação da transcrição, regulação da reprogramação de células somáticas, sinalização de DNA metiltransferases e fator de crescimento. Ao se avaliar tecidos tumorais foi registrado também um aumento da expressão gênica da *LSD2* no mieloma, glioblastoma, câncer colorretal e de mama (WANG et al., 2019).

Como pode ser visto, existem relatos de desregulação nas LSD1 e LSD2 em vários tipos de câncer. Entretanto, ainda não há dados na literatura que investigue a expressão dessas desmetilases de histonas na LLC.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral:**

-Avaliar a expressão dos genes *LSD1* e *LSD2* na LLC e investigar seu impacto no prognóstico desse câncer.

### **2.2 Específicos:**

-Determinar a expressão dos genes *LSD1* e *LSD2* em pacientes com LLC e em indivíduos saudáveis;

-Avaliar se há associação entre a expressão dos genes *LSD1* e *LSD2* com a leucometria e contagem de plaquetas dos pacientes de LLC;

-Analisar a expressão de ZAP-70 nas amostras de LLC e investigar se esse parâmetro é impactado pela expressão de *LSD1* e *LSD2*;

-Investigar se a expressão de *LSD1* e *LSD2* está associada a alterações citogenéticas na LLC;

-Investigar se há associação entre a expressão de *LSD1* e *LSD2* e as categorias de prognóstico;

- Avaliar o impacto do uso de GSK-LSD1 na expressão de genes que controlam a sobrevivência de células leucêmicas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Casuística**

Nesse estudo foram utilizadas amostras oriundas de 55 pacientes com LLC, atendidos no Serviço de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Adicionalmente foram utilizadas 8 amostras de pacientes hematologicamente saudáveis com idade entre 50 e 84 anos para o controle. Os pacientes que estavam sendo tratados por quimioterapia seguiram um protocolo de tratamento com fludarabina, fludarabina associada a ciclofosfamida, e clorambucil. Para realização do ensaio funcional de inibição de LSD1, obtivemos 11 amostras adicionais de pacientes com LLC, atendidos no Hospital de Base do Distrito Federal. O diagnóstico de LLC desses pacientes foi determinado pela morfologia das células B de aparência típica, pela linfocitose absoluta e pelo padrão imunofenotípico (MATUTES et al., 1994). Essas amostras, usadas como controle, foram submetidas ao isolamento de células B através de centrifugação por Ficoll-Hypaque e posterior separação imunomagnética. O termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) foi obtido para todos os pacientes e voluntários saudáveis e a execução do estudo foi aprovada pelo comitê de ética local.

#### **3.2 Isolamento das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)**

As CMSP foram isoladas das amostras de sangue periférico coletadas de doadores saudáveis e de pacientes com LLC, por uso do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Resumidamente, em tubo cônico de 15mL foram adicionados 3mL de Ficoll, 4mL sangue total e 4mL PBS. Posteriormente, o material foi centrifugado a 360g, por 25 minutos. Após esse tempo, formou-se um anel de células mononucleares, que foi recolhido por pipetagem, lavado com PBS três vezes e depois foi realizada contagem celular em câmara de Neubauer.

### **3.3 Isolamento das células B saudáveis por seleção imunomagnética**

Nas amostras controles, as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas pelo uso do Ficoll-Hypaque e posteriormente submetidas a separação imunomagnética para isolamento de células B, conforme instruções do fabricante (MiltenyiBiotec, Bergisch-Gladbach, Germany). Em suma, as CMSPs foram incubadas com o anticorpo monoclonal CD19 conjugado com microbeads (MiltenyiBiotec) e, posteriormente, a suspensão celular foi dispensada em uma coluna LS (MACS SeparationColumns; MiltenyiBiotec) previamente acoplada em um ímã (SuperMACS). As células CD19 tinham na sua superfície *beads* e ficaram retidas no campo magnético. Posteriormente a coluna foi retirada do campo magnético, as células obtidas para avaliação da pureza e extração de RNA pelo método de TRIZOL-LS (Invitrogen Inc). As amostras apresentaram marcação para CD19 superior a 90%, conforme determinado por Citometria de Fluxo.

### **3.4 Citometria de Fluxo**

As amostras de sangue periférico dos pacientes com LLC foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA. As CMSP foram isoladas em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e, após centrifugação, ajustamos  $10^6$  células por tubo para proceder a imunofenotipagem. O painel inicial de citometria de fluxo utilizada para diagnóstico dos casos recrutados consistiu em 3 tubos: CD20 FITC, CD79b PE, CD19 PE-Cy5, CD5 APC; anti- $\lambda$ FITC, anti- $\kappa$ PE, CD19 PE-Cy5, CD5 APC; e Anti- $\lambda$ FITC, anti- $\kappa$ PE, CD19 PE-Cy5, CD5 APC. Todos os anticorpos monoclonais foram obtidos da Becton Dickinson (San Jose, CA, USA), exceto os anticorpos anti- $\lambda$  e anti- $\kappa$  (Dako, Carpinteria, CA, USA). Ademais, foi analisada a expressão do marcador ZAP-70 (BD, San Jose, CA, USA), sendo considerados positivos os casos em que havia mais de 20% com marcação para essa proteína (SARGENT;

CRAIG; SWERDLOW, 2009). Esses testes foram realizados no Citometro de Fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson). Para análise foram adquiridos 10.000 eventos.

### **3.5 Citogenética**

A análise do cariótipo foi realizada por bandeamento G no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Em suma, foram utilizadas  $1 \times 10^7$  CMSP, sendo que a metáfase foi induzida em meio RPMI-1640 (Invitrogen, Gaithersburg, MD) com 20% de SBF na presença do oligonucleotídeo imunoestimulatório DSP30 (TIBMolBiol, Berlin, Germany) e interleucina 2 (IL-2). Após 72 horas em cultura, foi adicionado colcemid (Sigma, Munich, Germany) antes da preparação e espalhamento dos cromossomos. Após determinação do cariótipo, as amostras foram classificadas quanto ao prognóstico (RIGOLIN et al, 2017; DOHNER et al, 2000).

### **3.6 Extração do RNA e transcrição reversa**

O RNA total das CMSP dos pacientes com leucemia e das amostras purificadas CD19+ dos doadores saudáveis foram isoladas usando o reagente TRIZOL-LS. Em síntese, em um tubo (15mL) foram adicionados 750 $\mu$ L de TRIZOL-LS gelado e 250 $\mu$ L de PBS contendo a suspensão celular. Após o período de incubação de 5 min, 200 $\mu$ L de clorofórmio gelado foi acrescentado na mistura. Esse material foi então centrifugado por 15 min a 12.000g, a 4°C. Terminado esse processo, foram obtidas três fases. A fase aquosa foi transferida para outro tubo (1,5mL), onde foram adicionados 500 $\mu$ L de isopropanol gelado. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 12.000 g a 4°C. Finalizado esse processo foi adicionado 1mL de álcool gelado 100%. Por fim, a mistura foi centrifugada por 5 min a 7.500g, a 4°C, o etanol descartado e o pellet foi ressuspense em 20 $\mu$ L de água DEPC (Dietilpirocarbonato). Após obtenção do RNA, analisamos a qualidade desse material por meio do espectrofotômetro Nanodrop. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado usando 1 $\mu$ g do total de RNA pelo Kit

de transcrição reversa High Capacity (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

### 3.7 PCR em tempo real

A análise quantitativa da expressão dos genes *LSD1* e *LSD2* foi realizada em amostras controle (células B) e em amostras de LLC no equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus (ThermoFisher). Os reagentes utilizados e suas quantidades foram: tampão Master Mix (5uL), H<sub>2</sub>O (2,4uL), CxR (0,1uL), primers Forward e Reverse (0,5uL) totalizando 8uL, adicionados de 2uL de amostra de cDNA por reação. As condições de reação consistem em 40 ciclos com temperaturas de 95°C e 60°C no estágio de ciclagem.

O mix empregado para o processo de análise da expressão dos genes foi GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). O gene calibrador utilizado foi GAPDH, cuja eficiência de amplificação é a mesma dos genes alvos, o que possibilitou a análise dos dados pela metodologia  $\Delta\Delta C_t$  (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001). O  $\Delta C_t$  foi gerado a partir da normalização dos valores de quantificação da amostra alvo em relação à amostra controle. O  $\Delta\Delta C_t$  foi obtido pela subtração do valor de  $\Delta C_t$  das amostras leucêmicas do  $\Delta C_t$  médio das amostras controle das amostras controles (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010).

As sequências de primers utilizados foram as seguintes: *LSD1* 5'-TTGTCCTCGACTTACAGCTTGTC-3' 5'-GAGGGAATCCTATGGCTGTGG-3'; *LSD2* 5'-GTACCCGGGAGTTAGCAGAG-3' 5'-GTGTGAACAAGTATCTGCTCG-3'e *GAPDH* 5'-TCAACGACCACTTTGTCAAGCTCAGCT-3' 5'-GGTGGTCCAGGGGTCTTAC-3'.

### 3.8 Análise *In Silico* da expressão de LSD1 e LSD2 na LLC.

As análises *in silico* da expressão de *LSD1* e *LSD2* na LLC foram realizadas na plataforma Bloodspot e foi escolhido o estudo Leukemia MILE por possuir amostras comparáveis ao nosso estudo. O Leukemia MILE teve como objetivo avaliar a precisão clínica de perfis de expressão genética, originados de experimentos de *microarray*, comparados ao padrão ouro para 16 subclasses de leucemias agudas e crônicas, síndromes mielodisplásicas e um grupo controle de medula óssea saudável. O estudo contém um total de 2096 amostras, entretanto para a análise selecionamos apenas a população de pacientes com LLC (BAGGER et al., 2019; LABAJ et al., 2017). A análise foi realizada em 448 amostras de LLC e em 73 amostras de medula óssea obtidas de pacientes hematologicamente saudáveis (controle).

### 3.9 Ensaio de inibição de LSD1

Para esse ensaio foram coletadas 11 amostras de LLC no Hospital de Base do Distrito Federal. As CMSP desses pacientes foram isoladas e parte das células foi utilizada para análise de expressão dos genes *LSD1* e *LSD2*. As amostras que apresentaram expressão elevada desses genes (*cut-off* baseado na mediana de  $\Delta CT$ ) foram selecionadas para os ensaios funcionais de inibição de LSD1. Para isso, as CMSP dos pacientes foram cultivadas em meio RPMI e tratadas com 1 $\mu$ M do inibidor GSK-LSD1 por 24h (PARK et al., 2020). Após esse período as amostras foram submetidas a extração de RNA por uso do *kit PureLink® RNA Mini* e avaliamos a expressão dos genes *P53*, *BAX*, *CASP3* e *TP73*.

As sequências de primers utilizados foram as seguintes: *P53* F5'-AGAAAACCTACCAGGGCAGC-3' R5'- ACATCTTGTTGAGGGCAGGG-3'; *BAX* F5'-CAGACCGTGACCATCTTTGT-3' R5'- GCCTCAGCCCATCTTCTTC-3'; *CASP3* F5'-CTAGCGGATGGGTGCTATTG-3' R5'- GATACACAGCCACAGGTATGAG-3' e *TP73* F5'-CACCTCAGCTCTCCATCTTATTG-3' R5'- GCATGGGTCTTAGCCTTTCT-3'.



### **3.10 Análise estatística**

Para as análises estatísticas foi utilizado o software Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Para as comparações envolvendo dois grupos, utilizamos o teste Mann-Whitney e para três grupos, o Kruskal-Wallis. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5% (CI 95%).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características clínico-laboratoriais.

Foram analisadas as características clínicas, laboratoriais e epidemiológicas dos 54 pacientes com LLC. Desses pacientes, 22 são do sexo feminino (40,7%) e 32 do sexo masculino (59,3%). A média de idade dos pacientes no momento do diagnóstico foi de 63,5 anos. O estadiamento clínico se dividiu em: 37 pacientes Binet A (68,5%), 12 Binet B (22,2%) e 5 Binet C (9,3%). Em relação às alterações citogenéticas mais frequentes, 3 casos apresentaram deleção do 17p (5%) e 8 casos de trissomia do 12 (14,5%). Considerando-se o número de alterações cromossômicas, 12 pacientes não apresentaram alterações (22%), 28 pacientes mostraram 1 ou 2 alterações (52%), e 14 pacientes apresentaram 3 alterações (26%). Quanto ao prognóstico dessa coorte, 14 pacientes demonstraram um prognóstico favorável (26%), 22 pacientes apresentaram cariótipo de prognóstico intermediário (40,7%) e 18 pacientes apresentaram um prognóstico desfavorável (33,3%). Quanto à expressão de ZAP-70, houve positividade de expressão em 37 pacientes (69,8%) (Tabela 4). As análises de contingência mostraram que os pacientes com baixa expressão do gene *LSD1* são preponderantemente do sexo masculino ( $p=0,02$ ). Além disso, os pacientes com baixa expressão dos genes *LSD1* e *LSD2* tendem a mostrar maior número de leucócitos ( $p=0,009$  e  $p=0,01$ , respectivamente). O teste exato de Fisher também demonstrou que a expressão reduzida de *LSD1* e *LSD2* se associou a presença de alterações citogenéticas ( $p=0,04$  e  $p=0,009$ , respectivamente), especialmente, de impacto desfavorável ( $p=0,01$ ). Destaca-se que perdemos o resultado de ZAP-70 para uma amostra da coorte. Para a análise da expressão de *LSD2* também perdemos a expressão de 1 amostra.

**Tabela 5.** Características clínico-laboratoriais da coorte

Características	Total	LSD1		.p	LSD2		.p
		high	low		high	low	
Idade							
mediana	63 (43-85)	59 (43-85)	66 (49-80)	ns	63 (43-85)	65 (54-80)	ns
Sexo							
Masculino	32 (59,3)	12 (44,4)	20 (74)	<b>0,02</b>	13 (48,1)	19 (70,3)	ns
Feminino	22 (40,7)	15 (55,6)	7 (26)		14 (51,9)	8 (29,7)	
Binet							
A	37 (68,5)	20 (74)	17 (63)	ns	20 (74)	17 (63)	ns
B	12 (22,2)	6 (22,2)	6 (22,2)		6 (22,2)	6 (22,2)	
C	5 (9,3)	1 (3,8)	4 (14,8)		1 (3,8)	4 (14,8)	
Plaquetas							
mediana	143.000	147.000	140.000	ns	147.000	141.500	ns
Leucócitos							
mediana	45.250	34.400	54.300	<b>0,009</b>	30.100	49.500	<b>0,01</b>
ZAP-70+							
Positivo	37 (69,8)	17 (63)	20 (77)	ns	17 (63)	20 (77)	ns
Negativo	16 (30,2)	10 (37)	6 (23)		10 (37)	6 (23)	
Cariótipo							
Normal	12	9 (33,3)	3 (11,1)	<b>0,04</b>	10 (37)	2 (7,4)	<b>0,009</b>
Anormal	42	18 (66,7)	24 (88,9)		17 (63)	25 (92,5)	
Prognóstico							
Favorável	14 (26)	11 (40,75)	3 (11,1)	<b>0,01</b>	11 (40,75)	3 (11,1)	<b>0,01</b>
Intermediário	22 (40,7)	11 (40,75)	11 (40,75)		11 (40,75)	11 (40,75)	
Desfavorável	18 (33,3)	5 (18,5)	13 (48,15)		5 (18,5)	13 (48,15)	
Número de alterações cariotípicas							
0	12 (22)	9 (33,3)	3 (11,1)	<b>0,004</b>	10 (37)	2 (7,4)	<b>0,007</b>
1 or 2	28 (52)	16 (59,3)	12 (44,4)		14 (51,9)	14 (51,85)	
3+	14 (26)	2 (7,4)	12 (44,4)		3 (11,1)	11 (40,75)	

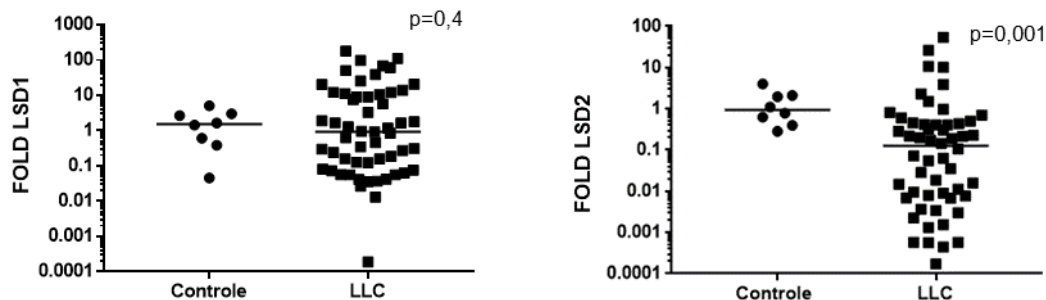
\*ns: não significativo.

\*porcentagem em parênteses

#### 4.2 Expressão de *LSD1* e *LSD2* na LLC

O gene *LSD1* não se mostrou diferencialmente expresso entre as amostras de LLC e as amostras controle ( $p=0,4$ ). Por outro lado, as amostras de LLC apresentaram menor expressão do gene *LSD2*, comparadas as células B saudáveis ( $p=0,001$ ) (Figura 5). É importante notar que as amostras de LLC mostraram um padrão heterogêneo de expressão de *LSD1* e *LSD2*. Tendo em vista esse achado, nós dicotomizamos as amostras de LLC em baixa e alta expressão de *LSD1* e *LSD2* para prosseguir com os estudos de associação. Essa classificação foi baseada na mediana de expressão gênica das amostras, sendo pacientes com mediana  $<7,83$  e  $\geq 7,83$  identificados como baixa e alta expressão de *LSD1*, respectivamente. Do mesmo modo, as

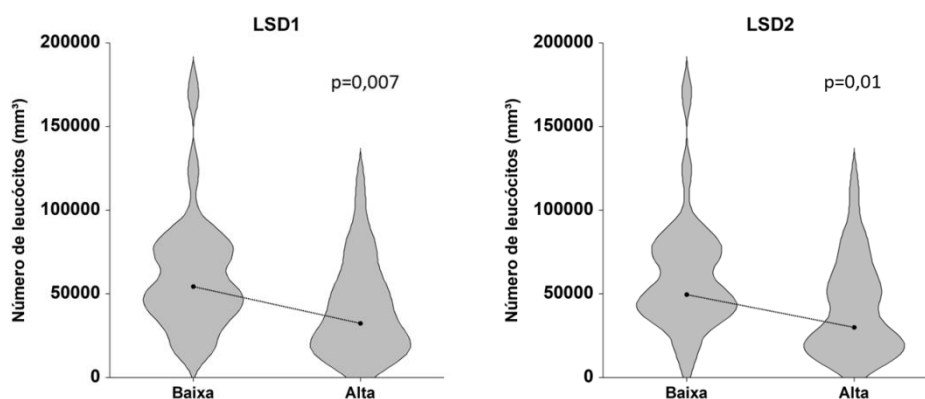
medianas de expressão  $<0,91$  e  $\geq 0,91$  permitiram a identificação dos pacientes com baixa e alta expressão do gene *LSD2*.



**Figura 5. Expressão dos genes *LSD1* e *LSD2* na LLC.** A expressão de *LSD1* e *LSD2* em amostras de LLC e controle (n=8) foi determinada por PCR em tempo Real. Os dados foram comparados pelo teste Mann Whitney. Os resultados são expressos em *Fold*. A linha plotada representa a mediana de expressão dos genes.

#### 4.3 A baixa expressão dos genes *LSD1* e *LSD2* está associada ao aumento do número de leucócitos na LLC.

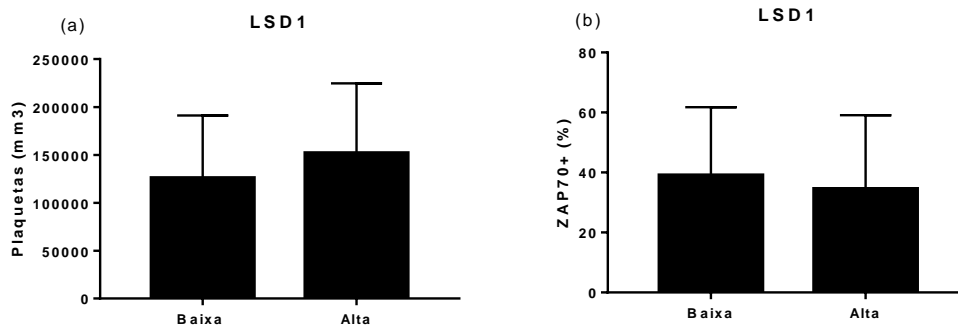
Os pacientes que apresentaram expressão diminuída dos genes *LSD1* e *LSD2* demonstraram um aumento no número de leucócitos ( $p= 0,007$  e  $p=0,01$ , respectivamente) (Figura 6).



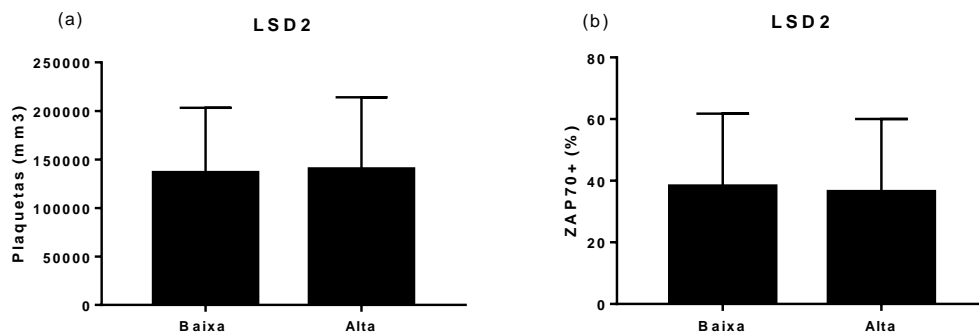
**Figura 6. Associação do impacto da expressão de *LSD1* e *LSD2* na leucometria de pacientes com LLC.** Os dados foram comparados pelo teste Mann Whitney. Os resultados são

expressos em número absoluto de leucócitos. A linha plotada une a mediana do número de leucócitos dos pacientes, conforme a expressão de *LSD1* e *LSD2*.

Avaliamos também se *LSD1* e *LSD2* poderiam exercer alguma influência sobre outros parâmetros laboratoriais e de impacto prognóstico, como número de plaquetas e expressão de ZAP-70. Não encontramos qualquer associação entre a expressão dessas desmetilases de histona e os parâmetros supracitados (Figuras 7 e 8).



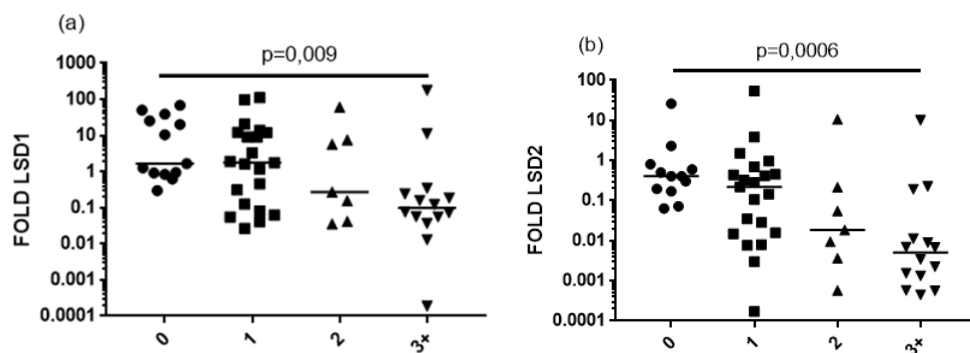
**Figura 7. Associação da expressão de *LSD1* com contagem de plaquetas (a), e expressão de ZAP-70 (b).** Os dados foram comparados pelo teste Mann Whitney. Os resultados são expressos em número absoluto de plaquetas (média  $\pm$  DP) e porcentagem de células ZAP-70 (média  $\pm$  DP).



**Figura 8. Associação da expressão de *LSD2* com contagem de plaquetas (a), e expressão de ZAP-70(b).** Os dados foram comparados pelo teste Mann Whitney. Os resultados são expressos em número absoluto de plaquetas (média  $\pm$  DP) e porcentagem de células ZAP-70 (média  $\pm$  DP).

#### 4.4 A expressão dos genes *LSD1* e *LSD2* está associada a alterações do cariótipo e pior prognóstico.

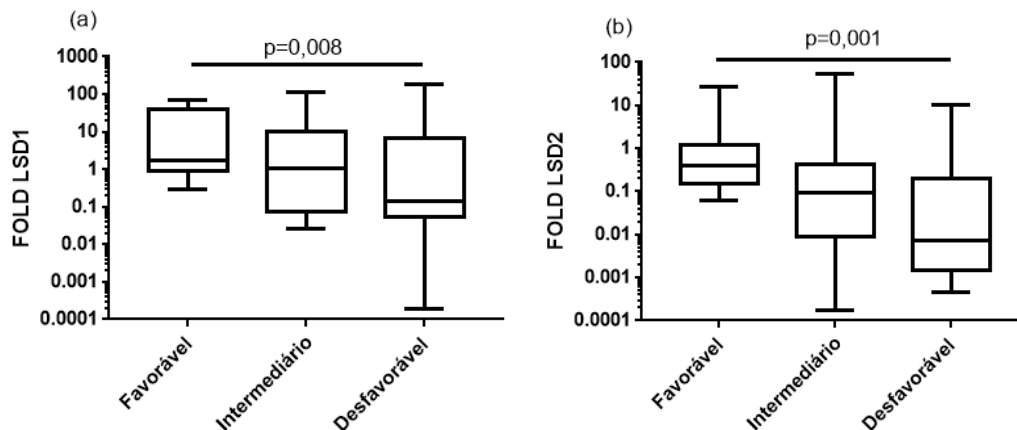
De modo a avaliar modificações citogenéticas e sua possível associação com a expressão dos genes alvos desse estudo, as amostras de LLC foram classificadas de acordo com o número de alterações cariotípicas em 0, 1, 2 e 3 ou mais alterações cromossômicas. É importante notar que os dois genes demonstraram estar relacionados com a presença de um cariótipo complexo. Foi observada expressão diminuída de *LSD1* nos pacientes de LLC que possuem um cariótipo com pelo menos 3 alterações cromossômicas, quando comparados com os indivíduos que não possuem alterações ( $p=0,009$ ) (Figura 9a). Do mesmo modo, as amostras de LLC com menor expressão de *LSD2*, tendem a apresentar cariótipo complexo, comparadas aos casos em que o cariótipo é íntegro ( $p= 0,0006$ ) (Figura 9b).



**Figura 9. Associação entre a expressão dos genes *LSD1*(a) e *LSD2*(b) e o número de alterações cromossômicas de pacientes com LLC. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis.**

Uma investigação adicional que realizamos foi considerar a classificação dos pacientes tendo em vista o resultado cariotípico favorável, intermediário e desfavorável (RIGOLIN et al., 2017; DOHNER et al., 2000). Observamos expressão reduzida de *LSD1* nos pacientes categorizados como intermediários e, de modo mais acentuado, em pacientes classificados no

grupo desfavorável ( $p=0,008$ ) (Figura 10a). Do mesmo modo, a expressão de *LSD2* tende a ser reduzida em pacientes do grupo desfavorável ( $p=0,001$ ) (Figura 10b).

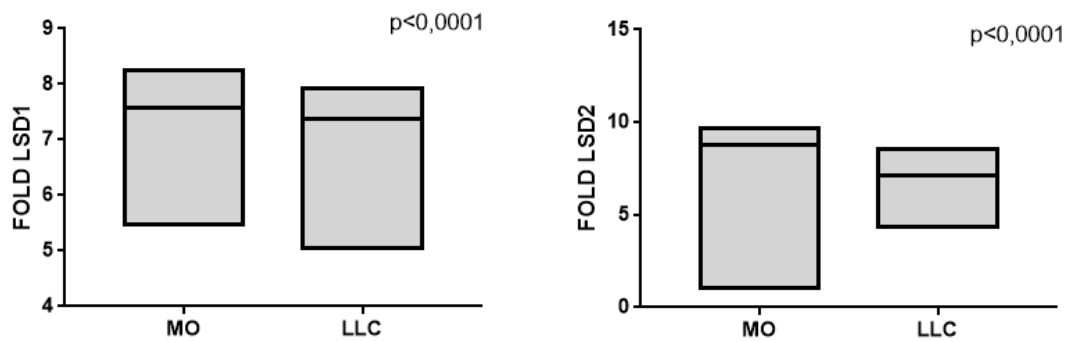


**Figura 10. Expressão dos genes *LSD1* (a) e *LSD2* (b) nas categorias de prognóstico.** O número de pacientes na categoria favorável é 15, 22 para o intermediário e 18 para desfavorável. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis.

#### 4.5 Análise *in silico* da expressão de *LSD1* e *LSD2* na LLC

Foi realizado também uma análise *in silico* da expressão dos genes *LSD1* e *LSD2* na LLC. Para essa análise nós utilizamos o Bloodspot, uma base de dados de expressão de mRNA de células hematopoiéticas saudáveis ou malignas. Dentre os grupos de amostras nós selecionamos os dados do estudo Leukemia MILE (LABAJ et al., 2017) para avaliar a expressão das desmetilases em questão e comparar com os achados deste trabalho.

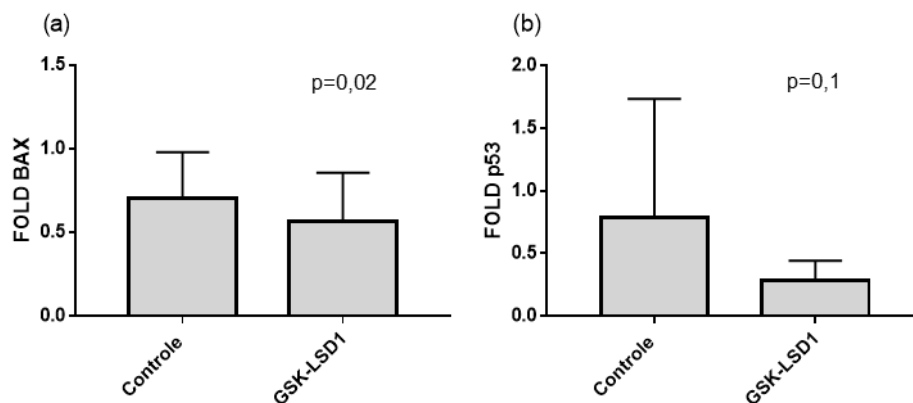
Foi observado que as amostras de LLC apresentaram expressão reduzida dos genes *LSD1* e *LSD2* ( $p<0,0001$ ), comparadas as amostras controle (Figura 11).



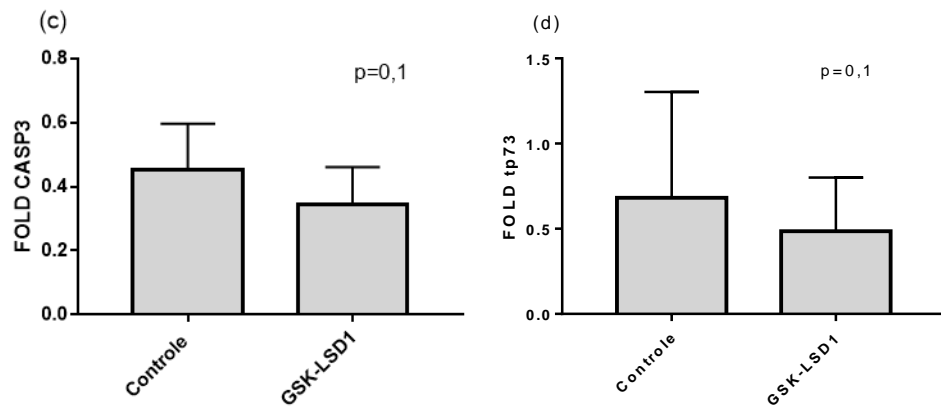
**Figura 11. Expressão dos genes *LSD1* e *LSD2* em amostras de pacientes com LLC e grupo controle provenientes do Bloodspot.** O grupo controle MO (médula óssea saudável) consiste de 73 amostras e o grupo LLC possui 448 amostras. Os dados foram comparados pelo teste Mann Whitney.

#### 4.6 Análise da expressão dos genes *BAX*, *p53*, *CASP3* e *TP73* em amostras tratadas com GSK-LSD1.

Como pode ser visto na Figura 12, o tratamento com GSK-LSD1 das amostras de LLC que apresentaram expressão elevada dos genes *LSD1* e *LSD2* induziu inibição do transcrito *BAX* ( $p=0,02$ ).







**Figura 12. Expressão dos genes *BAX*, *P53*, *CASP3* e *TP73*.** As amostras de LLC com expressão elevada de *LSD1* e *LSD2* foram tratadas com GSK-LSD1 e tiveram a expressão de *BAX*, *P53*, *CASP3* e *TP73* determinada por PCR em tempo real. Os dados foram comparados pelo teste t pareado.

## 5 Discussão

A LLC tem sido um dos campos de estudo mais dinâmicos na área da pesquisa oncohematológica nos últimos anos, considerando-se a heterogeneidade do seu curso clínico e os avanços no entendimento da sua patogênese que estão sendo alcançados pelo desenvolvimento de novas técnicas de pesquisa molecular (HALLEK, SHANAFELT, EICHHORST, 2018).

As modificações pós-traducionais por desmetilases de histonas possuem um papel fundamental na regulação de transcrição e expressão gênica e estão presentes em diversos tipos de câncer e outras doenças (KANISKAN, MARTINI, JIN, 2018). Em um trabalho prévio conduzido por nosso grupo, notamos que a baixa expressão dos genes da família *KDM4* estava associada ao pior prognóstico em pacientes com LLC (FILIÚ-BRAGA et al., 2019).

Desmetilases de lisina têm sido implicadas no processo de controle da expressão genética, como a regulação de substratos não-histonas como o DNMT1, p53 e STAT3 pela LSD1 (FANG, LIAO, YU, 2019). As proteínas LSD1 e LSD2 possuem estruturas e funções diferentes, no entanto ambas proteínas estão envolvidas no processo de regulação transcricional. Enquanto a LSD1 pode atuar como co-repressor ao se ligar com o complexo CoREST ou co-ativador ao se ligar com receptores de androgênio ou estrôgenio, a LSD2 parece ser importante para uma transcrição gênica ótima, já que a remoção de LSD2 endógeno promove um aumento nos níveis de H3K4me2 e um decréscimo em H3K9me2, o que resulta em uma regulação negativa da transcrição do gene alvo. É sugerida a possibilidade da associação da LSD2 com outros fatores como fatores de alongamento e RNA polimerase fosforilada para coordenação da dinâmica de metilação de H3K4 e H3K9 (FANG et al., 2010; PATEL et al., 2019).

Com relação ao gene *LSD2* nós encontramos sua expressão reduzida nas amostras de LLC, quando comparadas com os indivíduos saudáveis. Por outro lado, não encontramos diferença na expressão de *LSD1* ao comparar esses grupos. Entretanto, a baixa expressão tanto de *LSD1*, como *LSD2* se associou ao acúmulo de leucócitos e a alterações cariotípicas, especialmente de prognóstico adverso. A análise *in silico* realizada corrobora com os nossos achados em relação a expressão reduzida do gene *LSD2*, em relação as amostras do grupo controle. Por outro lado, enquanto a expressão de *LSD1* foi semelhante entre as amostras de LLC e controle por uso de PCR em tempo real, na base Bloodspot *LSD1* se mostrou mais expresso nas amostras controle obtidas da medula óssea de pacientes saudáveis. Pode ser que, em parte, essas diferenças ocorram pelos diferentes controles usados. Enquanto avaliamos a expressão dos genes em amostras de células B saudáveis, o controle explorado na análise *in silico* é representado por células de medula óssea, sem isolamento particular (LABAJ et al., 2017).

Ao contrário do que encontramos, tem sido reportado que *LSD1* encontra-se altamente expresso em diversos tipos de câncer como o de próstata (KAHL et al., 2006), mama (HUANG et al., 2012), esôfago (CHEN et al., 2011), bexiga (KAUFFMAN et al., 2011), pulmão (LV et al., 2012), neuroblastoma (SCHULTE et al., 2009) e, dentro das leucemias, na leucemia mieloide aguda como reportado por Magliulo, Bernardi, Messina, (2018) e Niebel et al., (2014). Entre os complexos em que o *LSD1* pode ser encontrado em associação, como o CoREST, há ainda o complexo NuRD (*Nucleosome Remodeling Deacetylase*) que de acordo com Wang, Zhang, Chen. (2018) está envolvido com a regulação da cascata de sinalização do TGF $\beta$ , que por sua vez possui um papel fundamental no crescimento e diferenciação celular. Em amostras não oncológicas, como demonstrado por Wang et al., (2018), a deleção do gene *LSD1* leva a uma expansão de células progenitoras e defeitos no desenvolvimento de linfócitos.

Levando em consideração a função fisiológica e o papel de LSD1 na oncogênese, existe um potencial terapêutico na inibição desse gene. No caso do câncer de mama, segundo Hosseini, Minucci. (2017) a inibição farmacológica ou por knockdown do *LSD1* regula negativamente diversos genes importantes na proliferação celular, controle do ciclo celular e tumorigênese como *E2F1*, *MKI67*, *CCNA2* e *CCNF*, resultando em inibição do crescimento das células cancerígenas do câncer de mama. Nesse aspecto, seria interessante validar o real impacto desse mecanismo sobre a LLC, tendo-se em vista que nessa leucemia a rigor não há proliferação celular acentuada em sangue periférico (FABBRI, 2011).

Como mencionado anteriormente, o gene *LSD1* se encontra hiperexpresso em vários casos de câncer e essa elevação pode estar associada a uma inibição da diferenciação celular. A atuação do LSD1 pode prevenir o acúmulo dos grupos dimetil de p53, inibindo a sua promoção transcricional, impedindo a apoptose e contribuindo para a carcinogênese através desse mecanismo de modificação da cromatina (WU et al., 2015). Esse papel antagonista ao p53 pode ser uma das explicações para o potencial oncogênico observado do LSD1.

O gene *LSD1* foi descrito como um importante fator hematopoiético para a diferenciação e proliferação de células eritrocitárias, megacariocíticas e células B (HAINES et al., 2018). Ademais, ele também possui ação sobre a segregação dos cromossomos como demonstrado por Shuang et al. (2009). A importância da mitose e meiose está na constância numérica dos cromossomos garantindo a integridade genômica, portanto, distúrbios cromossômicos constituem uma importante categoria de doenças genéticas e são responsáveis por uma grande proporção de todas as perdas reprodutivas, malformações congênitas e desempenham um papel importante na patogênese de neoplasias. Esses distúrbios se dão através de alterações cromossômicas numéricas ou estruturais. Entre as modificações numéricas temos a segregação cromossômica anormal, que consiste na não-disjunção meiótica ou mitótica (NUSSBAUM, MCINNES, WILLARD, 2008; OLIVEIRA et al., 2015). É importante destacar

que a inibição de *LSD1* leva ao desalinhamento cromossômico e atraso da divisão celular, o que poderia, em parte, corroborar com os nossos resultados, em que a baixa expressão desse gene está claramente associada à aquisição de alterações cromossômicas. Nesse contexto, Kim, Singh, Takata. (2015) demonstraram que a diminuição da expressão de *LSD1* promoveu efeitos deletérios em camundongos. Esses autores mostraram que após inibição de *LSD1*, os oócitos também apresentaram defeito no alinhamento e segregação cromossômica. Eles reportaram ainda que a depleção de *LSD1* nos oócitos resultou em aumento considerável dos níveis de H3K4me2 e de acetilação de histonas culminando em uma cromatina exposta, o que pode contribuir para o aumento de dano genético.

Estudos mostraram que a deleção do *LSD1* afeta o desenvolvimento de eritrócitos e granulócitos, mas não de monócitos, o que sugere que a função de *LSD1* pode ser linhagem-específica (VAN BERGEN, REIIDEN, 2019). Ao se tratar de células B especificamente, o *knockdown* desse gene causa uma diminuição na proliferação e diferenciação não relacionada à morte celular e uma redução, também, da expressão de genes associados ao ciclo celular (HAINES, 2018). Já em um modelo murino de leucemia de linhagem mista estudado por Harris, Huang, Lynch (2012) a supressão de *LSD1* apresentou altas taxas apoptóticas e diminuída leucemogênese, mantendo em perspectiva a possibilidade de utilização de inibidores como terapia.

O *LSD2* compartilha sua função de desmetilase com o seu homólogo *LSD1*, mas enquanto o *LSD1* se localiza em sua maioria nas regiões promotoras, o *LSD2* se encontra em regiões codantes já transcritas. Na literatura é possível observar também uma correlação entre a hiperexpressão desse gene e outros tipos de câncer como nos estudos de Cao LL. et al., (2018) e Cao Y. et al (2018), que avaliaram a expressão do *LSD2* nos tecidos de adenocarcinoma colorretal e câncer de pulmão de pequenas células, respectivamente. Nessas pesquisas o *LSD2* se apresentou com elevada expressão nos tumores. Por outro lado, assim como demonstrado

por nós neste estudo, tem sido reportado que o gene *LSD2* possui expressão reduzida em leucemias e em algumas classes de câncer de mama ER-negativos (FANG et al. 2010). Tem sido reportado também que a expressão de *LSD2* está elevada em câncer de mama, levando ao aumento da proliferação celular, assim como ocorre com o *LSD1*, porém essas células malignas apresentam capacidade de invasão reduzida (CHEN et al., 2017).

Apesar do mecanismo exato pelo qual o *LSD2* regula a metilação do DNA nas células cancerígenas do câncer de mama não ser esclarecido, foi encontrada expressão elevada de DNMT3B como resultado do aumento dos níveis de *LSD2*, sendo que o DNMT3B é um modificador epigenético que promove metilação do DNA e silenciamento genético no câncer. Tem sido especulado que a partir da hiperexpressão do *LSD2*, os níveis de H3K4me2 seriam diminuídos, o que geraria um ambiente favorável para o recrutamento de DNMT, permitindo sua atividade de repressão transcricional (HUANG et al., 2018). Corroborando com essas informações, Cao Y. et al., (2018), relatam que a influência na proliferação celular por parte do gene *LSD2* se dá pela regulação indireta da expressão do gene supressor de tumor TFPI-2. Proteínas associadas ao *LSD2* apresentam várias funcionalidades, incluindo replicação e reparo do DNA, remodelamento de nucleossomo e modificação de histona e transcrição gênica, o que sugere que o *LSD2* pode estar envolvido em várias funções celulares (FANG et al., 2010). O *LSD2* é encontrado hiperexpresso também no sarcoma de Ewing e a análise transcricional após um *knockdown* do gene revelou um papel modulador de genes reguladores metabólicos, além de notadamente diminuir a transformação oncogênica (PATEL et al., 2019).

Não há uma definição na literatura quanto a categorização do gene *LSD2* como um oncogene ou supressor tumoral. Enquanto Katz et al., (2014) sugere um papel oncogênico para essa enzima, com base em estudos em modelos de câncer de mama, Yang et al., (2015) reporta que *LSD2* atua como um supressor tumoral em câncer de pulmão.

Eventos epigenéticos podem estar associados a uma expressão adequada de genes envolvidos na meiose, um ciclo especializado realizado por células gaméticas, garantindo a integridade cromossômica e progressão meiótica (KOTA, FEIL, 2010). LSD2 também apresenta atividade no oócito, como determinado por Ciccone, Su, Hevi, (2009), e sua deficiência aumenta os níveis de H3K4me2 de maneira semelhante ao seu homólogo LSD1. Ademais, nesse mesmo estudo, esse gene parece regular o *imprinting* genômico nos oócitos de camundongos, sendo que embriões derivados de gametas deficientes de LSD2, mostraram falha na metilação de genes que sofrem *imprint*, ocasionando morte gestacional. A partir desses dados podemos inferir que a baixa expressão de LSD2 também pode estar associada a um aumento nos defeitos cromossômicos, o que corrobora com nossos achados, em que a baixa expressão desse gene se associou à aquisição de anormalidades cromossômicas.

Em nosso trabalho, identificamos que a inibição de LSD1 por tratamento das células leucêmicas com GSK-LSD1 promoveu inibição na expressão de BAX, o que, pelo menos em parte, poderia explicar o acúmulo de células malignas identificado entre os pacientes que possuem menor nível transcricional desse gene. Outro aspecto que deve ser notado, é que a maior sobrevivência dessas células pode favorecer a ocorrência de mais mutações (LIU et al., 2016). Vale enfatizar que a inibição de LSD1 promoveu redução nos níveis transcricionais de CAPS3 em 3 dos 4 pacientes avaliados. Muito provavelmente esse achado não tenha resultado em diferenças estatisticamente significativas devido a limitação do nosso número de casos para esse ensaio. Uma limitação importante do nosso estudo é que as células primárias de pacientes com LLC são notoriamente difíceis de se manter em cultura sem a presença de uma célula estromal para suporte. Como descrito por Panayiotidis et al., (1996) as células leucêmicas da maioria dos casos de LLC morrem rapidamente *in vitro* por apoptose. Portanto, não podemos descartar que os achados do nosso ensaio funcional de inibição de LSD1 não tenham sofrido algum impacto decorrente da cultura celular direta das células de LLC.

Com base nos nossos achados, acreditamos que os genes *LSD1* e *LSD2* podem ter um papel de gene supressor tumoral na LLC, sendo que a baixa expressão desses genes foi associada ao acúmulo de células malignas. Entretanto, estudos adicionais são necessários para descrever molecularmente como essas enzimas atuam para promover a sobrevivência das células leucêmicas e também por quais mecanismos elas poderiam impactar na instabilidade genômica detectada neste estudo. Vale ressaltar que este trabalho é o primeiro a avaliar a expressão de *LSD1* e *LSD2* e correlacioná-la com fatores prognósticos da LLC.



## **6 Conclusão**

Neste trabalho demonstramos que a expressão dos genes *LSD1* e *LSD2* está associada a marcadores prognósticos importantes na LLC, sendo que menor expressão desses transcritos se relaciona ao acúmulo de células malignas, à presença de padrão cariotípico preditivo de mau prognóstico e à aquisição de cariótipo complexo.

## 7 Referências

- AMENTE, F; LANIA. L; MAJELLO, B. The histone LSD1 demethylase in stemness and cancer transcription programs. *5*. v. 1829, n. 10, p, 981-986. 2013
- AUTORE, F.; STRATI, P; LAURENTI, L; FERRAJOLI, A. Morphological, immunophenotypic, and genetic features of chronic lymphocytic leukemia with trisomy 12: a comprehensive review. **Haematologica**. v. 103, n. 6, p. 931–938. 2018.
- BAGGER, F. O; KINALIS, S; RAPIN. N, et al. BloodSpot: a database of healthy and malignant haematopoiesis updated with purified and single cell mRNA sequencing profiles, **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 1, p. 225-241. 2019.
- BINET, J. L; et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. **Cancer**. v. 48, p. 198–206. 1981.
- BIASINI, M; BIENERT, S; WATERHOUSE, A; et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Res**. p. 252-8. 2014.
- BURGER, J. A; GHIA, P; ROSENWALD, A; et al., The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. **Blood**, v. 114, p. 3367-3375, 2009.
- BURGER, J. A; QUIROGA, M. P; HARTMANN, A. et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. **Blood**. v. 113, p. 3050-3058. 2009.
- BURKLE, M; NIEDERMEIER, M; SCHMITT-GRAFF, A; et al. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 110, p. 3316-3325, 2007.

- CAMPO, E. et al. TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics. **Haematologica**, [s. l.], v. 103, n. 12, p. 1956–1968, 2018.
- CAO, L. L; DU, C; LIU, H; et al. Lysine-specific demethylase 2A expression is associated with cell growth and cyclin D1 expression in colorectal adenocarcinoma. **The International Journal of Biological Markers**, v. 33, n. 4, p. 407–414. 2018.
- CAO, Y; GUO, C; YIN, Y; et al. Lysine-specific demethylase 2 contributes to the proliferation of small cell lung cancer by regulating the expression of TFPI-2. **Molecular medicine reports**, v. 18, n. 1, p. 733–740. 2018.
- CHEN, L; VASILATOS, S. N; QIN, Y; et al. Functional characterization of lysine-specific demethylase 2 (LSD2/KDM1B) in breast cancer progression. **Oncotarget**, v. 8, n. 47, p. 81737–81753. 2017.
- CHEN, L; WIDHOPF, G; HUYNH, L; et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**. v. 100, n. 13, p. 4609-14. 2002.
- CHEN, C; ZHAO, M; YIN, N. et al. Abnormal histone acetylation and methylation levels in esophageal squamous cell carcinomas. **Cancer Investig**. v. 29, n. 8, p. 548–556. 2011.
- CICCONE, D. N; SU, H; HEVI. S, et al.. KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. **Nature**, v. 461, n. 7262, p. 415–418. 2009.
- DAL PORTO, J. M; GAULD, S. B; MERRELL, K. T., et al. B cell antigen receptor signaling 101. **Mol. Immunol**. v. 41, n. 6-7, p. 599–613. 2004.
- DERVEAUX, S; VANDESOMPELE, J; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression. Analysis using real-time PCR. **Methods**. v. 50, n. 4, p. 227-30. 2010.

- DEGUINE, J; BARTON, G; M. MyD88: a central player in innate immune signaling. **F1000Prime Rep.**; v. 6, n. 97. 2014.
- DIMITROVA, E; TUBERFIELD, A. H; KLOSE, R. J. Histone demethylases in chromatin biology and beyond. **EMBO reports**, v. 16, n. 12, p. 1620–1639. 2015.
- DOHNER, H; STILGENBAUER, S; BENNER, A; LEUPOLT, E; KROBER, A; BULLINGER, L., et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med.** v. 343, p. 1910–6. 2000.
- DUHREN-VON MINDEN, M; UBELHART, R; SCHNEIDER, D. WOSSNING, T., et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. **Nature**; v. 489, n. 7415. p. 309-12. 2012.
- FABBRI, G., et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. **J. Exp. Med.**; v. 208, p. 1389–1401. 2011
- FANG, R; BARBERA, A. J; XU, Y; et al. Human LSD2/KDM1b/AOF1 regulates gene transcription by modulating intragenic H3K4me2 methylation. **Molecular cell**, v. 39, n. 2, p. 222–233. 2010.
- FANG, Y; LIAO, G; YU, B. LSD1/KDM1A inhibitors in clinical trials: advances and prospects. **Journal of hematology & oncology**, v. 12, n. 1, p. 129. 2019.
- FILIÚ- BRAGA, L. D. C; SEREJO, T. R. T; LUCENA-ARAÚJO, A. R; NEVES. F. A. R; DE CARVALHO, J. L; REGO, E. M; SALDANHA-ARAÚJO, F. Unraveling KDM4 histone demethylase expression and its association with adverse cytogenetic findings in chronic lymphocytic leukemia. **Med Oncol.** v. 36, n. 1, p. 3. 2018
- FRENZEL, L. P; REINHARDT, H. C; PALLASCH, C. P. Concepts of Chronic Lymphocytic Leukemia Pathogenesis: DNA Damage Response and Tumor Microenvironment. **Oncology research and treatment**, v. 39, n. 1-2, p. 9–16 2016.

- GOMES, L. C.; EVANGELISTA, F. C. G.; DE SOUSA, L. P. et al. Prognosis biomarkers evaluation in chronic lymphocytic leukemia. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, 2017.
- GU, F; LIN, YI; WANG, Z. et al. Biological roles of LSD1 beyond its demethylase activity. **Cell. Mol. Life Sci.** 2020.
- HAINES, R. R; BARWICK, B. G; SCHARER, C. D, et al. The Histone Demethylase LSD1 Regulates B Cell Proliferation and Plasmablast Differentiation. **Journal of immunology**. v. 201, n. 9, p. 2799–2811. 2018.
- HALLEK, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. **American Journal of Hematology**. v. 94, n. 1 p. 1266–87. 2020.
- HALLEK, M; SHANAFELT, T. D., EICHHORST, B. Chronic lymphocytic leukaemia. **The Lancet**, v. 391, n. 1012 p. 1524–1537. 2018.
- HAMBLIN, T. J; DAVIS Z; GARDINER, A; OSCIER, D.G; STEVENSON, F. K. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. **Blood**. v. 94: p. 1848–1854. 1999.
- HARRIS, W. J; HUANG, X; LYNCH, J. T., et al. The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. **Cancer Cell**. v. 21, n. 4, p. 473-87. 2019.
- HARTMAN, W. R; PELLEYMOUNTERM, L. L; MOON, I., et al. CD38 expression, function, and gene resequencing in a human lymphoblastoid cell line-based model system. **Leukemia & lymphoma**, v. 51, n. 7, p. 1315–1325. 2010.
- HAYWARD, D; COLE, P. A. LSD1 Histone Demethylase Assays and Inhibition. **Methods in enzymology**, v. 573, p. 261–278. 2016.

- HERISHANU, Y; PÉREZ-GALÁN, P; LIU, D., et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappa B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**. v. 117, n. 2, p. 563–574. 2011.
- HOSSEINI, A; MINUCCI, S. A comprehensive review of lysine-specific demethylase 1 and its roles in cancer. **Epigenomics**, v. 9, n. 8, p. 1123–1142.
- HOWLANDER, N; NOONE, A. M; KRAPCHO, M; MILLER, D; BREST, A; YU, M; RUHL, J; TATALOVICH, Z; MARIOTTO, A; LEWIS, D. R; CHEN. H. S; FEUER E. J; CRONIN, K. A. **SEER Cancer Statistics Review**, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2016/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/), based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site. 2019.
- HUANG, Y; YIN, Y; SUN, M., et al. Targeting LSD2 in breast cancer. **Aging**, v. 10, n. 1, p. 11–12. 2018.
- HUANG, Y; VASILATOS, S. N; BORIC, L., et al. Inhibitors of histone demethylation and histone deacetylation cooperate in regulating gene expression and inhibiting growth in human breast cancer cells. **Breast Cancer Res. Treat.** v. 131, n. 3, p. 777–789. 2012.
- IGNEY, F. H; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews. Cancer*. v. 2, n. 4, p. 277–288. 2002.
- KAHL, P; GULLOTTI, L; HEUKAMP, L. C., et al. Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. **Cancer Res**. v. 66, n. 23, p. 11341–11347. 2006.
- KANISKAN, H. Ü; MARTINI, M. L; JIN. J. Inhibitors of Protein Methyltransferases and Demethylases. **Chemical reviews**. v. 118, n. 3, p. 989–1068. 2018.

- KATZ, T. A; VASILATOS, S. N; HARRINGTON, E., et al. Inhibition of histone demethylase, LSD2 (KDM1B), attenuates DNA methylation and increases sensitivity to DNMT inhibitor-induced apoptosis in breast cancer cells. **Breast cancer research and treatment.** v. 146, p. 99-108. 2014.
- KAUFFMAN, E. C; ROBINSON, B. D; DOWNES, M. J., et al. Role of androgen receptor and associated lysine-demethylase coregulators, LSD1 and JMJD2A, in localized and advanced human bladder cancer. **Molecular carcinogenesis.** v. 50, n. 12, p. 931–944. 2011.
- KUROSAKI, T; SHINOHARA. H, BABA, Y. B cell signaling and fate decision. **Annu. Rev. Immunol.** v. 28, p. 21–55. 2010.
- KIM, J; SINGH, A. K; TAKATA, Y., et al. LSD1 is essential for oocyte meiotic progression by regulating CDC25B expression in mice. **Nature communications,** v. 6, p. 10116. 2015.
- KOTA, S. K; FEIL, R. Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. **Dev Cell,** v. 19, n. 5, p. 675-86. 2010.
- KOZUB, M. M; CARR, R. M; LOMBERK, G. L. LSD1, a double-edged sword, confers dynamic chromatin regulation but commonly promotes aberrant cell growth. **F1000Research.** v. 6. 2017.
- KIPPS, T. J; STEVENSON, F. K; WU, C. J., et al. Chronic lymphocytic leukaemia. **Nature reviews. Disease primers.** 2017.
- KUSCH, T. Histone H3 lysine 4 methylation revisited. **Transcription.** v. 3, n. 6, p. 310–314. 2012.
- LABAJ, W; PAPIEZ, A; POLANSKI, A., et al. Comprehensive Analysis of MILE Gene Expression Data Set Advances Discovery of Leukaemia Type and Subtype

- Biomarkers. **Interdisciplinary sciences, computational life sciences**. v. 9, n.1, p. 24–35. 2017
- LI, L; DONG, M; WANG, X. G. The Implication and Significance of Beta 2 Microglobulin: A Conservative Multifunctional Regulator. **Chinese medical journal**, v. 129, n. 4, p. 448–455. 2016.
  - LIU, X; LIU, H; LI, J., et al. Role of epigenetic in leukemia: From mechanism to therapy. **Chemico-Biological Interactions**. 2020.
  - LIU, Z; DING, Y; YE, N; WILD, C; CHEN, H; ZHOU, J. Direct Activation of Bax Protein for Cancer Therapy. **Medicinal research reviews**. v. 36, n. 2, p. 313–341. 2016.
  - LIVAK, K. J; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** (San Diego, Calif.). v. 25, n. 4, p. 402–408. 2001.
  - LV, T; YUAN, D; MIAO, X., et al. Over-expression of LSD1 promotes proliferation, migration and invasion in non-smallcell lung cancer. **PLoS ONE**.v. 7, n. 4. 2012.
  - MAES, M. E; SCHLAMP, C. L; NICKELLS, R. W. BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells. **Prog Retin Eye Res**. v. 57, p. 1-25. 2017.
  - MAIQUES- DIAZ, A; SOMERVAILLE, T. C. LSD1: biologic roles and therapeutic targeting. **Epigenomics**, v. 8, n. 8, p. 1103–1116. 2016.
  - MAGLIULO, D; BERNARDI, R; MESSINA, S. Lysine-Specific Demethylase 1A as a Promising Target in Acute Myeloid Leukemia. **Frontiers in oncology**, v. 8, p. 255. 2018.
  - MOLICA, S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. **Leukemia & Lymphoma**, v. 47, n.8, p. 1477–1480. 2006.



- MANOOCHEHRI, M; KARBASI, A; BANDEHPOUR, M; KAZEMI, B. Down-regulation of BAX gene during carcinogenesis and acquisition of resistance to 5-FU in colorectal cancer. **Pathology oncology research**. v. 20, n. 2, p. 301–307. 2014.
- MUÑOZ-NOVAS. C.; POZA-SANTAELLA, M; GONZÁLEZ-GASCÓN, Y., et al. The International Prognostic Index for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Has the Higher Value in Predicting Overall Outcome Compared with the Barcelona-Brno Biomarkers Only Prognostic Model and the MD Anderson Cancer Center Prognostic Index. **BioMed research international**. 2018.
- NIEBEL, D; KIRFEL, J; JANZEN, V; et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) in hematopoietic and lymphoid neoplasms. **Blood**. v. 3124, n. 1, p. 151-2. 2014.
- NIWA, H; UMEHARA, T. Structural insight into inhibitors of flavin adenine dinucleotide-dependent lysine demethylases. **Epigenetics**. v. 12. p. 00-00. 2017.
- NUSSBAUM, R. L; MCINNES, R. R; WILLARD, H. F. Thompson & Thompson – Genética Médica. Sétima Edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, p. 525. 2008.
- OLIVEIRA, K.,et al. Prevalence of the polymorphism MTHFR A1298C and not MTHFR C677T is related to chromosomal aneuploidy in Brazilian Turner Syndrome patients. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n. 8, p. 1374-1381. 2008.
- PANAYIOTIDIS, P; JONES, D; GANESHAGURU, K; FORONI, L; HOFFBRAND, A. V. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. **British journal of haematology**. v. 92, n. 1, p. 97–103. 1996.
- PARIKH, S. A. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2018. **Blood cancer journal**, v. 8, n. 10, p. 93. 2018.

- PARK, et al. Merkel cell polyomavirus activates LSD1-mediated blockade of non-canonical BAF to regulate transformation and tumorigenesis. **Nature cell biology**. v. 22, n. 5, p. 603–615. 2020.
- PATEL, P. O; PISHAS, K. I; TASLIM, C; et al. Investigating the role of LSD2 as an epigenetic regulator in Ewing sarcoma. **Oncotarget**, v. 10, n. 39, p. 3865–3878. 2019.
- RAI, K. R.; SAWITSKY, A.; CRONKITE, E. P.; et al. Clinical staging of chronic 61 lymphocytic leukemia. **Blood**. v. 46, n. 2, p. 219-234, 1975.
- PEREGO, P; GIAROLA, M; RIGHETTI, S. C; SUPINO, R; CASERINI. C; DELIA. D; PIEROTTI, M. A; MIYASHITA, T; REED, J. C; ZUNINO, F. Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. **Cancer research**. v. 56, n. 3, p. 556–562. 1996.
- RIGOLIN, G. M; CAVALLARI, M; QUAGLIA, F. M; FORMIGARO, L; LISTA, E; URSO, A. et al. In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. **Blood**. v. 129, p. 3495–8. 2017.
- RIZZO, R; AUDRITO, V; VACCA, P; et al. HLA-G is a component of the chronic lymphocytic leukemia escape repertoire to generate immune suppression: impact of the HLA-G 14 base pair (rs66554220) polymorphism. **Haematologica**, v. 99, p. 888-896. 2014.
- RODRIGUES, C. A., et al. Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations from the Brazilian Group of Chronic Lymphocytic Leukemia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 346-357, Dec. 2016.
- RUAN, J; HYJEK, P; KERMANI, P., et al. Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. **Clin. Cancer Res**. v. 12, p. 5622-5631. 2006.

- SCHULTE, J. H; LIM, S; SCHRAMM, A., et al. Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. **Cancer Res.** v. 69, p. 2065–2071. 2009.
- SHUANG, L; WENJUAN, B; HONG, J. LSD1 is required for chromosome segregation during mitosis. **Eur J Cell Biol.**; v. 89, n. 7, p. 557-63. 2010.
- SIVINA, M; KREITMAN. R. J, ARONS. E., et al. The bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) blocks hairy cell leukaemia survival, proliferation and B cell receptor signalling: a new therapeutic approach. **British journal of haematology.** v. 166, n. 2, p. 177–188. 2014.
- SUZUKI, M; YOULE, R. J; TJANDRA, N. Structure of Bax. **Cell**, v. 103, n. 4, p. 645–654. 2000.
- SWERDLOW, S. H; CAMPO, E; PILERI, S. A., et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2375–2390. 2016.
- TEN HACKEN, E; BURGER, J. A. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.** v. 1863, n. 3, p. 401–413. 2016.
- VAN BERGEN. M, VAN DER REIJDEN. B. A. Targeting the GFI1/1B-CoREST Complex in Acute Myeloid Leukemia. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 1027. 2019.
- VUCICEVIC, K; JAKOVLJEVIC, V; COLOVIC, N; TOSIC, N; KOSTIC, T; GLUMAC, I; PAVLOVIC, S; KARAN- DJURASEVIC, T; COLOVIC, M. TVucicevic, K., Jakovljevic, V., Colovic, N., Tosic, N., Kostic, T., Glumac, I., Pavlovic, S., Karan-Djurasevic, T., & Colovic, M. Association of *Bax* Expression and *Bcl2/Bax*

Ratio with Clinical and Molecular Prognostic Markers in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Journal of medical biochemistry**, v. 35, n. 2, p. 150–157. 2016.

- WANG. L., et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. **N. Engl. J. Med.** v. 365, p. 2497–2506. 2011.
- WANG, L., et al. Somatic mutation as a mechanism of Wnt/beta-catenin pathway activation in CLL. **Blood.** v. 124, p. 1089–1098. 2014.
- WANG, H; KADLECEK, T. A; AU-YEUNG, B. B; et al. ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 5. 2010.
- WANG, Y; SUN, L; LUO, Y., et al. Knockdown of KDM1B inhibits cell proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells 2019. **Pathology - Research and Practice.** v. 215, n. 5, p. 1054-1060. 2019.
- WANG. J, SAIJO. K, SKOLA. D, et al. Histone demethylase LSD1 regulates hematopoietic stem cells homeostasis and protects from death by endotoxic shock. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 2, p. 244–252. 2018.
- WANG. Y, ZHANG. H, CHEN. Y. LSD 1 is a subunit of the NuRD Complex and targets the metastasis programs in breast cancer. **Cell.** v. 138, n. 4, p. 660-72. 2009.
- WEAVER, T. M; MORRISON, E. A; MUSSELMAN, C. A. Reading More than Histones: The Prevalence of Nucleic Acid Binding among Reader Domains. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2614. 2018.
- WU, J; HU, L; DU, Y., et al. Prognostic role of LSD1 in various cancers: evidence from a meta-analysis. **OncoTargets and therapy.** v. 8, p. 2565–2570. 2015.
- YAMAMOTO, M; FIGUEIREDO, VERA, L. P. Epidemiologia da leucemia linfocítica crônica e leucemia linfocítica crônica familiar. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 27, n. 4, p. 229-232. 2005.

- YANG, M; GOCKE, C. B; LUO, X; et al. Structural basis for CoREST-dependent demethylation of nucleosomes by the human LSD1 histone demethylase. **Mol. Cell**, v. 23, p. 377-387. 2006.
- YANG, Y; YIN, X; YANG, H., et al. Histone demethylase LSD2 acts as an E3 ubiquitin ligase and inhibits cancer cell growth through promoting proteasomal degradation of OGT. **Mol Cell**. v. 58, p. 47-59. 2015.
- ZAGO, M. A; FALCÃO, R. P; PASQUINI, R. **Tratado de hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013.
- ZHANG, Q; QI, S; XU, M; et al. Structure-function analysis reveals a novel mechanism for regulation of histone demethylase LSD2/AOF1/KDM1b. **Cell research**, v. 23, n. 2, p. 225–241. 2013.