



Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**EFEITO ANTICÂNCER PROMOVIDO PELA INIBIÇÃO DE
EHMT1/EHMT2 EM LINHAGENS DE MELANOMA E CÂNCER
DE PULMÃO**

Luma Dayane de Carvalho Filiú Braga

Orientador:

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

Brasília
2023

**EFEITO ANTICÂNCER PROMOVIDO PELA INIBIÇÃO DE EHMT1/EHMT2
EM LINHAGENS DE MELANOMA E CÂNCER DE PULMÃO**

Luma Dayane de Carvalho Filiú Braga

Orientador:

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

Brasília

2023

Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Luma Dayane de Carvalho Filiú Braga

**EFEITO ANTICÂNCER PROMOVIDO PELA INIBIÇÃO DE EHMT1/EHMT2
EM LINHAGENS DE MELANOMA E CÂNCER DE PULMÃO**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós- Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade de Brasília,
como requisito parcial à obtenção do título
de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

Brasília
2023

Luma Dayane de Carvalho Filiú Braga

**EFEITO ANTICÂNCER PROMOVIDO PELA INIBIÇÃO DE
EHMT1/EHMT2 EM LINHAGENS DE MELANOMA E CÂNCER
DE PULMÃO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovação ____ de _____ de 2023.

Banca Examinadora

Presidente - Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araujo, Universidade de Brasília.

Membro externo 1 - Dra. Bruna Cândido Guido, Hospital da Criança de Brasília.

Membro externo 2 - Prof. Dr. Robert Edward Pogue, Universidade Católica de Brasília.

Membro interno - Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende, Universidade de Brasília.

Suplente - Profa. Dra. Djane Braz Duarte, Universidade de Brasília.

Brasília

2023

“Somos feitos da mesma matéria que nossos sonhos.”

William Shakespeare

DEDICATÓRIA

Eu dedico este trabalho à minha família. Aos meus familiares que partiram, o meu amado pai Vinícius, à minha vó Arlete e ao meu vô Gerson. Aos que estão trilhando a caminhada da vida, minha amada mãe Hercília Daniella, minha irmã Yasminn, meu irmão Tarek, meu sobrinho Miguel, minha bisavó Epifânia, minha vó Braulina, meu marido Mikael e à minha filha Mallu. Eu dedico a vocês estes anos de dedicação, ausência e esforço. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente, por ter me dado forças e me mantido perseverante mesmo em meio a tantos obstáculos ao longo desse período e perdas irreparáveis, como meu avô Gerson (2019), minha avó Arlete (2020) e meu amado pai Vinícius (2021). Obrigada por me permitir finalizar mais um ciclo da minha vida.

Aos meus pais, sou grata pelo imenso amor, por me incentivarem, pelos ensinamentos, por acreditarem no meu potencial, por sempre mostrarem que a honestidade e humildade são essenciais para alcançar qualquer coisa na vida. Ao meu pai, onde estiver, saiba que sempre levarei o seu amor, suas lembranças e humildade, sempre o guardarei no meu coração. À minha mãe, por continuamente estar ao meu lado, sempre me encher com seu carinho, força e me incentivar a não desistir jamais dos meus sonhos. Aos meus irmãos, agradeço à Yasminn e ao Tarek pela cumplicidade, amizade, irmandade e pela infância compartilhada ao lado de vocês. Além disso, Yasminn e mãe, agradeço por terem sido em vários momentos, uma mãe para minha filha.

À minha filha Mallu, por me fazer amadurecer, ensinar-me o que é amor incondicional e que a vida é uma grande dádiva, mesmo cheia de adversidades. Ao meu marido Mikael, pela compreensão e apoio em tantos momentos difíceis, por muitas vezes exercer o papel de mãe e pai ao longo desta jornada árdua, em criar e cuidar da nossa filha.

Aos meus amigos por me apoiarem, aconselharem e me ajudarem emocionalmente em momentos tão difíceis. À Maíra Nunes, que mesmo distante sempre esteve pronta a me ajudar e oferecer o seu ombro amigo. À Louise Garcia, manteve-se por perto e paciente no meu processo de luto. Amandda Évelin e Marielly Resende,

amigas e companheiras de laboratório, agradeço imensamente por me ensinarem cultivo celular e citometria de fluxo, terem me auxiliado em diversos experimentos e em tantos outros momentos, tanto pessoal como profissionalmente. Agradeço aos colegas e amigos que fiz na UnB, como na graduação e na pós, assim como nos laboratórios que passei, Farmol e LHCT, que me ajudaram de alguma forma nesta trajetória, gostaria de destacar a Raquel Serejo, Karla Braz, Laise Ananias, Natália Ioseph, Gabriela Muller, Daniel Freitas, Fernanda Lins, Naomi Souza, Isabella Mota e Elizabete. Admiro vocês!

Sou grata ao meu chefe, Dr. Cláudio Corrêa, por toda a sua paciência, humildade e cordialidade. Aos meus colegas e amigos de trabalho da Parasitologia/Urinálise do laboratório Sabin, em particular a Mayra Lúcia e Sâmara Akkari.

Agradeço a parceria com o laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília, onde eu executei a maior parte dos experimentos, agradeço à Rilva, aos colegas de laboratório, como o Manu, Natália, Ana, Henrique e Alessandra. Aos professores, a Fátima, Angélica, Flora, Djane, Carine, Simeoni, Guilherme e em especial ao Prof. Francisco de Assis.

Gostaria de agradecer aos Professores Diego Madureira e Juliana Lott por ceder as linhagens para realização deste trabalho. Além do Coordenador do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, o Professor Guilherme Gelfuso por me ajudar nos trâmites finais do doutorado.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Professor e Dr. Felipe Saldanha de Araújo, pela oportunidade, compreensão ao longo desses anos. Além disso, agradeço por compartilhar o seu tempo, sua experiência, paciência e resiliência para me auxiliar no decorrer do projeto.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta tese, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE TABELAS E QUADROS	19
LISTA DE ABREVIATURAS	20
1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Câncer: definição	23
1.1.1 Melanoma.....	24
1.1.2 Câncer de Pulmão	31
1.2 Epigenética.....	36
1.2.1 Histona lisina metiltransferases	38
1.2.2 Avanços terapêuticos contra o câncer com uso de drogas epigenéticas	41
2. JUSTIFICATIVA	44
3. OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo Geral.....	45
3.2 Objetivos específicos	45
4. METODOLOGIA.....	46
4.1 Cultivo Celular.....	46
4.2 Viabilidade celular	47
4.3 Ensaio de apoptose por Anexina-V e Iodeto de Propídeo	48
4.4 Liberação de Lactato Desidrogenase - LDH.....	48
4.5 Avaliação da atividade de CASPASE 3/7	49

4.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	49
4.7 Geração de espécies reativas de oxigênio	50
4.8 Ensaio de migração - técnica de “wound scratch assay”	50
4.9 Proliferação celular - CFSE	51
4.10 Análise de ciclo celular.....	51
4.11 Extração de RNA e transcrição reversa	52
4.12 PCR em tempo real	53
4.13 Análise <i>in silico</i>	55
4.14 Análise estatística	56
5. RESULTADOS	57
5.1 Expressão de EHMT1 e EHMT2 nas células MeWo, A549 e hFib	57
5.2 Inibição de EHMT1/EHMT2 reduziu a viabilidade celular	57
5.3 Inibição de EHMT1/EHMT2 induz apoptose nas linhagens A549 e MeWo	58
5.4 Liberação de LDH nas linhagens MeWo e A549	60
5.5 Atividade das caspases 3/7 na célula A549	61
5.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	62
5.7 Produção de espécies reativas de oxigênio	63
5.8 Análise da migração celular pela técnica de “wound scratch assay”	64
5.9 UNC0646 inibe a proliferação das células MeWo e A549.....	66
5.10 Efeito de UNC0646 no ciclo celular nas linhagens MeWo e A549	67
5.11 Expressão de genes relacionados à morte celular, migração e proliferação	67
5.12 Análise <i>in silico</i> dos GDEs e processos biológicos enriquecidos em relação a expressão de EHMT1 e EHMT2 em amostras de câncer de pulmão e pele.	70
5.13 Análise <i>in silico</i> do papel de EHMT1 e EHMT2 no prognóstico e na sobrevida de pacientes com câncer de pulmão e pele.	72

6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	82
8. REFERÊNCIAS.....	83
9. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	97

RESUMO

Modificações epigenéticas, incluindo metilação do DNA e modificação de histona, controlam a expressão gênica e desempenham um papel crucial durante a tumorigênese. A família das histonas metiltransferases de EHMT - composta por EHMT1 e EHMT2 – é desregulada em vários tipos de câncer. Neste estudo investigamos os efeitos da inibição de EHMT1/EHMT2 em linhagens celulares de câncer, MeWo e A549. Para isso, o inibidor seletivo de EHMT1/EHMT2, UNC0646, foi usado e os seguintes processos foram investigados: proliferação celular, viabilidade, morte, função mitocondrial, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), migração e expressão gênica. Além disso, realizamos análise *in silico* explorando bancos públicos que contém dados clínicos e laboratoriais de amostras de câncer de pulmão e pele. Através desses bancos identificamos genes diferencialmente expressos (GDEs), de acordo com a expressão de EHMT1/EHMT2, processos biológicos modulados por essas enzimas e o impacto delas na sobrevida de pacientes com câncer de pulmão e de pele. Inicialmente, células MeWo e A549 foram tratados com UNC0646 e pelo ensaio MTT investigamos o impacto da inibição de EHMT1/EHMT2 na proliferação/viabilidade celular. Então, considerando o EC50 e EC75 determinados após o ensaio MTT, investigamos a ocorrência de apoptose celular por Citometria de Fluxo (Anexina-V/iodeto de propídio-IP), a produção de lactato desidrogenase (LDH) por ensaio de colorimetria e a atividade da caspase 3/7 por luminescência. Avaliamos a integridade do potencial de membrana mitocondrial usando sonda rodamina 123, geração de EROs, capacidade migratória, progressão do ciclo celular e a proliferação das linhagens celulares, após inibição de EHMT1/EHMT2. Por fim, o perfil transcricional de genes relacionados à proliferação, morte celular e migração foram avaliados. A inibição das enzimas EHMT1/EHMT2

provocou uma diminuição significativa na viabilidade das células MeWo e A549, de forma dose-dependente. Em seguida, identificamos pelo ensaio de anexina/IP morte celular associada a apoptose celular. Além disso, a inibição de EHMT1/EHMT2 também promoveu aumento do LDH, despolarização do potencial de membrana mitocondrial, produção EROs, além da ativação de caspases 3/7. Observamos que a inibição de EHMT1/EHMT2 afetou também a capacidade migratória da linhagem A549 e o perfil proliferativo após 48 horas de tratamento. Curiosamente, a modificação de EHMT1/EHMT2 modulou a expressão gênica *BCL2*, *NLRP1*, *KI67*, *CDK1*, *CDK2* em A549 e *BAX*, *BAK*, *BCL2*, *CDK1* na MeWo. Finalmente, nossa análise *in silico* reforça a importância de EHMT1/EHMT2 nos modelos de câncer investigados, ponderando que alguns processos biológicos importantes são afetados, como apoptose. Nossos resultados indicam que a inibição de EHMT1/EHMT2 promove a morte celular em câncer de pele e pulmão. Esses achados são importantes e sugerem que essas histonas metiltransferases podem ser alvo epigenético para o tratamento de adenocarcinoma pulmonar e melanoma maligno.

Palavras-Chave: Metiltransferase, Morte celular, Câncer de Pulmão, Melanoma, EHMT1/EHMT2.

ABSTRACT

Epigenetic modifications, including DNA methylation and histone modification, control gene expression and play a crucial role in tumorigenesis. The EHMT family of histone methyltransferases-consisting of EHMT1 and EHMT2-is dysregulated in various cancers. In this study, we investigated the effects of EHMT1/EHMT2 on cancer cell lines, MeWo and A549. For this purpose, we used the selective inhibitor of EHMT1/EHMT2, UNC0646, and examined the following processes: Cell proliferation, viability, death, mitochondrial function, generation of reactive oxygen species (ROS), migration and gene expression. In addition, we performed in silico analyses and searched public databases of clinical and laboratory data from lung and skin cancer samples. Through these databases, we identified genes that are differentially expressed (GDE) according to the expression of EHMT1/EHMT2, biological processes modulated by these enzymes, and their impact on the survival of patients with lung and skin cancer. Then, considering the right IC50 and IC75 after MTT assay, we examined the occurrence of cellular apoptosis by flow cytometry (Annexin V/propidium iodide -PI), the production of lactate dehydrogenase (LDH) by colorimetric assay, and the activity of caspase 3/7 by luminescence. We examined the integrity of mitochondrial membrane potential using the rhodamine 123 probe, generation of ROS, migratory ability, cell cycle progression, and proliferation of cell lines after inhibition of EHMT1/EHMT2. Finally, the transcriptional profile of genes related to proliferation, cell death and migration were examined. Inhibition of EHMT1/EHMT2 enzymes caused a significant decrease in the viability of MeWo and A549 cells in a dose-dependent manner. Subsequently, we identified cell death associated with cell apoptosis by the annexin-V/PI assay. In addition, we observed that inhibition of EHMT1/EHMT2 also promoted an increase in LDH, depolarization of mitochondrial

membrane potential, production of ROS, and activation of caspases 3/7. Furthermore, the influence of EHMT1/EHMT2 affected A549 migratory ability and proliferation profile after 48 hours of treatment. Interestingly, EHMT1/EHMT2 modification modulated *BCL2*, *NLRP1*, *KI67*, *CDK1* gene expression in A549 and *BAX*, *BAK*, *BCL2*, *CDK1* in MeWo. Finally, our *in silico* analysis highlights the importance of EHMT1/EHMT2 in the cancer models studied, considering that some important biological processes are affected, including apoptosis and necrosis. Our results show that inhibition of EHMT1/EHMT2 promotes cell death in skin and lung cancer. These results are important and suggest that these histone methyltransferases may be epigenetic targets for the treatment of lung adenocarcinoma and malignant melanoma.

Keywords: Methyltransferase, Cell death, Lung cancer, Melanoma, EHMT1/EHMT2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de Metástase.....	23
Figura 2. Epiderme saudável e a origem celular de alguns tipos de câncer de pele.....	26
Figura 3. Critério ABCDE.....	29
Figura 4. Estrutura da cromatina.....	37
Figura 5. Estrutura dos inibidores competitivos de substrato, UNC0638 e UNC0646.....	41
Figura 6. Expressão de EHMT1 e EHMT2 nas células hFib, A549 e MeWo.....	57
Figura 7. A inibição de EHMT1 e EHMT2 reduz a viabilidade celular das células.....	58
Figura 8. A inibição de EHMT1 e EHMT2 aumenta a apoptose na A549.....	59
Figura 9. A inibição de EHMT1 e EHMT2 aumenta a apoptose na MeWo.....	60
Figura 10. A inibição de EHMT1/EHMT2 induz liberação de LDH pelas linhagens Mewo e A549.....	61
Figura 11. Atividade das caspases-3/7.....	62
Figura 12. Análise do potencial membrana em células MeWo e A549 por citometria de fluxo utilizando marcador Rho 123.....	63
Figura 13. Metabolismo oxidativo das células MeWo e A549 na presença do inibidor UNC0646.....	63

Figura 14. Migração das células A549.....	65
Figura 15. Migração das células MeWo.....	65
Figura 16. Inibição da proliferação celular nas células MeWo e A549.....	66
Figura 17. Efeito do inibidor UNC0646 sobre o ciclo celular nas células MeWo e A549.....	67
Figura 18. Inibição de EHMT1 e EHMT2 modifica a expressão de alguns genes na célula A549.....	68
Figura 19. Expressão de genes envolvidos com apoptose e proliferação na linhagem MeWo.....	69
Figura 20. Análise dos dados do cBioPortal dos genes diferencialmente expressos em amostras de Adenocarcinoma Pulmonar e Melanoma Cutâneo de acordo com a expressão de EHMT1 e EHMT2.....	70
Figura 21. Principais processos biológicos encontrados na análise de DEGs nas amostras de Adenocarcinoma Pulmonar e Melanoma Cutâneo de acordo com a expressão de EHMT1 e EHMT2.....	71
Figura 22. Dados do OncoLnc de sobrevida de pacientes com Adenocarcinoma Pulmonar e Melanoma Cutâneo em relação aos genes alvos.....	72

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Principais fatores de risco para o câncer de pulmão.....	32
Tabela 2. Sequência dos primers utilizados no estudo.....	54
Suplementar quadro 1. Os 20 genes mais expressos e inibidos em amostras de adenocarcinoma pulmonar, de acordo com a mediana de expressão de EHMT1.....	97
Suplementar quadro 2. Os 20 genes mais expressos e inibidos em amostras de adenocarcinoma pulmonar, de acordo com a mediana de expressão de EHMT2.....	97
Suplementar quadro 3. Os 20 genes mais expressos e inibidos em amostras de melanoma cutâneo, de acordo com a mediana de expressão de EHMT1.....	98
Suplementar quadro 4. Os 20 genes mais expressos e inibidos em amostras de melanoma cutâneo, de acordo com a mediana de expressão de EHMT2.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

µg - micrograma

µL - microlitro

µM - micromolar

ACP - Adenocarcinoma Pulmonar

AJCC - do inglês “*American Join Committee of Cancer*”

BAX – do inglês “*BCL2 associated X*”

BCL2 – do inglês “*B cell leukemia/lymphoma 2*”

BRAF – do inglês “*V3raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*”

CDK1 – do inglês “*Cyclin Dependent Kinase 1*”

cDNA - DNA complementar

CFSE - do inglês “*carboxyfluorescein succinimidyl ester*”

CO₂ - Dióxido de Carbono

CPCNP – Carcinoma Pulmonar de Células não Pequenas

CPCP - Carcinoma Pulmonar de Células Pequenas

CPCE - Carcinoma pulmonar de Células Escamosas

CPCG - Carcinoma pulmonar de Células Grandes

CXCR4 – do inglês “*C-X-C chemokine receptor type 4*”

DCFH-DA - 2'7'- diclorofluoresceína diacetato

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPOC- Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EHMT1 - do inglês “*Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1*” ou conhecido como GLP

EHMT2 - do inglês “*Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2*” ou conhecido como G9a

FCR - Fase de crescimento radial

FCV - Fase de crescimento vertical

FITC - do inglês “*Fluorescein isothiocyanate*”

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GDEs - Genes Diferencialmente Expressos

hFib - Fibroblasto humano

IP- Iodeto de Propídio

KMTs - Histona lisina metiltransferase

LDH - do inglês “*lactate desidrogenase*”

MAPK - do inglês “*Mitogen-activated protein kinase*”

MC - Melanoma Cutâneo

MC1R - Receptor de melanocortina 1

miRNA – microRNA

MFI – Mediana de Intensidade de fluorescência

mM - Milimolar

MPTs - Modificações pós-traducionais

MSH - Hormônio estimulante de melanócitos

MTT – do inglês “3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide”

OMS - Organização Mundial da Saúde

p53 – do inglês “*Tumor protein 53*”

PBS - do inglês “*Phosphate Buffered Saline*”

PCR - do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”

RNA - do inglês “*Ribonucleic Acid*”

EROs - Espécies reativas de oxigênio

rpm - rotações por minuto

RLU- Luminescência Relativa

SFB - Soro fetal bovino

TNM - Classificação de Tumores Malignos

UV - Radiação ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: definição

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, tendo sido responsável por quase 10 milhões de óbitos em 2020. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os cânceres mais letais em 2021 foram câncer de pulmão, de cólon e reto, de fígado, de estômago e de mama (WHO, 2021). Estima-se que o número de casos e mortes por câncer aumente rapidamente à medida que a população cresce, envelhece e adota comportamentos de estilo de vida que aumentam o risco para a doença (TORRE *et al.*, 2016).

O termo “câncer” abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas que têm em comum o crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos ou órgãos. Esses diversos tipos de câncer se desenvolvem dos vários tipos de células do corpo, como exemplo, quando iniciam em tecidos epiteliais, pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Outra característica que diferencia os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade metastática, em que as células invadem tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (Figura 1) (INCA, 2020).

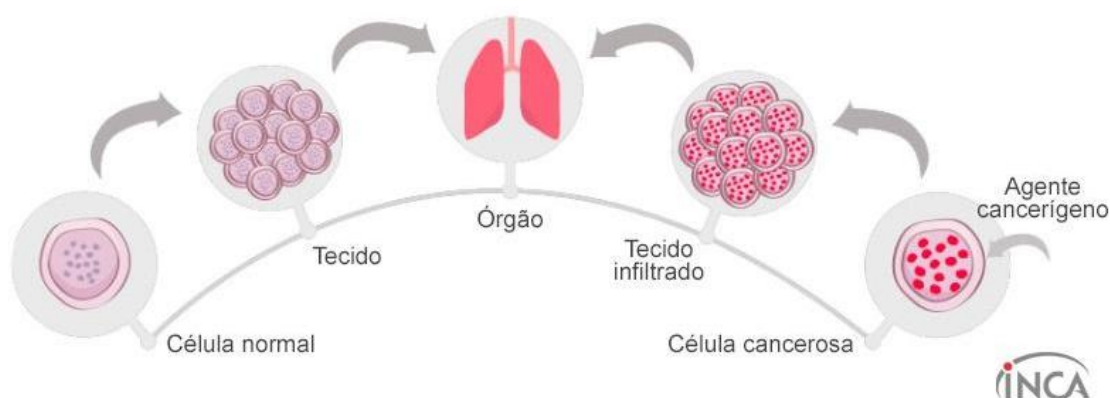


Figura 1. Processo de Metástase. Esse processo envolve a disseminação de células cancerosas de uma lesão primária para órgãos vizinhos ou distais. Fonte: INCA, 2020.

A metástase é a principal causa da letalidade do câncer, envolvendo uma variedade de mecanismos celulares, que incluem invasão do estroma, fuga da vigilância imunológica, modulação do microambiente do tecido e resistência à terapêutica (FISCHER *et al.*, 2015; SUHAIL *et al.*, 2019).

As células cancerosas são células transformadas, caracterizadas pela aquisição de uma série de mudanças que lhes permitem formar tumores. Além disso, essas células podem se comportar de maneiras diferentes, de acordo com as mudanças genéticas que estão por trás desta transformação (CREE, 2011). Por definição, o câncer é uma doença de mutações somáticas que selecionam um fenótipo invasivo e proliferativo. Ao longo da trajetória evolutiva de um câncer, diferentes populações geneticamente heterogêneas de células cancerosas tendem a evoluir e interagir dinamicamente umas com as outras. Esta heterogeneidade genética intratumoral contribui para a resistência às terapias direcionadas (YATES; CAMPBELL, 2012; BASLAN; HICKS, 2017).

1.1.1 Melanoma

Incidência

O melanoma maligno é um tumor altamente agressivo e de mau prognóstico (HUANG, 2018), devido à sua alta possibilidade de provocar metástase. No entanto, o prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom se detectado em fase inicial (INCA, 2021a). A maioria dos casos afeta principalmente indivíduos idosos, com incidência e taxas de mortalidade mais altas entre os homens brancos. Porém, o melanoma é o terceiro tipo de câncer mais comum em adolescentes e adultos jovens com idades entre 15 e 39 anos (O'NEILL; SCOGGINS, 2019.). No Brasil, embora o câncer de pele seja o mais frequente e corresponda a cerca de 30% de todos os tumores malignos

registrados no país, o melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão (INCA, 2021a).

Fatores de risco

Devido à diversa etiologia e à heterogeneidade da doença, o melanoma é considerado uma doença multifatorial, com fatores de risco genéticos, fenotípicos e ambientais que contribuem para a predisposição desse câncer (READ; WADT; HAYWARD, 2016; RASTRELLI *et al.*, 2014). O fator de risco ambiental mais importante e potencialmente modificável para o desenvolvimento do melanoma maligno é a exposição aos raios ultravioleta, devido ao seu efeito genotóxico (RASTRELLI *et al.*, 2014). A maioria das alterações genéticas da doença ocorre como mutações adquiridas aleatoriamente nos melanócitos, e o acúmulo de alterações genômicas contribui para o desenvolvimento, progressão e evolução do melanoma (READ; WADT; HAYWARD, 2016).

Os melanomas estão associados a várias alterações genéticas somáticas, as mais frequentes alterações são detectadas em melanomas cutâneos expostos ao sol cronicamente ou intermitentes, que afetam genes que controlam processos celulares central como proliferação (*BRAF*, *NRAS* e *NF1*), crescimento e metabolismo (*PTEN* e *KIT*), resistência à apoptose (*TP53*), controle do ciclo celular (*CDKN2A*) e tempo de vida replicativo (*TERT*) (READ; WADT; HAYWARD, 2016; LEONARDI *et al.*, 2018). Essas alterações genômicas normalmente levam à ativação aberrante de duas principais vias de sinalização no melanoma: A cascata de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) e a PI3K/AKT. A via MAPK está envolvida na transdução de sinais extracelulares, como fatores de crescimento e hormônios, para o núcleo, levando à expressão de genes que são centrais na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. A via PI3K está normalmente envolvida na homeostase celular. As anormalidades genéticas mais

frequentes são as mutações *BRAF* (37 a 50%), a maior frequência em melanomas cutâneos derivados de danos por exposição solar intermitente (LEONARDI *et al.*, 2018).

Origem

O melanoma se inicia nos melanócitos, localizado na camada epidérmica basal (Figura 2). O melanócito se origina de células da crista neural (MORAN *et al.*, 2018) que podem ser encontradas principalmente na epiderme basal e nos folículos pilosos, ao longo das superfícies mucosas, meninges e na camada coróide do olho. Em resposta ao dano ao DNA induzido por UV, os queratinócitos da pele produzem o hormônio estimulante de melanócitos (MSH) que se liga ao receptor de melanocortina 1 (MC1R) nos melanócitos que então produzem e liberam melanina (LEONARDI *et al.*, 2018). A melanina desempenha um papel crucial na dispersão da radiação ultravioleta (UV) e na absorção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são liberadas no citoplasma como resultado, evitando assim outras alterações no DNA (MORAN *et al.*, 2018).

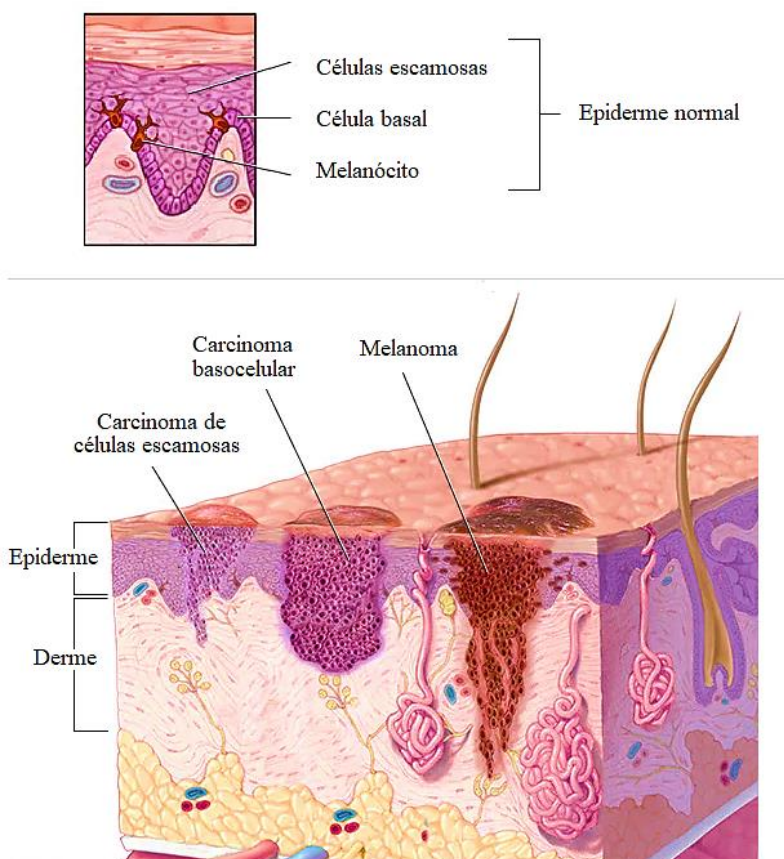


Figura 2. Epiderme saudável e a origem celular de alguns tipos de câncer de pele. O câncer de pele começa nas células que compõem a camada externa da pele, a epiderme. O melanoma surge dos melanócitos que são células pigmentares. Adaptado: Mayo Foundation for Medical Education and Research, 2023.

A grande maioria dos melanomas cutâneos surgem de melanócitos na epiderme e a maioria evolui por 2 principais estágios de progressão. No primeiro deles, as lesões iniciais podem ser reconhecidas como uma mancha ou placa pigmentada, que se expande aproximadamente ao longo dos raios de um círculo imperfeito no eixo horizontal dentro da pele, denominada fase de crescimento radial (FCR). No outro estágio de progressão, um tumor formado pode infiltrar a derme ou elevar a epiderme para formar um nódulo, cuja direção de crescimento inclui o eixo vertical (abaixo e/ou acima do nível da pele), denominado fase de crescimento vertical (FCV). Os melanomas "apenas FCR" têm um prognóstico excelente, enquanto as lesões FCV têm potencial para metástase (ELDER *et al.*, 2020).

O processo de metástase de células de melanoma de um tumor primário para um órgão secundário geralmente envolve as seguintes etapas: descolamento do tumor primário, invasão nos vasos sanguíneos ou linfáticos (intravasamento), sobrevivência na circulação, adesão ao sangue ou parede do vaso linfático, evasão dos vasos (extravasamento), parada e colonização em órgão secundário (HUANG; ROFSTAD, 2018).

Classificação

O melanoma pode ser classificado amplamente em cutâneo e extracutâneo. Os melanomas extracutâneos incluem ocular, mucosa e leptomeníngeo. Os melanomas cutâneos são o tipo mais comum de melanomas malignos (CHOPRA; SHARMA; RAO, 2020). Em relação às características clínicas e histológicas, o melanoma pode ser dividido

em 4 subtipos principais: extensivo superficial, nodular, lentigo maligno e acral-lentiginoso (CHOPRA; SHARMA; RAO, 2020; RASTRELLI *et al.*, 2014).

Melanoma extensivo superficial é o tipo mais comum de melanoma, correspondendo a aproximadamente 70% dos casos. Está relacionado com a exposição intermitente ao sol e associado a um bom prognóstico. O Melanoma nodular é responsável por 5% dos melanomas, está relacionado com a exposição intermitente ao sol, é mais comum em homens com idade entre 50 e 60 anos. Os melanomas nodulares costumam ser ulcerados, apenas com uma fase de crescimento vertical correlacionada com maior taxa de metástase (RASTRELLI *et al.*, 2014). Sendo relatado como mais agressivo em comparação com outros tipos de melanomas (CHOPRA; SHARMA; RAO, 2020).

O Melanoma lentigo maligno é responsável por 4% a 15% dos melanomas cutâneos, correlaciona-se com a exposição solar a longo prazo. Esse câncer pode evoluir por décadas antes de invadir a derme papilar. Já o melanoma acral lentiginoso corresponde a 5% dos melanomas em pessoas brancas, mas é o tipo mais comum de melanoma entre pacientes asiáticos, hispânicos e africanos (RASTRELLI *et al.*, 2014). A lesão normalmente é pigmentada ou amelanótica, o local mais comum é a superfície plantar (CHOPRA; SHARMA; RAO, 2020).

Diagnóstico

O padrão ouro para o diagnóstico de melanoma continua sendo a histopatologia, em conjunto com as características clínicas, no entanto há contribuições da imuno-histoquímica e dos avanços recentes na análise genômica de tumores (ELDER *et al.*, 2020). As características clínicas do melanoma incluem superfície elevada irregular, forma assimétrica, perímetro irregular, cor variada, mudança de aparência, ulcerações superficiais, sangramento, inflamação, coceira e dor (KOZOVSKA; GABRISOVA;

KUCEROVA, 2016). A regra ABCDE (RIGEL *et al.*, 2005) pode ser usada para distinguir entre lesões benignas e malignas, sendo que define-se para A: assimetria, B: borda irregular, C: cor não homogênea, D: diâmetro > 6 mm, E: evolução recente (modificação no tamanho, forma, cor) (Figura 3). Para confirmar o diagnóstico da doença, é realizado um exame histológico. O sistema tumor, nódulo, metastase (TNM) do *American Join Committee of Cancer* (AJCC) atualizado em 2018 (GERSHENWALD *et al.*, 2017) é usado para o estadiamento do melanoma. O sistema combina os atributos histológicos do tumor primário (T), a presença e extensão da doença do linfonodo próximos (N) e a presença e extensão da metástase à distância (M), os médicos são capazes de atribuir aos pacientes um agrupamento de estágios fortemente relacionado à sobrevivência e ao prognóstico (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

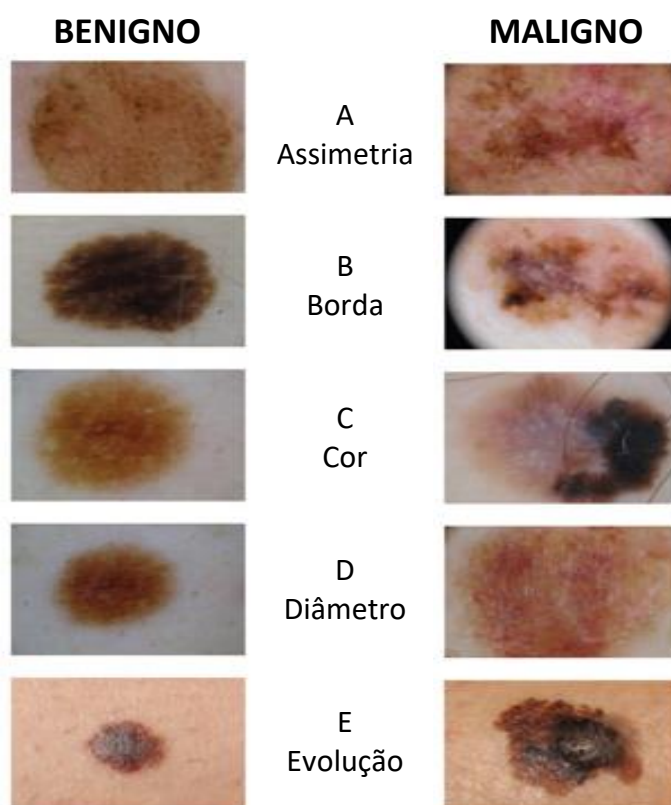


Figura 3. Critério ABCDE. Pigmentações malignas e benignas baseadas no método ABCDE onde “A” significa assimetria, “B” significa irregularidade da borda, “C” significa cor, “D” significa diâmetro e “E” significa evolução. Adaptado do: HC Marbella International Hospital, 2020.

A remoção cirúrgica do tumor e do tecido saudável circundante é o tratamento primário para melanoma localizado, seguido da biópsia do linfonodo sentinela para tumores com mais de 0,8mm de espessura ou ulcerados. Em pacientes com doença metastática, o tratamento cirúrgico não é curativo e outra linha de tratamento deve ser adotada, como as terapias medicamentosas. Até pouco tempo, a única opção de tratamento para pacientes com melanoma metastático era a quimioterapia, (LEE *et al.*, 2013; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019), no entanto, terapias direcionadas foram desenvolvidas para combater os defeitos moleculares presentes no melanoma. As abordagens mais promissoras incluem os inibidores de *BRAF* (proto-oncogene B-Raf), vemurafenibe e dabrafenibe, que foram aprovados para o tratamento de melanomas com mutação *BRAF* metastático. Embora sejam altamente eficazes em uma parte dos pacientes com mutação em *BRAF*, a maioria desenvolve resistência secundária em um curto período (REBECCA; SONDAK; SMALLEY, 2012; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

Tratamento

Nos últimos anos houve grandes avanços em tratamentos de imunoterapia para melanoma metastático. Os tratamentos mais eficazes são os inibidores e anticorpos que atuam em moléculas *checkpoints*, principalmente contra PD1, PD-L1/2 e CTLA-4 (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). Na superfície das células T a proteína PD-1, quando sinalizada por seu ligante (PD-L1/2), leva à inibição do sistema imunológico, promovendo tolerância e prevenção da autoimunidade (PASSARELLI *et al.*, 2017; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). A proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) é expressa constitutivamente em células T-reg e reconhece o receptor B7-1/2 em células apresentadoras de antígenos. CTLA-4 compete com CD28 nas células T pela ligação a B7-1/2, sendo que quando o CTLA-4 se liga a B7-1/2 há repressão da resposta

imune, ao contrário do que ocorre quando há ligação de CD28 (PRIETO *et al.* 2012; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). O tratamento com anticorpos para PD-1, PD-L1/2 e CTLA-4 bloqueia efetivamente a ligação aos respectivos ligantes e o sinal correspondente que causa tolerância, permitindo a estimulação da resposta imune. Existem três drogas inibidoras de moléculas *checkpoints* que foram aprovadas para uso no tratamento do melanoma: o anticorpo anti-CTLA-4 ipilimumabe e dois anticorpos anti-PD-1 nivolumabe e pembrolizumabe (TOPALIAN; DRAKE; PARDOLL, 2015; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). Embora os inibidores de *checkpoint* tenham permitido avanços importantes, a inibição promove a tolerância das células próprias gerando efeitos colaterais que podem ser graves. Além disso, uma parte dos pacientes não responde a essas drogas e os pacientes que respondem desenvolvem com frequência resistência secundária. Como os tratamentos são caros e os efeitos colaterais podem ser graves, há grande interesse da comunidade científica em encontrar outros alvos terapêuticos (GEORGE; ARMENIO; KATZ, 2017; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

1.1.2 Câncer de Pulmão

Incidência

O câncer de pulmão é o segundo câncer mais comum em homens e mulheres no Brasil. Desde 1985, esse é um dos principais cânceres em termos de incidência e mortalidade em todo mundo. Cerca de 13% de todos os casos novos de câncer são de pulmão (INCA, 2021b). A estimativa mundial de 2020 apontou incidência de 2,2 milhões de novos casos de câncer e 1,8 milhão de mortes, o câncer de pulmão foi a principal causa

de morte por câncer em 2020, representando aproximadamente um em cada 5 (18,0%) óbitos por câncer (SUNG *et al.*, 2021).

Fatores de Risco

O tabagismo e a exposição passiva ao tabaco são importantes fatores de risco (Tabela 1) para o desenvolvimento de câncer de pulmão. Em cerca de 85% dos casos diagnosticados, o câncer de pulmão está associado ao consumo de derivados de tabaco. Entretanto, a exposição à poluição do ar, infecções pulmonares de repetição, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), fatores genéticos e história familiar de câncer de pulmão favorecem ao desenvolvimento desse tipo de câncer (INCA, 2021b).

Tabela 1. Principais fatores de risco para o câncer de pulmão.

<i>Fator de risco</i>	<i>Magnitude da associação *</i>
<i>Tabagismo</i>	Risco de 20 vezes maior
<i>Fumante passivo</i>	5% a 28% de aumento do risco
<i>Cigarros eletrônicos</i>	Desconhecido
<i>Charutos, cachimbos e narguilés</i>	Risco aumentado de 1,9 a 4,6 vezes
<i>Maconha</i>	Nenhum risco conhecido
<i>Radônio</i>	14% a 29% de aumento do risco
<i>Amianto</i>	12% a 24% de aumento do risco
<i>História de DPOC, enfisema ou bronquite crônica</i>	Risco 2 a 3 vezes maior
<i>História de asma</i>	28% a 44% de aumento do risco
<i>História de pneumonia</i>	30% a 57% de aumento do risco
<i>História de Chlamydia pneumoniae</i>	Risco aumentado de 1,2 a 2,4 vezes
<i>História da tuberculose</i>	48% a 76% de aumento do risco
<i>HIV</i>	Risco 2 vezes maior

* comparação em relação a quem nunca fumou. Fonte: SCHABATH; COTE, 2019

O câncer de pulmão é um câncer altamente invasivo, com metástase rápida e prevalente. As células do câncer de pulmão têm defeitos nas sinalizações que regulam a proliferação celular normal e a homeostase. Acredita-se que a transformação de um fenótipo normal para maligno ocorre em várias etapas, por alterações genéticas e epigenéticas, evoluindo para um câncer invasivo por expansão clonal, por último, metástase e resistência à terapia. Várias alterações genéticas direcionáveis foram identificadas no câncer de pulmão incluindo: mutações de vários proto-oncogenes, como KRAS, EGFR, BRAF, PI3K, MEK e HER2; reorganizações estruturais em ALK, ROS1 e possivelmente RET; amplificação de proto-oncogenes como MET em adenocarcinomas, FGFR1 e DDR2 em carcinomas de células escamosas de pulmão; hiper expressão de genes oncogênicos por microRNAs (miRNAs); inativação de genes supressores de tumor, como TP53, RB1, CDKN2A, FHIT, RASSF1A e PTEN; aumento da atividade da telomerase, que contribui para a imortalidade celular (LEMJABBAR-ALAOUI *et al.*, 2015).

Classificação

O câncer de pulmão constitui um grupo de tumores heterogêneos, com diversos tipos de diferenciação, reconhecidos pela classificação da OMS de tumores de pulmão. A heterogeneidade tumoral tem sido descrita em vários tumores e tem sido tratada de várias maneiras: histológica, celular e molecular/genética. A heterogeneidade do tumor tem um impacto importante não apenas na classificação do tumor, mas também na definição do prognóstico e na decisão terapêutica (DE SOUSA; CARVALHO, 2018).

Os cânceres de pulmão são tradicionalmente divididos em carcinoma de -células não pequenas (CPCNP) e carcinoma de células pequenas (CPCP), sendo o primeiro responsável por aproximadamente 80% dos casos e o último por 20%. Devido à grande diversidade do CPCNP há uma subclassificação (LEMJABBAR-ALAOUI *et al.*, 2015;

ZHENG, 2016; SCHABATH; COTE, 2019) de acordo com a Classificação de Tumores Pulmonares da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2015 (TRAVIS *et al.*, 2015), além do CPCP, agora existem outros 3 tipos principais de câncer de pulmão, incluindo carcinoma de células escamosas (CPCE), adenocarcinoma e carcinoma de células grandes (CPCG). Esses tipos principais podem ser ainda subclassificados em subtipos mais específicos (TRAVIS, 2020).

Os carcinomas de células pequenas ou CPCP tem uma forte relação com o tabagismo, já que está presente em praticamente todos os casos (LEWIS *et al.*, 2014). O CPCP é uma doença maligna altamente agressiva, em que os pacientes geralmente apresentam metástase no início da doença (PLANCHARD; LE PÉCHOUX, 2011; ZHENG, 2016). O Carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE) representa cerca de 20% dos cânceres de pulmão (LEWIS *et al.*, 2014) e sua incidência diminuiu nas últimas décadas, geralmente ocorre na porção central do pulmão, ao longo das principais vias aéreas (BRAMBILLA *et al.*, 2014; ZHENG, 2016).

O adenocarcinoma pulmonar (ACP) é o tipo mais comum de câncer de pulmão, respondendo por mais de 40% dos cânceres de pulmão e 60% do CPCNP (LEWIS *et al.*, 2014). O ACP comumente forma uma massa localizada perifericamente com fibrose central e enrugamento pleural. Por definição, o ACP é uma neoplasia epitelial maligna com diferenciação glandular ou produção de mucina (TACHA, *et al.*, 2012; ZHENG, 2016). O carcinoma pulmonar de células grandes (CPCG) representa uma minoria de casos de CPNPC, menos de 3% dos cânceres de pulmão, são desprovidos de diferenciação específica de linhagem (LEWIS *et al.*, 2014 e ZHENG, 2016).

Diagnóstico

O diagnóstico e a classificação do câncer de pulmão fornecem informações essenciais para o prognóstico e orientam a seleção de regimes terapêuticos (ZHENG, 2016). O estudo inicial deve ser uma radiografia de tórax, seguido por uma tomografia computadorizada com contraste, em caso de dúvidas (LATIMER, 2018). A maioria dos cânceres de pulmão se apresenta em estágio avançado, exigindo biópsia de tecido ou diagnóstico de citologia. O objetivo da biópsia de tecido inclui o estabelecimento do diagnóstico de malignidade com base em achados histomorfológicos, classificação do tipo e grau do tumor auxiliado por coloração imunohistoquímica e obtenção de material celular para teste molecular direcionado por terapia. A detecção de alterações genéticas específicas tem se mostrado eficaz em prever a resposta ao tratamento e estratificar o prognóstico e é potencialmente aplicável na detecção precoce do câncer de pulmão (ZHENG, 2016).

Tratamento

As opções de tratamento para câncer de pulmão incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia direcionada. As recomendações das modalidades terapêuticas dependem de vários fatores, incluindo o tipo e o estágio do câncer (LEMJABBAR-ALAOUI *et al.*, 2015). Quando viável, o procedimento cirúrgico continua sendo o tratamento de escolha para tumores localizados em estágio inicial e pode ser curativa. Após a cirurgia, a quimioterapia adjuvante é prescrita para diminuir o risco de recorrência em pacientes com envolvimento de linfonodos. No entanto, a maioria dos cânceres de pulmão são descobertos em estágio avançado. Nesse caso, em pacientes devidamente selecionados, a quimioterapia e radioterapia adjuvante podem ser usadas para reduzir a massa tumoral para posterior procedimento cirúrgico. Em geral, mais de 80% dos pacientes recém-diagnosticados com câncer de pulmão recebem quimioterapia, sozinha ou em combinação com radioterapia (VISCONTI *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, novos medicamentos-alvo foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de CPCNP, que compreendem principalmente adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas, responsáveis por mais de 85% de todos os cânceres de pulmão. Drogas direcionadas a ALK, ROS e as vias EGF e VEGF têm sido particularmente benéficas para pacientes com CPCNP não escamosos. A aprovação muito recente de drogas direcionadas à via PD-L1 / PD-1 foi um avanço inovador, especialmente para o tratamento de CPCE (VISCONTI *et al.*, 2017). Os medicamentos que bloqueiam a ligação de PD-L1 ao seu receptor, como nivolumabe e pembrolizumabe, aumentam a imunidade contra uma ampla variedade de cânceres, incluindo CPCNP (CATAKOVIC *et al.*, 2017). No entanto, os efeitos de longo prazo das terapias de câncer alvo são limitados principalmente pela resistência adquirida. Portanto, a busca por novas opções terapêuticas sempre requer esforços, pois o câncer de pulmão ainda é a principal causa de mortalidade relacionada ao câncer (VISCONTI *et al.*, 2017).

1.2 Epigenética

Diversas anormalidades epigenéticas estão associadas ao desenvolvimento e progressão do câncer. A regulação epigenética envolve mecanismos responsáveis por controlar a acessibilidade física da região promotora à maquinaria de transcrição através da metilação do DNA, expressão de RNA não codificante, inativação da cromatina e modificação covalente de histonas (CAO, H *et al.*, 2019).

Nas células eucarióticas, o DNA é compactado como cromatina (Figura 4), cujas unidades funcionais são os nucleossomos. Cada nucleossomo é composto por um octâmero de quatro histonas centrais (H3, H4, H2A e H2B), ao redor do qual estão envolvidos 147 pares de bases de DNA (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011;

DAWSON; KOUZARIDES, 2012; AUDIA; CAMPBELL, 2016; ZHAO; SHILATIFARD, 2019). A cromatina pode ser subdividida em duas regiões principais: heterocromatina, que é altamente condensada, tem uma replicação tardia e contém principalmente genes inativos; e eucromatina, que é relativamente aberta e contém a maioria dos genes ativos (DAWSON; KOUZARIDES, 2012).

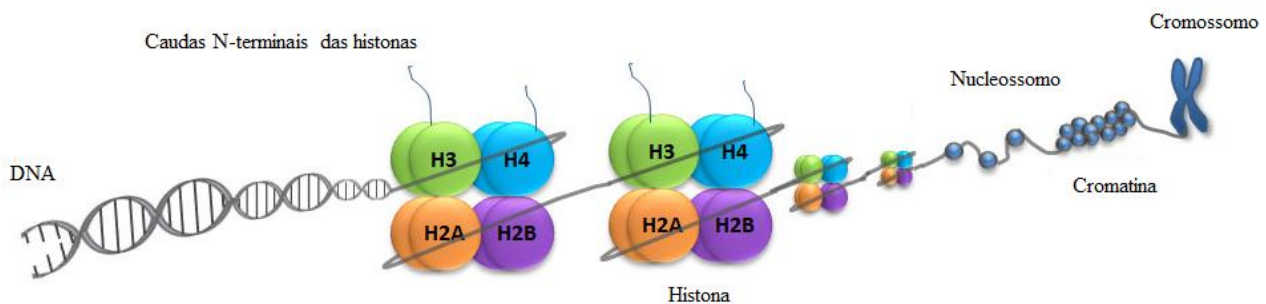


Figura 4. Estrutura da cromatina. As modificações epigenéticas podem ocorrer diretamente no DNA como nas caudas das histonas. Adaptado: GEN, 2023.

As proteínas histonas são globulares e cada uma possui uma cadeia lateral característica, ou cauda, que é densamente povoada com resíduos básicos de lisina e arginina. As caudas das histonas estão sujeitas a extensas modificações pós-traducionais covalentes (MPTs) que cooperam para o estado da cromatina. Algumas MPTs podem alterar a densidade de carga entre as histonas e o DNA, afetando a organização da cromatina e os processos transcricionais subjacentes, mas também podem servir como módulos de reconhecimento para proteínas de ligação específicas (AUDIA; CAMPBELL, 2016; ZHAO; SHILATIFARD, 2019).

As MPTs de histonas medeiam uma variedade de processos biológicos críticos, geralmente por meio de modificação da cromatina que conduz à expressão ou repressão de genes alvo. A maior parte da literatura concentra-se na acetilação, metilação e

fosforilação. No entanto, as histonas também podem ser modificadas de outras maneiras, como citrulinização, ubiquitinação, ADP-ribosilação, desaminação, formilação, O- GlcNAcilação, propionilação, butirilação, crotonilação e isomerização de prolina. Alterações nos padrões de MPTs de histonas têm sido amplamente associadas ao câncer, tanto em nível global em todo o genoma e em loci de genes específicos (AUDIA; CAMPBELL, 2016). Um equilíbrio entre modificações e modificadores específicos é mantido no estado estacionário da célula para manter a estrutura da cromatina, executar o programa de expressão gênica adequado e controlar o resultado biológico. Uma vez que o equilíbrio é interrompido, os fenótipos celulares podem ser alterados e preparados para o início e progressão da doença (ZHAO; SHILATIFARD, 2019).

1.2.1 Histona lisina metiltransferases

A metilação das histonas é um processo dinâmico com papéis chave no desenvolvimento e diferenciação. Os níveis aberrantes de metilação das histonas provavelmente desempenham um papel na tumorigênese. A metilação da histona está intimamente associada à regulação da transcrição, influenciando a arquitetura da cromatina, recrutando fatores de transcrição, interagindo com fatores de iniciação e alongamento e afetando o processamento do RNA (ZHAO; SHILATIFARD, 2019).

As histonas são metiladas por várias histonas metiltransferases e a metilação é ativamente removida por histonas desmetilases (CASCIELLO *et al.*, 2015). A metilação da histona ocorre nos átomos de nitrogênio da cadeia lateral de ambos os resíduos de lisina e arginina, sendo mais na histona H3 seguida por H4 (ZHAO; SHILATIFARD, 2019). Cada lisina pode estar presente na forma de não metilado (me0), mono-metilado

(me1), di-metilado (me2) ou trimetilado (me3). A metilação da lisina pode ocorrer em posições distintas com atividade transcricional significativamente divergente. A metilação de H3K4 aumenta a transcrição do gene, enquanto a metilação de H3K9 e H3K27 causam o silenciamento do gene (JAMBHEKAR; HALL; SHI., 2019; RAHMAN, *et al*, 2021).

Histona lisina metiltransferases (KMTs) são as enzimas envolvidas na transferência do grupo metil da S-adenosil-metionina para as caudas N-terminais dos resíduos de lisina presentes na histona (RAHMAN, *et al*, 2021). A família KMT1 contém pelo menos quatro membros em mamíferos, incluindo SUV39H1/2, G9a, GLP e SETDB1, com H3K9 como substrato para metilação, levando a marca de metilação associada à repressão transcricional (ZHAO; SHILATIFARD, 2019). EHMT2 (G9a) e sua proteína semelhante a EHMT2 análogo (GLP ou EHMT1) são proteínas de domínio SET conhecidas como KMTs que formam um complexo heterodimérico ativo que adicionam grupos mono-, di- e trimetil na histona H3K9 (H3K9me1, H3K9m2 e H3K9me3), H3K27 e H1. O domínio SET é o componente estrutural do G9a, composto por repetições de anquirina, que se envolvem nas interações proteína-proteína e nos sinais de localização nuclear da região N-terminal (RAHMAN *et al.*, 2021).

EHMT2 tem um papel fundamental no desenvolvimento de embriões, crescimento celular, autofagia, adipogênese e outros processos biológicos (SRINIVASAN *et al.*, 2019). Além disso, foi relatado que a expressão elevada de EHMT2 causa proliferação celular e metástase em vários cânceres humanos, como mama, ovário, cabeça e pescoço, gástrico, cólon, pulmão, bexiga, fígado, cervical, próstata, tumores neuroendócrinos e malignidades hematológicas (RAHMAN, *et al*, 2021). A di-metilação de H3K9 mediada por EHMT2 silencia os genes do antioncogene, resultando em um aumento potencial na proliferação de células cancerígenas. Níveis elevados de EHMT2 foram comumente

correlacionados com níveis mais elevados de metilação, levando à supressão de importantes genes supressores de tumor. Níveis mais elevados de expressão de EHMT2 também foram observados como associados a mau prognóstico em alguns tipos de câncer (CASCIELLO *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, vários inibidores do EHMT2 foram descobertos e relatados. Esses compostos são baseados em diferentes modificações químicas. Os atuais inibidores de EHMT2 podem ser amplamente divididos em três grupos com base em seus tipos de ligação: 1) inibidores competitivos de substrato (peptídeo); 2) os inibidores competitivos do cofator SAM (S-adenosil-metionina); 3) inibidores cujo mecanismo inibitório permanece obscuro. Em geral, os inibidores competitivos de substrato tendem a ter melhor seletividade do que os inibidores de SAM contra EHMT2, pois se ligam especificamente ao local do substrato em EHMT2, em vez de competir com o SAM. (LIU *et al.*, 2011; CAO, H *et al.*, 2019).

Uma das primeiras moléculas produzidas como inibidor de G9a foi BIX-01294 que competiu com SAM e antagonizou a atividade de G9a (CHANG *et al.*, 2009). BIX-01294 promoveu a morte celular dependente de autofagia e inibiu a proliferação de células cancerígenas em diferentes tipos de linhagens celulares de câncer através da inibição de G9a. Estudos de estrutura-atividade foram conduzidos em BIX-01294 para descobrir novos inibidores com potência e seletividade em relação a G9a e reduzir a toxicidade em células saudáveis, o que resultou nos compostos UNC0638, E72, DCG066 e A-366 (RAHMAN *et al.*, 2021). As moléculas apresentaram farmacocinética melhorada com alta seletividade e baixa toxicidade para as células normais (LIU *et al.*, 2013). UNC0638 mostrou maior potência e alta especificidade para G9a e inibiu a proliferação celular nas linhas celulares de câncer de mama, câncer cervical e câncer de fígado (RAHMAN *et al.*, 2021).

O inibidor UNC0646 (Figura 5) foi inspirado pela alta potência celular de UNC0638. UNC0646 foi descoberto pela introdução de um grupo lipofílico nas posições 4 e 7 de UNC0638, que melhorou a permeabilidade e, consequentemente, excelente relação entre potência e citotoxicidade. UNC0646 é altamente seletivo para EHMT2/EHMT1 (G9a/GLP) quando comparado a outras histonas metiltransferases como PKMTs (proteína lisina metiltransferases) e PRMTs (proteína arginina metiltransferases), incluindo SETD7, SUV39H2, SETD8 e PRMT (LIU *et al.*, 2011; CAO, H *et al.*, 2019).

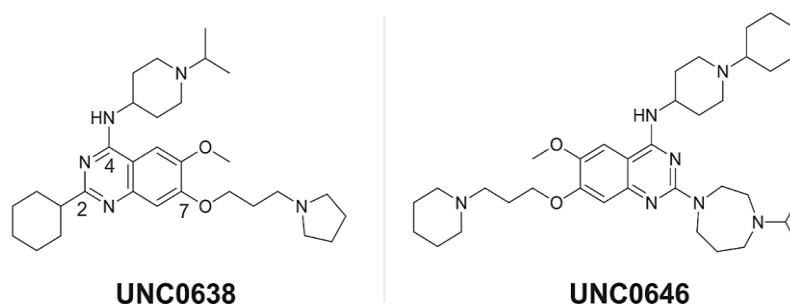


Figura 5. Estrutura dos inibidores competitivos de substrato, UNC0638 e UNC0646. Adaptado: CAO, H *et al.*, 2019.

1.2.2 Avanços terapêuticos contra o câncer com uso de drogas epigenéticas

As modulações epigenéticas no câncer conferem à célula tumoral um fenótipo que pode desencadear o processo de carcinogênese, seguido de alterações genéticas, que propagam a tumorigênese. Essas alterações refletem no prognóstico e no tratamento. A variação epigenética de cada tipo de câncer ou mesmo de cada paciente pode ser essencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (MIRANDA FURTADO *et al.*, 2019). Sendo assim, as alterações epigenéticas são atraentes para novos alvos terapêuticos por vários motivos, entre eles, as mutações recorrentes de moduladores epigenéticos e a

desregulação de características epigenéticas que são amplamente observadas em tumores. Além disso, as alterações epigenéticas em contraste com as alterações genéticas são possivelmente reversíveis (CAO; YAN, 2020).

No decorrer dos anos, várias terapias epigenéticas para tratamento do câncer foram aprovadas pela FDA. No entanto, novos compostos de drogas epigenéticas (epidrogas) estão sendo constantemente avaliados quanto à citotoxicidade, parâmetros farmacológicos e para melhor compreender seu mecanismo de ação em estudos pré-clínicos, bem como em ensaios clínicos para o desenvolvimento e liberação de novas terapias. A maioria dos compostos aprovados pelo FDA, incluindo a primeira epidroga aprovada para tratamento de câncer, Vorinostat® (2006), são inibidores de HDAC (HDACi), que apresentam resultados promissores em relação ao índice de seletividade e toxicidade (MIRANDA FURTADO *et al.*, 2019).

Atualmente, diversos agentes de direcionamento epigenético estão sob investigação clínica para o tratamento de tumores hematológicos e sólidos. Por exemplo, os inibidores que têm como alvo KMT6A (EZH2), KMT4 (DOT1L) e PRMT5, KDM1A (LSD1) e proteínas BET, entraram-se em testes clínicos (CAO; YAN, 2020). Ademais, surgiram novas, incluindo o uso de microRNA, combinações de múltiplas drogas e imunoterapia, ajudando a melhorar o tratamento do câncer e reduzir a resistência aos medicamentos (MIRANDA FURTADO *et al.*, 2019).

É importante destacar que embora tenham ocorrido avanços recentes quanto ao melhor entendimento da participação de EHMT1 e EHMT2 no desenvolvimento, progressão de alguns tipos de câncer e com relação a tumorigênese, as informações relativas ao envolvimento dessas enzimas metiltransferases no câncer de pulmão e

principalmente para melanoma são extremamente escassas, denotando que ambos são cânceres com mau prognóstico que evoluem para metástase.

2. JUSTIFICATIVA

A epigenética desempenha um papel vital em vários processos biológicos, como no desenvolvimento embrionário, na fisiopatologia de doenças e na apoptose celular. Nos últimos anos, tem se buscado desenvolver compostos que possam induzir a remodelação epigenética de modo a combater o câncer, considerando que o desequilíbrio epigenético é uma característica conhecida na origem, no desenvolvimento e na gravidade dos tumores. Entre os cânceres agressivos, que não possuem tratamento eficaz e que evoluem rapidamente para câncer metastático estão o melanoma e o câncer de pulmão. Considerando a relevância dos processos epigenéticos no câncer e a dificuldade em encontrar tratamento adequado, prognóstico ruim e gravidade do câncer de pulmão e melanoma, avaliamos neste trabalho a ação do inibidor UNC0646, seletivo para as metiltransferases EHMT1 e EHMT2, em mecanismos de morte celular de linhagens humanas de melanoma e adenocarcinoma de pulmão.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito anticâncer do inibidor de EHMT1/EHMT2 UNC0646 em linhagens humanas de melanoma e adenocarcinoma de pulmão.

3.2 Objetivos específicos

-Investigar o efeito do inibidor de EHMT1/EHMT2 UNC0646 sobre a viabilidade/citotoxicidade celular em linhagens de melanoma e adenocarcionoma de pulmão.

-Utilizar as linhagens A549 e MeWo para investigar o efeito de UNC0646 se afeta mecanismos essenciais na carcinogênese como morte celular, capacidade migratória, proliferação celular, geração de EROs, permeabilidade de membrana mitocondrial, expressão de genes relacionados aos processos.

- Avaliação *in silico* da expressão de EHMT1 e EHMT2 em banco de dados de mRNA de pacientes com melanoma e adenocarcinoma de pulmão com relação à sobrevida e expressão de genes e processos enriquecidos.

4. METODOLOGIA

4.1 Cultivo Celular

Neste trabalho utilizamos células humanas de adenocarcinoma pulmonar (A549 e Calu-3), melanoma (MeWo, WM164, SK-MEL-28) e fibroblasto humano (hFib). As informações e principais características das linhagens foram obtidas no site da *American Type Culture Collection* (ATCC) (www.atcc.org) para A549, Calu-3, MeWo e SK-MEL-28, para a linhagem WM164 no site Rockland (www.rockland.com). Dentre as células de adenocarcinoma pulmonar, as células A549 são células epiteliais alveolares basais humana e foram derivadas do tecido de adenocarcinoma de um homem caucasiano de 58 anos em meados de 1972. As células epiteliais Calu-3 foram isoladas de tecido pulmonar derivado de um paciente de 25 anos com adenocarcinoma pulmonar. Em relação às células de melanoma maligno, a linhagem MeWo apresenta uma morfologia fibroblastóide e foram derivadas do nódulo linfático, um sítio metastático, de um homem caucasiano de 78 anos, em 1974. As células de melanoma WM164 foram isoladas de uma região em metástase no braço de um homem de 22 anos com melanoma de disseminação superficial em estágio IV. Esta linhagem celular apresenta a mutação específica no gene BRAF e morfologicamente as células são arredondadas e levemente aderentes. As células SK-MEL-28 são melanócitos que apresentam uma morfologia poligonal e foram isolados do tecido cutâneo de um paciente masculino de 51 anos com melanoma maligno. A célula hFib foi derivada de abdômen humano saudável e nos foi cedida pela Profa. Dra. Juliana Lott de Carvalho, da Faculdade de Medicina-UnB.

As linhagens MeWo, SK-MEL-28, WM164 e A549 foram cultivadas em meio RPMI1640 suplementado com 10% de Soro fetal bovino (SFB), 100 µg/mL

penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina. A linhagem Calu-3 e as células primárias hFib foram mantidas em meio DMEM (high glucose) com 10% de SFB e 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina. As células, em sua totalidade, foram mantidas em estufa incubadora úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

4.2 Viabilidade celular

O efeito de inibição das metiltransferases da família EHMT sobre a viabilidade/citotoxicidade das células hFib, MeWo, SK-MEL-28, WM164, Calu-3 e A549 foi investigado pelo ensaio de MTT (3- [4, 5- dimethylthiazol-2-yl] -2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich). Em uma placa de 96 poços foram semeadas separadamente 7×10^3 células em meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB. As células foram tratadas com concentrações crescentes do inibidor UNC0646 (Sigma-Aldrich) – 1 µM, 2 µM, 4 µM, 8 µM, 16 µM e 32 µM. Após adição do inibidor, as células permaneceram por 24 horas em incubadora a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Em seguida, foi adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL) aos poços e a placa foi submetida à incubação por 4 horas. Após esse período, o sobrenadante foi removido e foi adicionado 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço. A placa foi mantida em bandeja agitadora por 15 min para dissolver os cristais de formazan. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância na leitora de placas DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter) no comprimento de onda de 570 nm. Com base nos resultados obtidos no ensaio de MTT, estabelecemos por regressão linear, as concentrações do inibidor que reduziram a viabilidade celular em 25% (EC₂₅), 50% (EC₅₀) e 75% (EC₇₅) das células, utilizando o software prisma 7. Para os demais ensaios, utilizamos as linhagens A549 e MeWo como modelos de câncer de pulmão e pele.

4.3 Ensaio de apoptose por Anexina-V e Iodeto de Propídeo

Com as doses EC50 e EC75 do inibidor, avaliamos o efeito de UNC0646 sobre a apoptose celular. Para isso, cultivamos separadamente em placa de 12 poços, 7×10^4 células A549 e MeWo por poço, em meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB. Essas células foram tratadas com o EC50 e o EC75 de UNC0646 por 24 horas, paralelamente ao grupo controle (não tratado). Após esse período, as células foram dissociadas com Accutase (Gibco), recolhidas e lavadas com PBS gelado em centrifugação à 1100 rpm por 5 min. As células foram ressuspensas no tampão de ligação (10 mM de HEPES/NaOH pH 7,4, 140 mM de NaCl, 4 mM de KCl e 0,75 mM de $MgCl_2$) (TRAHTEMBERG *et al.*, 2007) e no momento da marcação com Anexina-V FITC (BD Bioscience), foi adicionado em cada amostra 1,06 mM de $CaCl_2$. Após a incubação, foi adicionado 200 μ L de PBS nas amostras e, antes da aquisição, as células foram marcadas com Iodeto de Propídio (Thermo Fisher) ao abrigo de luz. Logo em seguida, 10.000 eventos de cada condição foram adquiridos no citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience).

4.4 Liberação de Lactato Desidrogenase - LDH

A liberação de LDH foi determinada por uso do kit CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega), seguindo as instruções do fabricante. A liberação de LDH é determinada com base na conversão de um sal de tetrazólio em um produto formazan. Em suma, as células MeWo e A549 foram plaqueadas a uma densidade de 7×10^4 células por poço e, depois das células aderirem ao fundo do poço, o inibidor UNC0646 (EC50 e EC75) foi adicionado nas amostras. Após 24 h, 100 μ L do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços e adicionado de 50 μ L do reagente CytoTox-96. As células

foram, então, incubadas no escuro por 30 min à temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 50 µl da solução de parada. A absorbância foi determinada com um leitor de placas DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter) a 492 nm.

4.5 Avaliação da atividade de CASPASE 3/7

O kit Caspase-Glo® 3/7 Assay System (Promega) é um ensaio luminescente que mensura as atividades das caspases-3 e -7. As células MeWo e A549 foram plaqueadas a uma densidade de 20×10^3 células por poço, cultivadas em uma placa branca de 96 poços e expostas ao UNC0646 (EC50 e EC75) por 24 h. O kit Caspase-Glo 3/7 foi utilizado de acordo com as orientações do fabricante. Após o período de incubação, 100 µL do reagente Caspase-Glo 3/7 foi adicionado em cada amostra. Após agitação da placa entre 300-500 rpm durante 30 s, as amostras foram incubadas por 60 min, em temperatura ambiente no escuro. A luminescência foi medida no equipamento Multimode Plate Reader (PerkinElmer).

4.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A sonda Rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich) é um corante específico para a marcação mitocondrial em células vivas. Esta sonda foi utilizada para avaliação do potencial de membrana mitocondrial nas células. Em suma, 7×10^4 células foram tratadas por 24h com UNC0646 (EC50 e EC75) em placas de 12 poços. Após esse período, as células foram dissociadas com Accutase (Gibco), recolhidas e lavadas com PBS. Após esta etapa, o pellet de células foi marcado com Rodamina 123 (5 µg/ mL diluído em RPMI-1640 sem soro), por 20 min em temperatura ambiente e no escuro. Em seguida, foi feita a aquisição de 10.000 eventos por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD

Bioscience). Os resultados são apresentados em Mediana de Intensidade de fluorescência (MFI), obtidos após análise no software FlowJo 10.0.7 (FlowJo LLC).

4.7 Geração de espécies reativas de oxigênio

Avaliamos a geração de EROs pelas células expostas ao inibidor UNC0646 utilizando o reagente 2'7'- diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). O DCFH-DA é absorvido pelas células onde a esterase celular cliva a molécula resultando em DCFH. A oxidação por EROs converte DCFH em DCF, que emite sinal fluorescente (KIM; XUE, 2020). Primeiramente, 7×10^4 células de A549 ou MeWo foram tratadas com UNC0646 (EC50) por 24h em placa de 12 poços. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas delicadamente com PBS. Para a avaliação da produção de EROs, 5 μ M DCFH-DA em meio sem SFB foi adicionado nos poços e as células foram incubadas por 30 minutos, protegidas da luz em estufa úmida. Em seguida, as células foram obtidas por uso de Accutase (Gibco) e as suspensões celulares transferidas para tubos de citometria. Os tubos foram centrifugados à 1100 rpm por 5 min e o sobrenadante descartado. Em seguida, as células foram ressuspensas em PBS e 10.000 eventos de cada condição foram adquiridos no citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience).

4.8 Ensaio de migração - técnica de “wound scratch assay”

O protocolo de LIANG *et al.*, (2007) foi seguido para avaliar o potencial de migração. As células foram plaqueadas em placas de 6 poços, contendo 1745 μ L de meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB. Após as células atingirem aproximadamente 80% de confluência, foram feitas “arranhaduras” no fundo do poço com auxílio de

ponteira p200. Em seguida, foi retirado o meio dos poços e as células foram lavadas por 2 vezes com PBS. As doses EC25 e EC50 de UNC0646 foram realizadas e as culturas foram mantidas sem SFB. A migração celular foi acompanhada nos tempos 0, 24 h e 48 h em uma região determinada da “arranhadura”, com auxílio de uma máquina fotográfica. Por uso do ImageJ (*National Institutes of Health*) analisamos a área de migração, nos diferentes tempos do experimento.

4.9 Proliferação celular - CFSE

O impacto do UNC0646 sobre a proliferação celular foi investigado por uso de *Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester* (CFSE, Sigma-Aldrich), seguindo instruções do fabricante. O CFSE é um composto fluorescente que entra passivamente em células viáveis. Neste processo, a cada divisão celular uma célula divide seu conteúdo fluorescente para as células-filhas, de forma que cada geração fica com metade da fluorescência da geração anterior. Neste ensaio, as células previamente marcadas com 10 μ M de CFSE foram colocadas em cultura na concentração de 7×10^4 células por poço em placas de 12 poços. Após a adesão, as células receberam o tratamento com UNC0646 (EC25 e EC50). Após 24h e 48h de tratamento, as células foram dissociadas, coletadas e 10.000 eventos foram adquiridos no citômetro FACSCalibur (BD Bioscience). A análise dos dados foi feita por uso do software FlowJo 10.0.7 (FlowJo LLC).

4.10 Análise de ciclo celular

Para análise do ciclo celular foram cultivadas $1,75 \times 10^5$ células em uma placa de 6 poços, contendo meio RPMI-1640 suplementado com 10% SFB. As células foram tratadas com as doses de EC25 e EC50 de UNC0646 por 48 horas e cultivadas

paralelamente ao grupo controle. Após esse período, as células foram recolhidas dos respectivos poços, transferidas a tubo cônico tipo falcon e lavadas duas vezes com PBS. Após centrifugação a 2000 x g por 5 min, as amostras foram ressuspensas gota a gota com 5 mL de metanol gelado no vortex e fixadas em gelo por 30 min. Após a fixação, os tubos foram centrifugados a 2000 x g por 5 min e lavados com PBS. As células foram ressuspensas com 50 µL da solução de RNase (100 µg/mL) e incubadas por 15 min. Posteriormente, foi adicionado 400 µL da solução de Iodeto de Propídeo (50 µg/mL) e as amostras foram incubadas por 15 min ao abrigo de luz e em temperatura ambiente. Por fim, as células foram transferidas para tubos de citometria e adicionadas de 500 µL de PBS. A leitura foi realizada no citômetro FACSCalibur (BD Bioscience), após aquisição de 100.000 eventos.

4.11 Extração de RNA e transcrição reversa

Para a extração de RNA, $1,75 \times 10^5$ células foram cultivadas em uma placa de 6 poços contendo meio RPMI1640 suplementado com 10% SFB. As células foram tratadas com as doses de EC50 do UNC0646, por 24 horas. Dado o período de incubação, o RNA foi extraído pelo método de TRIZOL-LS (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A quantidade e a qualidade do RNA obtido foram verificadas no espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare) e a transcrição reversa das amostras foi realizada por uso do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher), no termociclador (BioRad), seguindo as orientações do fabricante.

4.12 PCR em tempo real

Por PCR em tempo real realizamos a análise quantitativa da expressão gênica (Tabela 2) usando a metodologia SYBR Green (Thermo Fisher) e o equipamento QuantStudio 1 (Thermo Fisher). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata e a análise da expressão gênica relativa ocorreu pela metodologia de $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001). Para normalização da amostra, as diferenças dos ciclos limiares (ΔC_t) foram obtidas pela diferença no valor C_t entre os genes alvo e o de referência interno (GAPDH). Os valores médios de C_t obtidos das linhagens sem tratamento foram usados como referência.

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados no estudo.

Gene	Sequência (5' – 3')
<i>GAPDH</i>	F-TCAACGACCACTTTGTCAAGCTCAGCT R-GGTGGTCCAGGGGTCTTAC
<i>GSDMD</i>	F-ATGAGGTGCCTCCACAACCTTCC R- CCAGTTCCTTGAGATGGTCTC
<i>CASP1</i>	F- AAGACCCGAGCTTTGATTGACTC R – AAATCTCTGCCGACTTTTGTTTCC
<i>CASP8</i>	F- GGATGGCCACTGTGAATAACTG R- TCGAGGACATCGCTCTCTCA
<i>CASP2</i>	F- ACAAAAAGTGGCAGTGTGCCT R- TCCTTGCTGGTCAACCTGA
<i>CASP3</i>	F – CTAGCGGATGGGTGCTATTG R – GATACACAGCCACAGGTATGAG
<i>P53</i>	F- AGAAAACCTACCAGGGCAGC R- ACATCTTGTTGAGGGCAGGG
<i>BAX</i>	F – CAGACCGTGACCATCTTTGT R – GCCTCAGCCCATCTTCTTC
<i>BAK</i>	F – GTTTTCCGCAGCTACGTTTTT R – GCAGAGGTAAGGTGACCATCTC
<i>BCL2</i>	F – CAAAGCTGCAGGCTGTTTAAG R - GTCTGTCTGTGTGTGTGATGT
<i>KI67</i>	F – TAACACCATCAGCAGGGAAAG R – CTGCACTGGAGTTCCTATAAA
<i>CXCR4</i>	CATCCTCATCCTGGCTTTCTT CACACCCTTGCTTGATGATTC
<i>CDK1</i>	F – CTTGGCTTCAAAGCTGGCTC R – GGGTATGGTAGATCCCGGCT
<i>CDK2</i>	F – CCAGGAGTTACTTCTATGCCTGA R – TTCATCCAGGGGAGGTACAAC
<i>EHMT1</i>	F- AGGATTGCTGTGTGAAAACCG R- CTCTGCTGAGCCTTCATCGG
<i>EHMT2</i>	F- AAGGAGCCACGAGGGGTGTCC R- AGCTGCACAGGGGCAACTCC
<i>NLRP1</i>	F – AAGGGGCAGGCCACTCTCCCTC R – TGAGGCAGAGATTTCTCTCCAG
<i>NLRP3</i>	F- TCCTCGGTACTCAGCACTAATCAG R- GGTGCGCCAGGTCATTGTTG
<i>IL-1B</i>	F- AGAAGTACCTGAGCTCGCCA R- TGTTTAGGGCCATCAGCTTCA

4.13 Análise *in silico*

4.13.1 cBioPortal

O cBioPortal (<https://www.cbioportal.org>) é um site que explora dados genômicos multidimensionais de câncer (CERAMI *et al.*, 2012). Usamos o portal para identificarmos GDEs, de acordo com a mediana de expressão de EHMT1 e EHMT2 em dados de sequenciamento de mRNA, como de Adenocarcinoma Pulmonar com amostras 586 pacientes (The Cancer Genome Atlas - TCGA, Firehose Legacy) e o de Melanoma Cutâneo com amostras de 480 pacientes (TCGA, Firehose Legacy). Estes dados disponíveis no cBioPortal do TCGA são fornecidos pelo Firehose do Instituto Broad (Broad GDAC Firehose, 2016; DENG *et al.*, 2016).

4.13.2 DAVID

A lista de genes enriquecidos pelas alterações de EHMT1 e EHMT2 nos dados encontrados no cBioPortal foram usados para análise funcional no banco de dados Anotação, Visualização, e Descoberta Integrada (DAVID; david.abcc.ncifcrf.gov), que fornece um conjunto de ferramentas de anotação funcional para grandes listas de genes (HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009).

4.13.1 OncoLnc

Os dados para a análise de sobrevivência dos genes EHMT1 e EHMT2 foram coletados do OncoLnc (<http://www.oncolnc.org/>). OncoLnc é uma ferramenta interativa para estudar correlações de sobrevivência com lncRNA, miRNA e mRNA do banco de dados do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA) (ANAYA., 2016).

4.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism 7 (GraphPad Software). O teste T foi utilizado para comparações numéricas entre dois grupos. Comparações incluindo mais grupos foram realizadas usando ANOVA. Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão e o limiar de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Expressão de EHMT1 e EHMT2 nas células MeWo, A549 e hFib

Avaliamos os níveis de expressão dos genes EHMT1 e EHMT2 nas células A549, MeWo e hFib. A expressão dos dois genes de interesse não apresentou diferença entre as linhagens e a célula controle (Figura 6A e B).

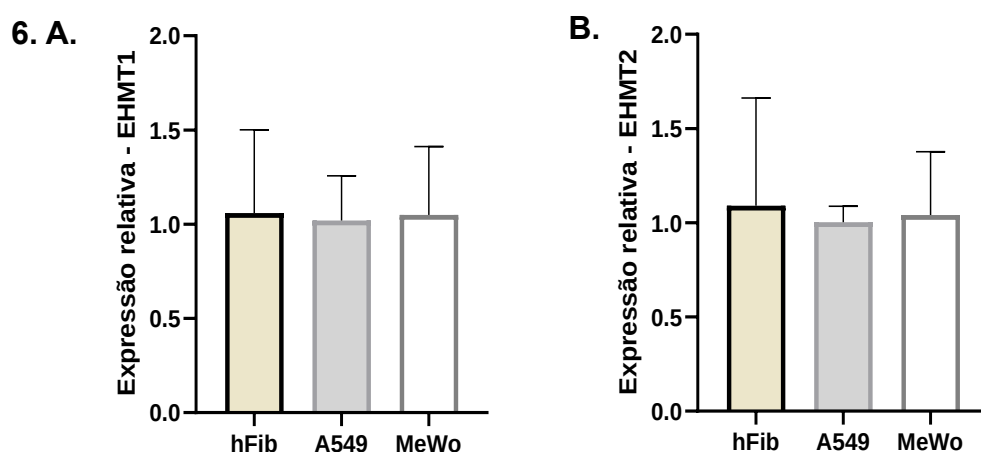


Figura 6. Expressão de EHMT1 e EHMT2 nas células hFib, A549 e MeWo. Entre as células investigadas não encontramos diferenças de expressão de EHMT1 (A) e EHMT2 (B). As reações foram realizadas em duplicatas e a expressão relativa foi obtida pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os dados representam média e desvio padrão, valor de $p > 0,05$.

5.2 Inibição de EHMT1/EHMT2 reduziu a viabilidade celular

Com propósito de investigar o papel de EHMT1 e EHMT2 sobre a viabilidade celular nas células MeWo, SK-MEL-28, WM164, A549, Calu-3 e hFib (controle), realizamos o ensaio de MTT. Após 24 horas de incubação, as células tratadas com inibidor apresentaram diminuição significativa da viabilidade celular de maneira dose dependente. A partir desses resultados, por regressão não linear, identificamos as doses EC25, EC50 e EC75 do UNC0646 (Figura 7). Para os demais experimentos funcionais,

serão apresentados os dados com as linhagens A549 e MeWo, como modelo de câncer de pulmão e pele, respectivamente.

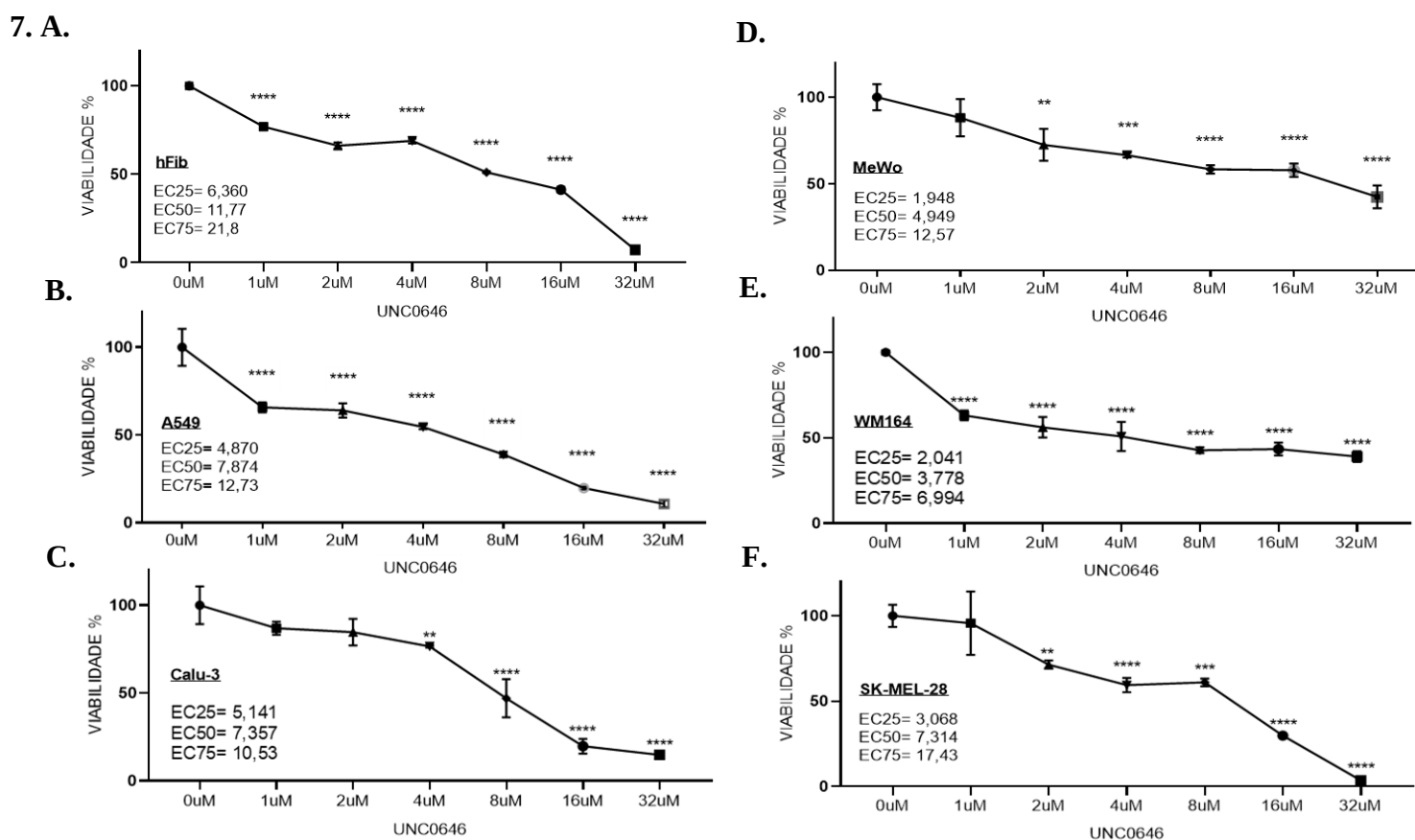


Figura 7. A inibição de EHMT1 e EHMT2 reduz a viabilidade celular das células. Resultados encontrados por espectrofotometria para as células hFib (A), A549 (B), Calu-3 (C), MeWo (D), WM164 (E) e SK-MEL-28 (F), tratadas por 24 horas com doses crescentes do inibidor UNC0646 (1, 2, 4, 8, 16 e 32 μ M). Estes dados são apresentados em porcentagem de viabilidade, junto com os valores de EC25, EC50 e EC75 (UNC0646). Todos os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão. ** significa $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.3 Inibição de EHMT1/EHMT2 induz apoptose nas linhagens A549 e MeWo

Com o objetivo de verificar o efeito da inibição de EHMT1/EHMT2 sobre a apoptose das células MeWo e A549, tratamos as linhagens por 24 horas com as doses de UNC0646, EC50 e de EC75. Após esse período, avaliamos por citometria de fluxo a ocorrência de apoptose inicial (Anexina-V+/IP-), apoptose tardia (Anexina-V+/IP+) e de apoptose total (Anexina-V+). Observamos que a inibição química dessas enzimas nas

células A549 resultou em um aumento de apoptose inicial ($p < 0,05$, EC50; $p < 0,0001$, EC75) e morte das células (apoptose total, $p < 0,001$ para EC50 e $p < 0,0001$ para EC75) (Figura 8). Na linhagem MeWo notamos aumento de morte celular (apoptose tardia, $p < 0,01$ no grupo com EC50 e $p < 0,0001$ para EC75) e presença de células com marcação IP+ ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$ para EC50 e EC75, respectivamente), Figura 9.

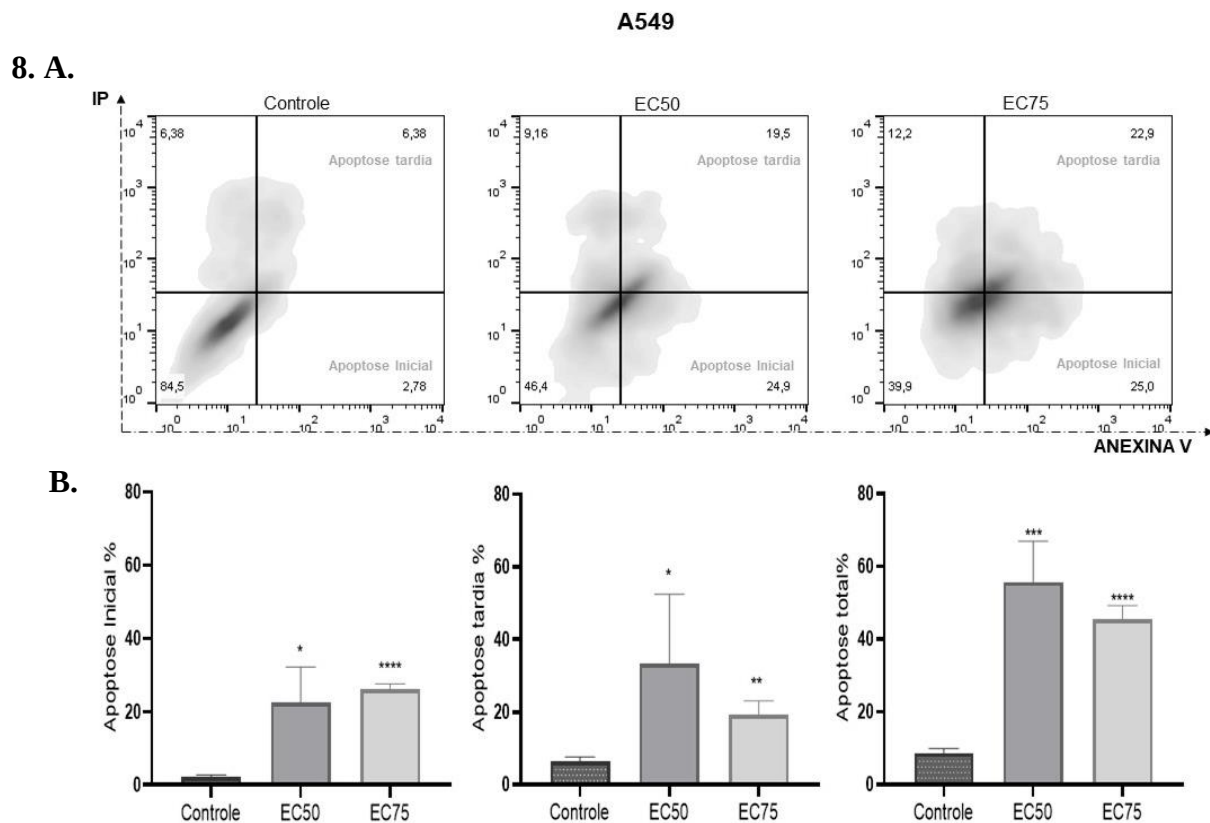


Figura 8. A inibição de EHMT1 e EHMT2 aumenta a apoptose na linhagem A549. (A) Gráficos de nuvem de citometria de fluxo representativos da marcação com Anexina-V/IP na célula A549, nos grupos controle e com as concentrações de UNC0646 de EC50 (7,876 μ M) e EC75 (12,73 μ M). (B) Por Gráficos de barras é possível observar que as concentrações de UNC induziram apoptose inicial e morte das células, em comparação com controle. Todos os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

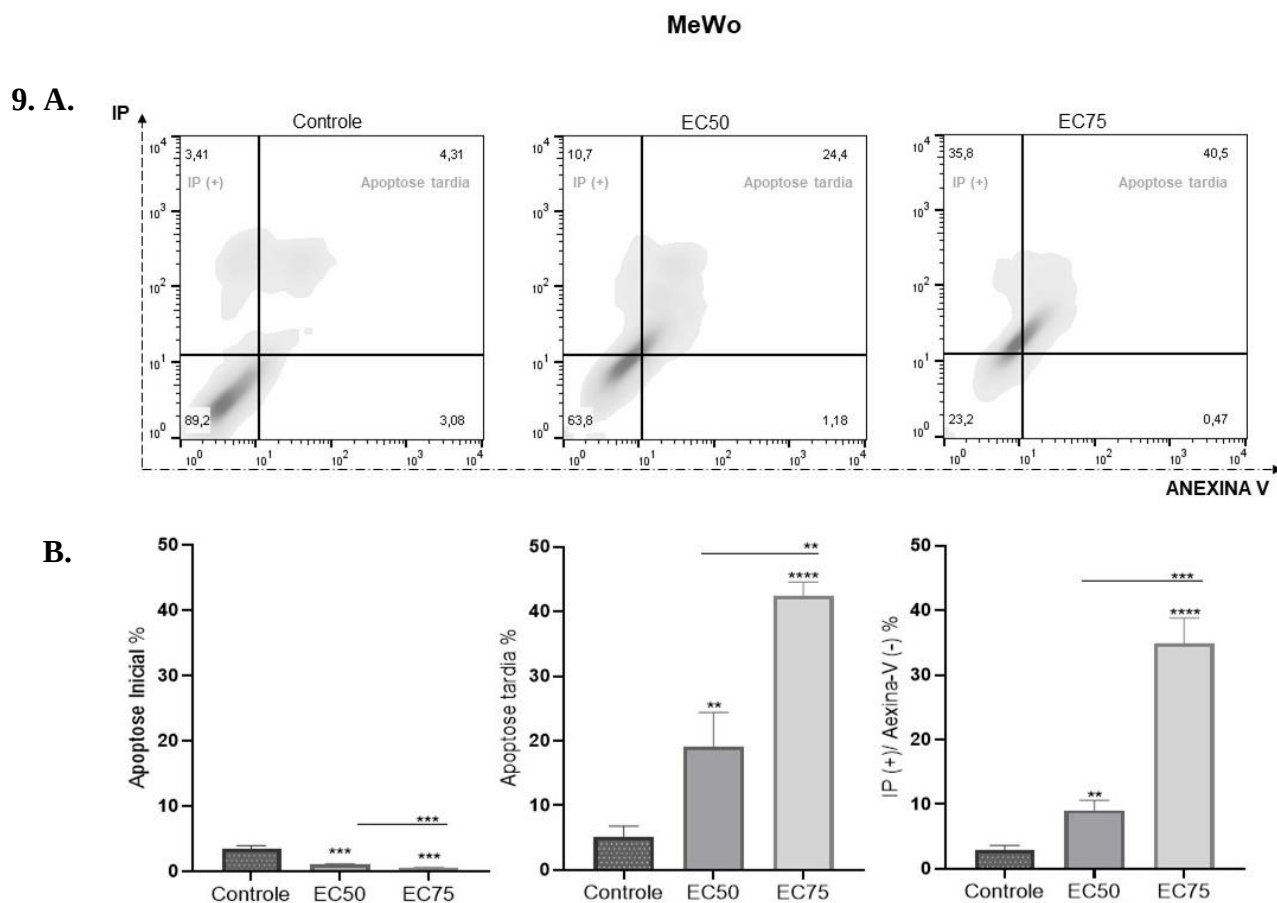


Figura 9. A inibição de EHMT1 e EHMT2 aumenta a apoptose na MeWo. (A) Gráficos de nuvem de citometria de fluxo representativos da marcação com Anexina-V/IP na célula MeWo, nos grupos controle, IC50 e IC75. (B) Por Gráficos de barras é possível observar que o inibidor induziu morte celular, em comparação com o grupo controle. Todos os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.4 Liberação de LDH nas linhagens MeWo e A549

Avaliamos a liberação de LDH pelas células utilizando o kit CytoTox-96. Após o tratamento com o inibidor UNC0646, nas concentrações de EC50 e EC75, observamos que a liberação de LDH nas linhagens MeWo ($p < 0,01$ e $< 0,0001$, respectivamente EC50 e EC75) e A549 ($p < 0,001$ e $< 0,01$ respectivamente EC50 e EC75) aumentou

significativamente em comparação ao grupo controle, sendo concordante com os achados de viabilidade e morte celular que foram apresentados previamente (Figura 10).

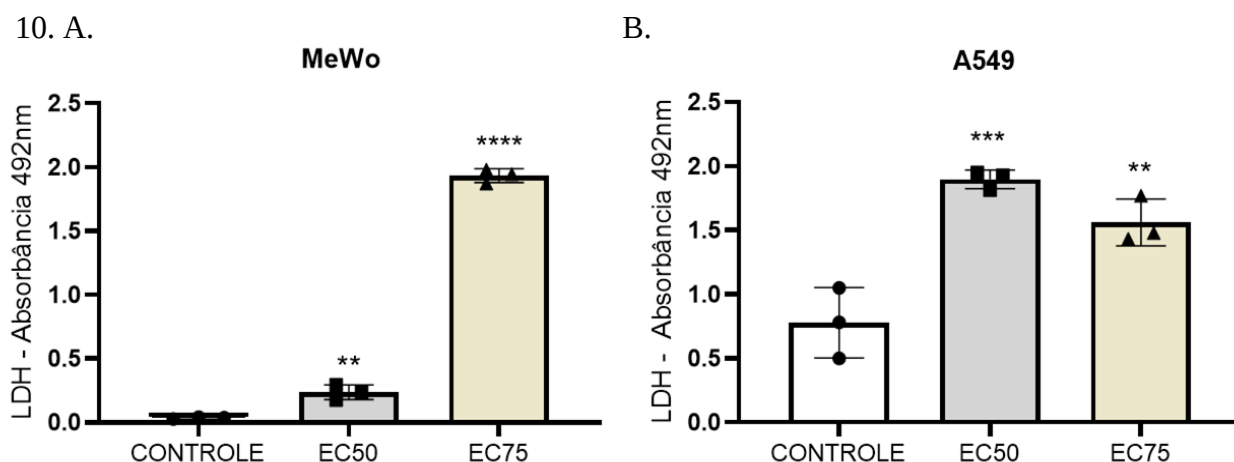
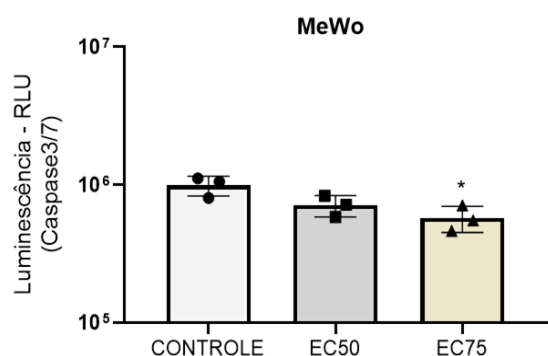


Figura 10. A inibição de EHMT1/EHMT2 induz liberação de LDH pelas linhagens Mewo e A549. Nos grupos tratados com o inibidor UNC0646 (EC50 e EC75) tanto na (A) MeWo e como na (B) A549 há aumento da liberação de LDH. Todos os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão. ** significa $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.5 Atividade das caspases 3/7 na célula A549

No ensaio de Anexina-V/IP, foi ressaltado que possivelmente há um mecanismo de morte celular distinto entre as células, sendo assim buscamos avaliar a influência de caspases-chaves envolvidas na apoptose celular. Na linhagem A549 observamos um aumento acentuado da atividade das caspase-3 e -7 no grupo tratado com EC75 ($p < 0,01$), em relação grupo controle (Figura 11). Contudo, na MeWo observamos um leve decréscimo na atividade dessas enzimas, ao comparar as células tratadas com EC75 e o controle ($p < 0,05$, Figura 11). Esses dados denotam que os mecanismos de morte celular induzida pela inibição de EHMT1/EHMT2 são distintos nas linhagens em estudo.

11. A.



B.

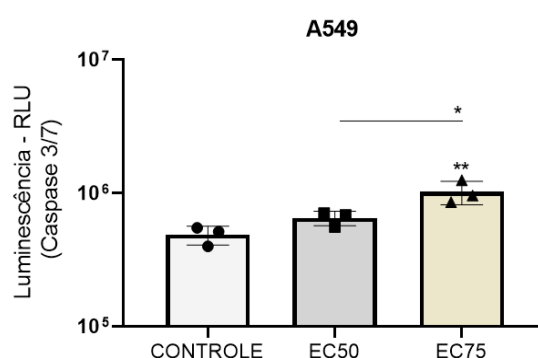
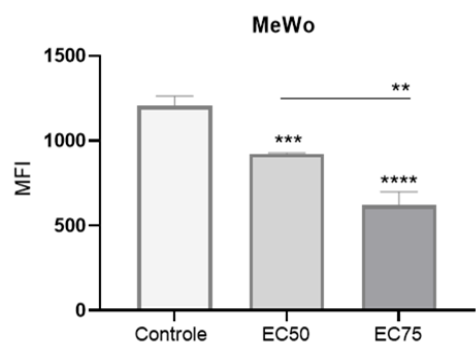


Figura 11. Atividade das caspases-3/7. (A) Na linhagem MeWo ocorreu diminuição da atividade das enzimas caspase 3/7 após 24h de tratamento com UNC0646 na concentração de EC75. (B) Na linhagem A549 houve aumento da atividade das enzimas na presença do inibidor, nas concentrações EC50 e EC75. Todos os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A disfunção mitocondrial foi avaliada no contexto do potencial elétrico de membrana, que é essencial para a respiração celular. O Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi medido usando a sonda fluorescente Rodamina-123. Como pode ser visto na Figura 12, as células MeWo tratadas com doses EC50 e EC75 apresentam diminuição do $\Delta\Psi_m$ comparadas ao grupo controle ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente). De modo similar, na linhagem A549 os grupos tratados com UNC0646 (EC50 e EC75) também mostraram redução do $\Delta\Psi_m$ em relação ao grupo controle ($p < 0,01$ para ambas as doses).

12. A.



B.

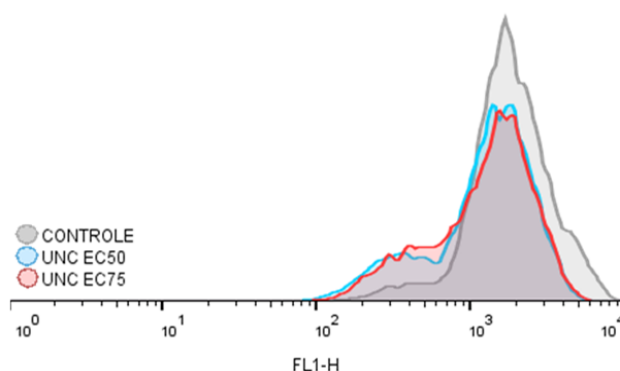
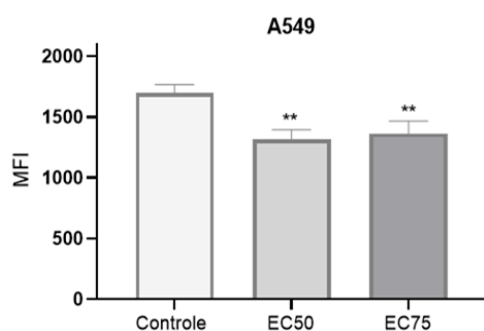
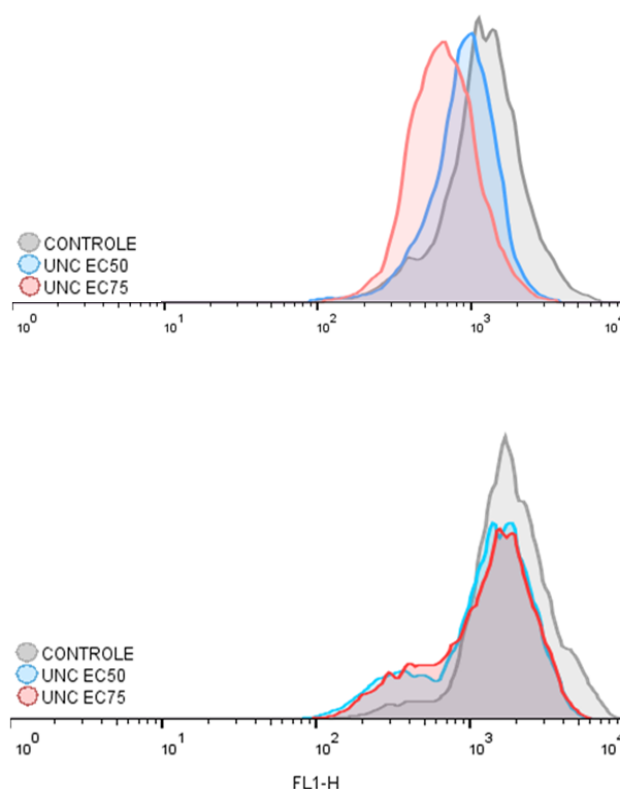
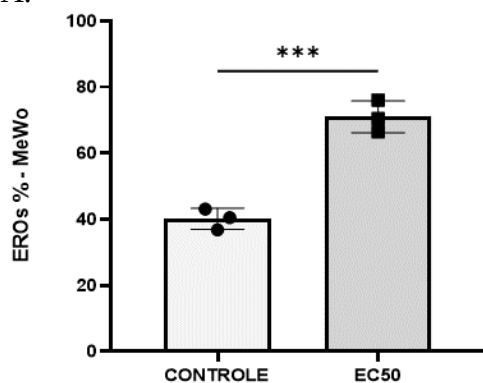


Figura 12. Análise do potencial membrana em células MeWo e A549 por citometria de fluxo utilizando marcador Rho 123. Os dados são apresentados em gráfico com Mediana de Intensidade de Fluorescência – MFI (A) e em histograma representativo da marcação com Rho123 (B). Na presença do inibidor de EHMT1/EHMT2 as células apresentaram diminuição do potencial membrana. ** significa $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.7 Produção de espécies reativas de oxigênio

O tratamento das linhagens MeWo ($P < 0,001$) e A549 ($P < 0,0001$) com as doses EC50 de UNC0646 induziu significativamente a geração de EROs. (Figura 13).

13.A.



B.

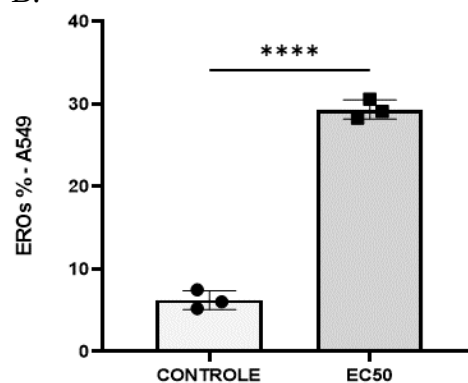


Figura 13. Metabolismo oxidativo das células MeWo e A549 na presença do inibidor UNC0646. O inibidor UNC0646 na dose EC50 foi capaz de induzir a geração de EROs nas linhagens MeWo (A) e A549 (B). No gráfico os valores são mostrados em porcentagem média de fluorescência. *** significa $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.8 Análise da migração celular pela técnica de “wound scratch assay”

Após 24h e 48h de tratamento, o inibidor UNC0646 foi capaz de reduzir a capacidade migratória na linhagem A549 na concentração de EC25 ($p < 0,05$, ambos os tempos) quando comparada ao controle (Figura 14A e B).

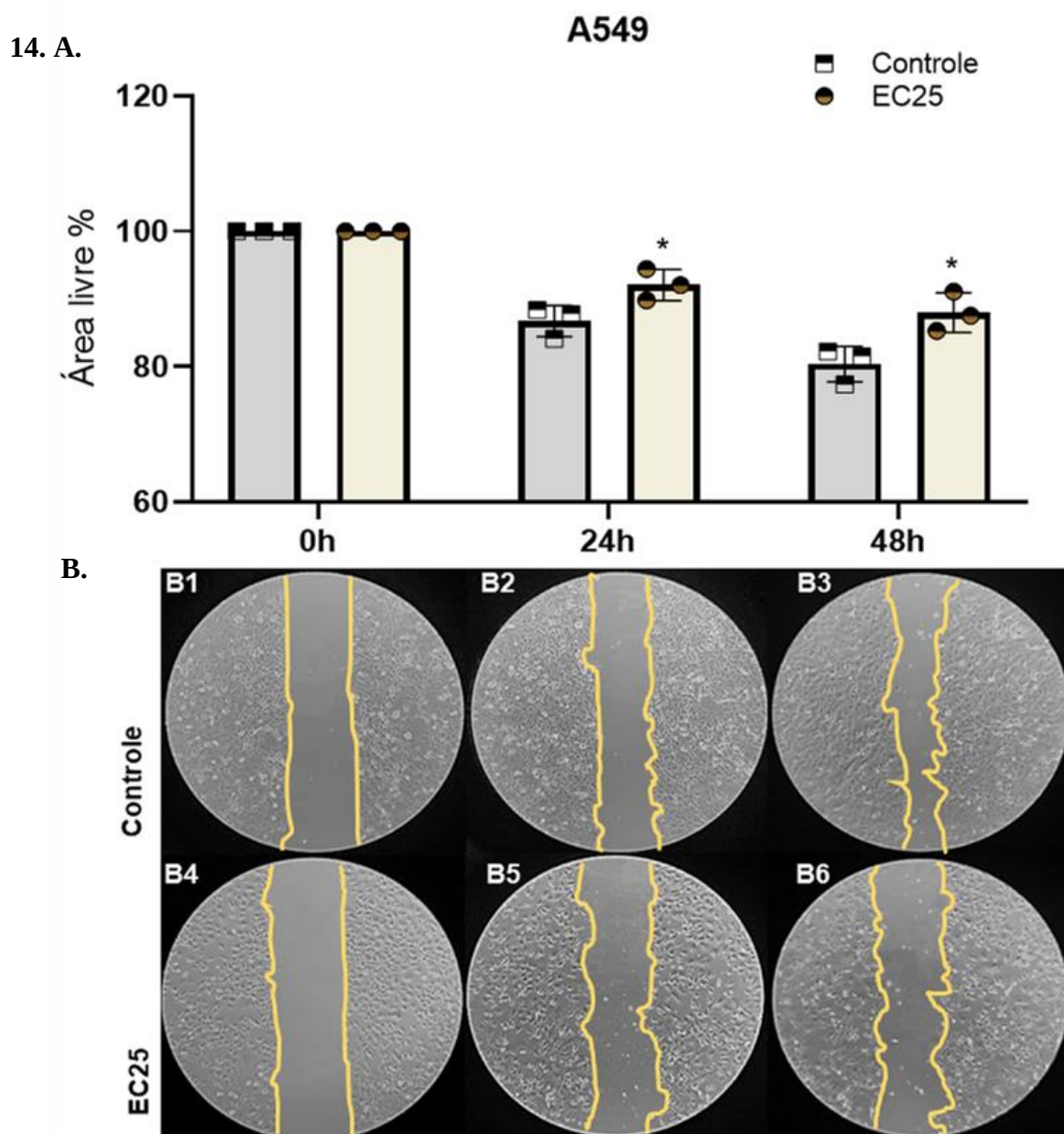


Figura 14. Migração das células A549. A) Porcentagem de área livre após a migração da célula em 48 horas. B) Migração da A549 no período de 0, 24 e 48 horas, respectivamente. B1, B2 e B3) Migração de controle (célula sem tratamento) nos tempos 0, 24 e 48 horas. B4, B5 e B6) Migração do grupo tratado com EC25 (UNC0646) nos tempos 0, 24 e 48 horas. * significa $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Ao contrário, na Mewo seguida de 24h e 48h de tratamento, o uso do inibidor não provocou diferença estatisticamente significativa na migração da linhagem em relação ao grupo controle (Figura 15). Deste modo, o resultado obtido com A549 é promissor, pois reforça que a inibição de EHMT1/EHMT2 inviabiliza a migração nessa linhagem, em que está intimamente correlacionada com processo de metástase em células tumorais.

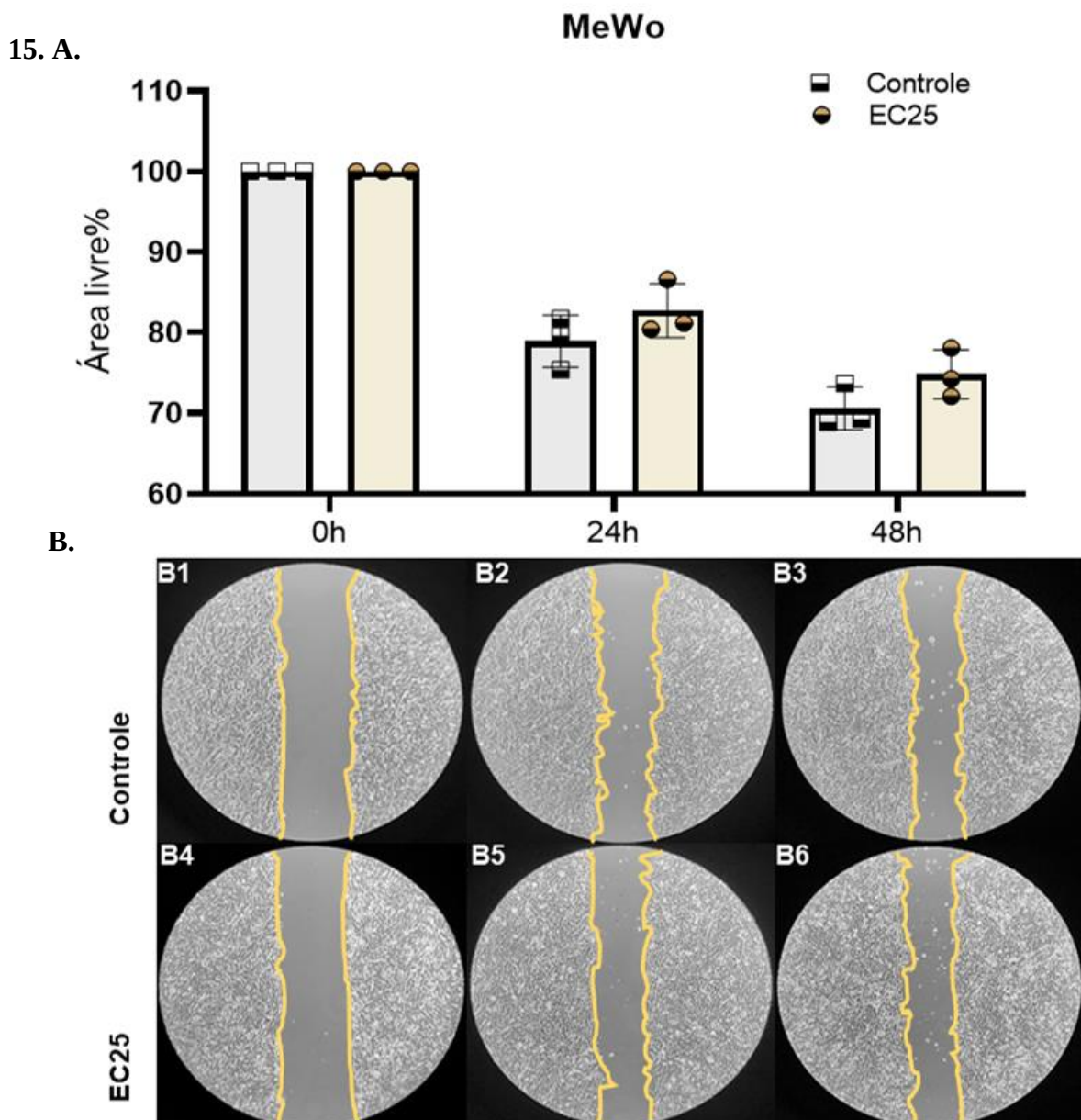
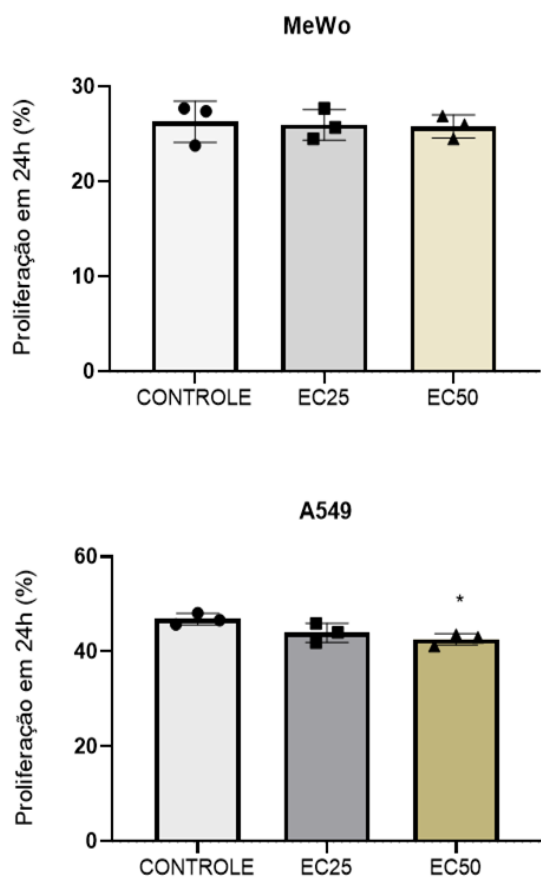


Figura 15. Migração das células MeWo. A) Porcentagem de área livre após a migração da célula 48 horas. Análise das imagens realizada no ImageJ. B) Migração da MeWo no período de 0, 24, e 48 horas, respectivamente. B1, B2 e B3) Migração do grupo controle (célula sem tratamento) nos tempos 0, 24, e 48 horas. B4, B5 e B6) Migração do grupo tratado com EC25 (UNC0646) nos tempos 0, 24, e 48 horas.

5.9 UNC0646 inibe a proliferação das células MeWo e A549

Por citometria de fluxo foi avaliado o impacto do inibidor de EHMT sobre proliferação nas linhagens com marcador CFSE. Na Figura 16 é possível notar o efeito na proliferação celular nas células cancerígenas pela ação do UNC0646 por 48h, nas doses EC25 e EC50, com redução da proliferação nas linhagens MeWo (EC25, $p < 0,001$; e EC50, $p < 0,0001$) e A549 (EC25 e EC50; $p < 0,0001$).

16. A.



B.

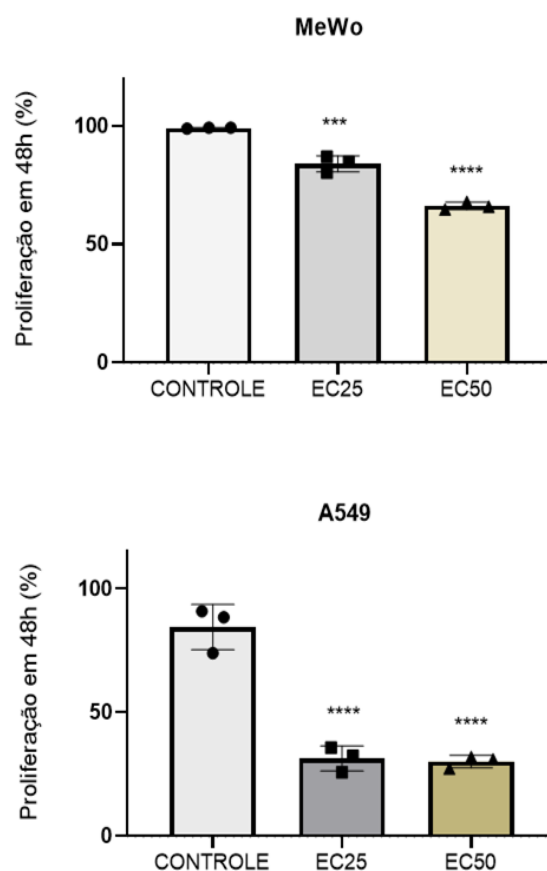


Figura 16. Inibição da proliferação celular nas células MeWo e A549. Ambas as células foram cultivadas por 24h (A) e 48h (B) com UNC0646 (EC25 e EC50), posteriormente, foi determinada a porcentagem de CFSE (proliferação). Os dados representam média e desvio padrão. * indica $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.10 Efeito de UNC0646 no ciclo celular nas linhagens MeWo e A549

Buscando entender se o inibidor de EHMT1/EHMT2 altera a progressão do ciclo celular na MeWo e A549, as células foram expostas ao marcador Iodeto de Propídeo. Na Figura 17, podemos observar que após 48h as doses do inibidor UNC0646 não alteraram significativamente nenhuma fase do ciclo celular nas duas linhagens. Entretanto, na MeWo há indicativo de aumento da fase G1 ($p=0,052$) e redução de G2 ($p = 0,055$).

17.

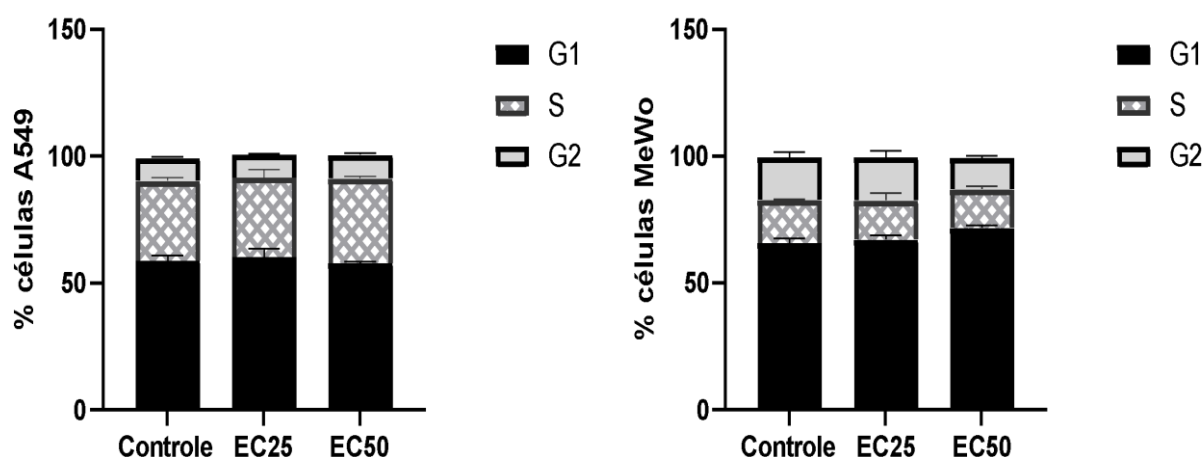


Figura 17. Efeito do inibidor UNC0646 sobre o ciclo celular nas células MeWo e A549. Análise das diferentes fases do ciclo celular pela variação da quantidade de DNA nas linhagens por citometria de fluxo. Os dados representam média e desvio padrão, valor de $p > 0,05$.

5.11 Expressão de genes relacionados à morte celular, migração e proliferação

Após observarmos morte celular, redução do potencial migratório e proliferativo nas células MeWo e A549, buscamos investigar a expressão de genes envolvidos nestes mecanismos (Figura 18 e 19). Para isso, tratamos as células com a concentração de EC50 de UNC0646, por 24 horas. Na célula A549 observamos que o nível de transcrição de

BCL2, *NLRP1*, *KI67*, *CDK1* e *CDK2* diminuíram significativamente no grupo tratado quando comparado com o grupo controle ($p= 0,04$, $p=0,01$, $p= 0,02$, $p=0,04$ e $p=0,03$, respectivamente) (Figura 18). A linhagem MeWo exposta a dose de EC50 apresentou um aumento significativo na expressão do gene *BAX* ($p=0,02$) e diminuição significativa de *BAK*, *BCL2* e *CDK1* ($p=0,04$, $p=0,03$, $p=0,03$ respectivamente) (Figura 19).

18.

A549

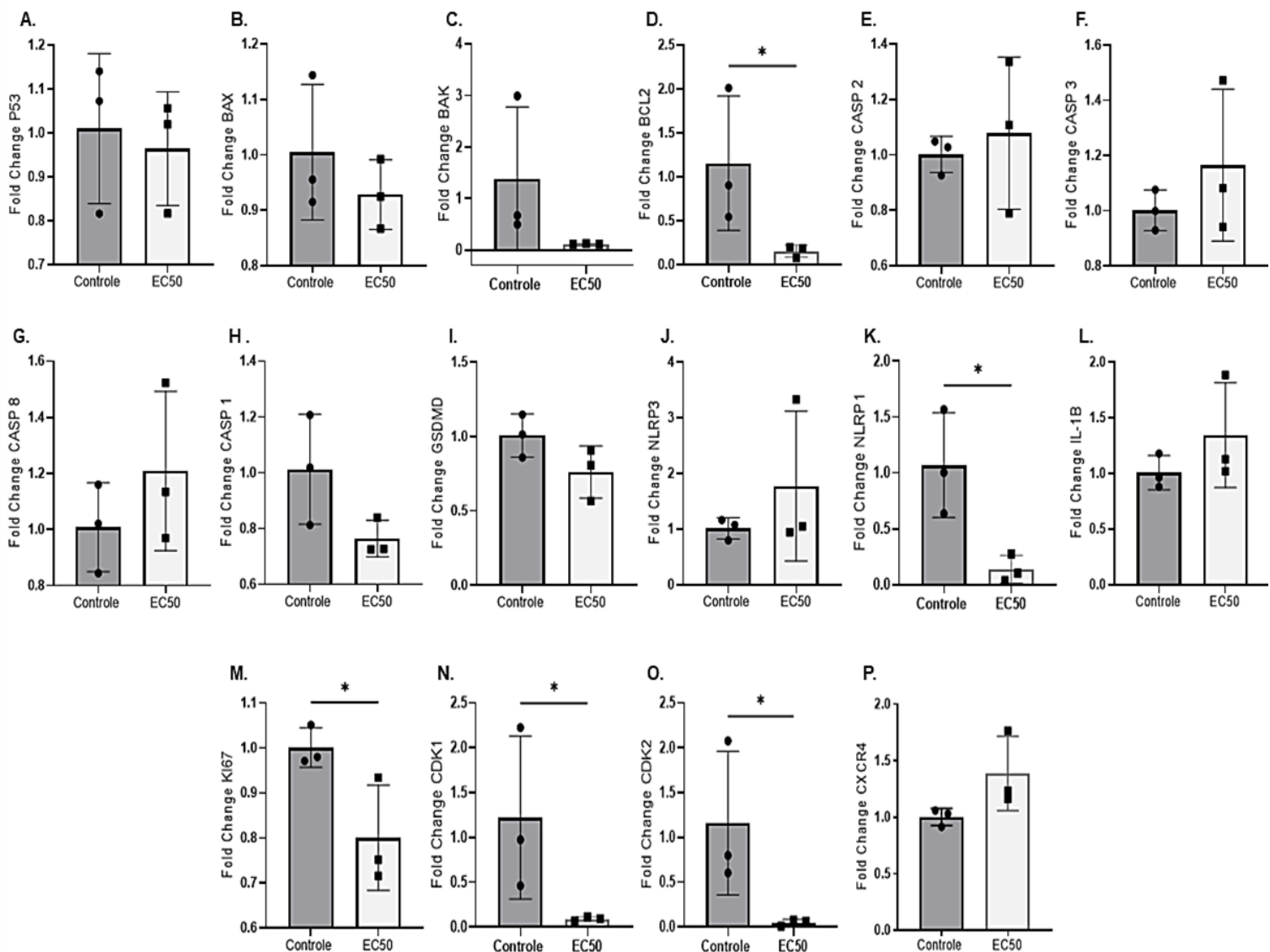


Figura 18. Inibição de EHMT1 e EHMT2 modifica a expressão de alguns genes na célula A549. A inibição dessas metiltransferases provocou diminuição significativa na expressão *BCL2* (D), *NLRP1*(K), *KI67*(M), *CDK1*(N) e *CDK2*(O). As reações foram realizadas em duplicatas e o valor relativo Fold Change

foi obtido pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os valores médios de Ct das amostras de A549 sem tratamento foram usados como referência. Todos os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão. * significa $p < 0,05$.

MeWo

19.

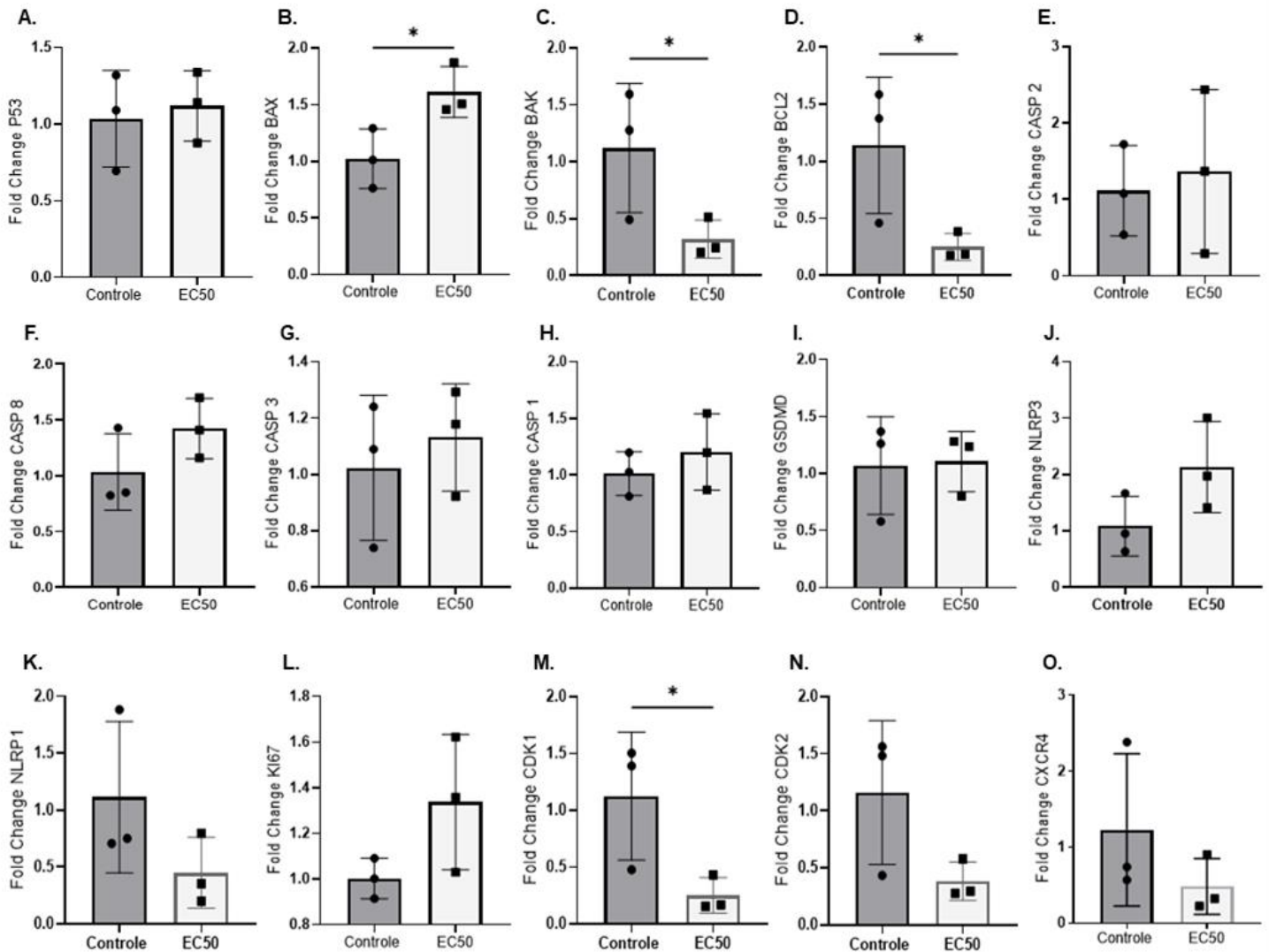


Figura 19. Expressão de genes envolvidos com apoptose e proliferação na linhagem MeWo. A inibição de EHMT1 e EHMT2 provocou aumento na expressão de BAX (J) e diminuição na transcrição de BAK®, BCL2(D) e CDK1(M). As reações foram realizadas em duplicatas e o valor relativo Fold Change foi obtido pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os valores médios de Ct das amostras de MeWo sem tratamento foram usados como referência. Todos os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão. * significa $p < 0,05$.

5.12 Análise in silico dos GDEs e processos biológicos enriquecidos em relação a expressão de EHMT1 e EHMT2 em amostras de câncer de pulmão e pele.

Utilizando os dados do cBioPortal, dicotomizamos as amostras dos bancos de Adenocarcinoma Pulmonar (AP) e Melanoma Cutâneo (MC) de acordo com a expressão mediana de expressão de EHMT1 e EHMT2. Ademais, com valor de p ajustado para $<0,05$, identificamos GDEs nos pacientes com AP. No total, 1618 GDEs foram identificados de acordo com a expressão diferencial de EHMT1 e (Figura 20A) e 3102 GDEs de EHMT2 (Figura 20C). Nas amostras dos pacientes com MC encontramos 2043 GDEs entre amostras com baixa e elevada expressão de EHMT1 (Figura 20B) e 4257 GDEs para EHMT2 (Figura 20D). Nos quadros suplementares (1-4) mostram os 20 principais GDEs, de acordo com a expressão de EHMT1 e EHMT2 nas amostras de pacientes com AP e MC.

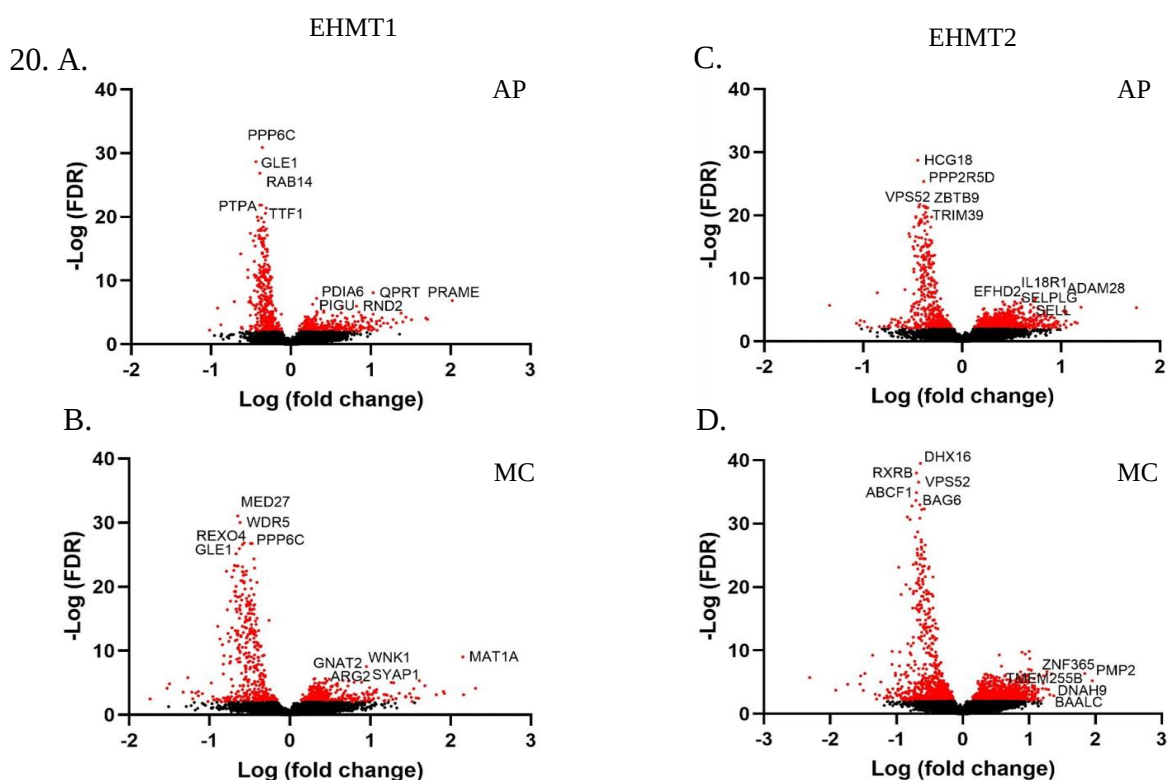


Figura 20. Genes diferencialmente expressos em amostras de Adenocarcinoma Pulmonar e Melanoma Cutâneo, de acordo com a expressão de EHMT1 e EHMT2. Gráficos de vulcão mostrando os GDEs em AP (A e C) e MC (B e D), de acordo com a expressão de EHMT1 e EHMT2. Genes com valor de “p” ajustado $< 0,05$ são destacados com pontos vermelhos.

A partir de GDEs, realizamos análise funcional de vias biológicas no banco de dados DAVID, Figura 21. A análise revelou que 12 vias biológicas foram enriquecidas em amostras de AP, de acordo com a expressão EHMT1 e 14 vias para EHMT2. Nas amostras de MC, 14 vias biológicas foram enriquecidas conforme a expressão EHMT1 e 17 vias para EHMT2. Entre os processos biológicos descritos, os mais relevantes nas amostras de AP identificados para EHMT1 foram reparo do DNA e dano ao DNA, já para EHMT2 apoptose e necrose. Nesse sentido, nas amostras de MC os processos biológicos identificados para EHMT1 foram ciclo celular e divisão celular. Para EHMT2 identificamos apoptose, necrose e regulação de crescimento celular. Sendo assim, esses processos biológicos afetados pela alteração da expressão de EHMT1 e EHMT2 encontrados na análise *in silico* nas amostras de adenocarcinoma pulmonar e melanoma cutâneo estão em linha, ao menos em parte, com nossos achados funcionais.

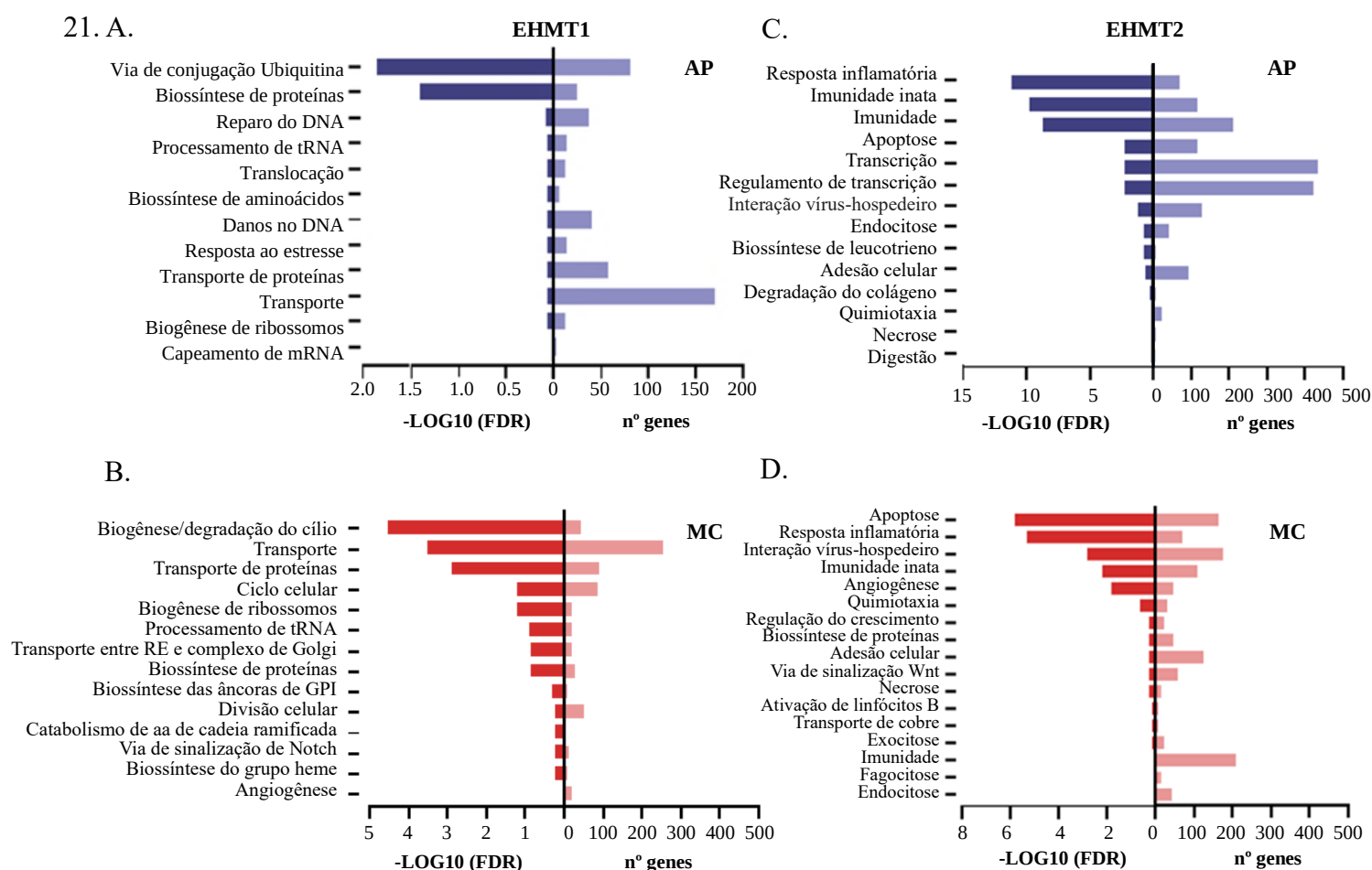


Figura 21. Principais processos biológicos encontrados na análise de DEGs nas amostras de Adenocarcinoma Pulmonar e Melanoma Cutâneo de acordo com a expressão de EHMT1 e EHMT2. Gráficos de barras mostrando os principais processos biológicos significativamente enriquecidos (log10 FDR) encontrados na análise de DEGs de acordo com a expressão de EHMT1 e EHMT2 nas amostras de AP e MC. Gene EHMT1 (A) AP e (B) MC; gene EHMT2 (C) AP e (D) MC.

5.13 Análise in sílico do papel de EHMT1 e EHMT2 no prognóstico e na sobrevida de pacientes com câncer de pulmão e pele.

Através da ferramenta OncoLnc foi avaliado o impacto dos genes EHMT1 e EHMT2 na sobrevida de pacientes com Adenocarcinoma pulmonar (AP) e Melanoma cutâneo (MC). A análise da expressão de EHMT1 e EHMT2 nos pacientes com AP (n=246) e MC (n=229) não apresentou impacto significativo na sobrevida global dos pacientes (para EHMT1, $p=0,7$ para AP e $p=0,1$ para MC; para EHMT2, $p=0,3$ para AP; $p=0,07$, para MC; Figura 22).

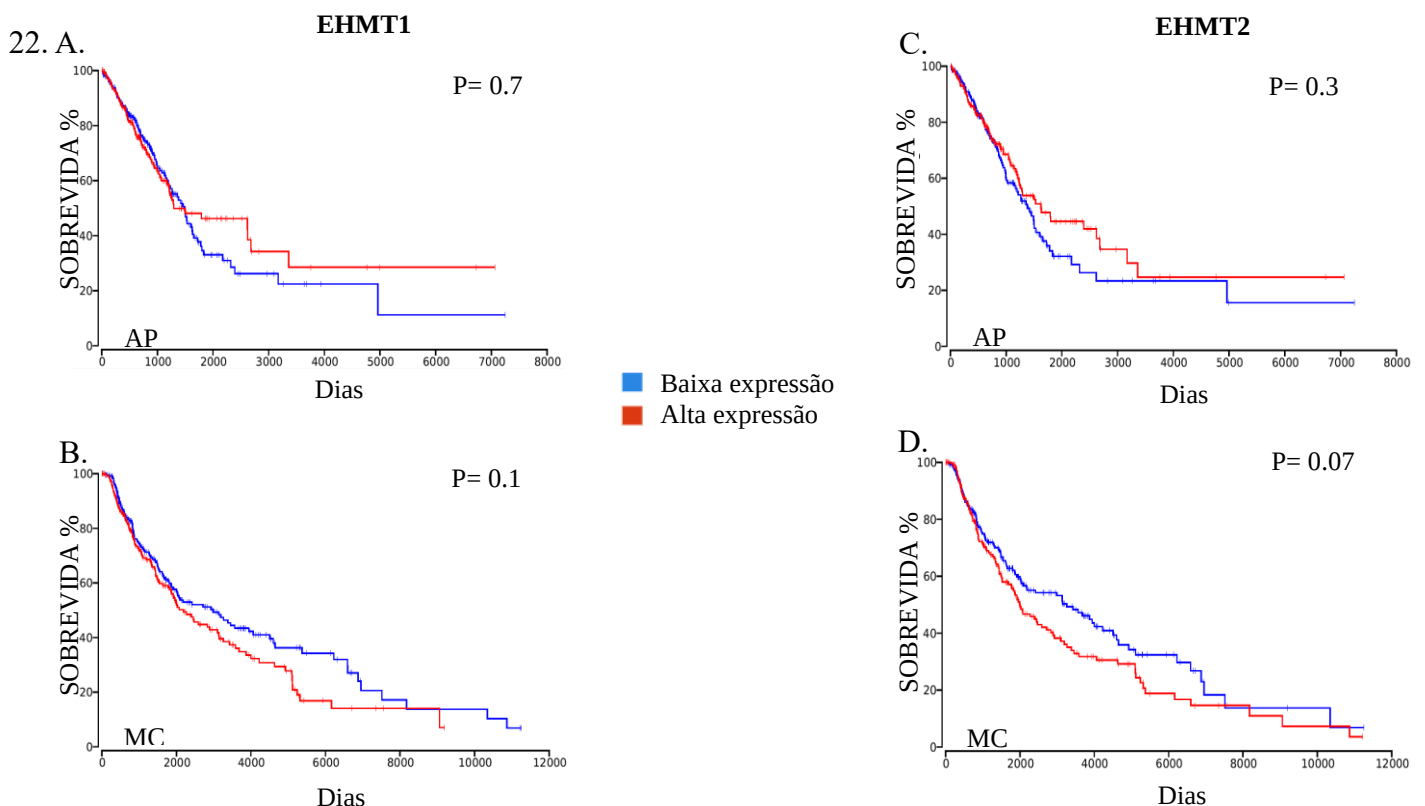


Figura 22. Dados do OncoLnc de sobrevida de pacientes com Adenocarcinoma Pulmonar e Melanoma Cutâneo em relação aos genes alvo. Os resultados mostraram que a diferença de expressão de EHMT1/EHMT2 não impactaram na sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão ou melanoma. Gene EHMT1 (A) AP e (B) MC; gene EHMT2 (C) AP e (D) MC.

6. DISCUSSÃO

Embora o câncer seja comumente considerado uma doença que surge principalmente do acúmulo de mutações genéticas, atualmente sabe-se que as alterações na modificação do DNA e das histonas contribuem para o início e a progressão do câncer. (CASCIELLO *et al.*, 2015). O envolvimento do EHMT2 na biologia do câncer é provavelmente devido ao seu papel fundamental na proliferação, sobrevivência e metástase das células tumorais, principalmente pelo controle de vários processos de transcrição (POULARD *et al.*, 2021). Níveis mais elevados de EHMT2 estão associados ao aumento da metilação que inibe a expressão de genes supressores de tumor, provavelmente resultando em fenótipos mais agressivos, com invasão e metástase (HUA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2021). A expressão de EHMT1 encontra-se elevada em câncer gástrico e na leucemia linfocítica crônica, além de apresentar impacto prognóstico em pacientes com essas patologias (ALVES-SILVA *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018). Neste trabalho, realizamos a inibição dessas enzimas metiltransferases em linhagem de melanoma cutâneo e adenocarcinoma pulmonar humano e identificamos que esse processo interfere na saúde mitocondrial das linhagens estudadas, culminando com morte celular. Além disso, a inibição de EHMT1/EHMT2 inibiu a migração na célula A549 e proliferação celular das linhagens MeWo e A549.

A apoptose ou morte celular programada é uma forma natural de remover células envelhecidas do corpo e células malignas. No entanto, no câncer, a sinalização apoptótica desregulada com ativação de sistemas antiapoptóticos permite que as células cancerígenas escapem desse programa, levando à proliferação descontrolada, resultando na sobrevivência do tumor, resistência terapêutica e recorrência do câncer (MOHAMMAD *et al.*, 2015). O trabalho de YUE-PENG *et al.* (2019) mostrou que a inibição de

EHMT1/EHMT2 por RNAi foi capaz de induzir apoptose em linhagens de câncer de bexiga. No carcinoma hepatocelular humano foi observado que o *knockdown* de EHMT2 reduziu os níveis de H3K9me2 e prejudicou o crescimento das células de carcinoma hepatocelular (YOKOYAMA *et al.*, 2017). Em nosso estudo, não identificamos diferença no nível transcricional de *EHMT1* e *EHMT2* nas linhagens MeWo e A549, quando comparadas com hFib. Em contrapartida, utilizando o inibidor UNC0646, as doses mais baixas afetaram a viabilidade celular principalmente nas células cancerígenas. Todavia em doses maiores, as células saudáveis foram afetadas consideravelmente, sendo assim, posteriormente o que pode ser avaliado é a forma de entrega da droga em estudo de sistema farmacotécnico.

Nas células MeWo e A549 além afetar a viabilidade notamos também aumento de atividade de LDH nos sobrenadantes. Similarmente ao observado, o trabalho DE SMEDT *et al.* (2021) mostrou que os inibidores de EHMT1/EHMT2, BIX01294 e UNC0638 reduziram a viabilidade e o crescimento das células do mieloma múltiplo (MM). Além de promover a apoptose de linhagens de MM humanas e murinas. Um trabalho do nosso grupo de pesquisa também demonstrou que a inibição de EHMT1/EHMT2 por UNC0646 diminuiu a viabilidade em células Jurkat de leucemia linfóide aguda, além de morte das células acompanhada pelo aumento da expressão de *P53*, *TP73*, *BAX* e *MDM4* (CARVALHO *et al.*, 2020).

Os achados já abordados mostram que a inibição de EHMT1/EHMT2 por UNC0646 induz a morte celular de ambas as linhagens, A549 e MeWo, e os nossos resultados por marcação com Anexina-V/IP validam os achados obtidos por MTT, apesar de EC75 do UNC0646 apresentar uma porcentagem menor na apoptose tardia, é possível verificar que ambas as doses levam a morte celular. Além disso, a disfunção mitocondrial e produção de EROs causada pelo UNC0646, corroboram estes resultados, considerando

que as mitocôndrias normalmente têm um papel central na morte celular apoptótica. Classicamente, durante apoptose há permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) o que leva uma célula à morte, que envolve a liberação do citocromo *c* da mitocôndria e ativação das caspases. Todavia, novas descobertas mostram ação das mitocôndrias em outros processos, incluindo necroptose, ferroptose e piroptose (BOCK; TAIT, 2020). As EROs são produzidas como resultado do metabolismo intracelular normal nas mitocôndrias, retículo endoplasmático e peroxissomos na célula, bem como de diferentes sistemas enzimáticos citosólicos. Quando as EROs permanecem em concentrações ótimas e em equilíbrio homeostático, elas podem atuar como segundos mensageiros, contribuindo para o controle de diversas funções celulares, como sobrevivência, crescimento ou diferenciação celular e regulação da sinalização celular. Por outro lado, quando a homeostase é comprometida há danos celulares levando à morte celular, devido à diminuição da atividade antioxidante ou altas quantidades de EROs (KAJARABILLE; LATUNDE-DADA, 2019). As EROs também desempenham funções importantes na indução de diferentes tipos de morte celular como na apoptose, ferroptose e necroptose (VILLALPANDO-RODRIGUEZ; GIBSON, 2021).

Em estudos *in vitro*, os estágios finais de apoptose podem causar alterações morfológicas características de necrose (necrose secundária), pois normalmente, não há a presença de células fagocíticas para fazer a remoção dessas células ou dos seus fragmentos. De acordo com a última publicação do Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (CNMC) (2018), foi salientado que o mecanismo de apoptose induzido por fármacos ou compostos em análise não fisiologicamente, deve ser usado o termo “morte celular regulada” para morte celular que envolve diferentes tipos, entre elas apoptose intrínseca e extrínseca, necroptose e piroptose (GALLUZZI *et al.*, 2018). Deste modo,

esses resultados de morte denotam que o processo de morte celular que envolve a inibição por UNC0646 é diferente na linhagem de melanoma e adenocarcinoma.

Neste sentido, buscamos entender melhor o processo de morte celular apresentada pela célula A549, após ação do inibidor UNC0646. Notamos aumento na atividade de caspases-3/7 e diminuição de *BCL2* no perfil transcricional. A proteína BCL-2 faz parte da via intrínseca e tem ação antiapoptótica (PISTRITTO *et al.*, 2016). De encontro aos nossos resultados, um trabalho mostrou que o inibidor UNC0642 induziu a apoptose em linhagens de câncer de bexiga, associado com níveis de expressão de marcadores de apoptose, caspase-3 clivada e PARP clivada (CAO, Y *et al.*, 2019). O trabalho CUI *et al.* (2015) demonstrou que a inibição de EHMT2 foi capaz ativar a via das caspases no câncer de bexiga. Sendo assim sugestivo para que o processo de morte celular regulada pela ação do UNC0646 na célula A549, possivelmente, seja apoptose intrínseca ou extrínseca, em que as vias convergem na ativação das caspase-3, 6 e 7 (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008; ROGERS *et al.*, 2017).

O mecanismo de morte envolvido na célula MeWo pela ação do inibidor UNC0646, provavelmente é diferente do observado na A549. Na linhagem MeWo há diminuição da atividade das caspases 3/7 e aumento de marcação de Iodeto de Propídio. No perfil transcricional, aumento de *BAX* e diminuição *BAK* e *BCL2*. No entanto, alguns trabalhos como com inibidor BIX-01294 na Leucemia Linfoblástica Aguda de células T mostrou que a inibição de EHMT2 induz a apoptose celular e regula positivamente a expressão de *BAX* e *CASP3* (HUANG Y *et al.*, 2017). Em outro estudo com o inibidor BIX-01294 também mostra que há regulação positiva de proteínas relacionadas à apoptose, *BAX* e *CASP3* no Linfoma de Células do Manto (WANG *et al.*, 2022). Sendo assim, os possíveis mecanismos de morte celular regulada pelo efeito da inibição de EHMT1/EHMT2 na célula MeWo diferem de outros modelos celulares, em que não

envolve a via intrínseca da apoptose. A morte celular apoptótica pela via intrínseca depende necessariamente de vários processos, como a ativação das caspases, regulação de proteínas antiapoptóticas como BCL-2 e pró-apoptóticas, entre elas BAK e BAX (HAFEZI; RAHMANI, 2021). Portanto, outros mecanismos não avaliados, como necroptose, piroptose ou necrose podem estar envolvidos na célula MeWo após inibição de EHMT1/EHMT2.

A migração e invasão do câncer no tecido circundante, em vasos sanguíneos e linfáticos, são um passo importante no processo de metástase, permitindo assim que as células cancerígenas colonizem órgãos distantes (DUFF; LONG, 2017). As interações célula-célula e a adesão celular estão entre os mediadores da progressão do câncer, por facilitar evasão imune e disseminação metastática (LÄUBLI; BORSIG, 2019). Além da quimiotaxia que pode favorecer a cascata metastática (KEDRIN, *et al.* 2007), é o fenômeno pelo qual o movimento das células é direcionado em resposta a um gradiente químico extracelular (ROUSSOS; CONDEELIS; PATSIALOU, 2011). Sendo assim, observamos que na célula MeWo o potencial migratório não foi afetado pela inibição de EHMT1/EHMT2. No entanto, na linhagem A549 verificamos um declínio no nível migratório das células tratadas com inibidor, o que pode indicar um efeito contra o potencial metastático das células. Na análise *in silico* em relação aos mecanismos biológicos é importante destacar que a quimiotaxia (*CCL5* e *RNASE2*) e adesão celular (*ADAM23*, *COL16A1*, *MYBPC*) são afetados pelo enriquecimento dos GDEs no adenocarcinoma pulmonar pela baixa expressão de EHMT2. Sendo possível supor com esta análise, que a inibição de EHMT1/EHMT2 pode levar a redução da quimiotaxia e adesão destas linhagens, desfavorecendo o potencial metastático. Similarmente, ao que foi abordado ZHANG *et al.* (2022) mostrou que o composto cinobufagina possivelmente inibiu a expressão EHMT2, o que suprimiu a proliferação, migração, invasão celular e

promoveu apoptose em células A549. No trabalho de HUANG T *et al.* (2017) como já citado, a inibição farmacológica EHMT2 suprimiu o crescimento de células tumorais, formação de colônias, invasão e migração em CPCNP. O *knockdown* de EHMT2 mediado por RNAi em células de câncer de pulmão altamente invasivas mostrou a inibição da migração e a invasão *in vitro* e a metástase *in vivo* (CHEN *et al.*, 2010).

Outra característica estudada no câncer é a capacidade de sustentar a proliferação não programada. O processo normal de divisão celular ocorre por meio do ciclo celular, geralmente dividido nas fases G0/G1, S, G2 e M, regulado por diferentes ciclinas específicas que atuam em associação com quinases dependentes de ciclina (CDKs) (INGHAM; SCHWARTZ, 2017; ZHENG *et al.*, 2019). CDK2 em complexo com ciclina E ou ciclina A, é necessário para iniciação e progressão através da fase S, aumenta à medida que as células progridem para as fases S e G2; enquanto CDK1 em complexo com ciclina A ou ciclina B é necessário para que ocorra a mitose (DITANO; SAKURIKAR; EASTMAN, 2021). Outros fatores envolvidos no ciclo celular, entre eles as separases, são proteases semelhantes às caspases evolutivamente conservadas, desempenhando um papel crucial na regulação do ciclo celular, pois executam a separação das cromátides irmãs na transição da metáfase para a anáfase (MOSCHOU; BOZHKOV., 2012). Além disso, uma proteína nuclear de vertebrados expressa em todas as células em proliferação, é o KI67, um biomarcador amplamente utilizado para estimar a proporção de células em divisão para classificar tumores (CUZICK *et al.*, 2011).

A inibição de EHMT1/EHMT2 na A549 no processo de proliferação celular levou ao decréscimo da expressão de KI67, CDK1 e CDK2 e à redução nos níveis do potencial proliferativo das células. Na MeWo encontramos diminuição da expressão de CDK1, com redução da proliferação no ensaio funcional, alteração no ciclo celular com indicativo de

elevação da fase G1 e diminuição da fase G2, fortalecendo os demais dados com possível parada do ciclo em G1. Convergingo com este achado, um trabalho com inibidor do ciclo celular mostrou inibição da proliferação de células de carcinoma hepático humano, através da indução da paragem da fase G0/G1, regulação negativa de CDK2, CDK4 e CDK6, seguida de morte celular apoptótica (HAN *et al.*, 2012). Em relação a progressão do ciclo celular na célula A549, não observamos alteração. No entanto, no trabalho de KUMADA *et al.* (2006), em camundongos foi destacado que a presença de cromossomos não segregados em células deficientes em separase não parece causar defeitos adicionais nos eventos de progressão do ciclo celular, como a replicação do DNA ou a duplicação do centrôssomo. Sendo assim, na ausência de separase o ciclo celular parece não ser afetada, o que pode ocorrer neste caso da A549, justificando os demais dados. Ou então, nesta linhagem seja necessário utilizar outra técnica, como a marcação de BrdU por citometria fluxo que é mais sensível para estimar a progressão ciclo celular. A análise bivariada do conteúdo de DNA celular versus a presença de BrdU fornece informações sobre a cinética da progressão do ciclo celular, permitindo medir a duração do ciclo celular e o comprimento de fases individuais do ciclo celular (TERRY; WHITER, 2001).

Alguns trabalhos reforçam os achados abordados de proliferação celular nas linhagens, exemplificando FLOTHO *et al.* (2009) demonstrou que os inibidores de metiltransferases bloqueiam a proliferação celular e desencadeiam a apoptose. CHAE *et al.* (2019) por sua vez mostrou que a inibição da metilação de FOXO1 mediada por EHMT2 pode regular a proliferação celular e apoptose. Ademais, outros dois trabalhos com câncer de mama reforçam esses achados, LIU *et al.* (2018) mostrou que o inibidor UNC0638 inibiu a proliferação celular em linhagem de células de câncer de mama. Já no outro foi destacado que a inibição de EHMT2 reduziu a expressão de TBX2, que inibiu a proliferação de células tumorais (CRAWFORD *et al.* 2019).

Por fim, na análise *in silico*, no que se refere aos mecanismos biológicos enriquecidos pelos GDEs de acordo com a alteração da expressão de EHMT1/EHMT2 nos bancos de dados dos cânceres de pele e pulmão, mostraram que alguns processos são afetados. Encontramos nas amostras de AP e MC principalmente para baixa expressão de EHMT2, alteração nos reguladores de apoptose e necrose. Entre os genes mais expressos nos reguladores de apoptose estão sobretudo os marcadores proapoptóticos nas amostras com baixa expressão de EHMT2, como *TP63*, *RIPK*, *RIPK3*, *NFKB*, *CASP1*, *CASP8*, *BCL10* e *BAX* para AP. Nas amostras de MC identificamos *BCL10*, *BAX*, *FAZ*, *NFKB1*, *RIPK3*, *TP73*, *CASP10*, *CASP5*, *CASP7*, *CASP8* e *CASP9*. Dentre os reguladores necróticos mais expressos nas amostras AP com baixa expressão de EHMT2 estão *NLRP1*, *CARD8*, *GSDME*, *MLKL*, *RIPK1* e *RIPK3*. Em MC identificamos *NLRP1*, *CASP4*, *GSDMB*, *GSDME*, *MLKL* e *RIPK3*. Estes resultados ressaltam os demais achados de morte nas células MeWo e A549 e nossos dados de expressão gênica, em que identificamos nas células MeWo e A549 inibição da transcrição de *BCL2* e expressão elevada de *BAX* na linhagem MeWo. A estratificação das amostras de acordo com a expressão de EHMT1 levou ao enriquecimento de mecanismos relacionados ao reparo do DNA e dano ao DNA para as amostras de pacientes com AP, ciclo celular e divisão celular nas amostras de MC. Fortalecendo assim, mais uma vez, todos os nossos dados, em importância o processo de morte e proliferação celular.

Na análise *in silico* de sobrevida dos pacientes com melanoma cutâneo e adenocarcinoma pulmonar, a alteração na expressão de EHMT1 e EHMT2 não afetou a sobrevida dos pacientes. Em contrapartida, alguns trabalhos em pacientes com câncer de mama, câncer de pulmão, câncer gástrico e câncer de esôfago associaram altos níveis de expressão de EHMT2 ao mau prognóstico e menor sobrevida dos pacientes (CHEN *et al.*, 2010; ZHONG *et al.*, 2015; YIN *et al.*, 2019; CASCIELLO *et al.*, 2020). Embora não

exista relação direta da expressão diferencial dessas enzimas EHMT1 e EHMT2 na sobrevida dos pacientes com esses cânceres, nossos dados indicam que EHMT1/EHMT2 atuam no processo de tumorigênese.

Deste modo, a inibição de EHMT1/EHMT2 pelo inibidor químico UNC0646 mostrou que afeta de forma acentuada a viabilidade celular de diferentes linhagens de melanoma e adenocarcinoma pulmonar. Além disso, nas células A549 e MeWo o efeito de UNC0646 levou a disfunção mitocondrial e produção de EROs, liberação de LDH e alteração da caspase-3/7 (A549). Identificamos também diminuição de proliferação celular na linhagem A549 e MeWo e inibição da migração celular nas células A549. Em conjunto, esses dados mostram a relevância de EHMT1/EHMT2 no processo carcinogênico dos modelos em estudo.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O foco do estudo centrou-se em averiguar alguns processos afetados na carcinogênese, em que obtivemos resultados promissores para viabilidade, morte, proliferação e migração celular encontrados pela inibição de EHMT1 e EHMT2 por meio do uso do inibidor químico UNC0646, tanto nas células de melanoma como em células de adenocarcinoma pulmonar. Considerando os resultados obtidos, seria relevante investigações mais aprofundadas, de modo a fornecer um melhor entendimento dos mecanismos afetados nesses modelos de câncer. Entre as possíveis investigações, seria interessante avaliação por outras metodologias na divisão celular e ciclo celular, aprofundar nas investigações com outras linhagens, direcionamento para avaliação de marcadores de necroptose, piroptose e/ou necrose nas células MeWo. Em adição, estudos de sistema farmacotécnico para entrega da droga sem causar consideráveis efeitos adversos para as células saudáveis e avaliação do efeito da inibição de EHMT1 e EHMT2 em modelos *ex vivo* e *in vivo*. Estes possíveis avanços podem direcionar no futuro para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas voltadas para histonas metiltransferases no adenocarcinoma de pulmão, melanoma maligno e possivelmente em outros cânceres.

8. REFERÊNCIAS

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

ANAYA, Jordan. OncoLnc: linking TCGA survival data to mRNAs, miRNAs, and lncRNAs. **PeerJ Computer Science**, v. 2, p. e67, 2016.

AUDIA, James E.; CAMPBELL, Robert M. Histone Modifications and Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives on Biology**, v. 8, n. 4, p. a019521, 2016.

BALCH, Charles M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **Journal of clinical oncology**, v. 27, n. 36, p. 6199, 2009.

BANNISTER, Andrew J.; KOUZARIDES, Tony. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Search**, v. 21, n. 3, p. 381-395, 2011.

BASLAN, Timour; HICKS, James. Unravelling biology and shifting paradigms in cancer with single-cell sequencing. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 9, p. 557-569, 2017.

BOCK, Florian J.; TAIT, Stephen WG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 2, p. 85-100, 2020.

BRAMBILLA, Christian et al. Lung squamous cell carcinomas with basaloid histology represent a specific molecular entity. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 22, p. 5777-5786, 2014.

Broad GDAC Firehose. TCGA data. 2016. Disponível: <
<https://gdac.broadinstitute.org/>>. Acessado em 25 de julho de 2023.

CAO, Hao et al. Recent progress in histone methyltransferase (G9a) inhibitors as anticancer agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 179, p. 537-546, 2019.

CAO, Jian; YAN, Qin. Cancer epigenetics, tumor immunity, and immunotherapy. **Trends in cancer**, v. 6, n. 7, p. 580-592, 2020.

CAO, Yue-peng et al. Inhibition of G9a by a small molecule inhibitor, UNC0642, induces apoptosis of human bladder cancer cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, n. 8, p. 1076-1084, 2019.

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

CASCIELLO, Francesco et al. G9a-mediated repression of CDH10 in hypoxia enhances breast tumour cell motility and associates with poor survival outcome. **Theranostics**, v. 10, n. 10, p. 4515, 2020.

CATAKOVIC, Kemal et al. T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy. **Cell communication and signaling**, v. 15, n. 1, p. 1-16 de 2017.

CERAMI, Ethan et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. **Cancer discovery**, v. 2, n. 5, p. 401-404, 2012.

CHAE, Yun-Cheol et al. FOXO1 degradation via G9a-mediated methylation promotes cell proliferation in colon cancer. **Nucleic acids research**, v. 47, n. 4, p. 1692-1705, 2019.

CHANG, Yanqi et al. Structural basis for G9a-like protein lysine methyltransferase inhibition by BIX-01294. **Nature structural & molecular biology**, v. 16, n. 3, p. 312-317, 2009.

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

CHOPRA, Asmita; SHARMA, Rohit; RAO, Uma NM. Pathology of melanoma. **Surgical Clinics**, v. 100, n. 1, p. 43-59, 2020.

CRAWFORD, Nyree T. et al. TBX2 interacts with heterochromatin protein 1 to recruit a novel repression complex to EGR1-targeted promoters to drive the proliferation of breast cancer cells. **Oncogene**, v. 38, n. 31, p. 5971-5986, 2019.

CREE, Ian A. Cancer biology. **Cancer Cell Culture**, p. 1-11, 2011.

CUZICK, Jack et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 32, p. 4273-4278, 2011.

DAVIS, Lauren E.; SHALIN, Sara C.; TACKETT, Alan J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer biology & therapy**, v. 20, n. 11, p. 1366-1379, 2019.

DAWSON, Mark A.; KOUZARIDES, Tony. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 12-27, 2012.

DE SMEDT, Eva et al. G9a/GLP targeting in MM promotes autophagy-associated apoptosis and boosts proteasome inhibitor-mediated cell death. **Blood advances**, v. 5, n. 9, p. 2325-2338, 2021.

DE SOUSA, Vitor ML.; CARVALHO, Lina. Heterogeneity in Lung Cancer. **Pathobiology**, v. 85, n. 1-2, p. 96-107, 2018.

DENG, Mario et al. Web-TCGA: an online platform for integrated analysis of molecular cancer data sets. **BMC bioinformatics**, v. 17, p. 1-7, 2016.

DITANO, Jennifer P.; SAKURIKAR, Nandini; EASTMAN, Alan. Activation of CDC25A phosphatase is limited by CDK2/cyclin A-mediated feedback inhibition. **Cell Cycle**, v. 20, n. 13, p. 1308-1319, 2021.

DUFF, Deirdre; LONG, Aideen. Roles for RACK1 in cancer cell migration and invasion. **Cellular signalling**, v. 35, p. 250-255, 2017.

ELDER, David E. et al. The 2018 World Health Organization classification of cutaneous, mucosal, and uveal melanoma: detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 144, n. 4, p. 500-522, 2020.

FISCHER, Kari R. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. **Nature**, v. 527, n. 7579, p. 472-476, 2015.

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

GALLUZZI, Lorenzo et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.

Genetic Engineering & Biotechnology News (GEN). What is epigenetics: Histone Modifications. 2023. Disponível em: < <https://www.whatisepigenetics.com/histone-modifications/>> Acesso: 05 de setembro de 2023.

GEORGE, Dean. D.; ARMENIO, Vicente. A.; KATZ, Steven. C. Combinatorial immunotherapy for melanoma. **Cancer gene therapy**, v. 24, n. 3, p. 141-147, 2017.

GERSHENWALD, Jeffrey E. et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual Joint Committee on Cancer. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 6, p. 472-492, 2017.

HAFEZI, Shirin; RAHMANI, Mohamed. Targeting BCL-2 in cancer: advances, challenges, and perspectives. **Cancers**, v. 13, n. 6, p. 1292, 2021

HAN, Yuanyuan et al. SKLB70326, a novel small-molecule inhibitor of cell-cycle progression, induces G0/G1 phase arrest and apoptosis in human hepatic carcinoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 421, n. 4, p. 684-689, 2012.

HC Marbella International Hospital. ABCDE Melanoma. 2020. Disponível em: <<https://www.hcmarbella.com/en/abcde-melanoma/>>. Acesso no dia 21 dezembro de 2020.

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

HUANG, Da Wei; SHERMAN, Brad T.; LEMPICKI, Richard A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009.

HUANG, Ruixia; ROFSTAD, Einar K. Integrins as therapeutic targets in the organ-specific metastasis of human malignant melanoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 1-14, 2018.

HUANG, Tianhao et al. G9A promotes tumor cell growth and invasion by silencing CASP1 in non-small-cell lung cancer cells. **Cell death & disease**, v. 8, n. 4, p. e2726-e2726, 2017.

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

INGHAM, Matthew; SCHWARTZ, Gary K. Cell-cycle therapeutics come of age. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 25, p. 2949, 2017.

Instituto Nacional do Câncer - INCA. Câncer de pele melanoma. 2021a. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>. Acesso: 02 outubro de 2021.

Instituto Nacional do Câncer - INCA. Câncer de pulmão. 2021b. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pulmao>>. Acesso: 10 novembro de 2021.

Instituto Nacional do Câncer - INCA. O que é o câncer? 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso: 02 outubro de 2021.

JAMBHEKAR, Ashwini; DHALL, Abhinav; SHI, Yang. Roles and regulation of histone methylation in animal development. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 20, n. 10, p. 625-641, 2019.

KAJARABILLE, Naroa; LATUNDE-DADA, Gladys O. Programmed cell-death by ferroptosis: antioxidants as mitigators. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 19, p. 4968, 2019.

KEDRIN, Dmitriy et al. Cell motility and cytoskeletal regulation in invasion and metastasis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, v. 12, p. 143-152, 2007.

KIM, Hyeoncheol; XUE, Xiang. Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate staining. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 160, p. e60682, 2020.

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

KNUDSON, C. Michael; BROWN, Nicholas M. Mitochondria potential, bax “activation,” and programmed cell death. **Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols**, p. 95-108, 2008.

KOZOVSKA, Zuzana.; GABRISOVA, Veronika.; KUCEROVA, Lucia. Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells. **Neoplasma**, v. 63, n. 4, p. 510-517, 2016.

KUMADA, Kazuki et al. The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase. **The Journal of cell biology**, v. 172, n. 6, p. 835-846, 2006.

LATIMER, Kelly M. Lung Cancer: Clinical Presentation and Diagnostics. **FP Essentials**, v. 464, p. 23-26, 2018.

LÄUBLI, Heinz; BORSIG, Lubor. Altered cell adhesion and glycosylation promote cancer immune suppression and metastasis. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2120, 2019.

LEE, Carrie et al. Historical review of melanoma treatment and outcomes. **Clinics in dermatology**, v. 31, n. 2, p. 141-147, 2013.

LEMJABBAR-ALAOUI, Hassan et al. Lung cancer: Biology and treatment options. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Reviews on Cancer**, v. 1856, n. 2, p. 189-210, 2015.

LEONARDI, Giulia C. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy. **International journal of oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071-1080, 2018.

LEWIS, Denise Riedel et al. US lung cancer trends by histologic type. **Cancer**, v. 120, n. 18, p. 2883-2892, 2014.

LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

LIU, Feng et al. Discovery of an in vivo chemical probe of the lysine methyltransferases G9a and GLP. **Journal of medicinal chemistry**, v. 56, n. 21, p. 8931-8942, 2013.

LIU, Feng et al. Optimization of cellular activity of G9a inhibitors 7-aminoalkoxy-quinazolines. **Journal of medicinal chemistry**, v. 54, n. 17, p. 6139-6150, 2011.

LIU, Xiang-Rong et al. UNC0638, a G9a inhibitor, suppresses epithelial mesenchymal transition mediated cellular migration and invasion in triple negative breast cancer. **Molecular medicine reports**, v. 17, n. 2, p. 2239-2244, 2018.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

Mayo Foundation for Medical Education and Research (MFMER). Where skin cancer develops. 2023. Disponível em: <<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/skin-cancer/multimedia/where-skin-cancer-develops/img-20007623> > Acesso: 03 de janeiro de 2023.

MIRANDA FURTADO, Cristiana L. et al. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. **Epigenetics**, v. 14, n. 12, p. 1164-1176, 2019.

MOHAMMAD, Ramzi M. et al. Amplo direcionamento de resistência à apoptose no câncer. In: **Seminários em biologia do câncer**. Academic Press, 2015. p. S78-S103.

MOSCHOU, Panagiotis N.; BOZHKOVA, Peter V. Separases: bioquímica e função. **Fisiologia Plantarum**, v. 145, n. 1, pág. 67-76, 2012.

O'NEILL, Conor H.; SCOGGINS, Charles R. Melanoma. **Journal of surgical oncology**, v. 120, n. 5, p. 873-881, 2019.

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

PISTRITTO, Giuseppa et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging (albania NY)**, v. 8, n. 4, p. 603, 2016.

PLANCHARD, David; LE PÉCHOUX, Cécile. Small cell lung cancer: new clinical recommendations and current status of biomarker assessment. **European Journal of Cancer**, v. 47, p. S272-S283, 2011.

POULARD, Coralie et al. Structure, Activity, and Function of the Protein Lysine Methyltransferase G9a. **Life**, v. 11, n. 10, p. 1082, 2021.

PRIETO, Peter A. et al. CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 7, p. 2039-2047, 2012.

RAHMAN, Ziaur et al. Targeting H3K9 methyltransferase G9a and its related molecule GLP as a potential therapeutic strategy for cancer. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 3, p. e22674, 2021.

RAHMAN, Ziaur et al. Targeting H3K9 methyltransferase G9a and its related molecule GLP as a potential therapeutic strategy for cancer. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 3, p. 22674, 2021.

RASTRELLI, Marco et al. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In vivo**, v. 28, n. 6, p. 1005-1011, 2014.

READ, Jazlyn; WADT, Karin AW.; HAYWARD, Nicholas K. Melanoma genetics. **Journal of medical genetics**, v. 53, n. 1, p. 1-14, 2016.

REBECCA, Vito W.; SONDAK, Vernon K.; SMALLEY, Keiran SM. A brief history of melanoma: from mummies to mutations. **Melanoma research**, v. 22, n. 2, p. 114, 2012.

RIGEL, Darrell S. et al. ABCDE an evolving concept in the early detection of melanoma. **Archives of dermatology**, v. 141, n. 8, p. 1032-1034, 2005.

ROGERS, Corey et al. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2017.

ROUSSOS, Evanthia T.; CONDEELIS, John S.; PATSIALOU, Antonia. Chemotaxis in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 8, p. 573-587, 2011.

SCHABATH, Matthew B.; COTE, Michele L. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 28, n. 10, p. 1563-1579, 2019.

SILVA-CARVALHO, Amandda E et al. Epigenetic priming by EHMT1/EHMT2 in acute lymphoblastic leukemia induces TP53 and TP73 overexpression and promotes cell death. **Toxicology in Vitro**, v. 69, p. 104992, 2020.

SOUZA, Barbara K. et al. EHMT2/G9a as an Epigenetic Target in Pediatric and Adult Brain Tumors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, p. 11292, 2021.

SRINIVASAN, Shruti et al. SUMOylation of G9a regulates its function as an activator of myoblast proliferation. **Cell death & disease**, v. 10, n. 3, p. 1-15, 2019

SUHAIL, Yasir et al. Systems biology of cancer metastasis. **Cell systems**, v. 9, n. 2, p. 109-127, 2019.

SUNG, Hyuna et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TACHA, David et al. A 6-antibody panel for the classification of lung adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 20, n. 3, p. 201-207, 2012.

TAYLOR, Rebecca C.; CULLEN, Sean P.; MARTIN, Seamus J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2008.

TERRY, Nicholas HA; WHITER, R. Allen. Cell cycle kinetics estimated by analysis of bromodeoxyuridine incorporation. **Methods in Cell Biology**, v. 63, p. 355-374, 2001.

TOPALIAN, Suzanne L.; DRAKE, Charles G.; PARDOLL, Drew M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. **Cancer cell**, v. 27, n. 4, p. 450-461, 2015.

TORRE, Lindsey A. et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 25, n. 1, p. 16-27, 2016.

TRAHTEMBERG, Uriel et al. Calcium, leukocyte cell death and the use of annexin V: fatal encounters. **Apoptosis**, v. 12, n. 10, p. 1769-1780, 2007.

TRAVIS, William D. et al. Introduction to the 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 10, n. 9, p. 1240-1242, 2015.

VILLALPANDO-RODRIGUEZ, Gloria E.; GIBSON, Spencer B. Reactive oxygen species (ROS) regulates different types of cell death by acting as a rheostat. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

VISCONTI, Roberta et al. The between Now and Then of Lung Cancer Chemotherapy and Immunotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1374, 2017.

WANG, Jun et al. EHMT2 (G9a) activation in mantle cell lymphoma and its associated DNA methylation and gene expression. **Cancer Biology & Medicine**, v. 19, n. 6, p. 836, 2022.

World Health Organization – WHO. Cancer. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso: 02 outubro de 2021.

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

YATES, Lucy R.; CAMPBELL, Peter J. Evolution of the cancer genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 11, p. 795-806, 2012.

YIN, Chao et al. G9a promotes cell proliferation and suppresses autophagy in gastric cancer by directly activating mTOR. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 12, p. 14036-14050, 2019.

YOKOYAMA, Masayuki et al. Histone lysine methyltransferase G9a is a novel epigenetic target for the treatment of hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 13, p. 21315, 2017.

ZHANG, Lingling et al. Cinobufagin induces FOXO1-regulated apoptosis, proliferation, migration, and invasion by inhibiting G9a in non-small-cell lung cancer A549 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 291, p. 115095, 2022.

ZHAO, Zibo; SHILATIFARD, Ali. Epigenetic modifications of histones in cancer. **Genome Biology**, v. 20, n. 1, p. 1-16, 2019.

ZHENG, Kai et al. Selective autophagy regulates cell cycle in cancer therapy. **Theranostics**, v. 9, n. 1, p. 104, 2019.

ZHENG, Min. Classification and Pathology of Lung Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 447-468, 2016.

ZHONG, Xinwen et al. Overexpression of G 9a and MCM 7 in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with poor prognosis. **Histopathology**, v. 66, n. 2, p. 192-200, 2015.

9. MATERIAL SUPLEMENTAR

Suplementar quadro 1. Os 20 genes mais expressos e inibidos em amostras de adenocarcinoma pulmonar, de acordo com a mediana de expressão de EHMT1.

Top 20 genes mais expressos em amostras de adenocarcinoma pulmonar com expressão reduzida de EHMT1				Top 20 genes menos expressos em amostras de adenocarcinoma pulmonar com expressão reduzida de EHMT1			
Gene	Razão Log	Valor de p	Valor de q	Gene	Razão Log	Valor de p	Valor de q
LYRM1	0.60	2.62e-25	1.31e-22	EHMT1	-0.75	1.46e-85	2.92e-81
ATP6V0E1	0.52	2.17e-24	9.23e-22	SNAPC4	-0.83	2.54e-47	2.54e-43
NDFIP1	0.42	5.52e-24	2.21e-21	BRD3	-0.62	1.91e-42	1.27e-38
GABARAPL2	0.45	9.74e-24	3.74e-21	PRRC2B	-0.74	2.99e-42	1.49e-38
SREK1IP1	0.45	3.75e-22	1.17e-19	NUP214	-0.49	1.21e-39	4.85e-36
MAP1LC3B	0.40	1.91e-21	5.09e-19	CIZ1	-0.46	2.25e-39	7.50e-36
MAGT1	0.45	2.31e-21	5.95e-19	SEC16A	-0.65	2.89e-39	8.24e-36
MOCS2	0.47	2.32e-21	5.95e-19	ODF2	-0.56	3.77e-37	9.42e-34
SELENOF	0.47	1.42e-20	3.31e-18	ABL1	-0.57	7.14e-37	1.58e-33
SELENOT	0.49	4.59e-20	9.88e-18	ANAPC2	-0.54	1.13e-36	2.26e-33
EMC7	0.41	1.32e-19	2.53e-17	NUP188	-0.58	2.02e-35	3.67e-32
SAR1B	0.48	3.11e-19	5.56e-17	PPP1R26	-0.70	4.70e-35	7.83e-32
NUDCD2	0.40	4.17e-19	7.25e-17	INPP5E	-0.64	6.42e-35	9.87e-32
PPCS	0.40	1.34e-18	2.09e-16	MED22	-0.49	2.36e-34	3.37e-31
COMMD10	0.52	3.79e-18	5.53e-16	KMT2B	-0.66	3.00e-34	3.99e-31
SUPT4H1	0.36	4.22e-18	6.07e-16	USP20	-0.55	1.31e-33	1.64e-30
SKP1	0.40	5.18e-18	7.39e-16	TSC1	-0.55	1.36e-32	1.60e-29
TTC1	0.36	5.49e-18	7.78e-16	CAMSAP1	-0.57	3.23e-32	3.59e-29
NSMCE1	0.39	6.54e-18	8.90e-16	WDR5	-0.46	3.50e-32	3.68e-29
TMED7	0.41	7.76e-18	1.05e-15	RABL6	-0.52	1.87e-31	1.87e-28

Suplementar quadro 2. Os 20 genes mais expressos e inibidos em amostras de adenocarcinoma pulmonar, de acordo com a mediana de expressão de EHMT2.

Top 20 genes mais expressos em amostras de adenocarcinoma pulmonar com expressão reduzida de EHMT2				Top 20 genes menos expressos em amostras de adenocarcinoma pulmonar com expressão reduzida de EHMT2			
Gene	Razão Log	Valor de p	Valor de q	Gene	Razão Log	Valor de p	Valor de q
ARL6IP5	0.63	3.15e-27	2.17e-24	EHMT2	-0.92	8.12e-103	1.62e-98
FAS	1.01	5.08e-27	3.17e-24	BAG6	-0.55	1.24e-53	1.24e-49
CD59	0.72	1.21e-25	5.61e-23	ZBTB12	-1.07	2.70e-52	1.80e-48
SPRED1	0.67	7.90e-24	2.68e-21	PRRC2A	-0.63	1.73e-42	8.66e-39
TPK1	0.83	4.63e-22	1.25e-19	DHX16	-0.44	4.79e-36	1.81e-32
STX12	0.34	9.47e-22	2.40e-19	LEMD2	-0.47	5.44e-36	1.81e-32
IL7	0.97	1.19e-21	2.98e-19	ATAT1	-0.76	4.10e-34	1.17e-30
B2M	0.67	1.63e-21	3.92e-19	VARS1	-0.59	7.11e-34	1.78e-30
RGS18	1.01	2.84e-21	6.59e-19	TJAP1	-0.50	5.51e-33	1.22e-29
CD58	0.55	3.94e-21	8.86e-19	SKIV2L	-0.46	9.24e-33	1.85e-29
ARHGAP18	0.60	6.11e-21	1.34e-18	VPS52	-0.42	1.18e-31	2.15e-28
STK17A	0.65	6.30e-21	1.37e-18	ABCF1	-0.48	2.72e-31	4.53e-28
CMTM6	0.39	3.56e-20	6.98e-18	C6ORF136	-0.58	7.80e-31	1.20e-27
HPGDS	1.37	3.78e-20	7.27e-18	BRD2	-0.42	1.89e-30	2.70e-27
ANKRD22	1.29	3.89e-20	7.40e-18	ATF6B	-0.44	3.12e-30	4.16e-27
ANXA5	0.44	4.20e-20	7.85e-18	NEURL4	-0.61	6.61e-30	8.26e-27
OSTM1	0.46	6.11e-20	1.12e-17	GTF2H4	-0.48	9.35e-30	1.10e-26
IFNGR1	0.56	9.34e-20	1.68e-17	AARS2	-0.51	1.15e-29	1.28e-26
MTMR6	0.45	1.04e-19	1.82e-17	C6ORF47	-0.42	3.75e-29	3.95e-26
AHR	0.78	1.14e-19	1.95e-17	CUL7	-0.57	7.05e-29	6.90e-26

Suplementar quadro 3. Os 20 genes mais expressos e inibidos em amostras de melanoma cutâneo, de acordo com a mediana de expressão de EHMT1.

Top 20 genes mais expressos em amostras de melanoma cutâneo com expressão reduzida de EHMT1				Top 20 genes menos expressos em amostras de melanoma cutâneo com expressão reduzida de EHMT1			
Gene	Razão Log	Valor de p	Valor de q	Gene	Razão Log	Valor de p	Valor de q
ARV1	0.45	1.28e-14	2.72e-12	EHMT1	-0.81	3.93e-101	7.88e-97
SELENOK	0.41	1.31e-14	2.76e-12	BRD3	-0.81	1.18e-45	1.18e-41
RNF7	0.33	1.97e-13	3.37e-11	WDR5	-0.59	1.41e-39	9.39e-36
TMEM14A	0.44	2.03e-13	3.45e-11	SEC16A	-0.63	2.69e-39	1.35e-35
EMC7	0.37	2.92e-13	4.87e-11	PRRC2B	-0.68	6.39e-34	2.56e-30
CMC1	0.37	3.90e-13	6.40e-11	NUP188	-0.59	1.68e-32	5.60e-29
GNPTG	0.46	4.72e-13	7.50e-11	MED22	-0.60	2.06e-32	5.90e-29
PTS	0.49	7.45e-13	1.16e-10	CIZ1	-0.56	1.50e-30	3.71e-27
S100A1	1.68	9.42e-13	1.44e-10	NELFB	-0.56	1.67e-30	3.71e-27
AIDA	0.36	1.02e-12	1.53e-10	CAMSAP1	-0.56	1.07e-29	2.15e-26
COX17	0.49	1.37e-12	2.01e-10	NOTCH1	-0.92	9.94e-29	1.81e-25
GLRX2	0.47	1.54e-12	2.22e-10	REXO4	-0.49	1.22e-28	2.04e-25
CD58	0.68	1.83e-12	2.62e-10	SNAPC4	-0.69	2.00e-28	3.08e-25
S100A13	0.64	1.95e-12	2.77e-10	TBC1D13	-0.55	5.36e-28	7.56e-25
DERL2	0.34	2.25e-12	3.12e-10	NUP214	-0.51	5.66e-28	7.56e-25
DPY30	0.32	3.12e-12	4.25e-10	SPOUT1	-0.57	2.12e-26	2.66e-23
MAT1A	1.95	3.61e-12	4.85e-10	SURF6	-0.45	2.38e-26	2.68e-23
LAMTOR5	0.33	6.32e-12	8.32e-10	DDX31	-0.48	2.41e-26	2.68e-23
SCOC	0.51	9.94e-12	1.25e-9	GLE1	-0.43	6.51e-26	6.87e-23
CFAP298	0.30	1.23e-11	1.51e-9	USP20	-0.54	1.68e-25	1.68e-22

Suplementar quadro 4. Os 20 genes mais expressos e inibidos em amostras de melanoma cutâneo, de acordo com a mediana de expressão de EHMT2.

Top 20 genes mais expressos em amostras de melanoma cutâneo com expressão reduzida de EHMT2				Top 20 genes menos expressos em amostras de melanoma cutâneo com expressão reduzida de EHMT2			
Gene	Razão Log	Valor de p	Valor de q	Gene	Razão Log	Valor de p	Valor de q
COQ10B	0.57	1.64e-24	4.75e-22	EHMT2	-0.98	1.01e-95	2.03e-91
IFNGR1	0.74	2.38e-23	6.11e-21	BAG6	-0.73	3.27e-56	3.28e-52
TANK	0.80	4.04e-23	9.74e-21	PRRC2A	-0.77	3.48e-55	2.32e-51
RNF19A	0.75	4.76e-22	1.07e-19	ZBTB9	-0.78	4.07e-50	2.04e-46
SPAG1	1.09	5.31e-22	1.18e-19	VAR51	-0.80	1.92e-47	7.70e-44
SELENOT	0.63	7.60e-22	1.65e-19	LSM2	-0.70	2.49e-47	8.31e-44
TMEM87B	0.81	7.84e-22	1.69e-19	ABCF1	-0.67	4.72e-47	1.35e-43
EVI2A	1.44	1.93e-21	3.95e-19	GNL1	-0.66	7.49e-47	1.85e-43
RGPD1	0.86	2.42e-21	4.89e-19	TRIM27	-0.57	8.30e-47	1.85e-43
BLTP3B	0.88	3.22e-21	6.32e-19	CSNK2B	-0.72	1.97e-46	3.95e-43
INSIG2	0.63	3.85e-21	7.35e-19	CUTA	-0.86	2.11e-45	3.61e-42
IFNAR2	0.62	7.38e-21	1.38e-18	NELFE	-0.68	2.17e-45	3.61e-42
STK17B	1.19	8.62e-21	1.58e-18	ZBTB12	-1.07	1.00e-43	1.55e-40
RAP1A	0.62	9.30e-21	1.69e-18	PPP2R5D	-0.63	2.92e-43	3.96e-40
MBNL1	0.74	1.34e-20	2.40e-18	VPS52	-0.61	2.97e-43	3.96e-40
PLEKHA3	0.57	2.27e-20	4.01e-18	C6ORF47	-0.63	1.67e-42	2.09e-39
NUCB2	0.97	2.48e-20	4.35e-18	NFKBIL1	-0.76	5.82e-42	6.86e-39
GOLM2	0.90	2.86e-20	4.94e-18	DHX16	-0.54	2.03e-40	2.26e-37
RAB21	0.46	4.16e-20	6.82e-18	BYSL	-0.73	5.14e-40	5.42e-37
CYLD	0.76	4.76e-20	7.63e-18	RXR8	-0.61	6.47e-40	6.48e-37