UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GABRIEL CARLOS BALDISSERA

**Estudo funcional do gene *HOXD10* em osteossarcoma pediátrico
com ênfase na proliferação celular**

Ribeirão Preto – SP

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GABRIEL CARLOS BALDISSERA

**Estudo funcional do gene *HOXD10* em osteossarcoma pediátrico
com ênfase na proliferação celular**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica

Orientador: Profa. Dra. María Sol Brassesco Annichini

Ribeirão Preto – SP

2021

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

Gabriel, Carlos Baldissera

Estudo funcional do gene *HOXD10* em osteossarcoma pediátrico com ênfase na proliferação celular. Ribeirão Preto, 2021.

71 f.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós- graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Diferenciação celular normal e neoplásica.

Orientador: Brassesco, María Sol.

1. HOXD10. 2. Osteossarcoma. 3. Proliferação.

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 16/19226-7);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP;
- Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto –
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Gabriel Carlos Baldissera

Título: Estudo funcional do gene *HOXD10* em osteossarcoma pediátrico com ênfase na proliferação celular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*“Em algum lugar, alguma coisa incrível está
esperando para ser descoberta”*

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, Profa. Dra. María Sol Brassesco Annichini, por todo ensinamento e crescimento pessoal que me proporcionou durante os anos do mestrado. Obrigado por me apoiar em tantos momentos, em especial naqueles em que precisava de alguém;

À minha “coorientadora”, Dra. Karina Bezerra Salomão, por me ensinar tudo aquilo que sei de bancada e por me ajudar nos melhores e piores momentos no laboratório;

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone por disponibilizar o espaço e a infraestrutura necessários para o desenvolvimento de grande parte dos experimentos do meu projeto;

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela oportunidade de aprendizado científico;

Ao programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular, bem como a todo o corpo docente e às secretárias Rosana Maria de Oliveira e Silvia Helena Costa pelos ensinamentos e paciência para resolver os problemas;

Ao Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelo apoio ao Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado e apoio financeiro – Código de Financiamento 001;

À Fundação de Apoio do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA) pelo apoio financeiro;

Às técnicas do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do Departamento de Puericultura e Pediatria, Rosane de Paula Gomes Queiroz, Veridiana Kill Suazo e Beth Perna, por toda a ajuda, paciência durante os experimentos e por todos os momentos bons que vivi no laboratório;

Aos meus amigos e colegas do laboratório de Biologia Celular e Oncogenética e aos do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, Marcela de Oliveira Silva, Marina Cândido, Larwsk Hayann, Mariana Medeiros, Vitor Piotto, Cecília Fagundes, Larissa Aine, Gabriela Vieira, Lenisa Geron, Graziella Souza, Carolina Alves, Pablo Chagas, Mirella Baroni, Luciana Veronez, Ricardo Bonfim, Kleiton Borges e Luís Nagano, por toda a ajuda e memoráveis conversas. Em especial ao Rodrigo Hakimi que esteve ao meu lado nessa caminhada. Tenho certeza de que vou levar para sempre a

amizade que criei aqui, pois foram muitos os bons momentos;

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, coordenado pela Prof^a Dra Enilza Maria Espreafico, por auxiliar-me no desenvolvimento dos meus experimentos. À doutoranda Bárbara Yasmin Garcia Andrade, que me ajudou com os protocolos e procedimentos de transdução lentiviral, um agradecimento especial, pois além da ajuda na bancada foi uma grande amiga que esteve presente em todos os momentos;

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto – HCFMRP-USP – e às técnicas, Patrícia Vianna Bonini Palma e Camila Cristina de Oliveira Menezes Bonado, por auxiliar-me nos experimentos e disponibilizar os aparelhos para realização;

Aos membros da banca, pela disponibilidade e pela avaliação do meu trabalho;

Ao Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto do Instituto de Biociências da USP e à Profa. Dra. Leticia Fröhlich Archangelo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por gentilmente cederem as linhagens celulares utilizadas para este trabalho;

À minha família, que em todo momento me deu suporte, em especial aos meus pais, Selso e Maria, aos meus irmãos, Tiago e Felipe, e às minhas cunhadas, Deborah e Ana; e à pequena Helena

Ao Bruno Basílio Rissi, quem esteve ao meu lado todo o tempo, pelo suporte encorajador para conseguir realizar o trabalho;

E a todos aqueles que fizeram parte da minha trajetória na USP, eu dedico este trabalho.

RESUMO

BALDISSERA, G. C. “Estudo funcional do gene *HOXD10* em osteossarcoma pediátrico com ênfase na proliferação celular”. 2021, 71f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Dada a alta incidência e letalidade do OS, a compreensão de suas vias moleculares é de suma importância. Estudos recentes apontaram o fator de transcrição *HOXD10* como um inibidor geral da invasão celular. De forma geral, a maioria dos genes *HOX* encontra-se hiperexpressa em tumores, onde possivelmente foram expressos durante o desenvolvimento daquele tecido/órgão. Dentro da família *HOX*, os *clusters* *HOXA* e *HOXD* têm sido relatados como responsáveis pelo desenvolvimento do tecido ósseo de forma normal. Além disso, *HOXD10* mostrou-se influenciador direto da formação óssea e do padrão de ossificação, sendo que animais *knock-out* desenvolvem defeitos nos membros posteriores. Pesquisas prévias do grupo demonstraram que *HOXD10* se apresenta em altos níveis em amostras primárias de OS sendo sua expressão inversamente correlacionada com características clínicas de pior prognóstico (volume tumoral, resposta Huvos e sobrevida). Desta forma, o presente trabalho visou avaliar os efeitos *in vitro* da hiperexpressão e do silenciamento deste gene sob os diferentes aspectos da proliferação celular em linhagens de OS (SaOS-2/U2-OS) através da técnica de transdução com vetores lentivirais. Os resultados obtidos com a linhagem SAOS-2 reforçam a hipótese do papel deste fator de transcrição como supressor tumoral em OS, evidenciado por alterações na proliferação celular, capacidade clonogênica e viabilidade celular após sua modulação. Contudo a heterogeneidade intrínseca do OS junto com as discrepâncias observadas na linhagem U2-OS, apontam para a necessidade de estudos mais aprofundados em outras linhagens de OS.

Palavras-Chave: *HOXD10*, osteossarcoma, proliferação

ABSTRACT

BALDISSERA, G. C. “Functional study of the *HOXD10* gene in pediatric osteosarcoma with an emphasis on cell proliferation”. 2021, 71p. Master’s degree dissertation - School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Given the high incidence and lethality of OS, understanding its underlying molecular pathways is of paramount importance. Recent studies have pointed the *HOXD10* transcription factor as a general inhibitor of cell invasion. In general, *HOX* genes that are overexpressed in tumors, are expressed during the normal development of that tissue/organ. Within the *HOX* family, *HOXA* and *HOXD* clusters have been reported to be responsible for the normal development of bone tissue. In addition, *HOXD10* proved to participate directly for bone formation and ossification patterning, evinced by developing defects in the hind limbs of knock-out experimental animals. Previous data by our group showed high levels of *HOXD10* in primary OS samples and an inverse correlation with worse prognosis clinical features such as increased tumor volume, worse Huvos response and lower survival. Thus, this study aimed to evaluate the *in vitro* effects of the modulation of *HOXD10* under different aspects of cell proliferation in OS cell lines (SaOS-2 / U2-OS) using lentiviral vectors. The results obtained with SAOS-2 cells reinforce the hypothesis that this transcription factor may act as a tumor suppressor in OS, evidenced by the observed changes in cell proliferation, clonogenic capacity and cell viability after its modulation. However, the intrinsic heterogeneity of OS together with the discrepancies observed in U2-OS cells, point to the need for further studies in other OS models.

Keywords: *HOXD10*, osteosarcoma, proliferation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação ilustrativa dos locais de maior incidência de Osteossarcoma (LIU et al, 2018).....	22
Figura 2. A grande família dos genes <i>HOX</i> é composta por 39 genes, distribuídos em 4 clusters (HOXA, HOXB, HOXC e HOXD).....	24
Figura 3. Expressão relativa de <i>HOXD10</i> entre as linhagens celulares Wild-type de OS (HOS, MG63, SaOS-2 e U2-OS)..	32
Figura 4. Mapa do plasmídeo pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>hHOXD10[shRNA#3].....	34
Figura 5. Mapa do plasmídeo pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>Scramble_shRNA.	34
Figura 6. Mapa do plasmídeo pLV[Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>hHOXD10[NM_002148.3].....	35
Figura 7. Mapa do plasmídeo pLV[Exp]-EGFP/Puro-CMV>Stuffer300	35
Figura 8. Gráficos com níveis de expressão de GFP gerados por citometria de fluxo na linhagem SaOS-2 modulada para o gene <i>HOXD10</i> após transdução viral.....	42
Figura 9. Gráficos com níveis de expressão de GFP gerados por citometria de fluxo na linhagem U2-OS modulada para o gene <i>HOXD10</i> após transdução viral.....	42
Figura 10. Expressão relativa de <i>HOXD10</i> nas linhagens celulares de osteossarcoma .	43
Figura 11. Expressão proteica de HOXD10	44
Figura 12. Taxa de proliferação relativa nas linhagens SaOS-2 e U2-OS	45
Figura 13. Capacidade clonogênica relativa apresentada pela linhagem SaOS-2 após modulação.....	46
Figura 14. Porcentagem de células viáveis apresentada pela linhagem SaOS-2 após modulação.....	47
Figura 15. Expressão relativa de genes associados a proliferação e viabilidade celular na linhagem de osteossarcoma SaOS-2 após modulação	48
Figura 16. Expressão relativa de genes associados a proliferação e viabilidade celular na linhagem de osteossarcoma U2-OS após modulação	48

Figura 17. Análise de interação proteica do HOXD10 a partir do software STRING...	53
Figura I. Avaliação da expressão proteica de HOXD10 nas linhagens U-2OS e SAOS-2 transduzidas com os vetores de partículas lentivirais all-in-one	68
Figura II. Mapas dos vetores pLKO.1 Puro e do vetor FUGW.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desregulação dos genes da família HOX em diferentes tipos de câncer	25
Tabela 2: Desregulação do gene <i>HOXD10</i> em diferentes tipos de câncer	26
Tabela I. Perfis de <i>Short Tandem Repeats</i> (STRs) descritos pela ATCC (American Type Culture Collection) para a linhagens celulares SaOS-2, U2-OS, HeLa e HEK 293-T...	66

LISTA DE SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BSA	Albumina do soro bovino
BSP	Sialoproteína Óssea
cDNA	DNA complementar
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP	Proteína verde fluorescente
Gli3	GLI Family Zinc Finger 3
GUS	Beta glucuronidase
HEK293T	Células 293 de rim embrionário humano
HeLa	Henrietta Lacks (linhagem celular derivada de câncer cervical)
HOS	Linhagem celular de osteosarcoma humano
HOX	Genes homeobox
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MEM	Meio Mínimo Essencial
MG63	Linhagem celular de osteossarcoma humana
MOI	Multiplicidade de infecção
OC	Osteocalcina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	Osteossarcoma
p53	Proteína de tumor 53
pRb	Proteína Retinoblastoma
RhoC	Família de genes homólogos de Ras, membro C
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute, meio de cultivo
S.O.C.	Super Optimal broth with Catabolites repression
SaOS-2	Linhagem celular de osteossarcoma humana
SBF	Soro Bovino Fetal
SHH	Sonic Hedgehog

ShRNA	Short hairpin RNA
STR	Short Tandem Repeats
TGF-β	Transforming growth factor beta
U2-OS	Linhagem celular de osteossarcoma humana
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

LISTA DE SÍMBOLOS

cm²	Centímetro quadrado
cm³	Centímetro cúbico
°C	Graus Celsius
h	Hora
L	Litro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem
kDa	Quilodalton
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

Introdução.....	20
Objetivos.....	28
Objetivo Geral	29
Objetivos específicos	29
Material e Métodos	30
Linhagens Celulares e Condições de Cultura	31
Modulação de <i>HOXD10</i>	32
Extração de RNA e qRT-PCR	36
Extração de Proteínas e Western blot	36
Ensaio Proliferação	37
Ensaio Clonogênico	38
Ensaio de necrose	38
Análise estatística	39
Resultados.....	40
Modulação gênica de <i>HOXD10</i> em linhagens de osteossarcoma.....	41
Influência da modulação de <i>HOXD10</i> na capacidade de proliferação	44
Análise da capacidade clonogênica de SaOS-2 após a modulação de <i>HOXD10</i>	45
Investigação da porcentagem de células viáveis em diferentes tempos após a modulação de <i>HOXD10</i>	46
Avaliação da expressão de genes associados com os processos de proliferação e viabilidade celular.....	47
Discussão	49
Conclusões.....	56
Referências Bibliográficas.....	58
Apêndices	65
Apêndice A.....	66

Apêndice B.	67
Silenciamento de <i>HOXD10</i> por CRISPR-Cas9.....	67
Silenciamento de <i>HOXD10</i> por shRNA “in-house”.....	68
Hiperexpressão de <i>HOXD10</i> por vetor lentiviral:.....	70

Introdução

O Osteossarcoma (OS) é um tumor caracterizado pela proliferação de células de origem mesenquimal e pela formação anômala de substância osteóide e matriz mineralizada (RITTER; BIELACK, 2010). O OS representa o tumor maligno mais comum em ossos primários, acometendo principalmente crianças e jovens adultos (HARRISON et al., 2018); entretanto, ainda pode ser considerado um tumor raro, pois corresponde com ~1% dos cânceres em geral (ANDERSON, 2016). Na maioria dos casos, apresenta um grande volume com mais de 5 cm de crescimento radial, combinando-se com o tecido mole e pressionando o tecido muscular ao redor (FLETCHER; UNNI, K. KRISHNAN; MERTENS, 2002).

Os locais mais afetados são as regiões metafisiárias dos ossos longos como o fêmur distal (42%), a tíbia proximal (19%) e o úmero proximal (10%) (**Figura 1**) (LIU et al., 2018). A primeira grande incidência, (FU et al., 2018; HAN; KIM; KIM, 2014; MIALOU et al., 2005), acontece na infância e na adolescência (corresponde com 2,4% de todos os cânceres malignos pediátricos), ao passo que a segunda é relatada principalmente em idosos acima de 60 anos (ZIELENSKA et al., 2001). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), aproximadamente 200 novos casos de OS são registrados por ano, sendo que as ocorrências em crianças e adolescentes representaram aproximadamente 70 novos registros por ano, o que corresponde a 32,4% de todos os casos (FUNDATO et al., 2012). Não obstante necessite maiores comprovações científicas quanto à sua localização e ao seu pico de incidência, acredita-se que ambos estejam atrelados a regiões e períodos de crescimento ósseo acelerado, em especial àqueles vivenciados durante a puberdade (GILL et al., 2013; MARINA et al., 2004).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a classificação do OS pode ser realizada a partir do tipo histológico e das características celulares, sendo o osteoblástico o mais comum e responsável por 75% de todas as ocorrências. Além deste, podem ser encontrados os tipos condroblástico e o fibroblástico (SANDBERG; BRIDGE, 2003). Outros subgrupos menos comuns incluem o OS secundário, periostal e parosteal (SANDBERG; BRIDGE, 2002).

O tratamento atual consiste em quimioterapia pré-operatória (neoadjuvante) seguida de remoção do tumor por meios cirúrgicos e, por fim, quimioterapia pós-operatória (adjuvante) (BIELACK et al., 2002; POMPETTI et al., 1998). O protocolo quimioterápico pré-operatório consiste na administração de metotrexato, cisplatina e doxorubicina. Após a retirada do tumor, as sessões de quimioterapia são continuadas com a inclusão de etoposide e ifosfamida, que são utilizadas concomitantemente às outras três

drogas anteriormente citadas (BACCI et al., 2001; KAGER; TAMAMYAN; BIELACK, 2017)

Apesar do grande avanço da tecnologia médica, o OS ainda é um tumor de grande agressividade e de difícil prognóstico quando encontrado em metástase, pois atinge outros ossos e pulmões, chegando inclusive a invadir os gânglios linfáticos em casos mais raros (LUETKE et al., 2014). O processo que abrange as etapas da metástase ocorre primeiramente pelo desprendimento da célula tumoral da massa primária, após o qual migra através do tecido normal e da matriz extracelular até o sistema vascular, por onde se dispersa. Por fim, estabelece-se em novos locais nos quais se desenvolverão novos focos tumorais (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002).

Cerca de 20% dos pacientes com OS já apresentam metástases no diagnóstico (BIELACK et al., 2002). Entre todos os pacientes diagnosticados, um terço dos que apresentam tumores localizados desenvolvem metástases após o tratamento (LIU et al., 2011). Nestes casos, mesmo com um novo tratamento quimioterápico, a sobrevida média é de cinco anos (BRENNECKE et al., 2013; GORLICK; KHANNA, 2010). Desta forma, estudos mais aprofundados sobre os mecanismos moleculares envolvidos na capacidade proliferativa, invasiva e metastática de OS mostram-se fundamentais.

Figura 1. Representação ilustrativa dos locais de maior incidência de Osteossarcoma (LIU et al, 2018).

Segundo GORLICK; KHANNA (2010) e 85% dos casos apresentaram metástases, mesmo que a quimioterapia não tenha sido utilizada, quando o tratamento foi totalmente baseado na ressecção cirúrgica, indicando a presença de micrometástases. Portanto, para reduzir a mortalidade desse tipo de tumor, ainda é necessário encontrar novos alvos terapêuticos.

Diferentemente de outros sarcomas, o OS não está associado a uma translocação ou a um rearranjo cromossômico específico, mas apresenta uma alta instabilidade cromossômica (SANDBERG; BRIDGE, 2002) e mutações nos genes *RB1* e *TP53*, que são comuns a muitos tipos tumorais (TOGUCHIDA et al., 1992). Outrossim, diverge da maioria dos tumores pediátricos, cujos fenótipos estão diretamente ligados à desregulação de vias de desenvolvimento embrionário como WNT/ β -catenina, TGF- β e Sonic-Hedgehog (SHH) (POOS et al., 2015).

Recentemente, alterações nos genes da família *HOX*, também responsáveis pelo desenvolvimento embrionário, vem sendo associadas ao estabelecimento e progressão tumoral, atuando de forma tecido-específica (HOMBRÍA; LOVEGROVE, 2003). No câncer, pensou-se inicialmente que essas proteínas atuavam como fatores de transcrição que promovem a carcinogênese, pois são encontradas em grandes quantidades nas células tumorais, sendo desreguladoras de várias vias de sinalização. No entanto, estudos subsequentes mostraram que os genes *HOX* podem atuar não apenas como ativadores nas células tumorais, mas também como inibidores da transcrição. Portanto, o aumento e/ou a diminuição da expressão de membros dessa família parecem ser essenciais para a promoção do tumor (BHATLEKAR; FIELDS; BOMAN, 2014).

Por serem componentes-chave de importantes vias regulatórias com atuação crucial na morfogênese dos órgãos durante o desenvolvimento embrionário (HOMBRÍA; LOVEGROVE, 2003), as proteínas codificadas pelos genes *HOX* são amplamente estudadas. Ainda, os genes *HOX* desempenham papéis significativos para a manutenção da pluripotência celular, regulação no processo de migração celular e desenvolvimento embrionário (SEIFERT, 2015). Em humanos, esta família pode ser dividida em 39 genes, os quais se encontram subdivididos em 4 *clusters* genômicos – HOXA, HOXB, HOXC e HOXD – localizados respectivamente nas regiões cromossômicas 7p15.3, 17q21.3, 12q13.3 e 2q31 (**Figura 2**) (APIOU et al., 1996).

Figura 2. A grande família dos genes *HOX* é composta por 39 genes, distribuídos em 4 clusters (*HOXA*, *HOXB*, *HOXC* e *HOXD*). A. Organização e o posicionamento dos genes *HOX* em cada um dos clusters presente no genoma humano. B. Representação do padrão de expressão dos genes *HOX* ao longo dos eixos de formação do embrião humano. *Imagem retirada do livro Emery's Elements of Medical Genetics (Turnpenny & Ellard, 2016. p.111, 15ª ed.).

Embora alguns genes *HOX* participem diretamente no desenvolvimento embrionário, eles podem do mesmo modo ser expressos em tecidos adultos onde, por ocasião de uma expressão desregulada, podem comprometer a estabilidade do tecido maduro (MILLER et al., 2001; SHAH; SUKUMAR, 2010). Alguns estudos sugerem que a maioria dos genes *HOX* encontrados com expressão aumentada em um câncer em determinada região do corpo são normalmente expressos durante o desenvolvimento daquele local. A expressão alterada de genes da família *HOX* é uma característica comum em tumores adultos que apresentam mutações em *TP53*, como o caso de câncer de cólon, bexiga, ovário, câncer de mama, entre outros (**Tabela 1**) (KANAI et al., 2010; MAKIYAMA et al., 2005). Referente ao câncer de mama, por exemplo, já foi relatada a hiperexpressão de 16 genes dos *clusters* *HOXA*, *HOXB*, *HOXC* e *HOXD* (MAKIYAMA et al., 2005).

Recentemente, XIE e colaboradores (2018) relataram a hiperexpressão do gene *HOXC10* em 45 amostras de osteossarcoma comparado com tecido ósseo normal; no entanto, a idade da coorte de estudo não foi informada.

Tabela 1: Alteração do gene *HOX* em diferentes tipos de câncer

Tipo tumoral	Gene HOX	Alteração HOXD10	Referência
Câncer de bexiga	HOXC4, HOXC5, HOXC6	↑	CANTILE et al. (2003)
Câncer de cólon	HOXA9, HOXB3, HOXB8, HOXB9	↑	KANAI et al. (2010)
Câncer de cólon	HOXB2, HOXB13, HOXD1, HOXD3, HOXD4, HOXD8, HOXD12	↓	KANAI et al. (2010)
Câncer de mama	HOXA1, HOXA2, HOXA3, HOXA5, HOXA9, HOXC11, HOXD3, HOXD4, HOXD8, HOXD9, HOXD10	↓	MAKIYAMA et al. (2005)
Câncer de mama	HOXA6, HOXA13, HOXB2, HOXB4, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB9, HOXC5, HOXC9, HOXC13, HOXD1, HOXD8, HOXD12, HOXD13	↑	HUR et al. (2014)
Câncer de mama com mutante para p53	HOXC5	↓	MAKIYAMA et al. (2005)
Câncer de ovário	HOXA9, HOXA10, HOXA11	↑	CHENG et al. (2005)
Câncer de próstata e metástase linfonodal	HOXC4, HOXC5, HOXC6, HOXC8, HOXB3, HOXB13	↑	MILLER et al. (2003) CHEN et al. (2013)
Câncer de tireóide	HOXA13, HOXB13, HOXC13, HOXD13	↑	CANTILE et al. (2013)
Carcinomas pulmonares	HOXA5, HOXA10, HOXB3, HOXB4, HOXC6	↑	ABE et al. (2006) BODEY et al. (2000)
Carcinoma renal	HOXA11, HOXC11, HOXD11	↑	CANTILE et al. (2011)
Glioblastoma	HOXA9, HOXA10	↑	COSTA et al. (2010) MURAT et al. (2008)
Malenoma	HOXC11	↑	CANTILE et al. (2011)
Osteossarcoma	HOXC10	↑	XIE et al. (2018)

↑: Aumento da expressão ↓: Diminuição da expressão

Adicionalmente, Estudos demonstram que a perda e o ganho de função relacionados à formação e desenvolvimento de membros e ao envolvimento na ossificação endocondral estão ligados diretamente aos *clusters* HOXA e HOXD (ZAKANY; DUBOULE, 2007). Como observado na **Figura 1**, o gene *HOXD10* participa na formação dos membros inferiores, local mais frequente do surgimento de OS. Além disso, *HOXD10* mostrou-se não apenas como regulador do padrão ósseo, mas também influenciador direto da formação óssea e do padrão de ossificação (VON HEYKING et al., 2106).

De fato, HEYKING e colaboradores (2016) demonstraram uma associação direta de *HOXD10* com a sinalização de WNT/ β -catenina, a qual é fundamental para a esqueletogênese. Ainda, segundo Hakami e colaboradores (2014), o *knockout* deste gene resultou em defeitos nos membros posteriores de animais de experimentação. Além disso, alguns alvos podem interagir com *HOXD10* ou predecessores de sua via e causar um pior prognóstico. Em camundongos, a expressão de *Shh* é ativada concomitantemente com *HOXD10* assim que ocorre a formação de um membro (SAKAMOTO et al., 2009).

O mecanismo específico pelo qual o *HOXD10* desempenha um papel na carcinogênese e progressão tumoral ainda é desconhecido. Apesar disso, é importante

notar que a expressão de *HOXD10* se mostra alterada em diferentes tumores (**Tabela 2**).

Tabela 2: Alteração do gene *HOXD10* em diferentes tipos de câncer

Tipo tumoral	Alteração <i>HOXD10</i>	Referência
Carcinoma de bexiga	↑	QI; YUAN; SUN (2019)
Câncer de esôfago	↑	ZHANG et al. (2019)
Câncer gástrico	↑	LI et al. (2019)
Câncer de mama	↑	AN et al. (2017)
Câncer de pâncreas	↑	LIN et al. (2020)
Carcinoma colangiocelular	↑	YANG et al. (2015)
Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço	↑/↓	HAKAMI et al. (2014)
Glioblastoma	↑	YACHI et al. (2018)
Hepato carcinoma	↑	GUO et al. (2017)

↑: Aumento da expressão ↓: Diminuição da expressão

No câncer gástrico, por exemplo, estudos demonstraram que a baixa expressão de *HOXD10* está relacionada a uma maior taxa de malignidade do tumor. Para mais, à indução do gene nas linhagens desse tipo de tumor sucedeu uma diminuição na capacidade clonogênica, nas taxas de invasão e na migração celular (VARDHINI et al., 2014; WANG et al., 2012). Com o aumento da expressão de *HOXD10*, foi possível observar uma alta nas taxas de migração e invasão – como aquelas no carcinoma de bexiga – e uma inibição na proliferação, migração e invasão – como visto em câncer de esôfago e câncer de mama (QI; YUAN; SUN (2019); ZHANG et al. (2019); AN et al. (2017). O aumento da expressão também levou a uma diminuição do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em câncer de pâncreas LIN et al. (2017). A diminuição na migração, proliferação e aumento de invasão foram relatados também em tumores que possuem uma baixa expressão do gene como em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (QI; YUAN; SUN (2019); ZHANG et al. (2019); AN et al. (2017); LIN et al. (2020); HAKAMI et al. (2014). Relatos como esses demonstram a grande importância no entendimento sobre a participação de *HOXD10* na progressão tumoral.

Resultados preliminares do nosso grupo (ROBERTO, 2018) mostraram, a partir de 25 amostras primárias de OS, que os níveis de *HOXD10* estão elevados (41 vezes) em relação aos controles (amostras de tecido ósseo não neoplásico e amostras provenientes

de cultivos primários de osteoblastos). Foi possível observar, igualmente, que nas amostras não neoplásicas, o *HOXD10* é pouquíssimo expresso, sugerindo a participação desse gene no estabelecimento/progressão dessa doença.

Nesse sentido, formulamos a hipótese de que a modulação da expressão do gene *HOXD10* influencia padrões de agressividade de OS, como, por exemplo, proliferação celular, capacidade clonogênica e morte. Desta forma, esperamos identificar os processos biológicos afetados pela desregulação de *HOXD10* e as possíveis contribuições para a identificação de vias moleculares por trás dos mesmos. Segundo nossa hipótese, a hiperexpressão tornaria o tumor menos agressivo, enquanto sua inibição levaria a padrões mais proliferativos. Os dados obtidos não somente servirão para a elucidação de mecanismos envolvidos na desregulação de *HOXD10*, como também para uma base futura em aplicações clínicas. Isso permitirá a identificação de alvos e abordagens de tratamento com uma maior eficiência e uma menor toxicidade para os pacientes afetados com esta doença.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos *in vitro* da hiperexpressão e do silenciamento do gene *HOXD10* sob os diferentes aspectos da proliferação celular.

Objetivos específicos

1. Hiperexpressar o gene utilizando técnica de transdução com vetores lentivirais em linhagens de OS;
2. Inibir o gene *HOXD10* a partir da técnica de transdução com vetores lentivirais em linhagens de osteossarcoma;
3. Analisar os efeitos da modulação nas linhagens de OS em relação aos processos de proliferação, capacidade clonogênica e indução de morte celular;
4. Analisar os níveis de expressão de genes associados ao processo de proliferação celular após a modulação de *HOXD10 in vitro*.

Material e Métodos

Linhagens Celulares e Condições de Cultura

Para o presente estudo foram utilizadas a linhagem de osteossarcoma SaOS-2 (gentilmente cedida pelo Prof. Oswaldo Keith Okamoto do Instituto de Biociências da USP) e a linhagem U2-OS que nos foi doada pela Profa. Dra. Leticia Fröhlich Archangelo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, ambas as linhagens apresentam características tumorigênicas e são suscetíveis a transfecção. A linhagem SaOS-2 é derivada do tumor de uma criança (11 anos) do sexo feminino, caucasiana (FOGH, 1975) e U2-OS de uma adolescente de 15 anos também do sexo feminino e caucasiana (PONTEN; SAKSELA, 1967). Previamente à realização dos experimentos, a autenticidade das linhagens celulares foi verificada por STR (*short tandem repeat profiling analysis*). As amostras de DNA extraídas das linhagens foram enviadas ao laboratório de Genética Bioquímica do Departamento de Genética da FMRP-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões e os resultados comparados aqueles referenciais do ATCC (*American Type Cell Culture*) (**Apêndice A**).

O cultivo foi realizado em garrafas de 75cm² e incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Foi utilizado meio de cultivo RPMI-1640 para SaOS-2 e DMEM-F12 para U2-OS ambas suplementadas com 100mg/L de penicilina, 100mg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal (pH entre 7,2 e 7,4).

Entre as linhagens celulares de osteossarcoma disponíveis em nosso laboratório (HOS, MG63, SaOS-2 e U2-OS), é sabido que elas expressam níveis particulares de HOXD10. A linhagem U2-OS, por exemplo, apresenta a menor expressão entre as quatro, enquanto a linhagem SaOS-2 possui uma expressão 2,5 vezes maior que a de HOS (linhagem utilizada como normalizadora). Inclusive, elas foram escolhidas para o estudo por possuírem uma capacidade tumorigênica conhecida, o que nos permite dar continuidade ao trabalho em ensaios *in vivo*.

Figura 3. Expressão relativa de *HOXD10* entre as linhagens celulares *Wild-type* de OS disponíveis em nosso laboratório (HOS, MG63, SaOS-2 e U2-OS). Os valores de expressão foram obtidos através de RT-qPCR e normalizados em relação à linhagem HOS (expressão = 1).

Modulação de *HOXD10*

Para os ensaios de modulação do gene *HOXD10* nas linhagens de estudo, foram primeiramente utilizados um vetor lentiviral comercial para inativação por CRISPR/Cas-9 (Sigma-Aldrich® - USA), e vetor de hiperexpressão produzido *in-house* por meio dos procedimentos de clonagem (**Apêndice B**). Diante do insucesso, optou-se por adquirir os plasmídeos pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>hHOXD10[shRNA#3] (VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB191209-2164njv) (**Figura 4**) e pLV[shRNA]-EGFP/Puro-U6>Scramble_shRNA como controle (VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB151023-10034) (**Figura 5**) para o silenciamento. Em relação a expressão induzida de *HOXD10*, adquirimos os plasmídeos pLV[Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>hHOXD10[NM_002148.3] (#ID VB191003-1112wns) (**Figura 6**) e pLV[Exp]-EGFP/Puro-CMV>Stuffer300 como controle (#ID VB181209-1075efx) (**Figura 7**) da empresa VectorBuilder® (Chicago IL, EUA). A expansão dos plasmídeos foi realizada em bactérias semeadas em placas de Petri contendo meio LB (#L2897; Sigma), em seguida em meio líquido, ambos suplementados com 100µg/mL de Ampicilina, e incubadas *overnight* em estufa à 37°C. Os plasmídeos foram então purificados utilizando

o *kit* QIAprep Spin Midprep (#12145; Qiagen Company, Hilden, Alemanha), segundo instruções do fabricante.

Para a produção das partículas lentivirais, utilizamos a linhagem HEK293T (linhagem com capacidade de produção de retrovírus e com alta suscetibilidade de transfecção - ATCC). Assim, os vetores de interesse foram inseridos nessas células, juntamente com vetores empacotadores específicos (pCMV- Δ 8.9 e pCMV-VSVG) e o otimizador de transfecção Polietilenoimina - PEI (Sigma-Aldrich® #306185). Após 24h o meio MEM foi substituído por um novo suplementado com 30% de soro bovino fetal para intensificar a proliferação celular, juntamente com o aumento da produção e liberação das partículas lentivirais. As partículas presentes no meio de cultura foram coletadas e filtradas com o objetivo de remover quaisquer possíveis resíduos celulares. Por fim, o filtrado foi armazenado e preservado à -80 °C.

Em seguida, procedeu-se a transdução das linhagens de osteossarcoma (SAOS-2/U2-OS). Com esse objetivo, foram semeadas $4,0 \times 10^5$ células por poço em placas de seis poços; 24 horas antes do ensaio, para que ficassem com confluência apropriada (80%). O meio RPMI-1640 e DMEM-F12 estavam livres de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e de soro bovino fetal, para que não interferissem no processo de transdução. Após o período em que as células já estavam aderidas na placa, as mesmas foram expostas a 1mL de suspensão viral e centrifugadas por 30min a 2200rpm, e posteriormente incubadas por 48 horas à 37°C com 5% de CO₂ em estufa úmida. Após a retirada do meio, o mesmo procedimento foi repetido e as células incubadas por mais 48 horas, em seguida o meio contendo vírus foi retirado e substituído por 2mL de meio completo.

Iniciou-se então as seleções das células moduladas com a administração de puromicina (2,5ug/ μ L). Após um período de crescimento as células foram transferidas para garrafas de 25cm³ e posteriormente 75cm³. Houve a confirmação da transdução das células a partir da visualização da proteína verde fluorescente (GFP). Em seguida foi realizado a seleção das células verdes fluorescentes utilizando o processo de Citometria de Fluxo, o método foi realizado no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto - HCFMRP-USP, utilizando o aparelho FACSÁria III (BD. Bioscience, San Diego, CA, EUA).

Figura 4. Mapa do plasmídeo pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>hHOXD10[shRNA#3]. VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #IDVB191209-2164.

Figura 5. Mapa do plasmídeo pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>Scramble_shRNA. VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #IDVB151023-10034.

Figura 6. Mapa do plasmídeo pLV[Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>hHOXD10[NM_002148.3]. VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #IDVB191003-1112.

Figura 7. Mapa do plasmídeo pLV[Exp]-EGFP/Puro-CMV>Stuffer300 VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB181209-107.

Extração de RNA e qRT-PCR

O RNA foi extraído das culturas celulares transduzidas e respectivos controles, por meio do Trizol Reagent (Invitrogen Inc, Carsdab, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado e armazenado em freezer -80°C até a sua utilização. A partir do RNA extraído, o DNA complementar foi sintetizado (cDNA) por meio do *kit* High capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O qRT-PCR foi realizado utilizando aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando o *kit* SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific®) ou o *kit* TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, #4304437), conforme as instruções dos fabricantes. Além disso, foram utilizados como controles endógenos os genes *GUS* (*beta glucuronidase*) e *HPRT* (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*).

Para a verificação da expressão do gene *HOXD10* foram utilizados os primers SyBR (Exxtend Biotecnologia Ltda - Paulínia/SP – Brasil) desenhados da seguinte maneira: *HOXD10* 5' AGTGCAGGAGAAGGAAAGCA 3' (F) e 5' TTCTGCCACTCTTTGCAGTG 3' (R) *GUS*; 5' CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA 3' (F) e 5' GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT 3' (R); e *HPRT* 5' GCTATTCTTGCCTTTCATTTTCAGAA 3' (F) e 5' ACTCTCATCTTAGGCTTTGTATTTTGC 3' (R).

Para a expressão dos alvos preditos foram utilizadas as sondas Taqman® - Life Technologies Ciclina D1 (00765553), *BCL2* (00608023), *XIAP* (01597783) e *Gli3* (00609233) e como controles os endógenos dos genes *GUS* (4326320E) e *GAPDH* (4326321E). A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$. (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Extração de Proteínas e Western blot

A extração das proteínas das culturas celulares foi realizada por meio do Ripa buffer (Thermo Scientific, CA, USA), juntamente com inibidores de protease e fosfatase, de acordo com as instruções do fabricante. Foi realizada a quantificação pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se uma solução albumina bovina sérica (BSA 0,1 mg/ml)

como padrão. A absorbância foi obtida por meio da leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm, no leitor iMark Microplate Absorbance reader (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA). 30µg de cada amostra foram separadas por eletroforese SDS-PAGE, seguida pela transferência do gel t para membrana de nitrocelulose e incubação em TBS-T 1% contendo 5% de solução bloqueadora (GE, Piscataway, NJ, EUA) por 1 hora, à 8°C. Posteriormente, procedeu-se a incubação overnight com o anticorpo anti-HOXD10 (1:100) (#ab172865; Abcam, Cambridge, USA). Como controle endógeno foi utilizada a proteína VINCULINA (#ab155120; Abcam, Cambridge, USA).

As membranas foram então lavadas e incubadas com o anticorpo secundário específico (1:10000 em TBS-T) por 1 hora em temperatura ambiente e lavadas com TBS-T 1%. O anticorpo secundário foi visualizado utilizando o ECLTM Western blotting Analysis System (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). A membrana foi exposta entre 1 e 450 segundos e então analisadas. Para análise da intensidade das bandas, foi utilizado o software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

Ensaio Proliferação

Para o ensaio de proliferação, as células HOXD10 *knockdown* (KD), HOXD10 hiperexpresso (HIP) e controles foram semeadas em densidades iniciais de $3,5 \times 10^3$ em placas de 96 poços e mantidas em condições de cultura. Posteriormente, as células foram incubadas e analisadas com diferentes tempos (24, 48 e 72 horas). A cada intervalo, foi removido o meio de cultura dos poços e adicionado 100µL de meio de cultura sem SBF com 5µL de Resazurina (Sigma-Aldrich, Inc, MO, USA) conforme recomendações do fabricante. As placas foram incubadas por 4 horas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. A leitura da absorbância de 570nm foi realizada utilizando o aparelho iMark Microplate Absorbance reader (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA). Os experimentos foram repetidos três vezes em triplicata. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Ensaio Clonogênico.

O ensaio de capacidade clonogênica foi realizado de acordo com FRANKEN et al. (2006). Para este ensaio, 500 células com diferentes níveis de expressão de *HOXD10* foram semeadas por poço em placas de seis poços. As células foram incubadas por 14 dias, tempo suficiente para a formação de colônias. Para visualização das colônias o meio de cultura foi descartado e as células foram fixadas com metanol absoluto e coradas com Giemsa (3%). A contagem foi realizada com auxílio de estereomicroscópio (40x) considerando apenas colônias com número de células maior ou igual a 50. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três testes independentes. Para o cálculo foi utilizada a seguinte fórmula:

$$PE = \frac{n^{\circ} \text{ de colônias formadas}}{n^{\circ} \text{ de células plaqueadas}} \times 100\%$$

Obtido o valor de PE, foi calculada a fração de sobrevivência (SE) pela seguinte equação:

$$SE = \frac{n^{\circ} \text{ de colônias formadas antes do tratamento}}{n^{\circ} \text{ de células plaqueadas} \times PE}$$

Ensaio de necrose

Para a detecção de morte celular, utilizou-se iodeto de propídio (Sigma-Aldrich, Inc, MO, USA) um corante intercalante que permite avaliar a viabilidade celular a partir da análise indireta por quantificação de DNA. Para tal, 100.000 células com diferentes níveis de *HOXD10* foram plaqueadas em placa de 6 poços. As células foram incubadas 72, 96 e 120 horas. Em cada tempo, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 500 µl de PBS, em seguida adicionou-se 50 µl de iodeto de propídio (50 µg/ml) e realizou-se a leitura no equipamento BD FACSAria III no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto - HCFMRP-USP sob responsabilidade do Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas e técnica de Patrícia Vianna Bonini Palma, após leitura obteve-se uma amostragem de 10 mil eventos. Os experimentos foram repetidos em triplicata.

Análise estatística

Os ensaios funcionais foram analisados utilizando-se os testes T-student ou one-way ANOVA, aplicando Bonferroni como pós-teste. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism 7 Software, considerando-se o nível de significância $\alpha=0,05$.

Resultados

Modulação gênica de *HOXD10* em linhagens de osteossarcoma

Para dar início nos estudos sobre o papel de *HOXD10* em linhagens de osteossarcoma (SaOs-2 e U2-OS), o primeiro passo foi a modulação do gene através de técnicas de silenciamento e hiperexpressão do mesmo. Utilizamos plasmídeos lentivirais pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>hHOXD1 para silenciamento (KD) e seu respectivo controle pLV[shRNA]-EGFP/Puro-U6>Scramble_shRNA (KD CT); para hiperexpressão foi utilizado o vetor pLV[Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>hHOXD10 (HIP) e pLV[Exp]-EGFP/Puro-CMV>Stuffer300 como controle (HIP CT). A confirmação se deu primeiramente através da visualização da expressão de GFP (**Figura 8 F e 9 F**). Foi utilizada uma imagem de cada linhagem apenas para efeitos demonstrativos.

Em seguida foi realizada a seleção das células GFP positivas através do processo de *cell sorting* por Citometria de Fluxo. Na linhagem SaOS-2 (**Figura 8**) no gráfico A são visualizadas as células *Wild-type*, utilizadas como controle negativo sem marcação fluorescente; em B e C as células HIP CT (controle positivo de GFP) e células HIP, respectivamente, ambas com 97,6% de positividade; em D as células KD CT (controle positivo de GFP) com 99% células GFP positivas, e em E células KD com 97% de positividade. Já na linhagem U2-OS (**Figura 9**), as células HIP CT e HIP apresentaram 89,9% e 86% de células GFP positivas respectivamente (**Figura 9 B e C**); ao mesmo tempo que as células KD CT e KD, mostraram 86,2% e 92,7% de células GFP positivas respectivamente (**Figura 9 D e E**).

Figura 8. Gráficos com níveis de expressão de GFP gerados por citometria de fluxo na linhagem SaOS-2 modulada para o gene *HOXD10* após transdução viral. A) SaOS-2 *Wild-Type*; B) SaOS-2 pLV [Exp] Control Vector; C) SaOS-2 pLV [Exp] HOXD10; D) SaOS-2 pLV sh Control Vector; E) SaOS-2 pLV shHOXD10; F) Imagem ilustrativa de GFP em SaOS-2.

Figura 9. Gráficos com níveis de expressão de GFP gerados por citometria de fluxo na linhagem U2-OS modulada para o gene *HOXD10* após transdução viral. A) U2-OS-2 *Wild-Type*; B) U2-OS-2 pLV [Exp] Control Vector; C) U2-OS pLV [Exp] HOXD10; D) U2-OS pLV sh Control Vector; E) U2-OS pLV shHOXD10; F) Imagem ilustrativa de GFP em U2-OS.

A seguir, para verificar a modulação gênica de *HOXD10* foi utilizada a técnica de RT-qPCR. Ambas as linhagens apresentaram alteração nos níveis de expressão de *HOXD10* (**Figura 10**), sendo está 83% ($p = 0,0002$) inferior após *knockdown* na linhagem SaOS-2 (**Figura 10 – A**) e 55% menor ($p = 0,0425$) na linhagem U2-OS em relação aos correspondentes vetores vazios. Em relação à hiperexpressão do gene de estudo, observarmos diferenças significativas entre as linhagens, se mostrando mais eficaz em U2-OS que em SaOS-2. Na primeira, o aumento de *HOXD10* foi de 60 vezes em relação ao controle ($p = 0,0026$), ao tempo que a linhagem SaOS-2 teve um aumento de *HOXD10* de 1,88 vezes em relação ao controle ($p = 0,003$).

Figura 10. Expressão relativa de *HOXD10* nas linhagens celulares de osteossarcoma SaOS-2 e U2-OS selvagens (*wild-type*, WT), transduzidas com pLV controle (vetor vazio, V.V. – HIP/KD), pLV [Exp]*HOXD10* (hiperexpressão, HIPER), e pLV sh*HOXD10* (*knockdown*, KD). Dados obtidos por RT-qPCR realizados no aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). No gráfico estão representadas a média e o desvio-padrão. Os valores de expressão foram normalizados em relação aos respectivos vetores controle para cada linhagem, somente um VV é mostrado para uma melhor observação (expressão = 1).

Também fizemos a verificação da modulação de *HOXD10* a nível proteico pela técnica de Western-Blot (**Figura 11 A-B**). Não foi possível observar uma diferença nos níveis proteicos de *HOXD10* nos grupos modulados em relação ao controle quando quantificamos as bandas obtidas no Western-Blot (**Figura 11 C-D**).

Figura 11. A-B. Expressão proteica de HOXD10 verificada por Western-blot nas linhagens celulares de osteossarcoma SaOS-2 e U2-OS selvagens (*wild-type* - WT), transduzidas com pLV [Exp]HOXD10 (hiperexpressão - HIP), pLV shHOXD10 (*knockdown* - KD), e seus respectivos vetores controle (CT). C-D. Quantificação das bandas obtidas através do experimento de Western-blot referentes à expressão proteica de HOXD10 nas linhagens celulares de osteossarcoma SaOS-2 e U2-OS selvagens (*wild-type* - WT), transduzidas com pLV [Exp]HOXD10 (hiperexpressão - HIPER), pLV shHOXD10 (*knockdown* - KD), e seus respectivos vetores controle (CT). A expressão proteica de Vinculina foi utilizada como controle positivo. kDa = quilodalton (peso molecular). Os valores de expressão foram normalizados em relação às células *wild-type* para cada linhagem (expressão = 1).

Influência da modulação de *HOXD10* na capacidade de proliferação

Após a modulação, buscamos verificar alterações fenotípicas nas linhagens estudadas. Um dos aspectos analisados foi a capacidade proliferativa. Como observado na **Figura 12** o *knockdown* de *HOXD10* (linha azul) levou a um aumento na capacidade proliferativa de SaOS-2 após modulação em todos os tempos analisados quando comparado ao controle (linha pontilhada), sendo um aumento sutil após 24 e 48h e um aumento maior e significativo após 72h ($p < 0,0001$). Já com a hiperexpressão de

HOXD10 (linha vermelha), constatamos uma redução significativa na capacidade proliferativa a partir do tempo de 48h ($p < 0,001$) e mais pronunciada em 72h ($p < 0,0001$) em relação ao controle (linha pontilhada). Na linhagem U2-OS (**Figura 12 B**) ambas as modulações levaram a uma redução na capacidade proliferativa em relação ao controle (linha pontilhada), mas não sendo significativo. A linhagem KD (linha azul) apresentou uma taxa de proliferação menor quando comparada também a linhagem HIP (linha vermelha), principalmente nos tempos de 48 e 72h.

Figura 12. A-B. Taxa de proliferação relativa nas linhagens SaOS-2 e U2-OS transduzidas com vetor pLV[Exp] *HOXD10* (hiperexpressão, HIP) e sh*HOXD10* (*knockdown*, KD) nos tempos de 24h, 48h e 72h. Os valores de expressão foram normalizados em relação aos respectivos vetores controle para cada linhagem (expressão = 1). *** $< 0,001$; **** $< 0,0001$.

Análise da capacidade clonogênica de SaOS-2 após a modulação de *HOXD10*

Outro fenótipo analisado foi a capacidade clonogênica. Das duas linhagens investigadas, apenas uma apresentou capacidade de formar colônias (SaOS-2). Como visto na **Figura 13**, as células HIP apresentaram uma capacidade menor de formar colônias em relação ao seu controle ($p = 0,0093$), ao passo que, KD obteve um aumento significativo na capacidade clonogênica ($p = 0,0095$).

Figura 13. Capacidade clonogênica relativa apresentadas pela linhagem SaOS-2 transduzidas com vetor pLV[Exp] HOXD10 (hiperexpressão, HIP) e shHOXD10 (*knockdown*, KD) em relação aos vetores vazios correspondentes. Os valores de expressão foram normalizados em relação aos respectivos vetores controle (expressão = 1). **<0,01.

Investigação da porcentagem de células viáveis em diferentes tempos após a modulação de *HOXD10*

A análise de viabilidade celular após modulação do gene *HOXD10* foi realizada em três diferentes tempos de após plaqueamento, 72h, 96h e 120h. As porcentagens foram obtidas a partir da incorporação de iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo. Como mostrado na **Figura 14 A-D**, a linhagem SaOS-2 HIP apresentou uma redução significativa de células viáveis quando comparada a seu controle no tempo de 96h ($p = 0,0403$), sendo tal diferença mais robusta após 120h ($p = 0,0315$) de cultivo, atingindo uma redução de 20% (**Figura 14 A**). Em relação à SaOS-2 KD, não houve diferença expressiva quando comparada a seu respectivo controle (**Figura 14 B**).

Figura 14. Porcentagem de células viáveis apresentada pela linhagem SaOS-2 transduzidas com vetor pLV[Exp] HOXD10 (hiperexpressão, HIP) e shHOXD10 (*knockdown*, KD) em relação aos vetores vazios correspondentes. Os valores foram normalizados em relação aos respectivos vetores controle. * $<0,1$.

Avaliação da expressão de genes associados com os processos de proliferação e viabilidade celular

A partir dos resultados obtidos anteriormente para compreender melhor o papel de *HOXD10* na proliferação e viabilidade celular, procuramos avaliar a expressão de genes que estão ligados diretamente a esses processos. Para tal, analisamos o nível de expressão de *CCND1*, *XIAP*, *BCL2* e *Gli3*

Em SaOS-2 foi observada uma diferença significativa nos níveis de expressão da Ciclina D1 (*CCND1*) tanto na linhagem hiperexpressa quanto silenciada. A hiperexpressão teve um aumento de 8 vezes em relação ao controle ($p = 0,0003$), enquanto o *Knockdown* teve um acréscimo de 4 vezes em relação ao controle ($p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças significativas na expressão dos demais genes (**Figura 15 A-B**).

Figura 15. Expressão gênica relativa de genes associados a proliferação e viabilidade celular na linhagem de osteossarcoma SaOS-2 transduzidas com vetor pLV[Exp] HOXD10 (hiperexpressão, HIP) e shHOXD10 (*knockdown*, KD) em relação aos vetores vazios correspondentes. Os valores de expressão foram normalizados em relação aos respectivos vetores controle para cada linhagem (expressão = 1). ***< 0,001; ****<0,0001.

Quando avaliamos a linhagem U2-OS, o aumento nos níveis de expressão da Ciclina D1 foi observado apenas após silenciamento de *HOXD10* ($p=0,043$), já a expressão de *Gli3* diminuiu significativamente em ambas as situações em relação aos seus controles. Novamente, não identificamos diferença na expressão dos outros genes (*XIAP* e *BCL2*) (**Figura 16 A-B**).

Figura 16. Expressão gênica relativa de genes associados a proliferação e viabilidade celular na linhagem de osteossarcoma U2-OS transduzidas com vetor pLV[Exp] HOXD10 (hiperexpressão, HIP) e shHOXD10 (*knockdown*, KD) em relação aos vetores vazios correspondentes. Os valores de expressão foram normalizados em relação aos respectivos vetores controle para cada linhagem (expressão = 1). *<0,1; **<0,01; ****<0,0001

Discussão

A capacidade de metástase do OS permanece um grande desafio na clínica. Assim, torna-se essencial compreender a regulação desse processo e identificar possíveis novos alvos terapêuticos. Embora 70% dos pacientes de OS que são submetidos a ressecção cirúrgica e quimioterapia multiagente possam tornar-se sobreviventes a longo prazo, o prognóstico daqueles que apresentam metástase primária ou recidiva ainda é desfavorável. Ademais, o tratamento de OS atingiu um platô para casos que não apresentam uma boa resposta ao tratamento padrão (BISHOP; JANEWAY; GORLICK, 2016; ZHANG et al., 2015). Esses resultados têm continuado inalterados por mais de três décadas (KAGER; TAMAMYAN; BIELACK, 2017).

Os genes da família *HOX* representam um conjunto de genes evolutivamente conservados com funções ligadas diretamente com o processo de desenvolvimento embrionário. Além disso, os fatores de transcrição codificados por eles regulam a expressão de genes envolvidos na proliferação celular (CILLO, (1994); QUINONEZ; INNIS, 2014). Inclusive, sua desregulação vem sendo descrita em vários tipos de cânceres. Particularmente, a hiperexpressão ou a perda de *HOXD10* têm sido associado à tumorigênese com papéis na sobrevivência, proliferação e invasão de células cancerosas, sendo caracterizado como um oncogene ou supressor tumoral dependendo do tipo tumoral. Entre alguns carcinomas nos que já foi relatada a desregulação de *HOXD10*, quer para hiperexpressão quer para silenciamento, estão os de mama (VARDHINI et al., 2014), gástrico (WANG et al., 2012), cabeça e pescoço (HAKAMI et al., 2014), ovário (NAKAYAMA et al., 2013), hepatocelular (LIAO et al., 2014) e gliomas (SASAYAMA et al., 2009). Essas alterações, de forma geral e a depender do tipo tumoral, vêm sendo caracterizadas por atribuir pior prognóstico, aumento da agressividade tumoral, assim como diminuição na sobrevida global.

A importância de *HOXD10* na progressão tumoral e no seu potencial uso como alvo terapêutico tem sido verificada experimentalmente em vários modelos. Estudos em carcinoma de cabeça e pescoço, por exemplo, relataram que o aumento induzido da expressão deste gene resultou em um aumento na migração e proliferação celular, mas diminuiu a invasão celular. Em complemento, viu-se que a redução de sua expressão teve efeito oposto, ou seja, resultou em um bloqueio na migração e proliferação, e um aumento na invasão (HAKAMI et al., 2014). Em relação ao sarcoma de Ewing, outro tumor pediátrico que acomete o tecido ósseo, a hiperexpressão de *HOXD10* promoveu a capacidade invasiva *in vitro*, ao passo que o seu silenciamento levou a uma supressão de metástase para o pulmão (VON HEYKING et al., 2106).

Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa evidenciaram que os níveis de *HOXD10* (mRNA) em amostras de OS pré-quimioterápicas se apresentam elevados em relação a controles sadios. Além disso, foi observado que tanto em cultivo primário de osteoblastos normais quanto no tecido ósseo maduro o gene é pouquíssimo expresso (ROBERTO, 2018). Ainda, a análise proteica subsequente revelou uma relação inversa com fatores prognósticos, sendo que aqueles que apresentavam um menor nível de expressão proteica de *HOXD10* possuíam maior volume tumoral e pior resposta ao tratamento. Para mais, a sobrevida global e livre de eventos se mostrou menor nos pacientes com menores níveis de expressão da proteína (HAKIME, 2020). Esses dados nos sugerem que o gene possa atuar no estabelecimento e progressão do tumor.

Nossos resultados em relação à modulação de *HOXD10* foram bem sucedidos em ambas as linhagens (SaOS-2/U2-OS). Quando silenciámos o gene em células SaOS-2, observamos um efeito mais expressivo com uma redução de 80% nos níveis de expressão. Já em U2-OS, o silenciamento foi de aproximadamente 50% em relação ao seu controle. considerando à hiperexpressão, obtivemos um padrão contrário, no qual as células U2-OS apresentaram níveis de expressão de *HOXD10* 60 vezes superiores, enquanto a SaOS-2, 2 vezes mais. Tal discrepância na eficiência da modulação entre as duas linhagens pode decorrer de diferenças na expressão endógena de *HOXD10* entre as linhagens. De fato, quando comparadas, SaOS-2 naturalmente expressa 3 vezes mais do que U2-OS apresenta (**Figura 3**). Ao mesmo tempo, existem relatos na literatura de diferenças em relação à passividade de serem transduzidas. SaOS-2 são menos permissivas em relação a processos de transdução viral do que células U2-OS (DESCHAMPS; KALAMVOKI, 2017; YAO; SCHAFFER, 1995).

Contudo, a modulação de *HOXD10* em nível proteico não foi demonstrada. Nesse sentido, LUO e colaboradores (2019) relatam que boa parte dos anticorpos comerciais para as proteínas HOX são de baixa qualidade. Ao mesmo tempo que apresentam grandes dificuldades para detectar seus alvos, apresentam baixa especificidade atrelada à considerável conservação evolutiva que a família *HOX* possui. Apesar disso, nossos resultados, após a modulação *in vitro* do gene *HOXD10*, mostraram alterações fenotípicas no que diz respeito à proliferação, à viabilidade celular e, sobretudo, à capacidade clonogênica das linhagens celulares.

Como visto acima, os resultados foram em sua maioria linhagem-dependentes, mas de forma geral, seguiram a hipótese de que menores níveis de *HOXD10* estariam associados com maior agressividade. Assim, o silenciamento de *HOXD10* em SaOS-2

levou a um aumento da taxa proliferativa, enquanto a hiperexpressão teve um efeito de diminuição do crescimento celular. Efeitos semelhantes foram previamente relatados em câncer de próstata (MO et al., 2017) e em células trofoblásticas durante o desenvolvimento de pré-eclâmpsia (ZHANG et al., 2021). Os nossos resultados em relação à capacidade clonogênica também demonstram uma relação inversa em relação aos níveis de *HOXD10*. Quando o nível de expressão de *HOXD10* está diminuído, podemos observar um aumento no número de colônias e o oposto ocorre quando as células estão hiperexpressando o gene. Esse mesmo fenótipo foi descrito por ZENG et al., 2019 em hemangioma. Os resultados obtidos sugerem, portanto, que *HOXD10* pode estar atuando como um fator de supressão tumoral em OS. De fato, o ensaio de clonogenicidade é capaz de medir a integridade reprodutiva das células por um período prolongado de tempo (S. FRANCO et al., 2016), uma característica crucial para colonizar novos ambientes e a formação de novos tumores durante o processo de metástase (SUMANTRAN, 2011).

Entretanto, a forma como *HOXD10* afeta o crescimento celular ainda é incerta. Dentre seus poucos alvos descritos (**Figura 17**), e com participação na regulação da proliferação celular, encontramos *RHOC* (Família de genes homólogos de Ras, membro C) (YU et al., 2013). Estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que essa GTPase se encontra em altos níveis em amostras de OS (DE OLIVEIRA, 2019). De acordo com a literatura, *HOXD10* suprime a expressão de *RHOC*, sendo um controlador negativo, em que as expressões de ambos são sempre inversas. O baixo nível de *HOXD10* leva a uma alta de *RHOC*, e *vice versa* (YUAN et al., 2019). Entretanto nas nossas amostras não foi verificada correlação entre a expressão gênica e/ou proteica entre *HOXD10* e *RHOC* (DE OLIVEIRA, 2019).

Figura 17. Análise de interação proteica do HOXD10 a partir do software STRING v10.5 (<https://string-db.org>). Foram considerados os parâmetros de coexpressão, evidência experimental, mineração de dados (textmining), e homologia (Score de interação: 0.400).

Ao mesmo tempo, em busca de compreender os efeitos da modulação de *HOXD10* em OS, estudamos outros genes que podem estar envolvidos nesse processo, como Ciclina D1 – uma proteína codificada pelo gene *CCND1* que atua na regulação do ciclo celular. Vimos em nossos resultados que a expressão de *CCND1* está aumentada nas células SaOS-2 hipermoduladas quando comparadas a *knockdown*. A Ciclina D1 promove a passagem pela fase G1 inibindo a proteína retinoblastoma (Rb), permitindo a progressão do ciclo celular através da transição G1/S e início da síntese de DNA (BALDIN et al., 1993; NEUMEISTER et al., 2003; SAKAMAKI et al., 2006). A redução dos níveis de *CCND1* nas células *knockdown* em relação às hiperexpressas pode indicar que essas células estejam em estágio mais avançado do ciclo, corroborando com os dados de proliferação. Esses resultados podem nos sugerir uma alteração no ciclo celular, mas outros ensaios são necessários para maiores inferências.

Também, foi visto na linhagem SaOS-2 uma redução na viabilidade das células após a hiperexpressão em relação ao controle. Dados semelhantes a esses foram encontrados em hepatocarcinoma celular (GUO et al., 2017), onde a presença de *HOXD10* teve um efeito pró-apoptótico nas células estudadas. Em vista dos resultados observados, investigamos a expressão de dois genes relacionados ao processo de

apoptose: *BCL2* (*B-cell lymphoma 2*) e *XIAP* (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*). Ambos caracterizam-se por serem genes antiapoptóticos (LATOUR; AGUILAR, 2015; SIDDIQUI; AHAD; AHSAN, 2015). No entanto, nenhuma alteração significativa da sua expressão foi observada em razão da modulação de *HOXD10* em OS.

Outro gene avaliado em nosso trabalho foi o *Gli3* (GLI Family Zinc Finger 3), no qual tampouco vimos diferenças significativas em relação ao nível de sua expressão na linhagem SaOS-2, mas em U2-OS vimos uma redução expressiva nas células *knockdown* em relação ao controle e à hiperexpressa. Isso pode estar ocorrendo porque *Gli3* é um alvo direto da via de SHH. Estudos anteriores já demonstraram que a deleção de *HOXD10* leva à inativação de *SHH* (TARCHINI; DUBOULE; KMITA, 2006). Ainda, CHEN e colaboradores (2004) apontaram que genes da família *HOX* interagem física e geneticamente com *Gli3* e podem converter este repressor em um ativador de genes alvo de *SHH*.

A divergência dos resultados observados entre as linhagens celulares utilizadas em nosso estudo pode decorrer de diversas razões. Uma delas é o conhecido caráter de heterogeneidade e alta instabilidade cromossômica de OS, o que faz com que as linhagens apresentem uma grande diversidade do ponto de vista molecular (RIVERA-VALENTIN; ZHU; HUGHES, 2015). Em relação a características de crescimento, ambas as células apresentam um tempo médio de duplicação de 2 a 3 vezes maior e uma taxa de proliferação de 15 a 20 vezes maior do que os osteoblastos normais. Contudo, quando comparadas entre si, SaOS-2 possui uma taxa menor nos primeiros dias de crescimento em relação a U2-OS, mas que se inverte no decorrer do tempo (PAUTKE et al., 2004).

Também, quando analisamos o perfil de SaOS-2, apresenta-se deleção no gene que codifica p53 assim como uma forma truncada e funcionalmente inativa da proteína retinoblastoma (pRb). Além disso, ao comparar SaOS-2 a células de osteoblasto primário, percebe-se que ela possui altos níveis de fosfatase alcalina (ALP), um regulador da mineralização óssea e diferenciador osteoblástico (SZULC; BAUER, 2013). Apresenta, igualmente, outros fatores de diferenciação osteoblástica como colágenos tipo I e III, OC (osteocalcina) e BSP (sialoproteína óssea). Por fim, a expressão de citocinas e fatores de crescimento mostram semelhanças com células primárias de osteoblastos humanos normais (BECKER et al., 1986; BILBE et al., 1996).

Por sua vez, U2-OS apresenta p53 e pRb funcionais (AKAN et al., 2012; RAO et al., 1996). Para mais, U2-OS não é classificada apenas como osteoblástica, mas também como fibroblástica (BOUTERFA et al., 1999), pois ao mesmo tempo em que quase não

apresenta marcadores osteoblásticos expressa marcadores positivos de cartilagem, como colágeno do tipo II, IX, X e IV (BECKER et al., 1986; CHICHESTER; FERNÁNDEZ; MINGUELL, 1993). Se levarmos em consideração que *HOXD10* atua na regulação da diferenciação osteoblástica, isso nos leva a crer que as divergências encontradas entre o papel de *HOXD10* e sua influência nos ensaios deste estudo possam decorrer das diferenças nas características das linhagens. Interessantemente, a correlação entre mutações em *TP53* e a baixa expressão de *HOXD10*, já foi relatada anteriormente em tumores de mama de alto grau histopatológico, sugerindo que a perda de ambos (como observado na linhagem SAOS-2) possa representar uma característica relacionada com a progressão da doença (SEKAR et al., 2014).

Deste modo, a necessidade de verificação do papel *HOXD10* em outras linhagens de OS torna-se necessária para a compreensão da contribuição real deste gene no desenvolvimento deste tumor.

Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste estudo, verificaram-se um silenciamento e uma hiperexpressão de *HOXD10*, além de diferentes fenótipos em relação à proliferação celular. A modulação se mostrou mais eficiente em células SaOS-2, mesmo que em U2-OS a hiperexpressão tenha sido expressiva.

O *HOXD10*, através dos ensaios funcionais, mostrou-se relevante no fenótipo tumoral, corroborando a nossa hipótese principal de que a hiperexpressão tornaria o tumor menos agressivo enquanto sua inibição levaria a padrões mais proliferativos. O aumento da sua expressão conseguiu reduzir a taxa de proliferação e a capacidade clonogênica além de manter uma taxa de viabilidade celular menor comparada àquelas que possuíam o *knockdown* do gene.

Desta forma, sugere-se que a atuação de *HOXD10* pode estar ligada diretamente à supressão tumoral em OS; entretanto, a forma pela qual ocorre este processo ainda é incerta. Portanto, o desenvolvimento de ensaios complementares se faz fundamental para futuras inferências a respeito da ação de *HOXD10* neste tipo tumoral. Do mesmo modo, estudos mais específicos sobre o papel deste gene em outras linhagens de OS são relevantes para a profunda compreensão da interação do gene com o desenvolvimento do tumor.

Referências Bibliográficas

- ABE, M. et al. Disordered expression of HOX genes in human non-small cell lung cancer. **Oncology reports**, v. 15, n. 4, p. 797–802, abr. 2006.
- AKAN, P. et al. Comprehensive analysis of the genome transcriptome and proteome landscapes of three tumor cell lines. **Genome Medicine**, v. 4, n. 11, p. 86, 2012.
- AN, N. et al. MicroRNA-376b promotes breast cancer metastasis by targeting Hoxd10 directly. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 1, p. 79–84, 2017.
- ANDERSON, M. E. Update on Survival in Osteosarcoma. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 47, n. 1, p. 283–292, jan. 2016.
- APIOU, F. et al. Fine mapping of human HOX gene clusters. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 73, n. 1–2, p. 114–115, 1996.
- BACCI, G. et al. Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremity. **European Journal of Cancer**, v. 37, n. 16, p. 2030–2039, nov. 2001.
- BALDIN, V. et al. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. **Genes & Development**, v. 7, n. 5, p. 812–821, 1 maio 1993.
- BECKER, J. et al. Immunohistochemical distribution of collagens types IV, V, and VI and of procollagens types I and III in human alveolar bone and dentine. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 34, n. 11, p. 1417–1429, 5 nov. 1986.
- BHATLEKAR, S.; FIELDS, J. Z.; BOMAN, B. M. HOX genes and their role in the development of human cancers. **Journal of Molecular Medicine**, v. 92, n. 8, p. 811–823, 5 ago. 2014.
- BIELACK, S. S. et al. Prognostic Factors in High-Grade Osteosarcoma of the Extremities or Trunk: An Analysis of 1,702 Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 3, p. 776–790, 1 fev. 2002.
- BILBE, G. et al. PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. **Bone**, v. 19, n. 5, p. 437–445, nov. 1996.
- BISHOP, M. W.; JANEWAY, K. A.; GORLICK, R. Future directions in the treatment of osteosarcoma. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 28, n. 1, p. 26–33, fev. 2016.
- BODEY, B. et al. Immunocytochemical detection of homeobox B3, B4, and C6 gene product expression in lung carcinomas. **Anticancer research**, v. 20, n. 4, p. 2711–2716, 2000.
- BOUTERFA, H. et al. Expression of different extracellular matrix components in human brain tumor and melanoma cells in respect to variant culture conditions. **Journal of neuro-oncology**, v. 44, n. 1, p. 23–33, ago. 1999.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRENNECKE, P. et al. Expression of the Chemokine Receptor CXCR7 in CXCR4-Expressing Human 143B Osteosarcoma Cells Enhances Lung Metastasis of Intratibial Xenografts in SCID Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74045, 10 set. 2013.
- CANTILE, M. et al. In vivo expression of the whole HOX gene network in human breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 39, n. 2, p. 257–264, jan. 2003.
- CANTILE, M. et al. Aberrant Expression of Posterior HOX Genes in Well Differentiated Histotypes of Thyroid Cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p.

21727–21740, 1 nov. 2013.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563–572, ago. 2002.

CHEN, Y. Direct interaction with Hoxd proteins reverses Gli3-repressor function to promote digit formation downstream of Shh. **Development**, v. 131, n. 10, p. 2339–2347, 21 abr. 2004.

CHENG, W. et al. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. **Nature Medicine**, v. 11, n. 5, p. 531–537, 10 maio 2005.

CHICHESTER, C. O.; FERNÁNDEZ, M.; MINGUELL, J. J. Extracellular Matrix Gene Expression by Human Bone Marrow Stroma and by Marrow Fibroblasts. **Cell Adhesion and Communication**, v. 1, n. 2, p. 93–99, 11 jan. 1993.

CILLO, C. HOX genes in human cancers. **Invasion & metastasis**, v. 14, n. 1–6, p. 38–49, [s.d.].

DE OLIVEIRA, V. P. **Análise da expressão de RhoC em osteossarcoma pediátrico e suas implicações clínicas**. Monografia – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2019.

DESCHAMPS, T.; KALAMVOKI, M. Impaired STING Pathway in Human Osteosarcoma U2OS Cells Contributes to the Growth of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus. **Journal of Virology**, v. 91, n. 9, 1 maio 2017.

FLETCHER, C. D. M.; UNNI, K. KRISHNAN, 1941–; MERTENS, F. Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone. In: [s.l: s.n.]. p. 427.

FOGH, J. Human tumor cells in vitro. **New York: Plenum Press**, 1975.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 21 dez. 2006.

FU, Y. et al. Forecast of actin-binding proteins as the oncotarget in osteosarcoma – a review of mechanism, diagnosis and therapy. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 11, p. 1553–1561, mar. 2018.

FUNDATO, C. T. et al. Itinerário Terapêutico de Adolescentes e Adultos Jovens com Osteossarcoma. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 2, p. 197–208, 29 jun. 2012.

GILL, J. et al. New targets and approaches in osteosarcoma. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 137, n. 1, p. 89–99, jan. 2013.

GORLICK, R.; KHANNA, C. Osteosarcoma. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 4, p. 683–691, abr. 2010.

GUO, Y. et al. Silencing HOXD10 by promoter region hypermethylation activates ERK signaling in hepatocellular carcinoma. **Clinical Epigenetics**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2017.

HAKAMI, F. et al. The roles of HOXD10 in the development and progression of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 4, p. 807–816, 2014.

HAKIME, R. G. **“HOXD10 em osteossarcoma pediátrico: análise do seu valor prognóstico e envolvimento nos processos de invasão e metástase”**. 2020, 81f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

HAN, J. A.; KIM, J.-Y.; KIM, J.-I. Analysis of Gene Expression in Cyclooxygenase-2-

- Overexpressed Human Osteosarcoma Cell Lines. **Genomics & Informatics**, v. 12, n. 4, p. 247, 2014.
- HARRISON, D. J. et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 18, n. 1, p. 39–50, 2 jan. 2018.
- HOMBRÍA, J. C.-G.; LOVEGROVE, B. Beyond homeosis—HOX function in morphogenesis and organogenesis. **Differentiation**, v. 71, n. 8, p. 461–476, out. 2003.
- HUR, H. et al. Analysis of HOX Gene Expression Patterns in Human Breast Cancer. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 64–71, 3 jan. 2014.
- KAGER, L.; TAMAMYAN, G.; BIELACK, S. Novel insights and therapeutic interventions for pediatric osteosarcoma. **Future Oncology**, v. 13, n. 4, p. 357–368, fev. 2017.
- KANAI, M. et al. Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas. **Oncol Rep**, v. 23, n. 3, p. 843–851, 2010.
- KETOLA, A. et al. Osteosarcoma and chondrosarcoma as targets for virus vectors and herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy. **International journal of molecular medicine**, v. 13, n. 5, p. 705–710, maio 2004.
- LATOUR, S.; AGUILAR, C. XIAP deficiency syndrome in humans. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 39, p. 115–123, mar. 2015.
- LI, C. et al. Downregulation of microRNA-92b-3p suppresses proliferation, migration, and invasion of gastric cancer SGC-7901 cells by targeting Homeobox D10. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 10, p. 17405–17412, 2019.
- LIAO, C. et al. miR-10b is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation, migration and invasion through RhoC, uPAR and MMPs. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 234, 19 dez. 2014.
- LIN, Z. et al. The effect of overexpression of the HOXD10 gene on the malignant proliferation, invasion, and tumor formation of pancreatic cancer cell PANC-1. **Gland Surgery**, v. 9, n. 2, p. 385–391, 2020.
- LIU, X. et al. ROCK1 as a potential therapeutic target in osteosarcoma. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 8, p. 1259–1266, ago. 2011.
- LIU, Y. et al. Logistic regression analysis for the identification of the metastasis-associated signaling pathways of osteosarcoma. **International Journal of Molecular Medicine**, 2 jan. 2018.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LUETKE, A. et al. Osteosarcoma treatment – Where do we stand? A state of the art review. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 4, p. 523–532, maio 2014.
- LUO, Z.; RHIE, S.; FARNHAM, P. The Enigmatic HOX Genes: Can We Crack Their Code? **Cancers**, v. 11, n. 3, p. 323, 7 mar. 2019.
- MAKIYAMA, K. et al. Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma. **Oncology Reports**, 1 abr. 2005.
- MARINA, N. et al. Biology and Therapeutic Advances for Pediatric Osteosarcoma. **The Oncologist**, v. 9, n. 4, p. 422–441, jul. 2004.

- MIALOU, V. et al. Metastatic osteosarcoma at diagnosis. **Cancer**, v. 104, n. 5, p. 1100–1109, 1 set. 2005.
- MILLER, D. F. B. et al. Cross-regulation of Hox genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. **Mechanisms of Development**, v. 102, n. 1–2, p. 3–16, abr. 2001.
- MILLER, G. J. et al. Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. **Cancer research**, v. 63, n. 18, p. 5879–5888, set. 2003.
- MO, R.-J. et al. Decreased HoxD10 Expression Promotes a Proliferative and Aggressive Phenotype in Prostate Cancer. **Current Molecular Medicine**, v. 17, n. 1, p. 70–78, 10 abr. 2017.
- MURAT, A. et al. Stem Cell–Related “Self-Renewal” Signature and High Epidermal Growth Factor Receptor Expression Associated With Resistance to Concomitant Chemoradiotherapy in Glioblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 18, p. 3015–3024, 20 jun. 2008.
- NAKAYAMA, I. et al. Loss of HOXD10 expression induced by upregulation of miR-10b accelerates the migration and invasion activities of ovarian cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 1, p. 63–71, jul. 2013.
- NEUMEISTER, P. et al. Cyclin D1 Governs Adhesion and Motility of Macrophages. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. 5, p. 2005–2015, maio 2003.
- PAUTKE, C. et al. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. **Anticancer research**, v. 24, n. 6, p. 3743–3748, 2004.
- POMPETTI, F. et al. Correlation between Apoptosis and TP53 Status in Osteosarcoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 105, n. 2, p. 177–181, set. 1998.
- PONTEN, J.; SAKSELA, E. Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. **International Journal of Cancer**, v. 2, n. 5, p. 434–447, 15 set. 1967.
- POOS, K. et al. Genomic Heterogeneity of Osteosarcoma - Shift from Single Candidates to Functional Modules. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0123082, 7 abr. 2015.
- QI, Z.; YUAN, L.; SUN, N. Propofol exhibits a tumor-suppressive effect and regulates cell viability, migration and invasion in bladder carcinoma by targeting the microRNA-10b/HOXD10 signaling pathway. **Oncology Letters**, v. 18, n. 6, p. 6228–6236, 2019.
- QUINONEZ, S. C.; INNIS, J. W. Human HOX gene disorders. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 111, n. 1, p. 4–15, jan. 2014.
- RAO, L. G. et al. Effects of 1 α ,25-dihydroxy-16ene, 23yne-vitamin D3 on osteoblastic function in human osteosarcoma SaOS-2 cells: differentiation-stage dependence and modulation by 17- β estradiol. **Bone**, v. 19, n. 6, p. 621–627, dez. 1996.
- RITTER, J.; BIELACK, S. S. Osteosarcoma. **Annals of Oncology**, v. 21, p. vii320–vii325, out. 2010.
- RIVERA-VALENTIN, R. K.; ZHU, L.; HUGHES, D. P. M. Bone Sarcomas in Pediatrics: Progress in Our Understanding of Tumor Biology and Implications for Therapy. **Pediatric Drugs**, v. 17, n. 4, p. 257–271, 23 ago. 2015.
- ROBERTO, G. M. **Influência do miR-10b na proliferação e capacidade invasiva de osteossarcoma**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 24 jul. 2018.
- S. FRANCO, S. et al. In vitro models of cancer stem cells and clinical applications. **BMC Cancer**, v. 16, n. S2, p. 738, 30 set. 2016.

- SAKAMAKI, T. et al. Cyclin D1 Determines Mitochondrial Function InVivo. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 14, p. 5449–5469, 15 jul. 2006.
- SAKAMOTO, K. et al. Heterochronic shift in Hox-mediated activation of Sonic hedgehog leads to morphological changes during fin development. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, 2009.
- SANDBERG, A. A.; BRIDGE, J. A. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. Synovial sarcoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 133, n. 1, p. 1–23, fev. 2002.
- SANDBERG, A. A.; BRIDGE, J. A. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 145, n. 1, p. 1–30, ago. 2003.
- SASAYAMA, T. et al. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 6, p. 1407–1413, 15 set. 2009.
- SEIFERT, A. Role of Hox genes in stem cell differentiation. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 3, p. 583, 2015.
- SEKAR, P. et al. Evaluation of p53, HoxD10, and E-Cadherin Status in Breast Cancer and Correlation with Histological Grade and Other Prognostic Factors. **Journal of Oncology**, v. 2014, p. 1–4, 2014.
- SHAH, N.; SUKUMAR, S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 5, p. 361–371, 1 maio 2010.
- SIDDIQUI, W. A.; AHAD, A.; AHSAN, H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 3, p. 289–317, 25 mar. 2015.
- SUMANTRAN, V. N. Cellular Chemosensitivity Assays: An Overview. In: [s.l.: s.n.]. p. 219–236.
- SZULC, P.; BAUER, D. C. Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis. In: **Osteoporosis**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 1573–1610.
- TARCHINI, B.; DUBOULE, D.; KMITA, M. Regulatory constraints in the evolution of the tetrapod limb anterior–posterior polarity. **Nature**, v. 443, n. 7114, p. 985–988, out. 2006.
- TOGUCHIDA, J. et al. Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas. **Cancer research**, v. 52, n. 22, p. 6194–6199, 1992.
- VARDHINI, N. V. et al. HOXD10 expression in human breast cancer. **Tumor Biology**, v. 35, n. 11, p. 10855–10860, 1 nov. 2014.
- VON HEYKING, K. et al. The posterior HOXD locus: Its contribution to phenotype and malignancy of Ewing sarcoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 41767–41780, 5 jul. 2016.
- WANG, L. et al. Homeobox D10 Gene, a Candidate Tumor Suppressor, Is Downregulated through Promoter Hypermethylation and Associated with Gastric Carcinogenesis. **Molecular Medicine**, v. 18, n. 3, p. 389–400, 8 mar. 2012.
- XIE, X.; XIAO, Y.; HUANG, X. Homeobox C10 knockdown suppresses cell proliferation and promotes cell apoptosis in osteosarcoma cells through regulating caspase 3. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 11, p. 473–482, jan. 2018.

YACHI, K. et al. miR-23a promotes invasion of glioblastoma via HOXD10-regulated glial-mesenchymal transition. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2018.

YANG, H. et al. HOXD10 acts as a tumor-suppressive factor via inhibition of the RHOC/AKT/MAPK pathway in human cholangiocellular carcinoma. **Oncology Reports**, v. 34, n. 4, p. 1681–1691, 2015.

YAO, F.; SCHAFFER, P. A. An activity specified by the osteosarcoma line U2OS can substitute functionally for ICP0, a major regulatory protein of herpes simplex virus type 1. **Journal of virology**, v. 69, n. 10, p. 6249–6258, 1995.

YU, X. et al. MicroRNA-10b Promotes Nucleus Pulposus Cell Proliferation through RhoC-Akt Pathway by Targeting HOXD10 in Interveterebral Disc Degeneration. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e83080, 20 dez. 2013.

YUAN, Y. et al. Epigenetic inactivation of HOXD10 is associated with human colon cancer via inhibiting the RHOC/AKT/MAPK signaling pathway. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, p. 9, 25 dez. 2019.

ZAKANY, J.; DUBOULE, D. The role of Hox genes during vertebrate limb development. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 17, n. 4, p. 359–366, ago. 2007.

ZENG, Z. et al. miR-501 promotes hemangioma progression by targeting HOXD10. **American journal of translational research**, v. 11, n. 4, p. 2439–2446, 2019.

ZHANG, J. et al. MicroRNAs in osteosarcoma. **Clinica Chimica Acta**, v. 444, p. 9–17, abr. 2015.

ZHANG, J. et al. Homeobox D10, a tumor suppressor, inhibits the proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 8, p. 13717–13725, 2019.

ZHANG, M. et al. Regulatory mechanism of <scp>miR</scp> -525-5p in over-invasion of trophoblast. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 47, n. 2, p. 679–688, fev. 2021.

ZIELENSKA, M. et al. Comparative genomic hybridization analysis identifies gains of 1p35~p36 and chromosome 19 in osteosarcoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 130, n. 1, p. 14–21, out. 2001.

Apêndices

Apêndice A.

Tabela I. Perfis de *Short Tandem Repeats* (STRs) descritos pela ATCC (*American Type Culture Collection*) para a linhagens celulares SaOS-2, U2-OS, HeLa e HEK 293-T e a confirmação dos mesmos nas células utilizadas no presente trabalho.

Linhagem	Perfil STR							
	CSF1PO	D13S317	D16S539	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	Vwa
Ref ATCC	10	12;13	12;13	12	8;10	6;9	8	18
SAOS-2	10	12;13	12;13	12	8;10	6;9	8	18
Ref ATCC	13	13	11;12	11	11;12	6;9.3	11;12	14;18
U-2OS	13	13	11;12	11	12	6;9.3	11;12	14;18
Ref ATCC	9;10	12;13.3	9;10	11;12	8;12	7	8;12	16;18
HeLa	9;10	12;13.3	9;10	11;12	8;12	7	8;12	16;18
Ref ATCC	11;12	12;14	9;13	8;9	11	7;9.3	11	16;18;19
HEK 293-T	11;12	12;14	9;13	8;9	11	7;9.3	11	16;18;19

Apêndice B.

Silenciamento de *HOXD10* por CRISPR-Cas9

Na tentativa de silenciar o gene de interesse, inicialmente foram adquiridas partículas lentivirais comerciais *all-in-one* (U6-gRNA/EF1a-Puro-2A-Cas9-2A-GFP) da Sigma-Aldrich®. A transdução foi realizada nas linhagens de osteossarcoma (SaOS-2/U2-OS) através de partículas lentivirais. Para tal, utilizou-se MOI (*Multiplicity of Infection*) 1, 5 e 10; seguindo recomendações do fabricante e a literatura (KETOLA et al., 2004), e o reagente *Hexadimethrine bromide* (8 µg/ml) para aumentar a eficiência da transdução. A solução lentiviral foi adicionada às células, plaqueada em poço de placa de 96 poços com 120 µl de meio de cultivo sem soro, mantidas por 6 horas nessas condições. Após este tempo, foi acrescido soro e, e as células mantidas por mais 18 horas. Subsequentemente, foi realizada a seleção com puromicina.

No entanto, não foi detectada a expressão do marcador fluorescente por citometria para nenhum dos gRNA (RNAguia) (HS0000252941, HS0000252943, HS0000252955) utilizados com os vetores, sendo as linhagens SAOS-2/U2-OS consideradas como não transduzidas.

Diante deste cenário, repetiram-se os experimentos, testando valores maiores de MOI e outras alternativas experimentais, como número de células semeadas, meios de cultivos, facilitador de transdução (Polibreno) e os três gRNA individualmente assim como misturados, a fim de conseguir aumentar as chances de transdução.

Assim, utilizou-se a mesma metodologia em que o valor de MOI passou de 10 para 50 e 100. Além disso, realizamos outras pequenas alterações procedimentais, como por exemplo diminuir o número de células plaqueadas para 4×10^3 células por poço, ou ainda incubá-las em meio de cultura na presença do vetor lentiviral por 48 horas à 37°C e 5% de CO₂, sendo 24 horas a mais do que o procedimento anterior. Após a realização da transdução, as linhagens celulares foram tratadas com puromicina.

Em todos os casos, para ambas as linhagens, a transdução não foi bem sucedida, evidenciado pela ausência de expressão do marcador fluorescente GFP. Após cada experimento, a eficiência do processo foi confirmada através de Western Blotting, mas não foi possível observar qualquer alteração na expressão proteica de HOXD10 nas células expostas ao vetor em relação às células *wild-type* (**Figura I**). A transdução da linhagem HeLa com os lentivírus, tampouco apresentou os resultados desejados,

independentemente do gRNA utilizado. Entramos em contato com o fornecedor da Sigma®, que reconheceu que a cadeia de refrigeração dos lentivirus podia ter sido afetada pela demora considerável em que ficaram na alfandega durante a importação. Com base em nossas recentes tentativas, nos enviaram outros vetores para reposição.

Após o recebimento destes novos vetores, novas tentativas foram realizadas, mas novamente sem sucesso, levando-nos a procurar outras alternativas.

Figura I. A) Avaliação da expressão proteica de HOXD10 nas linhagens U-2OS e SAOS-2 transduzidas com os vetores de partículas lentivirais all-in-one (U6-gRNA/EF1a-Puro-2A-Cas9-2A-GFP) da Sigma-Aldrich®. A linhagem HeLa foi utilizada como controle. B) Avaliação da expressão proteica de HOXD10 na HeLa. Somente são apresentados dados com o gRNA HS0000252941. WT = Wild-type; V.V. = vetor vazio.

Silenciamento de *HOXD10* por shRNA “in-house”:

Na tentativa de suprir os problemas com o vetor comercial, optamos pela técnica de clonagem de oligonucleotídeos sh.HOXD10 (Exxtend -Solução em Oligos -Paulínia, SP, Brasil) sintetizados em base a sequência já descrita por (VON HEYKING e colaboradores(2016).5’GATCCGGGGTAACTATTATTGCGCATTCAAGAGATGCG CAATAATAGTTACCCCTTTTTTCTAGAG-3’(sense) e 5’- AATTCTCTAGAAAAAAGGGGTAAGTATTATTGCGCATCTCTTGAA TGCGCAATAATAGTTACCCCG-3’ (antisense). Estes oligos foram anelados e inseridos no vetor pLKO.1 Puro (Addgene #8463), que apresenta gene de resistência à puromicina (**Figura II**) e também num segundo vetor, o FUGW (Addgene #14883) que possui proteína verde fluorescente (GFP) (Figura x).

A digestão de ambos os vetores foi realizada utilizando enzimas de restrição específicas para cada plasmídeo: EcoRI (New England Biolabs® #R0101S) e BamHI (New England Biolabs® #R0136S) para pLKO.1 puro, e AgeI (New England Biolabs®

#R0552S) e BamH1 (New England Biolabs® # R0136S) para FUGW. A confirmação da digestão dos vetores foi realizada por meio de corrida em gel de agarose 1%, como exemplificado na **Figura II**. Posteriormente, foi realizada a purificação das bandas do gel utilizando o QIAquick PCR Purification *Kit* (#28106; QUIAGEN) seguindo as normas do fabricante.

Após quantificação do DNA, foram realizadas reações de ligação do inserto shHOXD10 em cada um dos vetores, utilizando a enzima DNA Ligase T4 (ThermoFisher Scientific® #IVGN2104). Posteriormente à ligação, foi realizada a transformação, na qual se inseriu o conteúdo da ligação em bactérias quimiocompetentes (#A3610; Promega®). Para o crescimento destas, utilizou-se uma placa de Petri contendo meio LB ágar com ampicilina. Após confirmação de inserção do vetor nas bactérias, as colônias foram coletadas e incubadas em tubos de ensaio contendo meio LB e ampicilina. Com o propósito de promover a expansão do número de cópias dos vetores, os mesmos foram mantidos em uma estufa a 37°C sob agitação *overnight*, purificados, e concentrados à partir do *Kit* QIAGEN Prep (cat #12123 e #12145).

Figura II. A e B) Mapas dos vetores pLKO.1 Puro e do vetor FUGW, respectivamente; C) Fotografia de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo evidenciando a digestão com enzimas de restrição (AgeI e BamH1) para a abertura e linearização do vetor FUGW.

Para inserção dos plasmídeos nas linhagens celulares SaOS-2 e U2-OS de forma a obter o silenciamento duradouro de *HOXD10*, optamos por fazer a produção de partículas lentivirais. Para tal, utilizamos a linhagem HEK293T por se tratar de uma linhagem com capacidade de produção de retrovírus e com alta suscetibilidade de transfecção. Os vetores de interesse foram inseridos nessas células, juntamente com vetores empacotadores específicos (pCMV-Δ8.9 e pCMV-VSVG) e o otimizador de transfecção Polietilenoimina - PEI (Sigma-Aldrich® #306185). Após 24h o meio foi substituído por

um novo suplementado com 30% de SBF para intensificar a proliferação celular, juntamente com o aumento da produção e liberação das partículas lentivirais. Tais partículas, presentes no meio de cultura, foram coletadas e filtradas com o objetivo de remover quaisquer possíveis resíduos celulares. Por fim, o filtrado foi armazenado e preservado à -80 °C.

Contudo, Após a transdução das partículas lentivirais de shHOXD10 em ambas as linhagens SAOS-2 e U-2OS, não conseguimos constatar a presença de GFP, outros testes foram feitos para confirmação, mas infelizmente não havia funcionado a técnica.

Hiperexpressão de *HOXD10* por vetor lentiviral:

Paralelamente, realizamos experimentos de construção do vetor lentiviral para hiperexpressão de *HOXD10* nas linhagens celulares. A região de *HOXD10* foi amplificada a partir do plasmídeo *HOXD10*-pCDNA (addGene #21007) utilizando os primers 5'CGAAGTGCAGGAGAAGGAAA -3'(sense) e 5'-TTCTGCCACTCTTTGCAGTG -3' (antisense) em seguida a região foi inserida no vetor pLVX-ZsGreen1-N1 (#632565; Clontech®) previamente digerido pelas enzimas EcoRI (New England Biolabs® # R0101S) e BamHI (New England Biolabs® #R0136S), utilizando a *kit* T4 DNA Ligase Master Mix (ThermoFisher Scientific® #IVGN2104) seguindo as recomendações do fabricante. O vetor pLVX-ZsGreen1-N1 contém todos os elementos de processamento viral necessários para a produção de lentivírus, bem como elementos para melhorar o título viral para expressão do transgene.

Após a construção do vetor lentiviral, foi realizada sua transfecção na linhagem HEK293T para empacotamento, da mesma forma como descrito para o empacotamento do vetor com o shHOXD10.

Para transdução utilizaram-se placas de 6 poços. Foram plaqueadas 10×10^5 células por poço, e estas foram incubadas por 48 horas em 2ml de meio de cultivo com 10% de SBF e antibiótico e 1ml da solução com as partículas lentivirais, à 37°C e 5% de CO₂. Após este período, o meio de cultivo foi descartado, e adicionou-se novamente 2ml de meio de cultivo com 10% de SBF e antibiótico, e mais 1ml da solução com as partículas lentivirais por poço. As células foram novamente incubadas por 48 horas, para então retirar-se as partículas não infectantes, e iniciar a seleção das células por meio da adição de meio de cultivo completo com puromicina.

Após 48 horas do início da seleção por puromicina, não foi possível observar a expressão do marcador fluorescente GFP nas linhagens estudadas, tão pouco foi possível verificar qualquer diferença na expressão proteica de HOXD10 nas células de OS transduzidas.