

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

NATÁLIA VOLGARINE SCARABOTO BONFA

**Análise de vias gênicas reguladas pelo gene *HOXB2* em
Glioblastoma**

Ribeirão Preto

2021

NATÁLIA VOLGARINE SCARABOTO BONFA

**Análise de vias gênicas reguladas pelo gene *HOXB2* em
Glioblastoma**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Genética.
Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva
Jr.

Ribeirão Preto
2021

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

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.

Scaraboto Bonfa, Natália Volgarine

Análise de vias gênicas reguladas pelo gene *HOXB2* em Glioblastoma. Ribeirão Preto, 2021.

120 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Silva Jr, Wilson Araújo.

1. Genes HOX. 2. Regulação Gênica. 3. Fator de Transcrição.
4. Glioblastoma. 5. RNA-seq. 6. Chip-seq. 7. PChI-C.

Nome: SCARABOTO BONFA, Natália Volgarine

Título: Análise de vias gênicas reguladas pelo gene *HOXB2* em Glioblastoma.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Genética.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Membro do programa

Instituição: FMRP – USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Membro da USP

Instituição: FMRP– USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Membro externo a USP

Instituição: -USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À todos os cientistas que, dia após dia, lutam para destruir mitos, derrubar preconceitos e tornar nosso mundo um lugar mais justo

AGRADECIMENTOS

Sou grata à minha família por todo amor incondicional, cuidado e carinho ao longo desses anos. Agradeço ao meu irmão pelos bons exemplos; minha mãe por todo carinho e cuidado. Ao meu pai, meu grande companheiro, agradeço por todos seus esforços para que eu pudesse ter tudo o que precisava.

Agradeço ao meu marido Felipe Bonfa, por sempre estar ao meu lado me dando apoio e tanto amor em cada momento. Era você que estava segurando minha mão quando as coisas tornavam-se difíceis nessa jornada, e sempre será você que me motivará a ser minha melhor versão.

Sou grata a todos os meus amigos que sempre tornam meus dias mais felizes. Um agradecimento especial a Graziela, minha companheira de graduação e laboratório. Aprendi muito com você ao longo desses anos, e nunca vou me esquecer dessa nossa parceria que deu tão certo!

Sou grata a todos os meus colegas do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, que direta ou indiretamente me auxiliaram no desenvolvimento do meu projeto, e me proporcionaram um ambiente tão saudável para trabalhar.

Sou grata ao meu orientador, o Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior, por toda paciência e apoio que tem me dado desde minha iniciação científica. Você tem sempre acreditado em mim e me motivado a crescer dia após dia. São 7 anos de uma parceria que ainda tem muita história pela frente.

Sou grata ao Prof. Dr. Peter Fraser, por ter me aceito para estágio em seu laboratório. Você me permitiu uma oportunidade única de experiência internacional e de aprimorar meu projeto. Agradeço também a todo o grupo do laboratório do prof. Fraser, em especial ao senhor Gregg Hoffman, cuja bondade e apoio eu sempre vou me lembrar.

Sou grata a Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, por toda estrutura e apoio que permitiram a execução deste projeto.

Agradeço à Universidade de São Paulo, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), e à Universidade do Estado da Flórida (FSU), por todo conhecimento que adquiri na pós-graduação.

Sou grata aos órgãos de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) / CEPID - Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão – nº processo 2017/24027-6 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, por todo apoio financeiro.

Por fim, sou grata a todos que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho, e a todos aqueles que passaram por mim e deixaram algum conhecimento pelo caminho.

RESUMO

SCARABOTO BONFA, Natália Volgarine. **Análise de vias gênicas reguladas pelo gene *HOXB2* em Glioblastoma**. 2021. 120 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Os genes *HOX* compõem um subgrupo da família Homeobox que são caracterizados pelo alto grau de conservação entre fungos, plantas e animais. Em mamíferos, existem 39 genes *HOX* distribuídos em quatro grupos ou *clusters*: *HOXA*, *HOXB*, *HOXC* e *HOXD*, localizados nos cromossomos 2, 7, 17 e 12, respectivamente. Os genes *HOX* são fatores de transcrição que atuam durante o desenvolvimento embrionário, regulando processos biológicos fundamentais como: proliferação, diferenciação, migração, angiogênese e apoptose. Vários estudos têm demonstrado também um papel importante dos genes *HOX* na tumorigênese, envolvendo um perfil de expressão tecido-específico em diferentes tipos tumorais. Análises previamente realizadas mostraram que o gene *HOXB2* é *up*-regulado em glioblastoma (GBM), e que o seu nível de expressão é um fator significativo no tempo de sobrevida dos pacientes. Neste trabalho, nós demonstramos com ensaios *in vitro* que o gene *HOXB2* regula a proliferação celular, senescência e apoptose em linhagens de glioblastoma. Ensaios de NGS elucidaram, ainda, potenciais alvos do gene *HOXB2* e indicaram a sua atuação sobre várias vias biológicas importantes no contexto tumoral. Não obstante, foi demonstrada a organização do genoma em linhagem de glioblastoma frente às interações do *HOXB2* em promotores e *enhancers*. Trata-se de um estudo original que traz à luz informações relevantes sobre o papel do gene *HOXB2* na regulação da tumorigênese do Glioblastoma.

Palavras-chave: Genes *HOX*, Regulação Gênica, Fator de Transcrição, Glioblastoma, RNA-seq, Chip-seq e PCHi-C.

ABSTRACT

SCARABOTO BONFA, Natália Volgarine. **Analysis of gene pathways regulated by *HOXB2* gene in Glioblastoma**. 2021. 120 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

HOX genes comprise a subgroup of the Homeobox family characterized by a high degree of conservation among fungi, plants, and animals. In mammals, there are 39 HOX genes distributed in four groups or clusters: HOXA, HOXB, HOXC, and HOXD, located on chromosomes 2, 7, 17, and 12, respectively. HOX genes are transcription factors that act during embryonic development, regulating fundamental biological processes such as proliferation, differentiation, migration, angiogenesis, and apoptosis. Several studies have also demonstrated an important role of HOX genes in tumorigenesis, involving a tissue-specific expression profile in different tumor types. Previous analyzes have shown that the HOXB2 gene is up-regulated in glioblastoma (GBM) and that its expression level is a significant factor in a patient's survival time. This work demonstrates that the HOXB2 gene regulates, in vitro, cell proliferation, senescence, and apoptosis in glioblastoma cell lines. NGS assays also elucidated potential targets of the HOXB2 gene and indicated its role in several critical biological pathways in the tumor context. Nevertheless, the genome organization in a glioblastoma cell line was demonstrated in the face of the HOXB2 interactions in promoters and enhancers. In summary, this is an original study that brings to light relevant information about the role of the HOXB2 gene in the regulation of Glioblastoma tumorigenesis.

Keywords: HOX Genes, Gene Regulation, Transcription Factor, Glioblastoma, RNA-seq, ChiP-seq and PCHi-C.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais marcos histopatológicos do GBM	Pg. 19
Figura 2. Colinearidade temporal e espacial dos genes <i>HOX</i>	Pg. 21
Figura 3. Expressão dos genes <i>HOX</i> em glioblastoma	Pg. 23
Figura 4. Correlação entre a sobrevida dos pacientes com GBM e nível de expressão do gene <i>HOXB2</i>	Pg. 26
Figura 5. Promoter Capture Hi-C e design de isca de captura	Pg. 41
Figura 6. Expressão do gene <i>HOXB2</i> em linhagens de astrócito e astrocitoma grau II, III e IV (GBM)	Pg. 45
Figura 7. Alinhamento das sequências obtidas pelo sequenciamento dos shRNAs (Seq_1) e das sequências dos primers dos shRNAs (Seq_2)	Pg. 46
Figura 8. Eficiência do silenciamento do gene <i>HOXB2</i> obtidos a partir de duas sequências de sh <i>HOXB2</i>	Pg. 48
Figura 9. Morfologia das linhagens controle e tratadas com duas sequências de sh <i>HOXB2</i>	Pg. 49
Figura 10. Efeito do silenciamento do gene <i>HOXB2</i> na taxa de proliferação celular das linhagens ACBRI 371, U343 e U87	Pg. 50
Figura 11. Efeito do silenciamento do gene <i>HOXB2</i> na formação de colônias das linhagens ACBRI 371, U343 e U87	Pg. 52
Figura 12. Efeito do silenciamento do gene <i>HOXB2</i> na viabilidade celular das linhagens ACBRI 371, U343 e U87	Pg. 54
Figura 13. Efeito do silenciamento do gene <i>HOXB2</i> na senescência celular das linhagens ACBRI 371, U343 e U87	Pg. 55
Figura 14. Efeito do silenciamento do gene <i>HOXB2</i> na porcentagem de células distribuídas em cada fase do ciclo celular, nas linhagens ACBRI 371, U343 e U87	Pg. 57
Figura 15. Nível de expressão (RNA) do gene <i>HOXB2</i> nas amostras utilizadas no RNA-seq	Pg. 58
Figura 16. Impacto do silenciamento do gene <i>HOXB2</i> no perfil de expressão gênica em linhagem de astrócito	Pg. 59
Figura 17. <i>Dot plot</i> das 50 principais vias biológicas <i>up</i> -reguladas em astrócito após silenciamento do gene <i>HOXB2</i>	Pg. 60
Figura 18. <i>Dot plot</i> das 50 principais vias biológicas <i>down</i> -reguladas em astrócito após silenciamento do gene <i>HOXB2</i>	Pg. 61
Figura 19. Impacto do silenciamento do gene <i>HOXB2</i> no perfil de expressão gênica na linhagem U343	Pg. 62
Figura 20. <i>Dot plot</i> das 50 principais vias biológicas <i>up</i> -reguladas na linhagem U343 após silenciamento do gene <i>HOXB2</i>	Pg. 63
Figura 21. <i>Dot plot</i> das 50 principais vias biológicas <i>down</i> -reguladas na linhagem U343 após silenciamento do gene <i>HOXB2</i>	Pg. 65

Figura 22. Impacto do silenciamento do gene <i>HOXB2</i> no perfil de expressão gênica em linhagem U87	Pg. 66
Figura 23. <i>Dot plot</i> das 50 principais vias biológicas <i>up</i> -reguladas na linhagem U87 após silenciamento do gene <i>HOXB2</i>	Pg. 68
Figura 24. <i>Dot plot</i> das 50 principais vias biológicas <i>down</i> -reguladas na linhagem U87 após silenciamento do gene <i>HOXB2</i>	Pg. 69
Figura 25. Níveis de expressão do gene <i>HOXB2</i> após transdução com a sequência de <i>shHOXB2</i> (shRNA2)	Pg. 69
Figura 26. Relatório de qualidade das amostras sequenciadas, gerado pelos <i>scripts Truncater e Mapper</i> , do HiCUP	Pg. 70
Figura 27. Relatório de qualidade das amostras sequenciadas, gerado pelo <i>script Filter</i> , do HiCUP	Pg. 71
Figura 28. Número de interações únicas estatisticamente significativas identificadas no controle (círculo amarelo) e na condição <i>shHOXB2</i> (círculo azul)	Pg. 73
Figura 29. Interações genômicas identificadas pela ferramenta ChiCAGO	Pg. 74
Figura 30. Interação única entre o promotor do gene <i>ATP5PB</i> (seta vermelha) e elemento regulador no gene <i>TMIGD3</i> (seta preta), na condição <i>shHOXB2</i>	Pg. 77
Figura 31. Interação única entre o promotor do gene <i>NDUF11</i> (seta vermelha) e elemento regulador no gene <i>UBA1</i> (seta preta), na condição <i>shHOXB2</i>	Pg. 78
Figura 32. Interação única entre o promotor do gene <i>TNFRSF1A</i> (seta vermelha) e elemento regulador no gene <i>CD9</i> (seta preta), na condição <i>shHOXB2</i>	Pg. 79
Figura 33. Interação única entre o promotor do gene <i>RPAIN</i> (seta vermelha) e elemento regulador no gene <i>DHX33</i> (seta preta), na condição <i>shHOXB2</i>	Pg. 80
Figura 34. Interação única entre o promotor do gene <i>PRIMPOL</i> (seta vermelha) e elemento regulador no gene <i>CENPU</i> (seta preta), na condição <i>shHOXB2</i>	Pg. 81
Figura 35. Interação única entre o promotor do gene <i>SPHK2</i> (seta vermelha) e elemento regulador no gene <i>SPHK2</i> , e três elementos reguladores no gene <i>DBP</i> (setas pretas), na condição <i>shHOXB2</i>	Pg. 82
Figura 36. Interação única entre o promotor do gene <i>EIF4B</i> (seta vermelha) e elemento regulador no gene <i>EIF4B</i> (seta preta), na condição <i>shHOXB2</i>	Pg. 83
Figura 37. Interação única entre o promotor do gene <i>MARS</i> (seta vermelha) e elemento regulador no gene <i>MARS</i> , e três elementos reguladores no gene <i>DDIT3</i> e <i>KIF5A</i> (setas pretas), na condição <i>shHOXB2</i>	Pg. 84
Figura 38. Interação única entre o promotor do gene <i>VTI1B</i> (seta vermelha) e elemento regulador nos genes <i>PLEHH1</i> , <i>PIGH</i> , <i>ARG2</i> e <i>RDH11</i> (setas pretas), na condição <i>shHOXB2</i>	Pg. 86
Figura 39. Interação única entre o promotor do gene <i>F11R</i> (seta vermelha) e elemento regulador no gene <i>F11R</i> , e elementos reguladores nos genes <i>NECTIN4</i> , <i>PFDN2</i> e <i>UFC1</i> (setas pretas), na condição <i>shHOXB2</i>	Pg. 87
Figura 40. Fragmentação mecânica da cromatina nas linhagens ACBRI 371, U343 e U87	Pg. 88

Figura 41. Eletroferograma das amostras <i>input</i> e imunoprecipitadas com o anti- HOXB2	Pg. 89
Figura 42. Vias significativamente reguladas pelos alvos diretos do <i>HOXB2</i>	Pg. 90
Figura 43. Representação esquemática dos possíveis papéis na tumorigênese de quatro genes preditos como alvos diretos do gene <i>HOXB2</i> em glioblastoma	Pg. 95
Figura 44. Organização da rede gênica das linhagens de glioblastoma nas condições controle (à esquerda) e <i>shHOXB2</i> (à direita)	Pg. 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de <i>p value</i> dos genes <i>HOX</i> e Coeficiente de Cox	Pg. 25
Tabela 2. Linhagens celulares empregadas neste trabalho, e seus respectivos tipos de tecido e meios de cultivo	Pg. 31
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> para a construção dos “ <i>Short Hairpins</i> ”	Pg. 34
Tabela 4. Vias biológicas reguladas diferencialmente após o silenciamento do gene <i>HOXB2</i> e seus respectivos genes envolvidos	Pg. 76
Tabela 5. Concentração do DNA das amostras input e imunoprecipitadas com anti- <i>HOXB2</i>	Pg. 88
Tabela 6. Alvos do gene <i>HOXB2</i> , preditos <i>in silico</i>	Pg. 92
Tabela 7. Alvos do gene <i>HOXB2</i> , preditos <i>in silico</i> , diferencialmente expressos na condição sh <i>HOXB2</i> nas linhagens de GBM	Pg. 93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTA	<i>American Brain Tumor Association</i>
ANOVA	Análise de variância
ARK1B1	Aldo-ceto redutase 1
ATP	Adenosina trifosfato
ATP5PB	Subunidade β da ATP sintase mitocondrial
cDNA	DNA complementar
ChiP	Imunoprecipitação da cromatina
Clbio	Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Ácido nucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIF4B	Fator de iniciação da tradução eucariótica 4B
FASN	Ácido graxo sintase
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
F11R	Proteína de adesão juncional A
GATA-1	Fator de transcrição eritróide
GBM	Glioblastoma
HOTAIR	<i>HOX</i> transcript antisense RNA
HOX	Homeobox
IgG	Imunoglobulina
KIRREL-AS2	Molécula 1 de adesão da família nefrina 1 – RNA antisense 2
LAMA4	Subunidade alfa-3 da laminina
LncRNA	RNA longo não-codificador
MARS	Metionil-tRNA sintetase citoplasmática
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA

NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NDUFB11	NADH desidrogenase ubiquinona subunidade 11
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
pb	Par de bases
PBS	Tampão fosfato-salino
PCHi-C	<i>Promoter Capture Hi-C</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGPEP1	Piroglutamil-peptidase I
pH	Tampão fosfato-salino
PI	Iodeto de propídio
PNMA2	Antígeno paraneoplásico Ma2
PRIMPOL	DNA polimerase e primase
RNA	Ácido ribonucléico
RNaseA	Ribonuclease
RPAIN	Proteína de interação com RPA
RT	Transcriptase reversa
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa qualitativa e quantitativa
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio
Seq	Sequenciamento
shHOXB2	<i>Short Hairpin HOXB2</i>
SPHK2	Esfingosina quinase 2
SPRI	Solid Phase Reversible Immobilization
shRNA	<i>Short Hairpin RNA</i>
shRNA1	<i>Short Hairpin RNA 1</i>
shRNA2	<i>Short Hairpin RNA 2</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TNFRSF1A	Receptor do fator de necrose tumoral I
VTI1B	Transporte da vesícula através da interação com o homólogo 1B de t-SNAREs
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	Pg. 19
1.1. Glioblastoma	Pg. 19
1.2. Genes <i>HOX</i>	Pg. 20
1.3. Genes <i>HOX</i> e câncer	Pg. 22
1.4. Genes <i>HOX</i> e glioblastoma	Pg. 23
1.5. Gene <i>HOXB2</i>	Pg. 26
2.OBJETIVOS	Pg. 29
2.1. Objetivo geral	Pg. 29
2.2. Objetivos específicos	Pg. 29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	Pg. 31
3.1. Aspectos éticos e biossegurança	Pg. 31
3.2. Manutenção e expansão das linhagens celulares	Pg. 31
3.3. Extração de RNA	Pg. 32
3.4. Análise dos níveis de expressão por meio de PCR em tempo real (RT-qPCR)	Pg. 32
3.5. Análise de expressão da proteína HOXB2	Pg. 33
3.6. Construção do vetor de short hairpin RNA (shRNA)	Pg. 33
3.7. Sequenciamento do vetor de shRNA para confirmação da clonagem	Pg. 34
3.8. Produção das partículas lentivirais	Pg. 34
3.9. Transdução lentiviral das linhagens ACBRI 371, U343 e U87	Pg. 35
3.10. Ensaio funcionais <i>in vitro</i>	Pg. 35
3.10.1. Proliferação	Pg. 35
3.10.2. Clonogênico	Pg. 36
3.10.3. Viabilidade celular/apoptose	Pg. 36
3.10.4. Senescência celular	Pg. 37
3.10.5. Ciclo celular	Pg. 37
3.11. Sequenciamento de RNA (RNA-seq)	Pg. 38
3.11.1. Preparo das bibliotecas e sequenciamento	Pg. 38
3.11.2. Análise dos dados	Pg. 39
3.12. <i>Promoter Capture Hi-C</i> (PCHi-C)	Pg. 39
3.12.1. Protocolo experimental	Pg. 40
3.12.2. Análise dos dados	Pg. 42
3.13. Imunoprecipitação da cromatina (ChiP)	Pg. 42
3.14. Análises estatísticas	Pg. 43

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	Pg. 45
4.1. Análise da expressão do gene <i>HOXB2</i> no painel de linhagens celulares de cérebro e seleção das linhagens para os ensaios celulares	Pg. 45
4.2. Produção das linhagens com silenciamento estável do gene <i>HOXB2</i>	Pg. 47
4.3. Caracterização funcional do gene <i>HOXB2</i>	Pg. 48
4.3.1. Proliferação celular	Pg. 50
4.3.2. Clonogênico	Pg. 51
4.3.3. Viabilidade celular/apoptose	Pg. 52
4.3.4. Senescência celular	Pg. 54
4.3.5. Ciclo celular	Pg. 56
4.4. Análise do impacto do silenciamento do gene <i>HOXB2</i> sobre o padrão global de transcrição das linhagens de glioblastoma e astrócito	Pg. 57
4.5. Análise do impacto do silenciamento do gene <i>HOXB2</i> na conformação do genoma da linhagem U87	Pg. 70
4.5.1. Análise ChiCAGO	Pg. 73
4.6. Identificação dos alvos do gene <i>HOXB2</i> em linhagens de glioblastoma	Pg. 87
4.7. Predição <i>in silico</i> dos alvos do gene <i>HOXB2</i>	Pg. 90
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS	Pg. 98
6. CONCLUSÕES	Pg. 100
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pg. 102
8. APÊNDICE	Pg. 109
8.1. Protocolo experimental da técnica <i>Promoter Capture Hi-C</i> (PCHi-C)	Pg. 109
9. ANEXO	Pg. 119
9.1. Parecer da Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto	Pg. 119
9.2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	Pg. 120

1. INTRODUÇÃO

1.1. Glioblastoma

Segundo a Organização Mundial da Saúde, os gliomas são tumores que acometem as células da glia, sendo classificados em três grandes grupos: Astrocitomas (grau II e III); Oligodendrogliomas (grau II e III) e glioblastomas (astrocitoma grau IV) (Zhang et al., 2020). Entre os grupos, o glioblastoma é o glioma mais invasivo e agressivo (Szopa et al., 2017), representando 60-75% de todos os astrocitomas (*American Brain Tumor Association - ABTA*). A incidência do glioblastoma aumenta conforme o avanço da idade, sendo mais prevalente em indivíduos homens (ABTA). Segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA 2020), 11 mil pacientes são diagnosticados com glioblastoma por ano no Brasil. O glioblastoma (GBM) tende a se desenvolver nos hemisférios cerebrais, principalmente nas regiões frontotemporal e parietal (Netto et al., 2016). São marcados pela intensa capacidade de invadir as regiões adjacentes e apresentam alta reincidência após ressecção cirúrgica (Phillips et al., 2006). Além disso, o GBM é considerado um dos tumores sólidos mais angiogênicos, mostrando alto grau de proliferação vascular e hiperplasia endotelial (Angelucci & Sica, 2019). A Figura 1 traz as principais modificações histopatológicas associadas à progressão do glioblastoma.

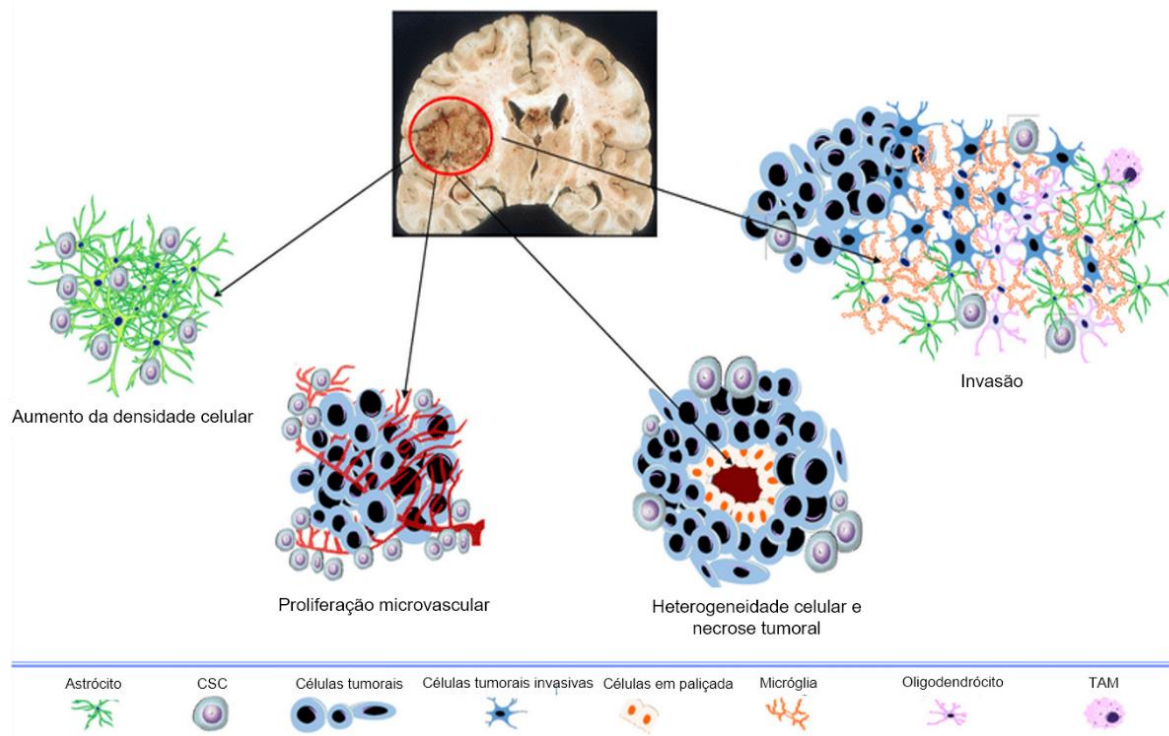


Figura 1. **Principais marcadores histopatológicos do GBM.** CSC: Células-tronco tumorais; TAM: Macrófago associado a tumor. Adaptado de Angelucci & Sica, 2019.

A partir das características clinicopatológicas, os glioblastomas são divididos em glioblastoma primário e secundário (Ohgaki; Kleihues, 2013). O glioblastoma primário surge diretamente como um astrocitoma na gradação IV, apresentando maior agressividade e tendendo a acometer indivíduos mais velhos. O secundário, por outro lado, se desenvolve a partir dos graus mais inferiores dos astrocitomas (II ou III) e apresenta crescimento inicial lento, tornando-se mais agressivo com a evolução do tempo. Independentemente de primário ou secundário, o glioblastoma apresenta uma intensa inter e intra heterogeneidade tumoral, envolvendo características histopatológicas e genéticas, como mutações e diferentes estados de metilação do DNA (Zhang et al., 2020). Todas essas variabilidades resultam em desafios para o tratamento do tumor e corroboram diretamente para o baixo tempo de sobrevida após o diagnóstico (Homma et al., 2006; Marusyk and Polyak, 2010; Szerlip et al., 2012; Brennan et al., 2013). Mesmo com a combinação de cirurgia, quimioterapia e radioterapia, o tempo médio de sobrevida dos pacientes acometidos pelo glioblastoma é de apenas 15 meses (Batilekar et al., 2014), com taxa de sobrevivência de 5% após cinco anos do diagnóstico (Verhaak et al., 2010).

1.2. Genes *HOX*

O universo dos genes *HOX* passou a ser desvendado no início do século passado com os experimentos de Bridges e Morgan envolvendo *Drosophila melanogaster* (Bridges & Morgan, 1923). A observação de *Drosophilas* mutantes que apresentavam alterações na estrutura corpórea e no desenvolvimento, que incluíam a substituição de antenas por patas, levaram esses pesquisadores a sugerir a existência de genes responsáveis pelo desenvolvimento das *Drosophilas*. Décadas depois esses genes foram confirmados e denominados de homeóticos, ou simplesmente *HOX*. Genes *HOX* ortólogos foram encontrados na maioria dos animais (McGinnis et al., 1994). Nos vertebrados, tais genes estão contidos em *clusters* (famílias), e o número de membros varia de acordo com a complexidade anatômica dos organismos. Até o presente momento já foram identificados em mamíferos 39 genes *HOX*, que se subdividem em quatro *clusters*, denominados de *HOXA*, *HOXB*, *HOXC* e *HOXD*, localizados nos cromossomos 2, 7, 17 e 12, respectivamente (McGinnis et al., 2006).

Os genes *HOX* têm como uma das funções mais marcantes a formação do eixo ântero-posterior (A-P) dos vertebrados. Eles atuam na diferenciação de tipos celulares, tecidos e órgãos, localizados nessa região, e regulam vários processos

biológicos como proliferação, migração, adesão e morte celular, de acordo com o molde morfológico (organismo) a ser desenvolvido (Zakany; Zakany, 2007). Assim como outros genes da superfamília Homeobox, os genes *HOX* codificam fatores de transcrição que se caracterizam por possuírem um domínio de ligação ao DNA, chamado de homeodomínio (Scott et al., 1983). São capazes de ativar e reprimir em diversos tipos de células e tecidos múltiplos genes efetores ao longo do desenvolvimento embrionário (Levine; Hoey, 1998).

A regulação dos genes *HOX* durante o desenvolvimento canônico dos vertebrados segue preceitos de colinearidade espacial e temporal. A posição do gene *HOX* dentro do seu *cluster* corresponde à sua expressão no eixo A-P (Figura 2) e os genes mais à 3' são expressos antes daqueles com posição mais à 5'. Além disso, existe certa prevalência da região posterior, de forma que os genes *HOX* que estão posicionados na região 5' do *cluster* terão dominância fenotípica sobre aqueles mais anteriores (Shah; Sukumar, 2010).

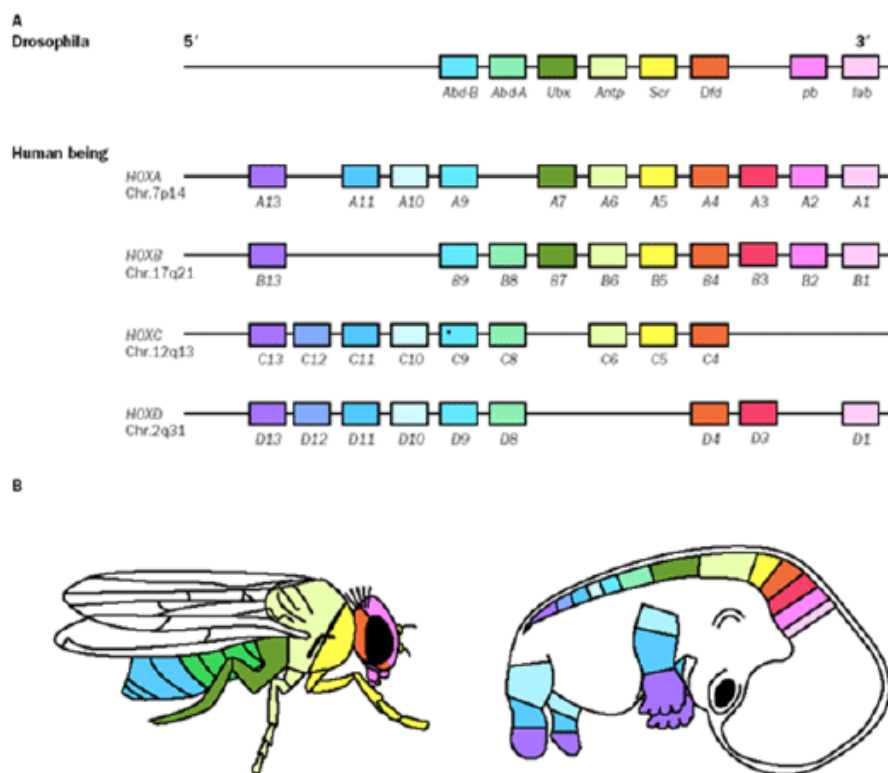


Figura 2. **Colinearidade temporal e espacial dos genes *HOX***. Fonte: Goodman et al., 2003.

1.3. Genes *HOX* e câncer

Apesar dos mecanismos de regulação durante o desenvolvimento canônico, alterações nos níveis de expressão de vários genes *HOX* têm sido relatadas em inúmeros tipos de tumores, exemplos (Alami et al., 1999; Maeda et al., 2004; Moon et al., 2012; Hur et al., 2014; Zhai et al., 2007). Os mecanismos epigenéticos são os principais responsáveis pelo padrão de expressão aberrante, como, por exemplo, a metilação de ilhas CpGs na região promotora dos genes *HOX*, que resulta no silenciamento da sua expressão (Hershiko et al., 2003; Raunch, 2007). O silenciamento dos genes *HOX* devido a metilação da região promotora foi evidenciado em tumores tais como mama, ovário e melanoma (Miyamoto et al., 2005; Cai et al., 2007; Furuta et al., 2006), sugerindo que este seja um mecanismo importante na regulação da expressão dos genes *HOX* em diferentes tumores. Além do controle epigenético, é sabido que a expressão dos genes *HOX* é regulada por mecanismos pós-transcricionais. A nível pós transcricional, Chopra e Misha (2006) relataram que microRNAs (miRNAs) localizados na região dos *clusters HOX* também são responsáveis pelo controle da expressão dos genes *HOX*. A regulação ocorre devido a degradação do RNA mensageiro (mRNA) ou bloqueio da tradução (Chopra; Misha, 2006). Além disso, RNAs longos não codificadores (lncRNAs) foram descritos atuando na regulação da expressão de genes *HOX* em cis (Sessa et al., 2007; Sasaki et al., 2007), ou trans, como é o caso do Hotair, um lncRNA localizado no *cluster HOXC* que regula diretamente a expressão dos genes *HOXD* (Rinn et al., 2007).

Os efeitos das alterações dos níveis de expressão dos genes *HOX* são variáveis, sendo notável uma especificidade tecidual (Shah; Sukumar, 2010). Por exemplo, em tumores colorretais, a *up*-regulação do gene *HOXB7* contribui para a proliferação e tumorigênese através da regulação do ciclo celular (Liao et al., 2011). Em outros contextos tumorais, o aumento dos níveis de expressão dos genes *HOX* contribui para a tumorigênese por meio do escape de apoptose (Chen et al., 2007) e alterações nos receptores de sinais, que dirigem o crescimento do tumor (Miao et al., 2007), bem como no mecanismo de transição epitélio-mesenquimal (Shah; Sukumar, 2010) que está associado ao processo metastático.

1.4. Genes *HOX* e glioblastoma

Devido à alta expressão dos genes *HOX* em glioblastoma, alguns estudos relataram o papel destes genes durante a progressão tumoral. Tabuse et al (2011) concluíram, por exemplo, que a *up*-regulação do gene *HOXD9* promove a proliferação e a sobrevivência celular em linhagens tumorais de GBM. Li et al (2017) e Gaspar et al (2010), por outro lado, demonstraram que alguns genes *HOX* podem funcionar como indicadores do prognóstico, devido ao seu padrão de expressão tecido-específico. Segundo Li e colaboradores (2017), a superexpressão do gene *HOXC4*, que é co-expresso com o antígeno CD133 (um marcador de células-tronco tumorais), está relacionada a uma menor sobrevida dos pacientes portadores de GBM. Segundo Gaspar et al (2010), altos níveis de expressão do gene *HOXA9* e *A10* também estão relacionados a um prognóstico ruim, uma vez que a *up*-regulação destes genes combinada com outras alterações genéticas pode levar à resistência ao tratamento com Temozolomida.

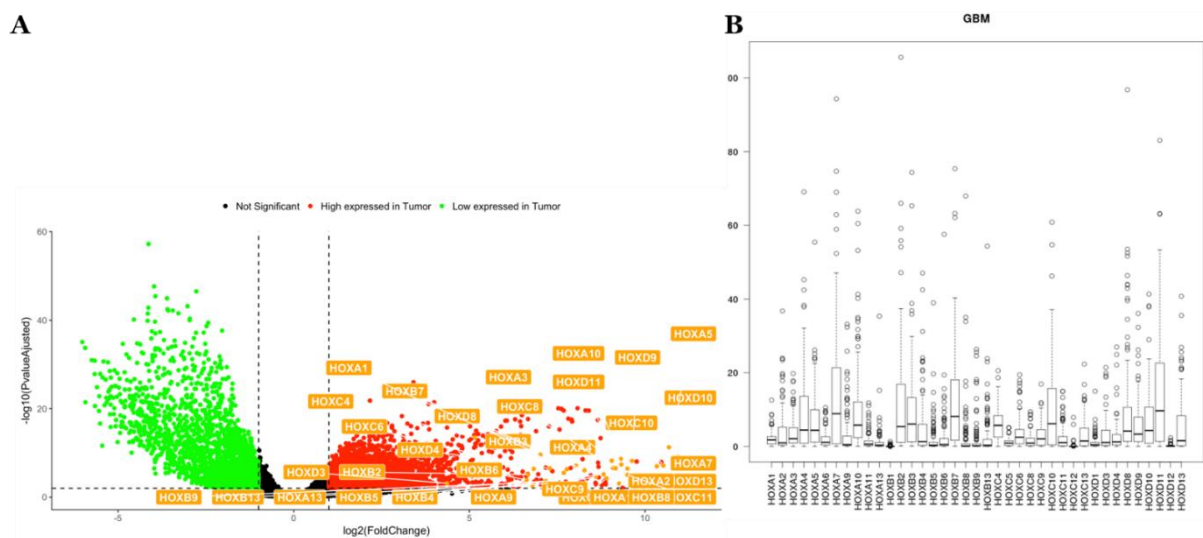


Figura 3. **Expressão dos genes *HOX* em glioblastoma.** **A.** *Volcano plot* dos genes *HOX* *down* (à esquerda) e *up* (à direita) regulados em GBM. O eixo x representa o \log_2 dos valores de fold-change e o eixo y mostra o $-\log_{10}$ do p valor ajustado. **B.** *Box plots* evidenciando a expressão dos 39 genes *HOX* em GBM.

Numa análise prévia, nosso grupo avaliou o perfil de expressão dos genes *HOX* em glioblastoma, utilizando dados públicos depositados no TCGA (*The Cancer Genome Atlas*). Os resultados, mostrados na Figura 3A, indicam que 33 dos 39 genes *HOX* são *up*-regulados em glioblastoma. Dos 33 genes *up*-regulados, destacam-se os genes *HOXA7*, B2, B7, C10 e D11 (Figura 3B). Já foi evidenciado que vários genes *HOX* são *up*-regulados ou altamente expressos em GBM, tanto em amostras de tecido quanto em linhagens tumorais (Fattah et al, 2006).

A busca por correlações entre os níveis de expressão dos genes *HOX* e o tempo de sobrevida dos pacientes acometidos pelo glioblastoma é uma abordagem interessante para a seleção de genes indicadores de prognóstico e alvos para estudo, e já vem sendo realizada por alguns estudos citados anteriormente (Li et al, 2017; Gaspar, et al, 2010). A tabela 1, elaborada com dados do TCGA a partir da plataforma *Oncolnc*, sumariza os resultados do modelo de Regressão de Cox em que é avaliado o efeito dos níveis de expressão de cada gene *HOX* sobre o tempo de sobrevida dos pacientes com GBM. Selecionando-se o conjunto de 25% e 50% dos pacientes com GBM, que mais e menos expressam cada gene, obtivemos os valores de *p* para cada situação, considerando significância estatística para os valores de $p < 0,05$. Isso significa que para os genes *HOX* cujos *p-values* foram $< 0,05$, há uma significância estatística na diferença do tempo de sobrevida dos pacientes cujos tumores expressaram os maiores e os menores níveis de expressão de cada *HOX*. Nesse sentido, observa-se que, dentre os 33 genes *HOX up*-regulados em GBM, apenas os genes *HOXB2*, B5, B8 e B9 apresentaram *p-values* significativos nas duas situações (25% e 50% das amostras de GBM com os maiores e menores níveis de expressão) (Tabela 1). Além disso, os valores de Coeficiente de Cox foram positivos para esses genes, o que demonstra que a correlação se estabelece entre maiores níveis de expressão gênica e menores intervalos de sobrevida.

Tabela 1. Valores de *p value* dos genes *HOX* e Coeficiente de Cox. A amostragem compreende 25% e 50% dos GBMs com os maiores e menores níveis de expressão de cada gene *HOX*. Valores obtidos a partir do Modelo de Regressão de Cox

Gene	Valor de p (25%)	Valor de p (50%)	Coeficiente de Cox
HOXA1	0,595	0,31	-0,046
HOXA2	0,31	0,347	0,148
HOXA3	0,0546	0,304	0,047
HOXA4	0,181	0,179	0,112
HOXA5	0,659	0,396	-0,022
HOXA7	0,855	0,954	0,036
HOXA9	0,2	0,692	0,078
HOXA10	0,17	0,0578	-0,037
HOXA13	0,00236	0,0368	-0,175
HOXB2	0,0242	0,00182	0,211
HOXB3	0,0167	0,0728	0,14
HOXB4	0,0836	0,029	0,157
HOXB5	0,00422	0,0467	0,259
HOXB6	0,36	0,11	0,083
HOXB87	0,00505	0,0526	0,223
HOXB8	0,0128	0,00569	0,195
HOXB9	0,00946	0,00866	0,301
HOXB13	0,282	0,013	0,124
HOXC4	0,358	0,468	0,138
HOXC4	0,358	0,468	0,138
HOXC6	0,0631	0,0139	0,211
HOXC8	0,1	0,0028	0,157
HOXC9	0,13	0,0385	0,173
HOXC10	0,076	0,019	0,176
HOXC11	0,0172	0,0996	0,207
HOXD3	0,931	0,946	0,011
HOXD4	0,96	0,129	0,051
HOXD8	0,0551	0,844	0,131
HOXD9	0,403	0,033	0,119
HOXD10	0,0597	0,039	0,231
HOXD11	0,0179	0,0539	0,245
HOXD13	0,752	0,357	0,143

Entre os genes *HOX* demonstrados como os melhores indicadores de prognóstico, o gene *HOXB2* se destaca devido a sua alta expressão nos resultados obtidos em amostras do TCGA realizadas pelo nosso grupo (Figura 1). A análise de sobrevida realizada na plataforma *Oncolnc* revela que o nível de expressão do gene *HOXB2* impacta no tempo de sobrevida dos pacientes com glioblastoma (Figura 4). Observa-se que os pacientes cujos tumores apresentaram menores níveis de expressão do gene *HOXB2* sobreviveram mais tempo do que aqueles que exibiram os maiores níveis de expressão. Essa correlação torna-se ainda mais acentuada quando a amostragem é aumentada (Figura 4B), em que todos os pacientes com altos níveis de expressão do *HOXB2* no tumor faleceram em até 1500 dias.

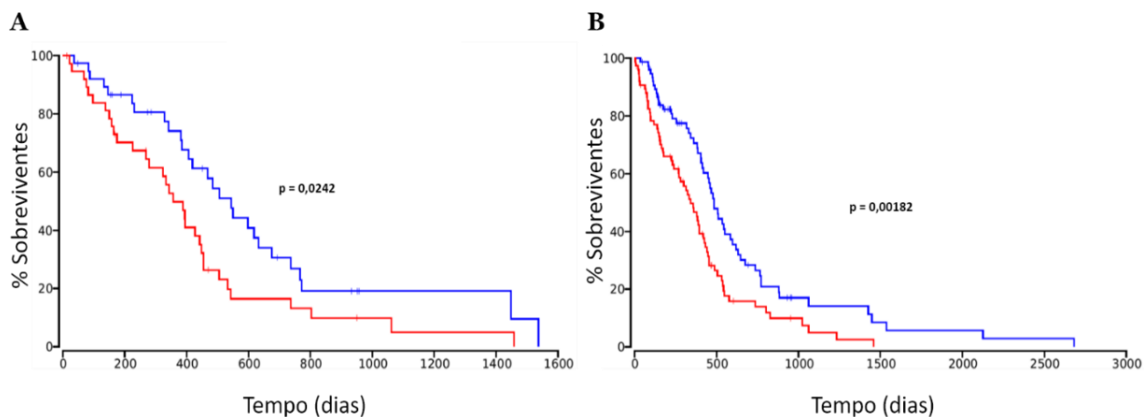


Figura 4. **Correlação entre a sobrevida dos pacientes com GBM e nível de expressão do gene *HOXB2*.** Curva azul e vermelha representam, respectivamente, *down* e *up*-regulação de *HOXB2*. Amostragem de 25% dos pacientes. B. Amostragem de 50% dos pacientes. (Retirado da plataforma *Oncolnc*).

1.5. Gene *HOXB2*

O gene *HOXB2*, assim como alguns outros genes do *cluster B* e *A*, exerce papéis no desenvolvimento neural (Maconochie et al., 1997). Ele é um dos responsáveis pelo desenvolvimento e segmentação do rombencéfalo e pelo controle do surgimento de subtipos neuronais no rombômero 3 (Davenne et al., 1999), bem como pela formação da parede ventral corpórea (Manley et al., 2001). Ainda, tem ação na hematopoese, sendo regulado pelo fator de transcrição GATA-1 durante o desenvolvimento dos eritrócitos (Vieille-Grosjean; Huber, 1995). É sabido que o gene *HOXB2* também é regulado pelo ácido retinóico, tanto durante o desenvolvimento embrionário quanto na carcinogênese (Segara et al., 2005).

Alterações nos níveis de expressão do gene *HOXB2* têm sido reportadas e analisadas em alguns tipos de tumores. Em estudos envolvendo câncer de mama

(Boimel et al., 2011) e leucemia mieloide aguda (Lindblad, et al., 2015), o *HOXB2* comporta-se como supressor tumoral. No câncer de pâncreas, por outro lado, a expressão ectópica do gene *HOXB2* ocorre em uma significativa parcela de pacientes, e demonstra uma profunda associação com a progressão tumoral. Em pacientes que fizeram a ressecção cirúrgica do câncer de pâncreas, por exemplo, apenas aqueles que não expressavam o gene *HOXB2* tiveram uma vantagem na sobrevivência (Segara et al., 2005). No estágio I de adenocarcinoma de pulmão, o *HOXB2* encontra-se *up*-regulado, promovendo a invasão tumoral através da regulação transcricional de genes relacionados à metástase (Inamura et al., 2008). Um destes genes é o *LAMA4*, que tem se mostrado essencial para a progressão de tumores da glia (Inamura et al., 2008). Em câncer de cérvix, o gene *HOXB2* também atua como promotor tumoral, de forma que o aumento na sua expressão parece ser um evento importante na evolução do tumor (Gonzalez-Herrera et al., 2015).

Vários estudos têm associado a desregulação dos genes *HOX* com o desenvolvimento de diferentes tipos de tumores, uma vez que esses genes participam do controle de vários processos biológicos. A avaliação da expressão dos genes *HOX* em glioblastoma, realizada pelo nosso grupo, evidenciou um claro padrão de genes *up*-regulados, de forma que os níveis de expressão de quatro genes do *cluster B* mostraram ter influência sobre o tempo de sobrevida dos pacientes. Entre esses, o gene *HOXB2* destaca-se pelo seu alto nível de expressão, sendo o quarto gene *HOX* mais expresso em GBM. Vários estudos já têm elucidado seus papéis no desenvolvimento do câncer, atuando tanto como supressor quanto promotor tumoral, dependendo do contexto tecidual. Nesse sentido, a caracterização global do gene *HOXB2* em glioblastoma torna-se importante para uma melhor compreensão da atuação desse gene nesse tipo tumoral. Essa compreensão pode auxiliar na descoberta de novos marcadores de prognóstico e na abertura de novas frentes de terapia do glioblastoma.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente projeto teve por objetivo investigar o papel funcional do gene *HOXB2* no glioblastoma e identificar seus potenciais alvos e vias gênicas reguladas, bem como elucidar a atuação do gene *HOXB2* na topologia do genoma de linhagem de glioblastoma.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o perfil de expressão do gene *HOXB2* em linhagens de GBM e de astrócito.
2. Avaliar o efeito do silenciamento do *HOXB2* sobre a viabilidade celular/apoptose, senescência, ciclo celular, proliferação e clonogenia, em linhagens de glioblastoma e em linhagem de astrócito.
3. Avaliar o impacto do silenciamento do gene *HOXB2* no padrão global de transcrição em linhagens de glioblastoma e em linhagem de astrócito.
4. Compreender as interações genômicas em linhagem de glioblastoma e elucidar o papel do gene *HOXB2* na topologia do genoma.
5. Identificar genes-alvo de *HOXB2* em linhagens de glioblastoma.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos e biossegurança

Este trabalho foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio) com o número de processo 297/2019.003-02 e dispensado de submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa pela coordenação do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Anexo).

3.2. Manutenção e expansão das linhagens celulares

Em nosso projeto, utilizamos ao total 12 linhagens celulares (Tabela 2), originadas de tecido cerebral e mantidas no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática ligado ao Centro de Terapia Celular (CEPID/FAPESP). Previamente à utilização no projeto, o DNA dessas linhagens foi analisado para confirmação genotípica. As linhagens, previamente estocadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e cultivadas em meio apropriado (Gibco) (Tabela 2), sem antibióticos e suplementado com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em estufa úmida a 5% CO₂ e 37°C, e foram testadas regularmente para identificação de contaminação por bactérias do gênero *Mycoplasma*.

Tabela 2. Linhagens celulares empregadas neste trabalho, e seus respectivos tipos de tecido e meios de cultivo.

Linhagem celular	Tipo	Meio de cultivo
ACBRI 371	Astrócito	DMEM, <i>High glucose</i>
R186	Astrocitoma grau II	DMEM, <i>High glucose</i>
R286	Astrocitoma grau II	DMEM, <i>High glucose</i>
R259	Astrocitoma grau II	DMEM, <i>High glucose</i>
UW467	Astrocitoma grau III	DMEM, <i>High glucose</i>
U87	Glioblastoma	DMEM, <i>High glucose</i>
U138	Glioblastoma	DMEM, <i>High glucose</i>
U251	Glioblastoma	DMEM, <i>High glucose</i>
U343	Glioblastoma	MEM
T98G	Glioblastoma	DMEM, <i>High glucose</i>
GAMG	Glioblastoma	DMEM, <i>High glucose</i>
SF188	Glioblastoma	DMEM, <i>High glucose</i>

3.3. Extração de RNA

O RNA total das linhagens foi isolado pelo *Trizol* (*Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, EUA*) seguindo as orientações do protocolo do fabricante. A quantificação do material foi realizada por espectrofotometria em comprimento de onda 260nm no equipamento NanoDrop® 1000 (*Thermo Fisher Scientific*). O RNA das amostras empregadas no RNA-seq foi extraído com a utilização do *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN), seguindo as orientações do fabricante.

Os cDNAs das linhagens foram preparados utilizando o *High Capacity Kit* (*Thermo Fisher Scientific*). Para 1µg de RNA, utilizamos as seguintes quantidades de reagentes: 2µl RT solução-tampão 10x, 0,8µl dNTPs, 2µl 10x RT *Random Primer*, 1µl enzima *multiscribe* e 4,2µl água ultrapura *nuclease free*. Ciclo: 25°C (10 minutos); 37°C (2 horas); e 4°C (infinito).

3.4. Análise dos níveis de expressão por meio de PCR em tempo real (RT-qPCR)

A análise de RT-qPCR foi utilizada para analisar o silenciamento do gene *HOXB2* a nível transcricional e avaliar o seu perfil de expressão nas linhagens estudadas. Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit de transcrição reversa *High Capacity cDNA Transcription Kit* (*Applied Biosystems*). As reações foram realizadas com 1µg de RNA total, 2µl de 10X *RT random primers*, 2µl de 10X *first strand buffer*, 0,8µl de dNTPs 100mM, 1µl de enzima *Multiscribe* e 4,2µl água tratada livre de RNases. As reações foram incubadas a 25°C por 10 minutos e 37°C por 2 horas e posteriormente armazenada a - 20°C. Para a análise de qPCR foi utilizada sonda *Taqman® HOXB2* (IDT) e o gene normalizador *HPRT1* (*Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1*), no equipamento *7500 fast Real Time PCR System* (*LifeTech*). As reações foram preparadas em duplicata biológica, com 5µl de *Taqman® PCR Master Mix 2X*, 1µl da sonda e 2µl de cDNA (diluição 1:5) em volume final de 10µl. As condições da reação de amplificação para foram de 50°C por 20 segundos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e de 60°C por 1 minuto. Cada experimento foi feito em triplicata.

3.5. Análise da expressão da proteína HOXB2

Para analisar o silenciamento do gene *HOXB2* a nível traducional, em cada linhagem, o extrato protéico foi obtido a partir da lise de 250 mil células com 100µl de tampão de amostra concentrado cinco vezes (Tris 225mM, SDS 7,5%, glicerol 1%; azul de bromofenol 1% e β-mercaptoetanol 25%). Os extratos proteicos foram quantificados utilizando o *kit Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. 30µg de proteína total por amostra foram separadas por eletroforese de gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas em membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com o tampão TBST (1X TBS, 0.25% Tween-20), contendo 5% de leite em pó desnatado a temperatura ambiente, *overnight*. Em seguida, a membrana foi incubada na presença do anticorpo anti-*HOXB2* e do endógeno tubulina. Após a incubação, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 min com o tampão TBS-T e incubada com o secundário *anti-rabbit*. Por fim, as bandas foram visualizadas no aparelho *ImageQuant* (GE Healthcare) por quimioluminescência usando o *ECL™ Prime Western Blotting System* (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados dois diferentes anti-*HOXB2*: Abcam (ab220390) LSBio (LS-C352309).

3.6. Construção do vetor de *short hairpin RNA* (shRNA)

Para avaliar o papel funcional do gene *HOXB2* em glioblastoma, construímos um sistema de silenciamento baseado em *short hairpin RNA* (shRNA). Essa metodologia, por envolver a integração de DNA na célula-alvo, tende a promover um efeito duradouro sobre o silenciamento gênico. De uma forma geral, as etapas do processo consistiram em: Desenho de primers alvejando o gene *HOXB2*; Anelamento entre as sequências *sense* e *antisense* de cada par de *primers*; Digestão do vetor empregando enzimas de digestão; Purificação do vetor; Reação de ligação entre o vetor e os *primers*; Transformação bacteriana; Confirmação da obtenção dos clones positivos; Produção das partículas lentivirais; Transdução das linhagens e confirmação do silenciamento.

Para a execução do protocolo nós utilizaremos o sistema lentiviral pLKO. Foram desenhadas duas sequências de *primers*, sendo que a primeira sequência shRNA1 foi obtida de Inamura et al (2008) e a segunda sequência shRNA2 obtida da empresa

Sigma. As sequências desenhadas encontram-se na tabela 3, sendo que as cores em vermelho são correspondentes ao sítio de restrição de enzima *EcoRI*, em azul corresponde ao loop, em laranja o sítio de restrição para *AgeI* e em verde corresponde a repetição terminal da construção. O anelamento das sequências assim como a clonagem no vetor pLKO foi realizado de acordo ao protocolo da Addgene (Addgene: pLKO.1-TRC Cloning Vector- <https://www.addgene.org/protocols/plko/>).

Tabela 3. Sequência dos *primers* para a construção dos “*Short Hairpins*”

Nome	Sequência
shRNA1/ <i>EcoRI</i>	5' CCGG GCCTTTAGCCGTTTCGCTTATTCTCGAGAATAAGCGAACGGCTAAAGGC TTTTG 3'
shRNA1/ <i>AgeI</i>	5' AATTC AAAAGCCTTTAGCCGTTTCGCTTATTCTCGAGAATAAGCGAACGGCTAAAGGC 3'
shRNA2/ <i>EcoRI</i>	5' CCGG TTA CTGAATTAGCGTTTAATCCTCGAGGATTAAACGCTAATTCAGTAA TTTTG 3'
shRNA2/ <i>AgeI</i>	5' AATTC AAAAATTACTGAATTAGCGTTTAATCCTCGAGGATTAAACGCTAATTCAGTAA 3'

3.7. Sequenciamento do vetor de shRNA para confirmação da clonagem

Foi realizado sequenciamento de DNA para confirmação da clonagem das sequências de shRNA no plasmídeo pLKO. Para tanto, colônias resistentes à ampicilina foram selecionadas e o material para sequenciamento foi preparado utilizando-se o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (ThermoFisher), de acordo com as instruções do fabricante. A corrida foi realizada no equipamento *3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*, e o resultado foi visualizado no *software SnapGene Viewer 4.2.6*. A análise dos dados foi realizada no *software Serial Cloner*.

3.8. Produção das partículas lentivirais

A produção das partículas lentivirais seguiu o protocolo da Addgene apresentado na sessão 3.6. Para tanto, as células HEK-293T foram transfectadas por polietilenimina com os plasmídeos lentivirais pLKO-*HOXB2* e com o plasmídeo de empacotamento psPAX2 e de envelope pMD2.G. A coleta do sobrenadante foi realizada nos períodos de 48 e 72 horas após a transfecção. Os sobrenadantes foram filtrados em membrana de 0,48µm, e estocados a -80°C até utilização.

3.9. Transdução lentiviral das linhagens ACBRI 371, U343 e U87

As linhagens celulares ACBRI 371, U343 e U87 foram previamente cultivadas por um período mínimo de 7 dias após descongelamento, e tiveram a morfologia avaliada em microscopia óptica antes da execução do protocolo. Cerca de 1 milhão de células foram ressuspensas, por linhagem e condição, com o sobrenadante viral, na proporção de 1ml sobrenadante por 2ml meio de cultivo celular, e deixadas em cultivo por um período de 4 dias. Após esse período, as células transduzidas foram repicadas e plaqueadas em uma confluência de 70%, e então selecionadas através da droga puromicina, (2µg/ml de meio), por um período de 2 dias. Após término da seleção, as linhagens foram expandidas e o material celular foi coletado para análise do silenciamento.

3.10. Ensaios funcionais *in vitro*

Foram realizados ensaios *in vitro* a fim de caracterizar a função do gene *HOXB2* no glioblastoma. Para tanto, utilizamos as linhagens ACBRI 371, U343 e U87, após transdução com as partículas virais contendo as sequências de *short hairpin RNA* (shRNA1 e shRNA2), e das partículas contendo o vetor pLKO (controle). Todos os ensaios foram realizados em triplicata biológica e experimental.

3.10.1. Proliferação celular

Para avaliação da taxa de proliferação celular, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços, 500 células/poço, num total de sete placas para cada experimento. A taxa de proliferação foi avaliada pelo método colorimétrico de cristal violeta. Após retirada do meio dos poços e lavagem com PBS 1x, foram adicionados 50µl de cristal violeta, com uma espera de 15 minutos. Em seguida, o cristal violeta foi retirado, e os poços foram lavados, com descarte de qualquer líquido vestigial. Foram adicionados 100µl de ácido acético 10%, seguido de homogeneização do material e espera de 30 minutos. Em seguida, as leituras das absorbâncias foram realizadas no equipamento *FLUOstar Omega* (BMG LABTECH) com filtro de excitação em 540nm, a cada 48 horas, sendo a leitura inicial (tempo 0) realizada quatro horas após o plaqueamento, tempo necessário para as células aderirem à placa. Ao todo, foram 7 placas de 96 poços, sendo a primeira placa para a leitura inicial (4h após

plaqueamento) e as demais placas, uma para cada dois dias (48, 96, 144, 192, 240 e 288h), totalizando 7 leituras

3.10.2. Clonogênico

O clonogênico é um ensaio *in vitro* baseado na sobrevivência celular, que permite avaliar a habilidade de uma única célula formar uma colônia (Franken, et al; 2006). Nesse sentido, as linhagens foram plaqueadas na quantidade de 500 células por poço em placas de 6 poços com 2mL de meio completo, conforme a técnica descrita por Franken et al (2006). As placas permaneceram em estufa úmida por 12 dias. Depois desse período, foi realizada a coloração e fixação das colônias. Para tanto, o meio de cultura dos poços foi descartado, e estes foram lavados com 1ml de PBS 1X. As colônias foram coradas e fixadas com 1ml de cristal violeta (solução de 0,05% em etanol 70%) por 15 minutos, e, em seguida, os poços foram lavados com água destilada por 5 vezes. As placas foram deixadas para secar em temperatura ambiente e então, fotografadas. A contagem das colônias foi realizada de forma manual e conferida em microscópio. Apenas os aglomerados com mais de 50 células foram considerados colônias, e portanto, computados.

3.10.3. Viabilidade celular/apoptose

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, num total de 20 mil células/poço, e em seguida mantidas em estufa úmida (5% CO₂ e 37°C) por cinco dias. Após esse período, foi coletado o sobrenadante de cada poço. Os poços foram lavados com PBS e foi realizado o repique empregando *Tryple*TM *Express* (Invitrogen) durante 3 minutos. Após o descolamento das células, o reagente foi neutralizado com DMEN High Glicose, contendo 10% SBF. O sobrenadante resultante da lavagem com PBS 1x e a tripsina inativada com meio foram coletados e unidos ao sobrenadante coletado a princípio. As células foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* celular foram acrescentados 300uL de tampão de ligação e 1uL de Annexin V, Alexa Fluor 488 conjugate (ThermoFisher), seguindo incubação por 15 minutos no escuro. No momento da leitura no citômetro *FACS-Calibur* (BD Biosciences) foram acrescentados 50uL de iodeto de propídio (PI) em cada amostra. Foram consideradas viáveis as células marcadas negativamente para PI e para Anexina V, enquanto que as células duplamente positivas para os

marcadores foram consideradas células mortas por apoptose tardia ou necrose. As células marcadas positivamente apenas para Anexina V foram consideradas em estágio de apoptose recente.

3.10.4. Senescência celular

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, num total de 20 mil células/poço, e em seguida, mantidas em estufa úmida (5% CO₂ e 37°C) por cinco dias. Após esse período, o meio de cultivo foi retirado e os poços foram lavados com 300µl de PBS 1x, descartando-o em seguida. As células foram fixadas com 300µl de paraformaldeído 4%, por 10 minutos. Em seguida, o fixador foi retirado e realizada uma nova lavagem com 300µl de PBS 1x, descartando-o novamente. Foram adicionados, por poço, 190µl solução SA-B-GAL (pH 6,0)+ 10µl solução X-Gal (20mg/ml). As placas foram embrulhadas em papel alumínio e incubadas na estufa por 18 horas. Após esse período, os poços foram fotografados e foi realizada a quantificação do número de células senescentes, que apresentam coloração azul-esverdeada, devido à hidrólise de X-Gal, substrato cromogênico da enzima beta-galactosidase. Em células senescentes, há o acúmulo da enzima beta-galactosidase nos lisossomos, cujo pH ótimo de atividade é 6,0, igual ao pH do tampão SA-B-GAL. Em células não senescentes, o pH ótimo é 4,0. Nesse sentido, apenas em células senescentes a enzima beta-galactosidase é capaz de hidrolisar o X-Gal, que confere a coloração azul-esverdeada (Gary & Kindell, 2005).

3.10.5. Ciclo celular

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, 30 mil células/poço, e mantidas em estufa úmida (5% CO₂ e 37°C) por cinco dias. Após esse período, foi realizado o repique celular e centrifugação das células por 3 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* celular foi ressuspensionado em 300µl de PBS-EDTA 5mm. Em seguida, foram adicionados 700µl de etanol absoluto e as amostras foram passadas rapidamente em vortex. O material foi congelado a -20°C, por pelo menos 16 horas. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2200 rpm. O sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* foram adicionados 95µl de PBS-EDTA 5mm e 5µl de RnaseA (20mg/ml). As amostras foram incubadas a 37°C por 30

minutos. No momento da leitura no citômetro, foram adicionados 50µl de iodeto de propídio em cada amostra.

3.11. Sequenciamento de RNA (RNA-seq)

Foi realizado o ensaio de RNA-seq a fim de avaliar a função do gene *HOXB2* no perfil transcricional total da linhagem de astrócito e das linhagens de glioblastoma, bem como identificar as vias biológicas em que seus potenciais alvos estão envolvidos. Para tanto, utilizamos as linhagens ACBRI 371, U343 e U87, após transdução com as partículas virais contendo as sequências de *short hairpin RNA* (shRNA1 e shRNA2), e das partículas contendo o vetor pLKO (controle). Foi utilizado uma amostra por condição.

3.11.1. Preparo das bibliotecas e sequenciamento

A análise quantitativa e qualitativa dos mRNAs e lncRNAs será realizada pelo sequenciamento de larga escala, usando o protocolo de RNA-Seq, seguido da análise de bioinformática. Foi utilizado o kit de preparo de amostra *TruSeq RNA Sample Prep v2 (Illumina Inc.)*. O RNA poliadenilado (poli A+) na porção 3' foi purificado do RNA total através da utilização de sequências complementares de timinas (poli T) ligadas a esferas magnéticas. A partir do RNA poli A+ isolado foi sintetizado o DNA complementar (cDNA), utilizando hexâmeros randômicos e a enzima *Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA)*. O cDNA foi purificado utilizando-se esferas paramagnéticas (*AMPure XP beads, Beckman Coulter*) e, em seguida, suas extremidades foram removidas com a utilização do *mix End Repair (Illumina)*. Foram ligados adaptadores às extremidades do cDNA e foi feita uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para enriquecer seletivamente os fragmentos de cDNA cujas extremidades foram ligadas a adaptadores e amplificar a quantidade de DNA na biblioteca. O tamanho dos fragmentos formados foi avaliado através do equipamento *Bioanalyzer (Agilent Technologies)* e a quantificação dos mesmos foi feita por PCR em tempo real utilizando-se o kit *KAPA SYBR FAST (KAPA Biosystems)*. As bibliotecas foram diluídas e *clusterizadas* com reagentes do *TruSeq Cluster Generation Kit v5* e posteriormente sequenciadas com o *TruSeq NextSeq 500/550 High Output kit v2*, em equipamento NextSeq (Illumina).

3.11.2. Análise dos dados

O objetivo principal das análises consistiu em identificar os genes diferencialmente expressos entre as condições controles e com *HOXB2* silenciado, bem como as vias biológicas em que esses genes estão envolvidos. Para tanto, foi utilizado o pacote R/Bioconductor EdgeR (Robinson et al., 2010) e foram determinados como diferencialmente expressos os genes com o p-valor ajustado ao *False Discovery Rate* (FDR) menor que (0,05). Foram criados gráficos *volcano plots* empregando o pacote R ggplot2 (Wickham, 2016) e *heatmaps* utilizando o pacote R/Bioconductor ComplexHeatmap (Gu et al., 2016) com distância de Correlação de Pearson e Clusterização Hierárquica ward.D2. Para o enriquecimento de vias biológicas do conjunto de genes diferencialmente expressos após silenciamento do *HOXB2* foi utilizado o pacote R/Bioconductor *clusterProfiler* (Yu et al., 2012).

3.12. Promoter Capture Hi-C

Promoter Capture Hi-C (PCHi-C) é um método que permite a detecção das interações entre regiões promotoras e elementos distais, a nível de genoma (Schoenfelder et al., 2018). Ele consiste no enriquecimento de sequências promotoras identificadas a partir das bibliotecas Hi-C, empregando uma seleção com milhares de iscas de RNA biotinizadas, que são complementares às extremidades de todos os fragmentos de restrição contendo o promotor (Figura 5). Essas iscas de RNA são hibridizados com o DNA alvo e, com o *pulldown* de biotina-estreptavidina, é possível identificar sequências promotoras e seus parceiros de interação frequentes, como *enhancers* e outros elementos reguladores potenciais. Após sequenciamento *paired-end* de alto rendimento, um teste estatístico é aplicado para identificar regiões de interação significativas com o promotor no nível do fragmento de restrição.

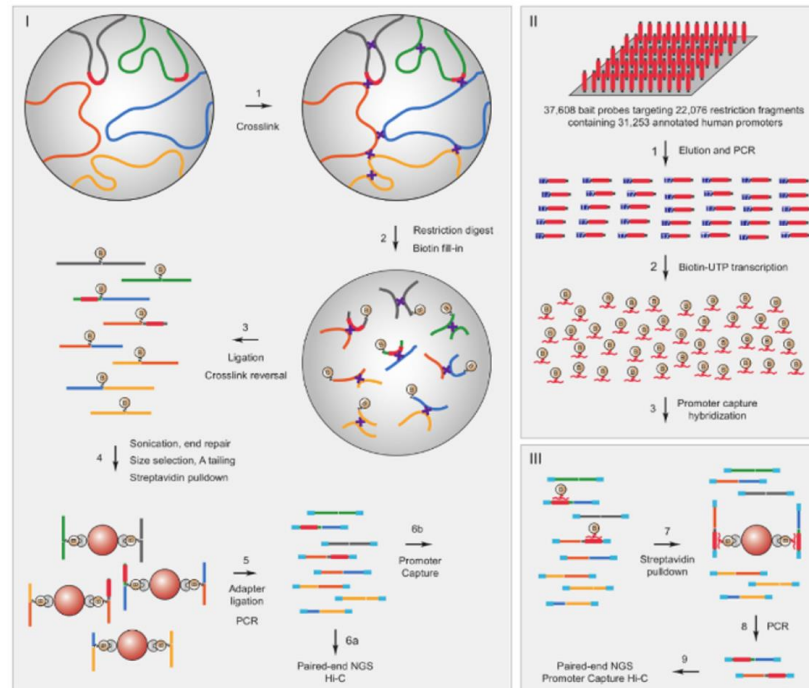
A técnica de PCHi-C foi inteiramente executada no Laboratório do professor Peter Fraser, no Departamento de Ciências Biológicas da Universidade do Estado da Flórida, EUA.

3.12.1. Protocolo experimental

Utilizamos a linhagem U87 para execução do protocolo de PCHi-C, que foi cultivada conforme metodologia descrita no item 3.2 desta seção. A fim de não somente compreender a estrutura tridimensional do genoma da linhagem de GBM mas também qual a influência do gene *HOXB2* nessa configuração, nós realizamos o silenciamento do *HOXB2* anteriormente à execução da técnica. Foi utilizada a sequência de shRNA2 (de acordo com o descrito no item 3.9), e realizada a análise de expressão a nível de RNA e proteína para confirmar a eficiência de silenciamento adequada para o experimento.

A maior parte do protocolo foi executada de acordo com o descrito em Schoenfelder et al. (2018), e todos os materiais e metodologia com as adaptações utilizadas neste trabalho encontram-se em Apêndice. De uma forma geral, as etapas do PCHi-C consistiram em: Fixação de 10 milhões de células por condição (Controle e sh*HOXB2*) utilizando formaldeído; Lise celular e digestão do DNA com a enzima de restrição *HindIII*; Preenchimento das extremidades dos fragmentos com biotina; Ligaç o no n cleo; Revers o do *crosslink*, purifica o do DNA e fragmenta o mec nica em sonicador; Sele o dos fragmentos por tamanho atrav s de *beads* SPRI; *Pulldown* de biotina/streptavidina dos produtos de liga o; Reparo das extremidades e adi o de cauda de dATP e dos adaptadores de liga o; Amplifica o das bibliotecas de Hi-C por PCR; Isolamento dos produtos de liga o contendo os fragmentos de promotor; Amplifica o das bibliotecas de PCHi-C por PCR e sequenciamento em larga escala.

A



B

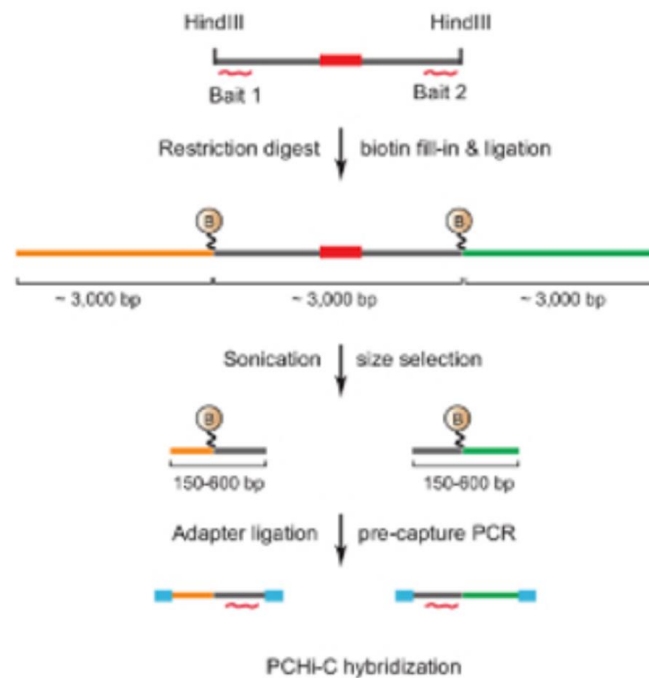


Figura 5. **Promotor Capture Hi-C e design de isca de captura.** A. (I). Ligação no núcleo. (II). Hibridização em solução com iscas de RNA biotilado. (III). Processo de direcionamento dos fragmentos de restrição de todos os promotores de genes humanos B. Desenho de isca para PCHI-C. As iscas de captura de RNA biotilado (linhas curvas vermelhas) são projetadas contra as extremidades dos fragmentos de restrição contendo região promotora. Os produtos de ligação que consistem em fragmentos de restrição contendo o promotor (cinza) e seus fragmentos de restrição de interação (amarelo e verde) são isolados por meio de hibridização de complementaridade de sequência entre isca de RNA e DNA alvo, e subsequente *pull-down* de biotina-estreptavidina (mostrado em A). Adaptado de Schoenfelder et al (2018).

3.12.2. Análise dos dados

A maior parte do protocolo das análises seguiu o descrito em Wingett et al (2015) e (Cairns et al, 2016). Foram utilizadas duas pipelines: HiCUP e CHiCAGO. O HiCUP é uma pipeline que permite analisar a qualidade do sequenciamento das bibliotecas de Hi-C, consistindo nos seguintes *scripts* Perl:

1. *HiCUP Digester*: Cria um genoma de referência digerido.
2. *HiCUP Truncater*: Cliva as *reads* nas junções de ligação do Hi-C.
3. *HiCUP Mapper*: Alinha as *reads* contra um genoma de referência.
4. *HiCUP Filter*: Remove os artefatos mais comuns de Hi-C.
5. *HiCUP Deduplicator*: Remove (retendo uma cópia) os produtos de PCR duplicados.

Após a análise da qualidade do experimento, foi aplicada a *pipeline* ChiCAGO para identificação das interações estatisticamente significativas (score > 5).

3.13. Imunoprecipitação da cromatina (ChIP)

A imunoprecipitação da cromatina foi realizada seguindo o protocolo do *EZ - Magna ChIP G kit* (Milipore), nas linhagens U343 e U87, com utilização do anticorpo anti-*HOXB2* (LSBio). Inicialmente, 4×10^6 células foram tratadas, em temperatura ambiente, com formaldeído 37%, na concentração final de 1%, por 10 minutos. O formaldeído age para fixar as ligações entre proteína e DNA, processo chamado *crosslink*. As ligações covalentes foram neutralizadas pela adição de glicina 10x, durante 5 minutos sob leve agitação, seguido de lavagem com PBS 1x gelado. As células foram lisadas com tampão de lise celular suplementado com inibidores de protease, e coletadas em tubos de 1,5ml. O material foi centrifugado e o *pellet* foi ressuspensionado em tampão de lise nuclear para liberação da cromatina. Após esse processo, as amostras foram submetidas à etapa de fragmentação da cromatina pelo método de sonicação, com utilização do equipamento *Vibra-Cell™ Ultrasonic* modelo VCX-130. Para ambas as linhagens, foram utilizados pulsos de 30 segundos (30% de amplitude), com intervalos de 60 segundos em descanso, sempre no gelo. Nas amostras da linhagem U87 foram necessários 12 pulsos para fragmentação adequada da cromatina, enquanto na U343 foram empregados 20. Após esse processo, a eficiência da fragmentação foi analisada em gel de agarose 2%, com anterior reversão do *crosslink* pela ação da enzima Proteinase K.

Em seguida, as amostras foram ressuspensas em tampão de diluição da cromatina e a imunoprecipitação foi realizada utilizando anticorpos controle (IgG e RNA polimerase II) e o anti-*HOXB2*, seguindo as recomendações dos fabricantes, com incubação a 4°C *overnight* sob rotação. Antes da aplicação dos anticorpos, foi retirado 10µl da amostra de cromatina diluída (2% da cromatina total) para funcionar como *input*. No dia seguinte, foram adicionadas *beads* magnéticas revestidas com proteína G na reação anticorpo + cromatina, e deixadas *overnight* sob rotação a 4°C. No dia seguinte, foram realizadas lavagens com tampão contendo alto e baixo teor de sal, a fim de retirar os fragmentos que não se aderiram às *beads*. Em seguida, foi realizada a eluição da cromatina do complexo, seguido da reversão do *crosslink*. Por fim, foi realizada a eluição do DNA imunoprecipitado e do DNA da amostra *input*. A quantidade e qualidade do DNA foi analisada pelo fluorômetro Qubit (Thermo Fisher Scientific).

3.14. Análises estatísticas

Os dados foram analisados usando o pacote de *software GraphPad Prism 7.0*. A significância estatística foi determinada pelo teste t de *Student*, e uma probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da expressão do gene *HOXB2* no painel de linhagens celulares de cérebro e seleção das linhagens para os ensaios celulares

A primeira etapa deste projeto consistiu em analisar o nível de expressão do gene *HOXB2* no painel de linhagens contendo linhagem de astrócito e astrocitoma graus II, III e IV (glioblastoma) (Tabela 2). O objetivo consistiu em confirmar a expressão do gene nestas linhagens e escolher as mais adequadas para os ensaios *in vitro* após silenciamento do *HOXB2*. Considerando o nível de expressão de RNA (Figura 6.A), observamos que as linhagens ACBRI 371, U343 e U87 destacam-se por altos níveis de expressão. O nível de expressão da proteína *HOXB2* (Figura 6B e C), no entanto, mostrou-se incompatível com os níveis de RNA. Observa-se, por exemplo, que a linhagem U138 não apresenta expressão do *HOXB2* a nível de RNA, porém mostra uma alta expressão a nível proteico. Considerando esses resultados, nos baseamos apenas na expressão de RNA como critério de seleção das linhagens ACBRI 371, U343 e U87 para os ensaios funcionais. Conforme discutido por Luo et al (2019), os anticorpos comerciais para as proteínas *HOX* são de baixa qualidade e podem gerar marcações equivocadas, provavelmente devido à forte conservação evolutiva entre as sequências dos genes *HOX*.

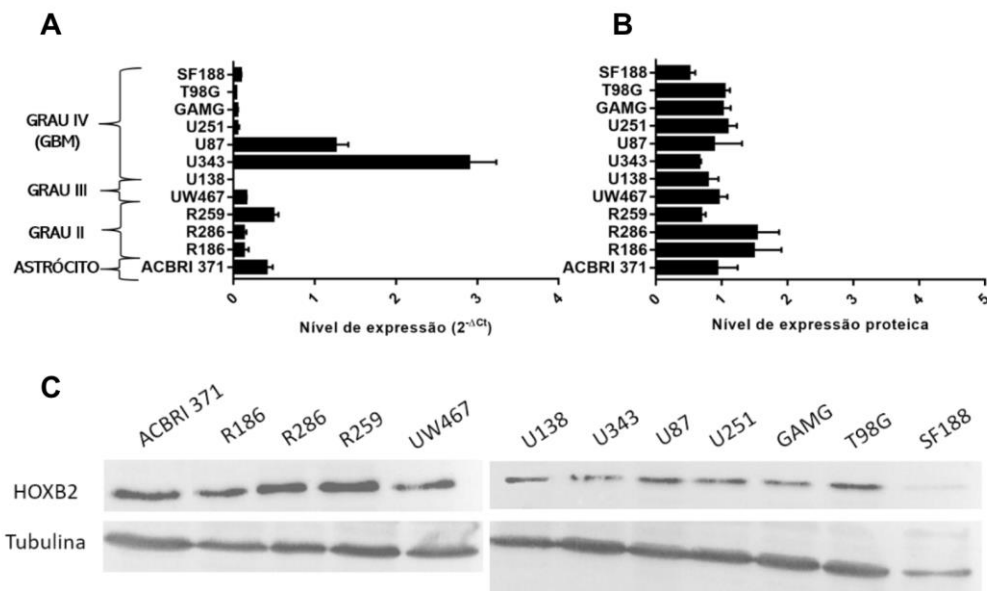


Figura 6. Expressão do gene *HOXB2* em linhagens de astrócito e astrocitoma grau II, III e IV (GBM). **A.** O gráfico representa o nível de expressão a nível de RNA (2^{-ΔCt}) do gene *HOXB2* normalizado pelo endógeno HPRT. Foram realizadas triplicatas experimentais. **B.** Nível de expressão da proteína *HOXB2* (37 kDa), normalizado pelo gene endógeno tubulina (50 kDa). Foram realizadas triplicatas experimentais. **C.** Western blot representando a expressão do gene *HOXB2* e do endógeno tubulina no painel de linhagens.

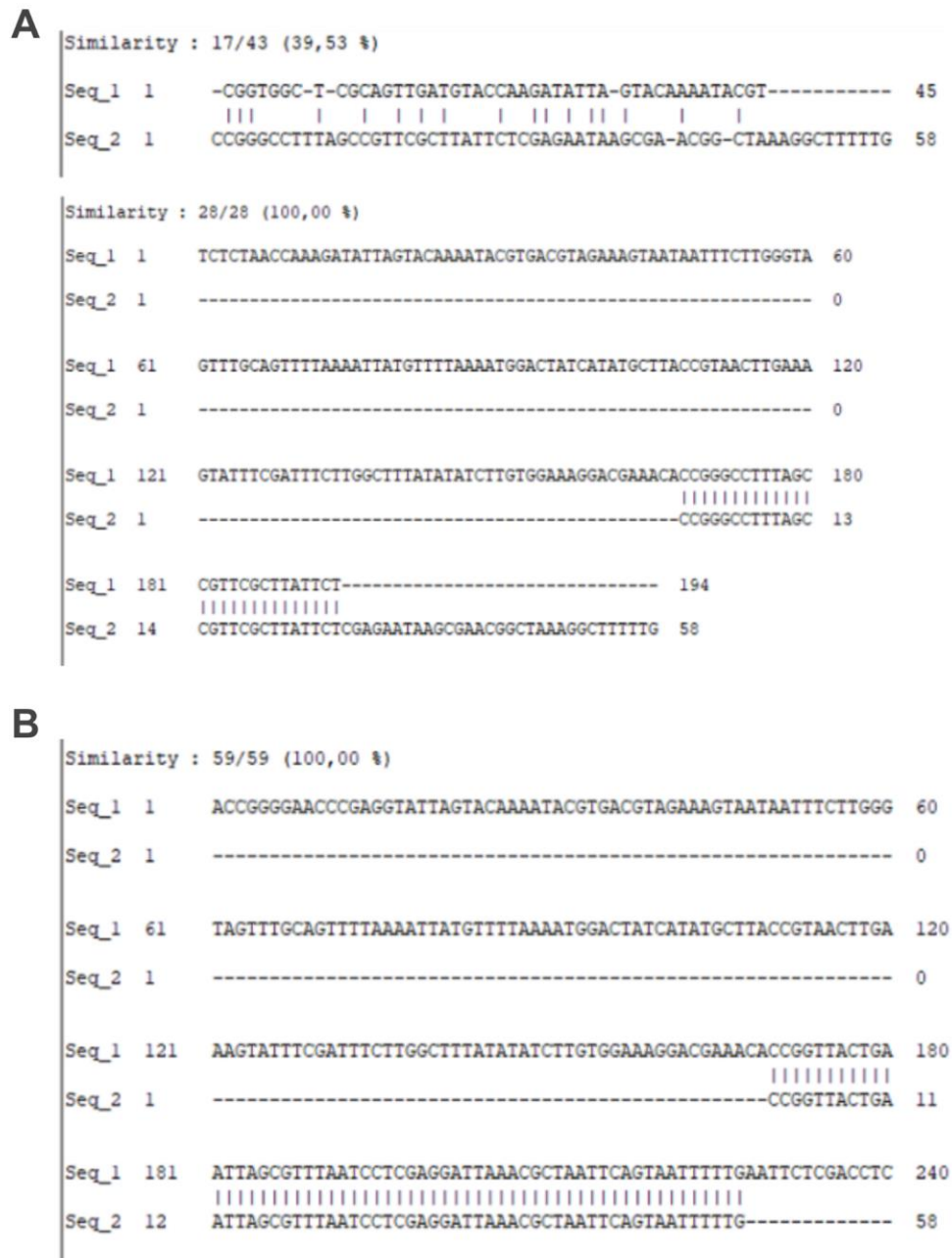


Figura 7. Alinhamento das seqüências obtidas pelo sequenciamento dos *shRNAs* (Seq_1) e das seqüências dos *primers dos shRNAs* (Seq_2). **A.** Similaridade parcial obtida com o sequenciamento do *shRNA1*. **B.** Similaridade obtida pelo sequenciamento do *shRNA2*. Sequenciamento realizado no equipamento 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Software de análise: Serial Cloner.

4.2. Produção de linhagens com silenciamento estável do gene *HOXB2*

Conforme metodologia apresentada no tópico 3.9, trabalhamos na obtenção de linhagens *HOXB2* silenciadas através de duas sequências de *short hairpin* RNA, denominadas 1 e 2. Na etapa de confirmação dos clones positivos, realizamos sequenciamento de DNA de cerca de 20 clones para cada sequência de shRNA. A Figura 7 mostra os melhores alinhamentos obtidos entre as sequências geradas pelo sequenciador e as sequências de cada um dos shRNA. A Figura 7A mostra o alinhamento da sequência do shRNA 1, de dois sequenciamentos independentes, para os quais não conseguimos obter 100% de alinhamento. De uma forma geral, encontramos dificuldades em sequenciar os clones de ambos os shRNA, provavelmente devido à própria estrutura secundária intrínseca do *hairpin* do shRNA (Moore, et al., 2010). A fim de otimizar o sequenciamento, empregamos 5% de DMSO, um desnaturante de DNA, que auxiliou na confirmação da sequência do shRNA 2 (Figura 7B).

Compreendendo as dificuldades técnicas em sequenciar shRNA optamos por seguir para as etapas de produção de partículas lentivirais e transdução das linhagens, e analisar o nível de silenciamento obtido. A fim de avaliar o perfil de silenciamento de cada shRNA de uma forma ampla, realizamos a transfecção de seis linhagens: ACBRI 371, U343, U87, T98G, U251 e GAMG. As células foram mantidas em vírus (1ml de vírus/2ml de meio) por um período de quatro dias. Após, realizamos a seleção das células transduzidas com puromicina (2µg/ml de meio), e por um período de dois dias. Após a seleção, realizamos a extração de RNA por Trizol, síntese de cDNA e qPCR, empregando sondas *Taqman* (*HOXB2* e *HPRT1*). Os resultados podem ser vistos na imagem 8.

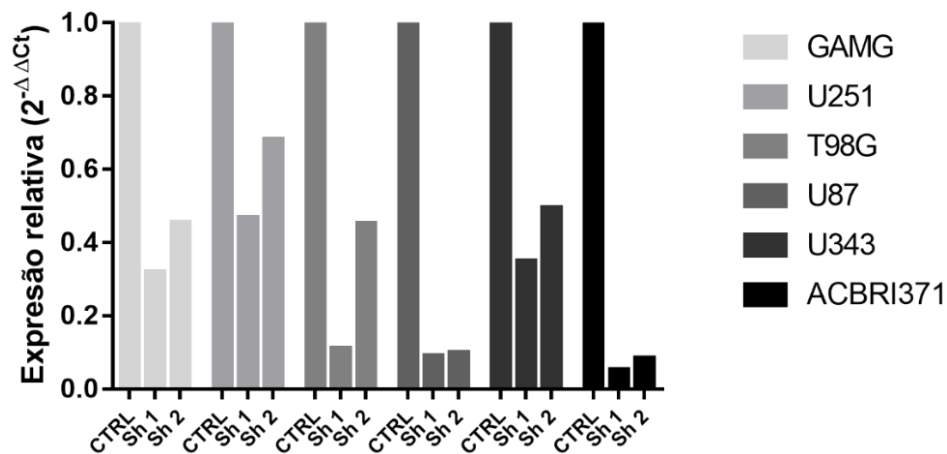


Figura 8. **Eficiência do silenciamento do gene *HOXB2* obtidos a partir de duas seqüências de sh*HOXB2*.** Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) do gene *HOXB2* em astrócito (ACBRI 371) e em 5 linhagens de glioblastoma. Gene HPRT1 utilizado como controle endógeno.

Observa-se que ambas as seqüências de *short hairpin* promovem o silenciamento do *HOXB2*, e que o nível de silenciamento varia de acordo com a linhagem. Nas linhagens GAMG, U251, T98G e U343, o shRNA 1 promove um silenciamento consideravelmente maior do que o promovido pelo shRNA 2. Nas linhagens ACBRI 371 e U87, por outro lado, as seqüências de *short hairpin* promovem níveis de silenciamento similares, e nas linhagens U343 e GAMG, obtivemos níveis máximos de silenciamento em torno de 65% (shRNA 1) e 50% (shRNA 2). Na linhagem U343, empregamos polibreno (8µg/ml meio), um agente que auxilia na eficiência das transfecções, porém não foram obtidos níveis maiores de silenciamento.

4.3. Caracterização funcional do gene *HOXB2*

Após a obtenção das linhagens silenciadas, observamos algumas alterações morfológicas e uma diminuição visual no padrão de crescimento celular. A Figura 9 mostra a morfologia das linhagens ACBRI 371, U343 e U87, capturada dois dias após o término da seleção com puromicina. Observamos que as células silenciadas adquirem uma forma mais alongada e aparentam estresse, sendo mais proeminente na transdução com shRNA 1, que tende a promover maior nível de silenciamento.

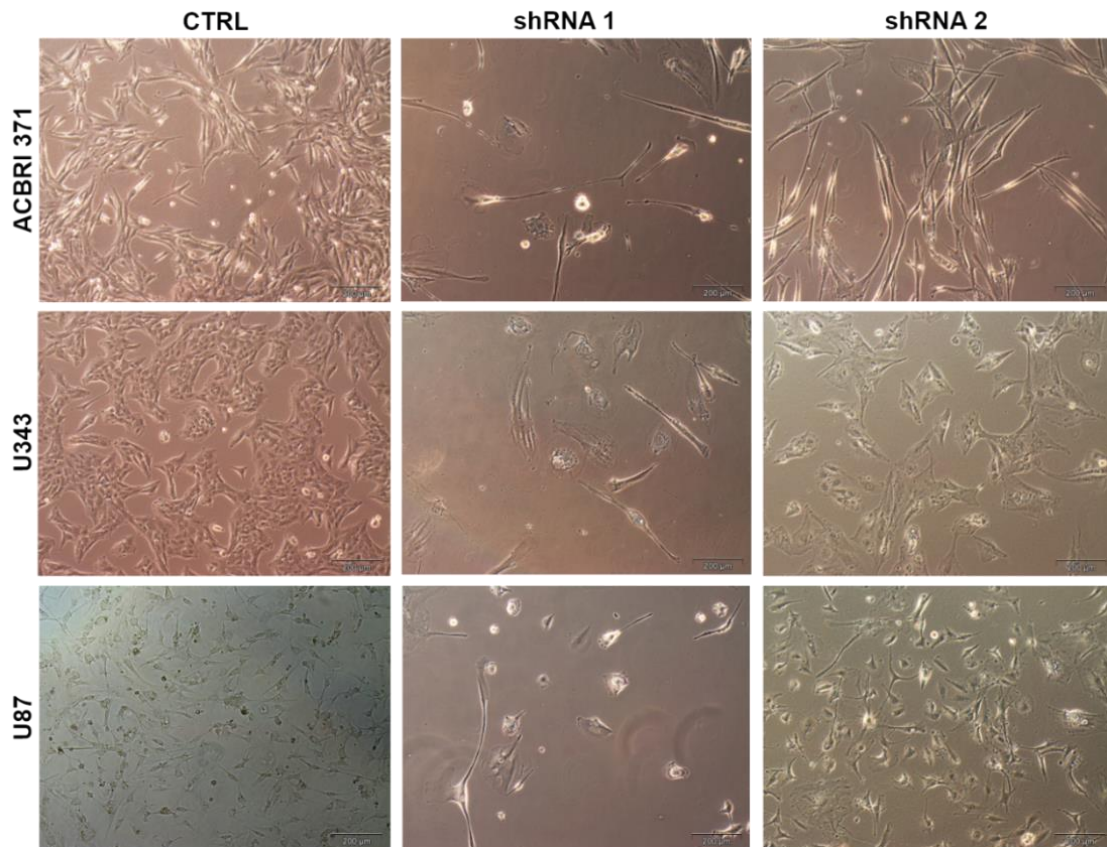


Figura 9. **Morfologia das linhagens controle e tratadas com duas sequências de shHOXB2.** Microscopia óptica, aumento 100x.

Essas observações nos levaram a questionar sobre quais mecanismos biológicos o *HOXB2* está envolvido, e quais ensaios funcionais *in vitro* seriam relevantes para uma melhor elucidação do papel funcional deste gene. Nesse sentido, as linhagens ACBRI 371, U343 e U87 foram selecionadas para a execução de cinco ensaios *in vitro*, sendo estes: Proliferação, clonogênico, Viabilidade/apoptose, senescência, e ciclo celular. Para todos os ensaios realizados, as células foram transduzidas com as partículas lentivirais (ctrl, *shRNA1* e *shRNA2*), selecionadas com puromicina e a confirmação do silenciamento foi realizada por RT-qPCR. Todos os ensaios foram realizados em triplicata biológica e experimental. Ainda, durante cada ensaio foi coletado o lisado celular para extração de proteína e confirmação do silenciamento a nível proteico, etapa que poderá ser realizada com a testagem de novos anticorpos.

4.3.1. Proliferação celular

Vários estudos têm demonstrado a atuação dos genes *HOX* na proliferação celular durante a tumorigênese (Liao et al., 2011; Darda et al., 2014; Tabuse et al., 2011), inclusive o gene *HOXB2* (Lindblad, et al., 2015; Boimel, et al., 2011). Nesse sentido, avaliamos a taxa de proliferação celular nas linhagens ACBRI 371, U343 e U87, nas condições CTRL, shRNA 1 e shRNA 2. A Figura 10 mostra os resultados obtidos.

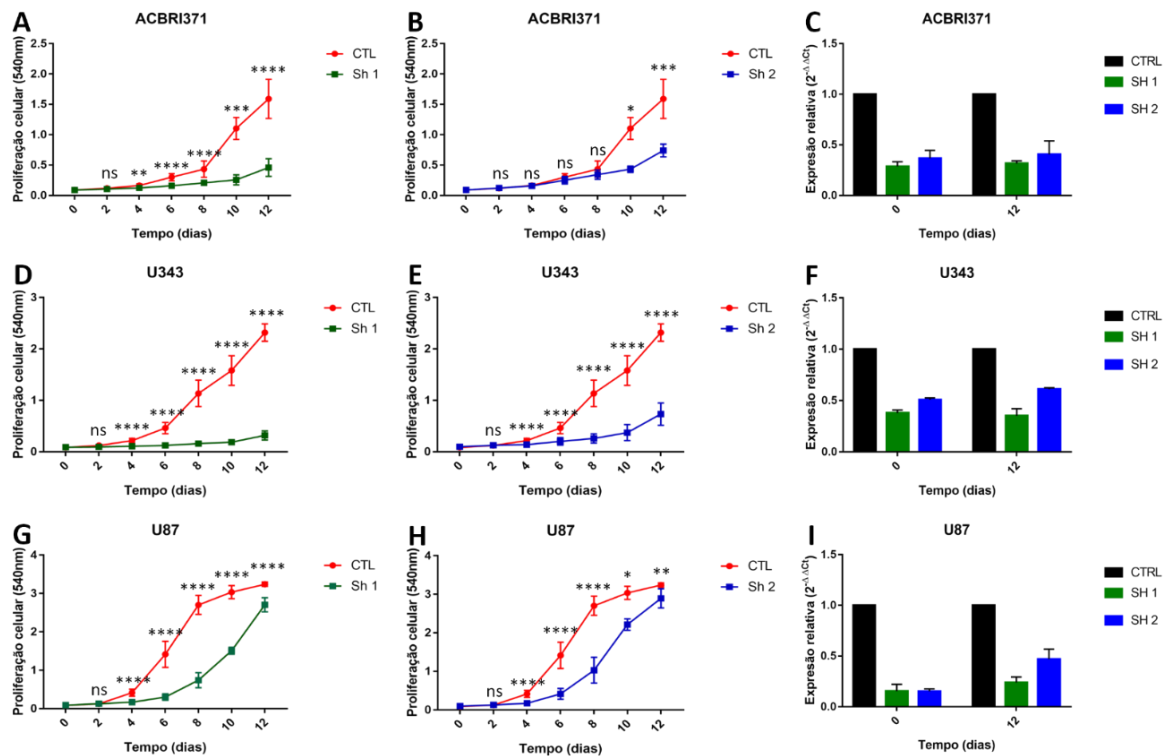


Figura 10. Efeito do silenciamento do gene *HOXB2* na taxa de proliferação celular das linhagens ACBRI 371, U343 e U87. A, D e G: Taxa de proliferação das linhagens silenciadas com shRNA 1. B, E e H: Taxa de proliferação das linhagens silenciadas com sh RNA2. C, F e I: Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) do *HOXB2* no início (tempo 0) e fim dos ensaios (12 dias). Taxa de proliferação avaliada a partir da absorbância resultante do material celular. ns: não significativo, * $p = 0,027$, ** $p = 0,0014$, *** $p = 0,0005$ e **** $p = 0,0001$. Experimento realizado em triplicata biológica e experimental. Ordinary One-way ANOVA como teste *post-hoc* aplicado (a partir dos valores brutos convertidos em \log_{10}).

Interessantemente, observa-se que ambos os shRNA promovem uma diminuição significativa na taxa de proliferação celular, nas três linhagens celulares analisadas. Nas linhagens ACBRI 371 e U87, o shRNA 1 promove uma redução mais significativa na proliferação, quando comparado ao shRNA 2. Na linhagem ACBRI 371, o shRNA 1 tanto apresenta um maior nível de silenciamento quanto este silenciamento é mais estável (Figura 10C). Na linhagem U87, o nível de

silenciamento produzido por ambos os shRNA foram similares, no entanto as células transfectadas com o shRNA 1 apresentaram silenciamento mais estável ao longo do experimento (Figura 10I). Curiosamente, as células transfectadas com o shRNA 2 passaram a apresentar maior taxa de proliferação entre o 8° e 10° dia de experimento (Figura 10H), período em que começamos a observar uma diminuição no nível de silenciamento (dado não mostrado). Nesta linhagem, devido a sua alta capacidade natural de proliferação, observamos que as células controle atingiram rapidamente uma alta confluência, em torno do 8° dia de experimento (Figura 10G). Neste ponto, as células apresentavam intenso contato (várias camadas empilhadas), e isto provavelmente explica a taxa mais constante de proliferação observada entre o 8° e 12° dia, em detrimento das U87 shRNA 1 e 2 que continuaram crescendo entre os dias finais do experimento (Figura 10G e H). Na linhagem U343, por sua vez, observamos que em ambos os shRNA há uma mesma diferença estatisticamente significativa ($p= 0,0001$) nas taxas de proliferação celular, em relação ao controle (Figura 10D e E). No entanto, nas U343 transfectadas com shRNA 1, observamos uma diminuição mais intensa na taxa de proliferação, em concordância com o maior nível de silenciamento e estabilidade do silenciamento promovido por este shRNA (Figura 10F). Nesta linhagem, observa-se que níveis de silenciamento medianos (em torno de 50 e 60%) já são suficientes para alterações fenotípicas, como a taxa de proliferação celular.

4.3.2. Clonogênico

O clonogênico é um ensaio *in vitro* baseado na sobrevivência celular, que permite avaliar a habilidade de uma única célula formar uma colônia (Franken, et al; 2006). Nesse sentido, as linhagens ACBRI 371, U343 e U87, nas condições ctrl, shRNA 1 e shRNA 2, foram ressuspendidas e plaqueadas na quantidade de 500 células por poço em placas de 6 poços com 2mL de meio completo, conforme a técnica descrita por Franken et al. (2006). As placas permaneceram em estufa úmida por 12 dias. Depois desse período, foi realizada a coloração, fixação e contagem das colônias, conforme protocolo da sessão 3.10.2. Os níveis de expressão do gene *HOXB2* em cada condição e linhagem durante este experimento foram os mesmos durante a análise da proliferação celular (Figura 10C, F e I). A Figura 11 mostra os resultados obtidos.

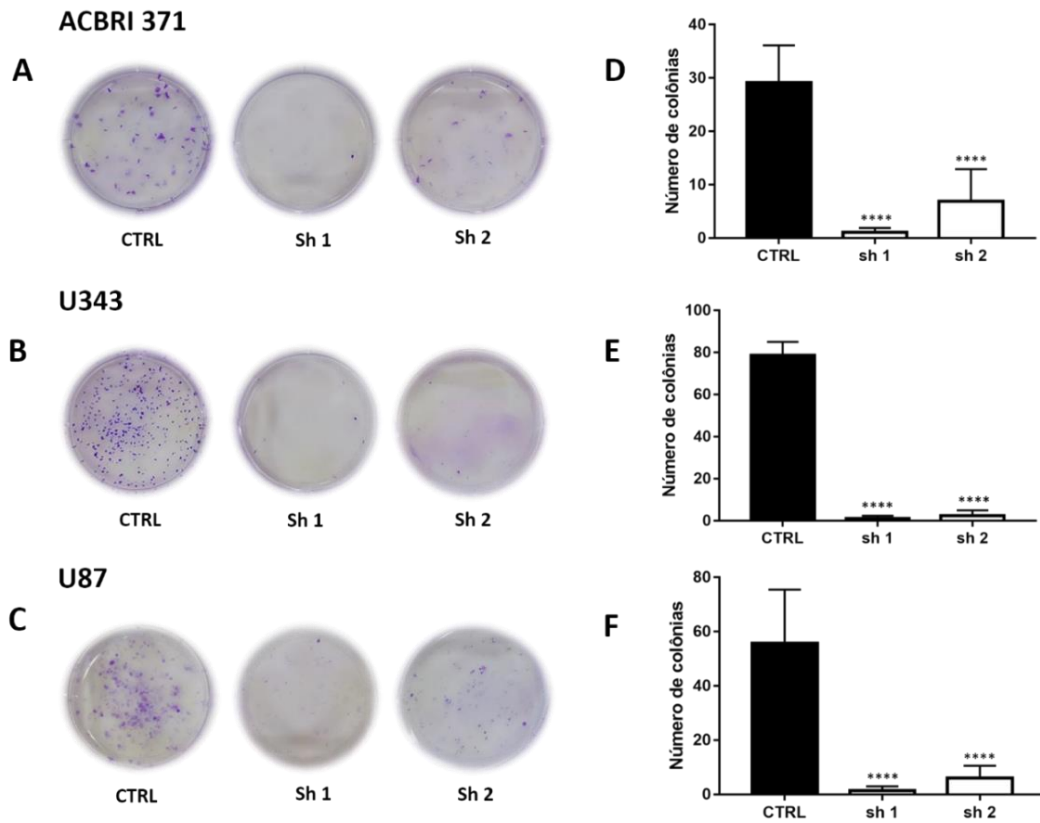


Figura 11. Efeito do silenciamento do gene *HOXB2* na formação de colônias das linhagens ACBRI 371, U343 e U87. A, B e C: Imagens representativas das colônias formadas pelas células em cada condição. D, E e F: Gráficos representativos do número de colônias formadas em cada condição. ****p= 0,0001. Ordinary One-way ANOVA como teste *post-hoc* aplicado (a partir dos valores brutos convertidos em \log_{10}).

Os resultados indicam uma redução significativa ($p=0,0001$) no número de colônias das células transduzidas com ambos shRNA, nas três linhagens avaliadas (Figura 11). Nessas linhagens, é nítido que o número de colônias na condição shRNA 1 é mínimo e bem similar entre elas. Além disso, observa-se que a linhagem U343 é aquela que apresenta menor número de colônias nos shRNA em relação ao número encontrado no controle (Figura 11E). Nas linhagens ACBRI 371 e U87, o número de colônias no tratamento shRNA 2 é visivelmente maior do que o encontrado no shRNA 1, o que pode ser explicado pelo maior nível de silenciamento e/ou estabilidade do fenótipo induzido pelo shRNA 1. Em todas as linhagens, os dados do ensaio clonogênico corroboram os resultados obtidos na proliferação, demonstrando o envolvimento do gene *HOXB2* na capacidade proliferativa *in vitro*.

4.3.3. Viabilidade celular/apoptose

Dada a drástica diminuição no número de colônias e da taxa de proliferação celular nas células transfectadas com *shHOXB2*, nos questionamos sobre quais

mecanismos biológicos seriam os responsáveis por esses fenótipos. Nesse sentido, realizamos os ensaios de viabilidade/apoptose, senescência e ciclo celular.

Para a realização desses ensaios, fizemos novas transduções que resultaram em níveis diferentes de silenciamento daqueles obtidos durante os ensaios de proliferação e clonogênico. Nas linhagens ACBRI 371, U343 e U87, a porcentagem de silenciamento promovida pelos shRNA 1 e 2 foram, respectivamente, 95 e 90%; 62 e 20%; 91 e 90%. Na linhagem U87 shRNA 2, observamos uma diminuição no nível de silenciamento durante os ensaios, para cerca de 50%.

No ensaio de viabilidade/apoptose, as linhagens ACBRI 371, U343 e U87, nas condições ctrl, shRNA 1 e shRNA 2, foram plaqueadas em placa de 24 poços, em triplicata biológica e experimental, conforme protocolo da sessão 3.10.3. Foram consideradas viáveis as células marcadas negativamente para PI e para Anexina V, enquanto que as células duplamente positivas para os marcadores foram consideradas células mortas por apoptose tardia ou necrose. As células marcadas positivamente apenas para Anexina V foram consideradas em estágio de apoptose recente. A Figura 12 resume os resultados obtidos.

Observa-se que, de uma forma geral, há um aumento considerável na taxa de apoptose recente, evidenciada pela marcação com Anexina V, nas linhagens transfectadas com os shRNA (Figura 12). Quanto à taxa de necrose ou apoptose tardia, não há diferenças relevantes. Na linhagem ACBRI 371, há um aumento significativo ($p= 0,0001$) no número de células em apoptose em ambos os shRNA, no entanto a porcentagem é nitidamente maior nas células transfectadas com o shRNA 1 (Figura 12D). Na linhagem U87, há significância estatística apenas nas células silenciadas com o shRNA 1, enquanto que na linhagem U343, ambos os shRNA promovem taxas muito similares de células em apoptose recente. Neste linhagem, pode-se concluir que mesmo níveis baixos de silenciamento (em torno de 20% para o shRNA 2) são suficientes para a manifestação do fenótipo observado, e que a diferença no nível de silenciamento entre os shRNA não resulta em diferença nas taxas de células em apoptose.

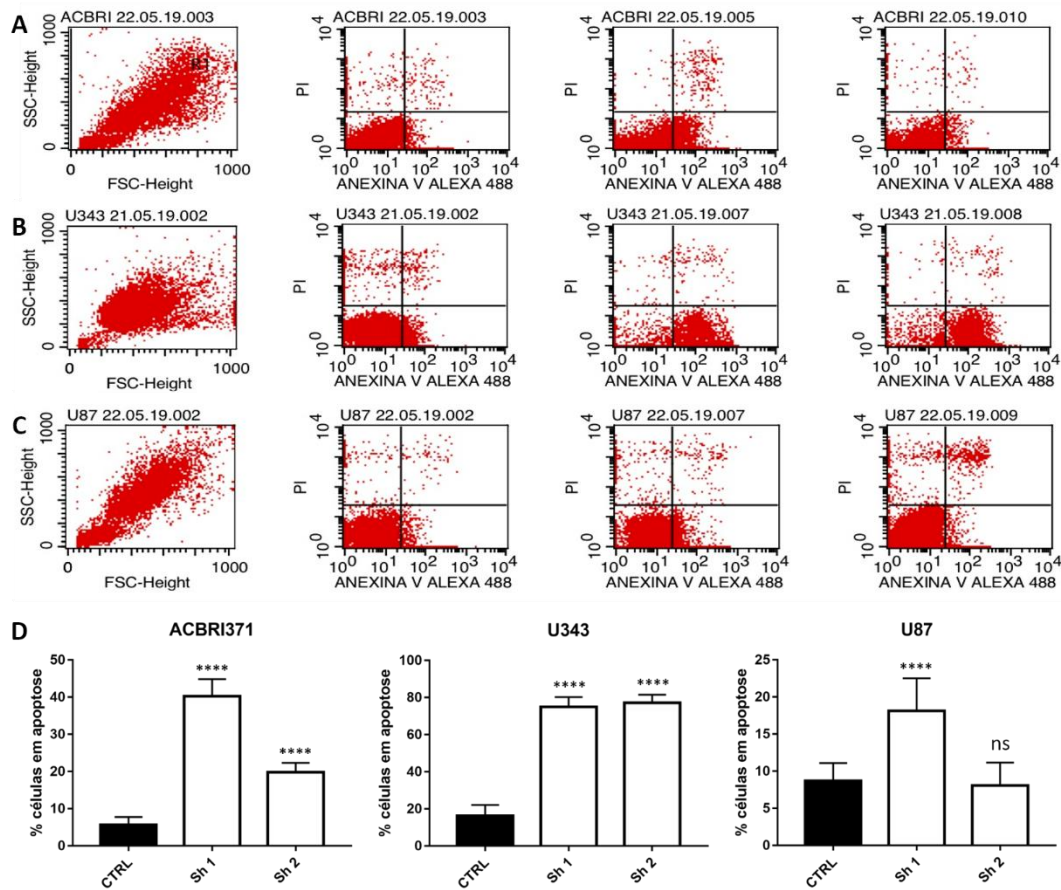


Figura 12. Efeito do silenciamento do gene *HOXB2* na viabilidade celular das linhagens ACBRI 371, U343 e U87. As células foram marcadas com Anexina V e PI, e analisadas por citometria de fluxo. As células duplamente negativas para ambos os marcadores representam células viáveis; células marcadas apenas com Anexina representam apoptose recente, e células marcadas com ambos os marcadores representam apoptose tardia ou necrose. **A, B e C.** Gráfico representativo das populações de células identificadas pelo citômetro. **D.** Porcentagem de células em apoptose recente em cada condição e linhagem. **** $p=0,0001$. Ordinary One-way ANOVA como teste *post-hoc* aplicado (a partir dos valores brutos convertidos em \log_{10}).

4.3.4. – Senescência celular

Os resultados dos ensaios de viabilidade/apoptose auxiliaram na compreensão de como o silenciamento do gene *HOXB2* pode promover a diminuição das taxas de proliferação celular e crescimento de colônias. A fim de avaliar outros mecanismos envolvidos, realizamos o ensaio de senescência, que permite identificar células que deixam de se dividir. Nesse sentido, as linhagens ACBRI 371, U343 e U87, nas condições ctrl, shRNA 1 e shRNA 2, foram plaqueadas em placa de 24 poços, em triplicata biológica e experimental, conforme metodologia apresentada no tópico 3.10.4. A Figura 13 reúne os resultados obtidos.

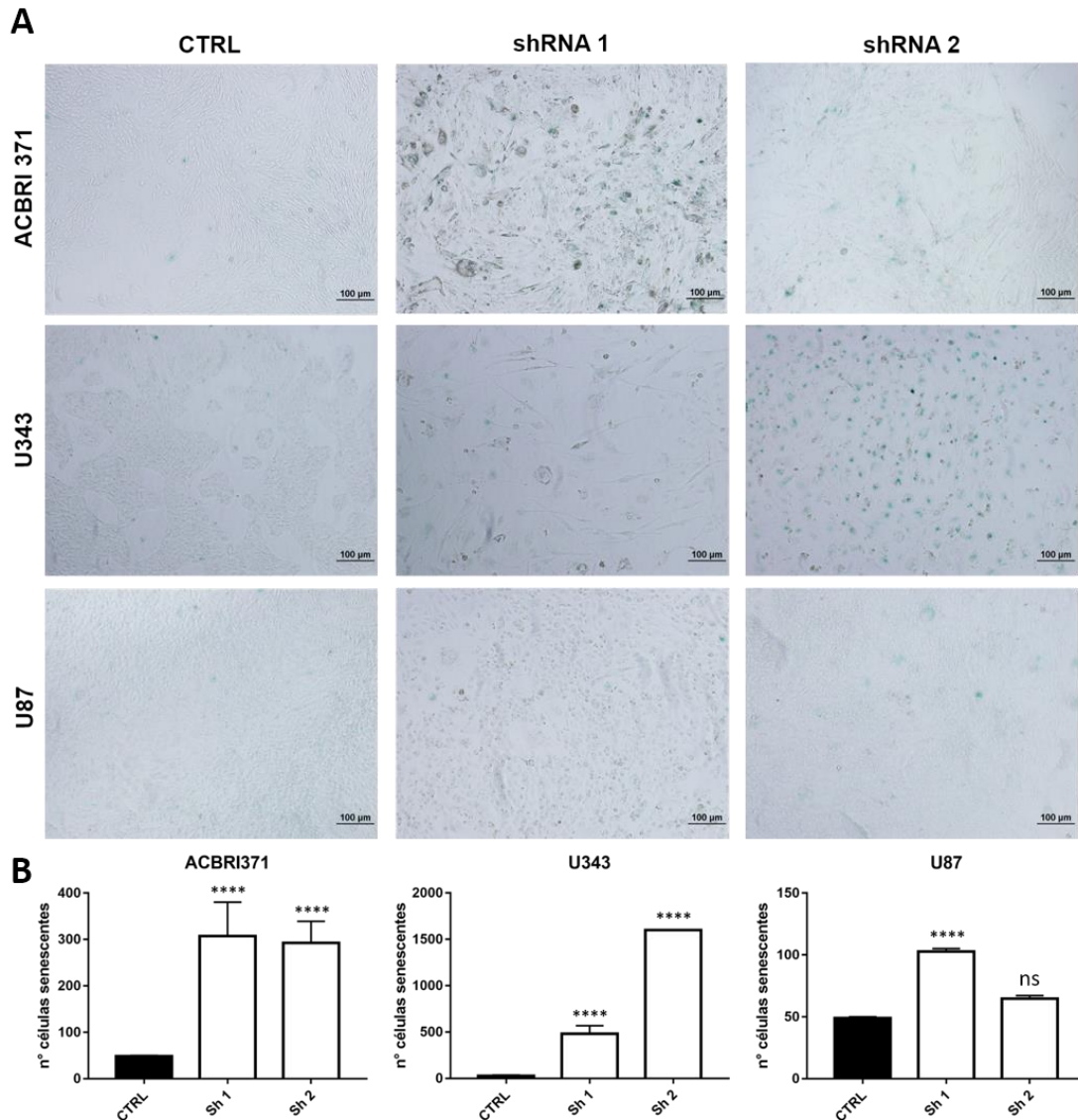


Figura 13. **Efeito do silenciamento do gene *HOXB2* na senescência celular das linhagens ACBRI 371, U343 e U87** **A.** Fotografia em microscopia ótica (aumento 200x) das linhagens ACBRI 371, U343 e U87, evidenciando o estado de senescência (coloração azul-esverdeada). **B.** Contagem do número de células senescentes. As linhagens foram plaqueadas em placa de 24 poços (30 mil células por poço, triplicata por condição e experimental), e foram aguardados 5 dias. Após fixação com paraformaldeído 4%, as células foram mantidas em solução SA-B-GAL contendo X-gal por 18 horas. Por fim, os poços foram fotografados e realizou-se a contagem de células senescentes utilizando-se o *software ImageJ*. **** $p=0,0001$. *Ordinary One-way ANOVA* como teste *post-hoc* aplicado (a partir dos valores brutos convertidos em \log_{10}).

De uma forma geral, os resultados obtidos mostram um drástico aumento no número de células senescentes nas células transduzidas com os shRNA. Nas linhagens ACBRI 371 e U343, há uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0001$) em ambos os shRNA em relação ao controle. Na linhagem U87, há uma diferença significativa apenas no shRNA 1, enquanto que na linhagem U343, há quase 100% de células senescentes (Figura 13A). Nesta linhagem, é pertinente ressaltar que o número

de células shRNA 1 presentes nos poços, ao final do experimento, foi muito menor do que o número de células shRNA 2 (visível na Figura 13A). Considerando-se que foram plaqueadas iguais quantidades de células, e que ambos os tratamentos possuem taxas similares de células em apoptose (Figura 12), pode-se sugerir que haja algum outro mecanismo atuante nas U343 shRNA 1, que promova essa menor taxa de crescimento celular. Essa observação é compatível com o nível de silenciamento mais intenso do gene *HOXB2* na condição shRNA 1.

4.3.5. Ciclo celular

O ensaio de ciclo celular foi realizado a fim de identificar se o silenciamento do gene *HOXB2* pode promover a parada das células nas etapas do ciclo celular. Esse método emprega iodeto de propídio, um agente intercalante fluorescente que se liga ao DNA de forma estequiométrica. Assim, as células presentes na fase S do ciclo celular terão mais DNA do que aquelas em G1, enquanto que as células em G2 terão o dobro de DNA das células em G1. Nesse contexto, as linhagens ACBRI 371, U343 e U87, nas condições ctrl, shRNA1 e shRNA2, foram plaqueadas em placa de 24 poços, em triplicata biológica e experimental, conforme protocolo apresentado anteriormente. A Figura 14 resume os resultados obtidos.

Em todas as linhagens e shRNA (com exceção da U87 shRNA 2) há uma diminuição significativa de células em G1 (Figura 14A). Com relação à fase S (Figura 14B), há um aumento significativo de células pausadas nesta etapa, nas linhagens ACBRI 371 (shRNA1 e 2), U343 (shRNA 2) e U87 (shRNA 1). Além da parada na fase S, observamos o acúmulo de células na fase G2 (Figura 14C), nas linhagens ACBRI 371 shRNA 2, e U343 e U87, ambas shRNA 1. Esses resultados podem ser causados por mecanismos como dano ao DNA e estresse oxidativo (Chen, et al., 2005), e podem estar implicados no processo de senescência celular, uma vez que há estudos que demonstram senescência celular durante as fases S (Mendoza, et al., 2014) e G2 (Mao, et al., 2012).

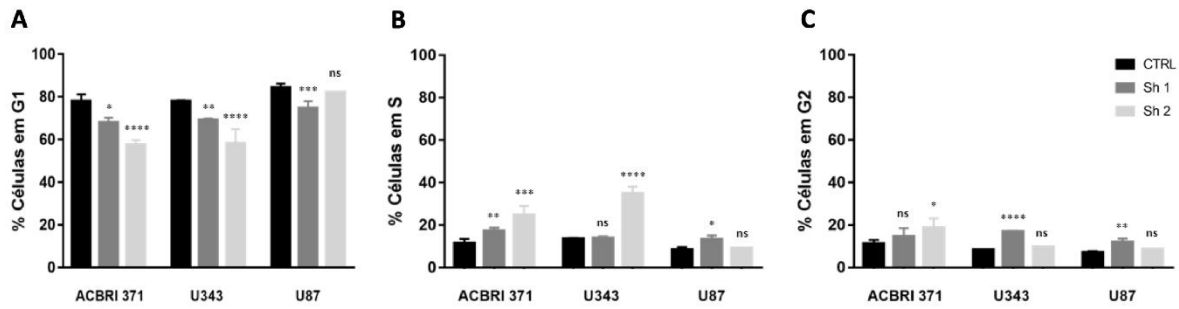


Figura 14. Efeito do silenciamento do gene *HOXB2* na porcentagem de células distribuídas em cada fase do ciclo celular, nas linhagens ACBRI 371, U343 e U87. **A.** Porcentagem de células em G1. **B.** Porcentagem de células em S. **C.** Porcentagem de células em G2. As células foram marcadas com PI e analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos representam a porcentagem de células nas fases do ciclo celular, em cada condição e linhagem. ns: não significativo, * $p \leq 0,0208$, ** $p \leq 0,0061$, *** $p \leq 0,0003$ e **** $p = 0,0001$. Ordinary One-way ANOVA como teste *post-hoc* aplicado (a partir dos valores brutos convertidos em \log_{10}).

4.4. Análise do impacto do silenciamento do gene *HOXB2* sobre o padrão global de transcrição das linhagens de glioblastoma e astrócito

Nós selecionamos as linhagens ACBRI 371, U343 e U87 para a realização do RNA-seq, a fim de avaliar o impacto do silenciamento do gene *HOXB2* sobre o padrão global de transcrição. Nesse contexto, nós incluímos no sequenciamento tanto as amostras silenciadas pelos *short hairpin RNA* 1 quanto pelo 2. Após os processos de transdução e seleção das células transduzidas, o RNA destas células foi extraído com o Kit *RNeasy Plus Micro* (livre de DNA contaminante), e a Figura 15 mostra os níveis de silenciamento do gene *HOXB2* obtido. Os resultados indicam um silenciamento em torno de 95, 62 e 90% (shRNA1) e 90, 20 e 90% (shRNA2) nas linhagens ACBRI 371, U343 e U87, respectivamente. Em seguida, foi realizado o preparo das bibliotecas e sequenciamento do RNA total utilizando-se o kit *TruSeq RNA Sample Prep v2* (Illumina), no equipamento *NextSeq* (Illumina),

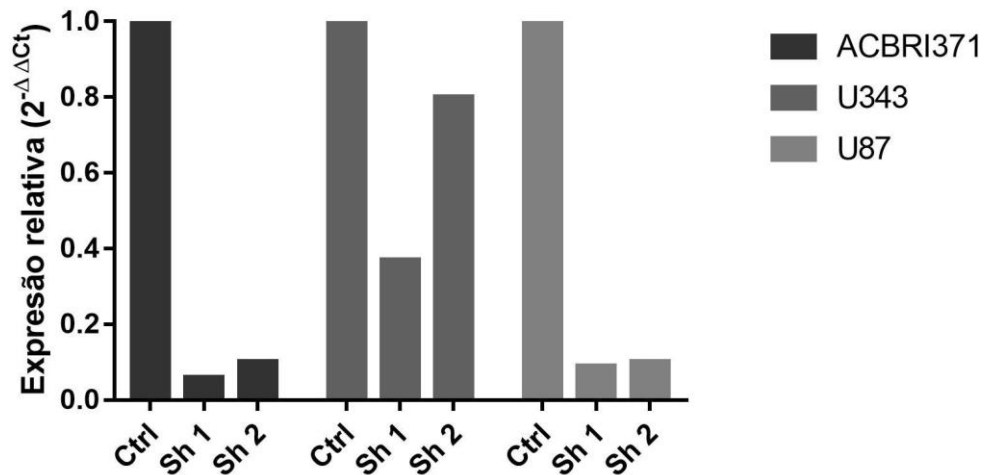


Figura 15. Nível de expressão (RNA) do gene *HOXB2* nas amostras utilizadas no RNA-seq. Expressão relativa obtida por RT-qPCR. Gene HPRT1 como controle endógeno.

O objetivo principal das análises consistiu em identificar os genes diferencialmente expressos entre as condições de controle e *HOXB2* silenciado, bem como as vias biológicas em que esses genes estão envolvidos. Para tanto, foi utilizado o pacote R/Bioconductor EdgeR (Robinson et al., 2010) e foram determinados como diferencialmente expressos os genes com o p-valor ajustado ao *False Discovery Rate* (FDR) menor que (0,05). Foram criados gráficos *volcano plots* empregando o pacote R ggplot2 (Wickham, 2016) e *heatmaps* utilizando o pacote R/Bioconductor ComplexHeatmap (Gu et al., 2016) com distância de Correlação de Pearson e Clusterização Hierárquica ward.D2. Para o enriquecimento de vias biológicas do conjunto de genes diferencialmente expressos após silenciamento do *HOXB2* foi utilizado o pacote R/Bioconductor clusterProfiler (Yu et al., 2012). Os resultados estão descritos a seguir para cada tipo de linhagem celular.

- **ACBRI 371 (Astrócito)**

A Figura 16A apresenta o *heatmap* dos genes diferencialmente expressos na linhagem de astrócito, sendo nítido o impacto do silenciamento do gene *HOXB2*. Observa-se que o silenciamento do *HOXB2* promove principalmente a *down*-regulação de seus possíveis alvos (diretos e indiretos), com uma pequena parcela de genes *up*-regulados (parte superior do gráfico). Interessantemente, ambas as sequências de shRNA promoveram perfis similares de expressão gênica, o que é

importante no contexto do uso dessa metodologia. A Figura 16B representa os 50 principais genes diferencialmente expressos entre as amostras controle e shRNAs/astrócitos, sendo destes 12 genes *up*-regulados e 38 *down*-regulados.

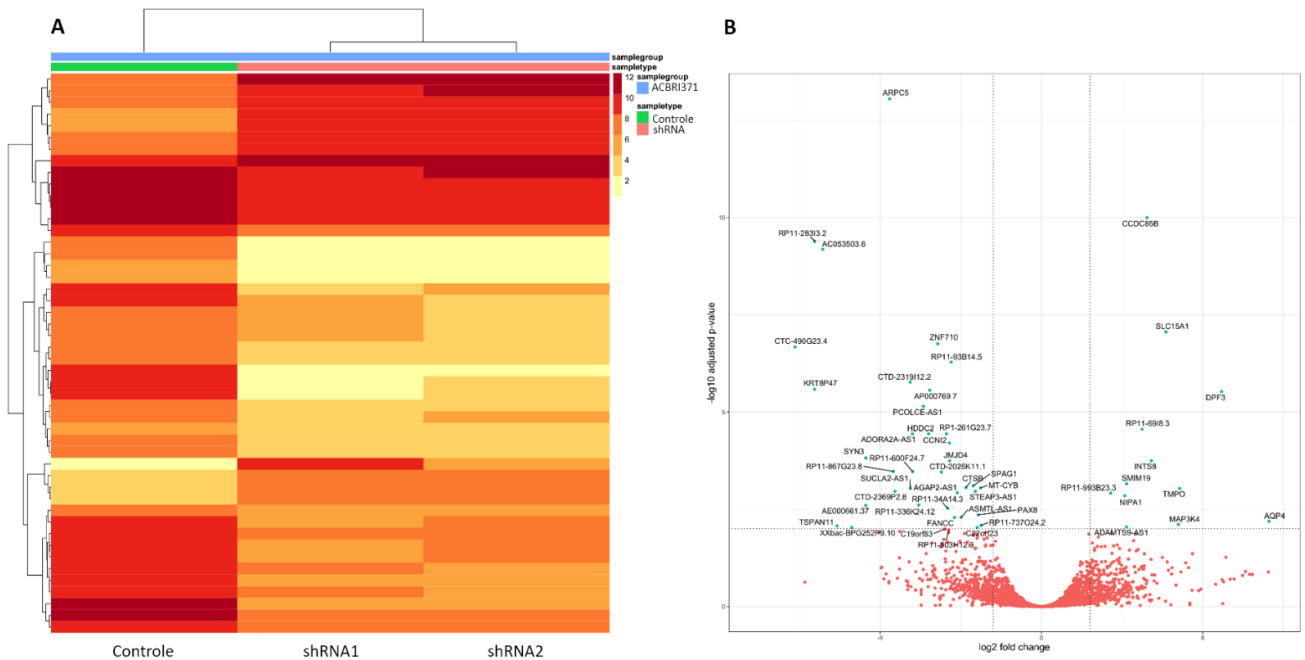


Figura 16. **Impacto do silenciamento do gene *HOXB2* no perfil de expressão gênica em linhagem de astrócito.** **A.** Heatmap dos valores de expressão dos genes diferencialmente expressos nas amostras controle e shRNA. **B.** Volcano plot entre as amostras controle e shRNA, em azul os genes diferencialmente expressos.

A análise da função biológica dos genes diferencialmente expressos em astrócitos pode ser visualizada nas Figuras 17 e 18. Tanto para o astrócito quanto para as demais linhagens analisadas, selecionamos as 50 principais vias biológicas representadas pelos grupos de genes *up* e *down*-regulados após silenciamento do gene *HOXB2*. Para elaboração das Figuras (*dot plots*), foi utilizado o valor de $p < 0,05$.

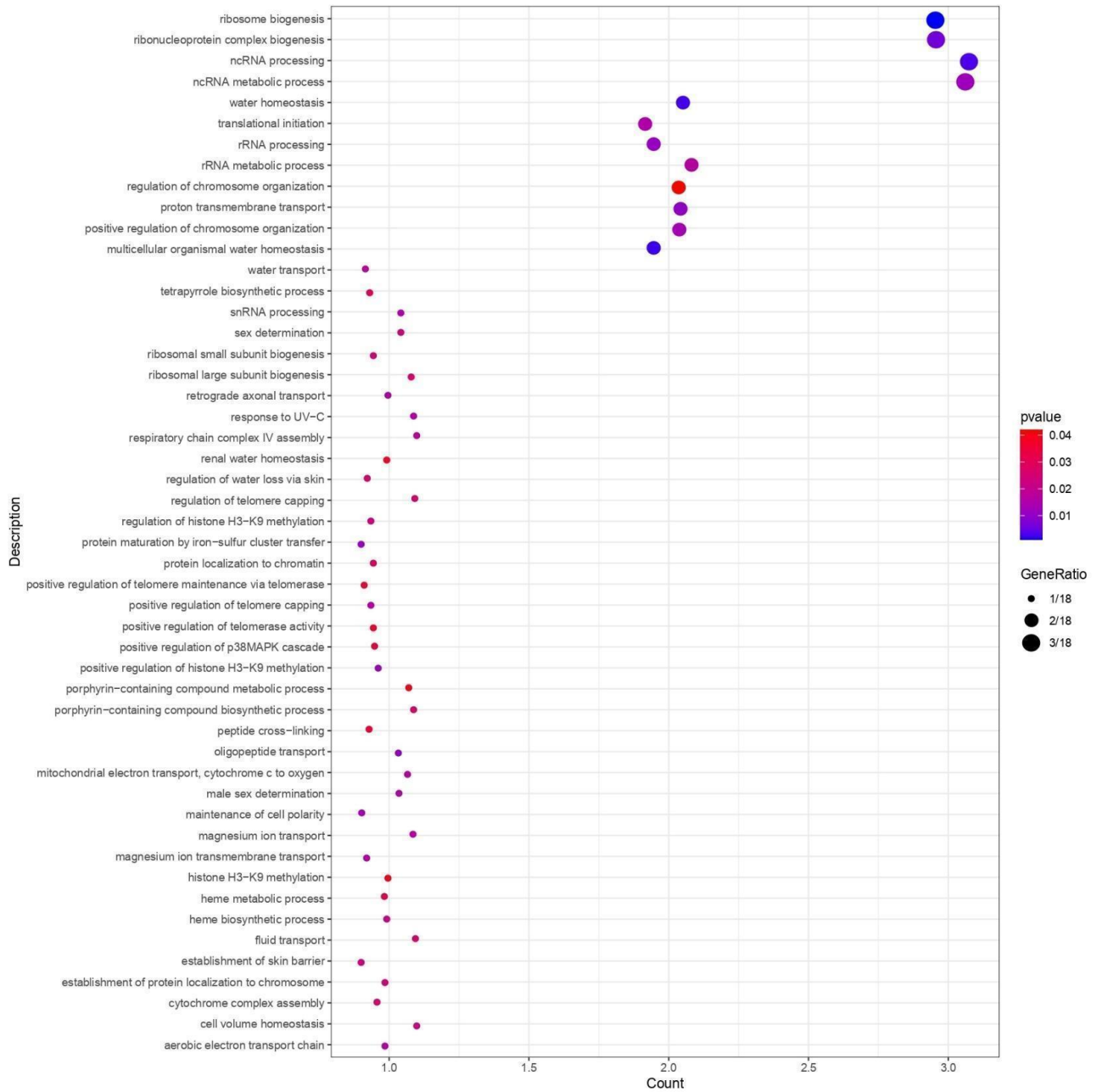


Figura 17. **Dot plot** das 50 principais vias biológicas **up-reguladas** em astrócito após **silenciamento do gene HOXB2**. A cor dos pontos representa a significância estatística da via, e o diâmetro indica a quantidade de genes envolvidos em cada via.

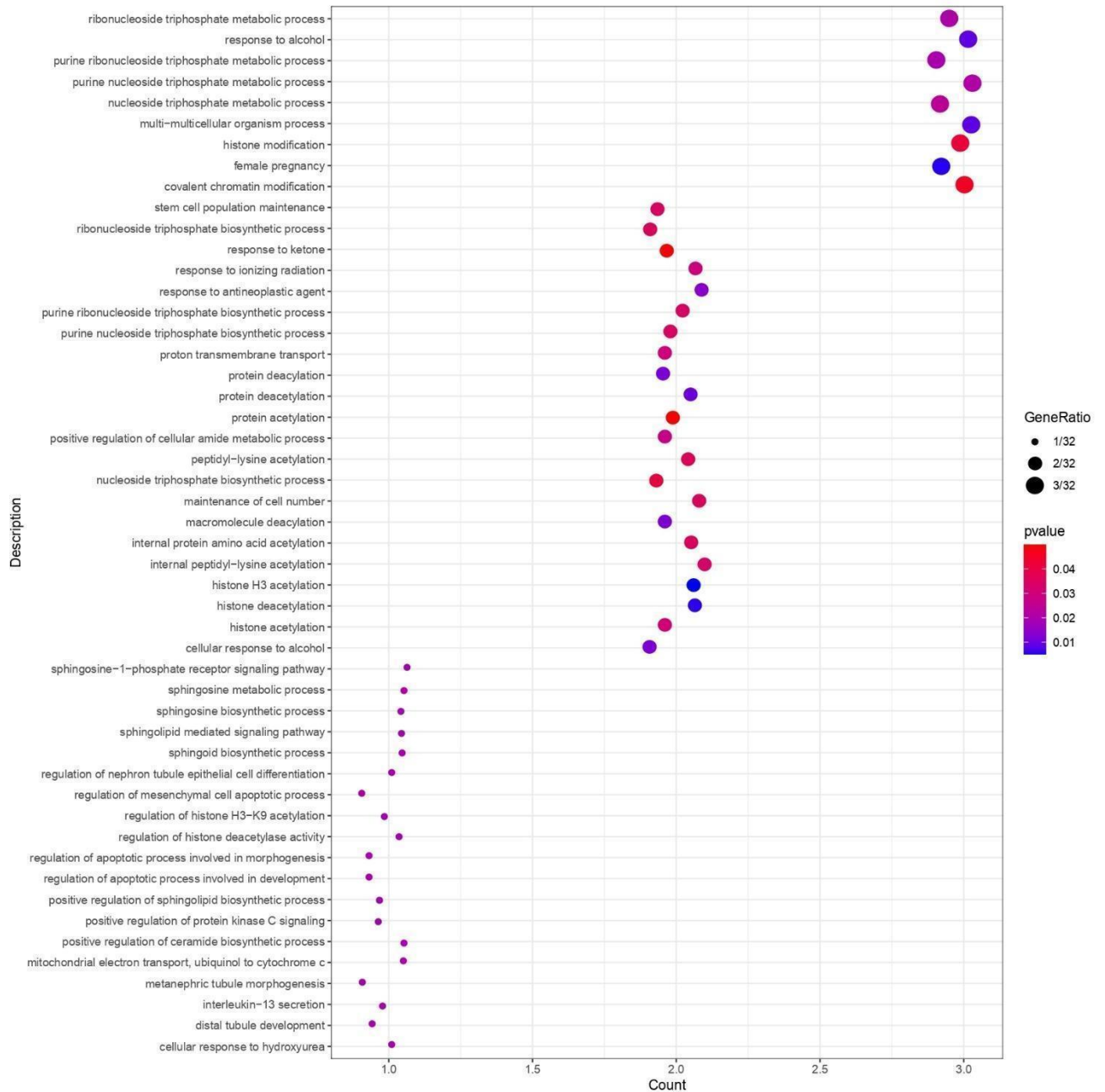


Figura 18. **Dot plot** das 50 principais vias biológicas *down-reguladas* em astrócito após silenciamento do gene *HOXB2*. A cor dos pontos representa a significância estatística da via, e o diâmetro indica a quantidade de genes envolvidos em cada via.

Em astrócito, observamos a *up-regulação* de vias biológicas tais como biogênese de ribossomos, metabolismo e processamento de RNAs não codificantes, homeostase de água, regulação da organização cromossômica e transporte transmembrana de próton (Figura 17). Quanto às vias *down-reguladas* (Figura 18), observam-se processos metabólicos de ribo e nucleosídeos, modificações de histonas, cromatina e proteínas, regulação da produção de esfingolipídeos e

ceramida. A identificação das vias *up* e *down*-reguladas sugerem o papel do *HOXB2* na manutenção dos processos celulares canônicos em astrócitos.

- **U343 (GBM)**

A Figura 19A apresenta o *heatmap* dos genes diferencialmente expressos na linhagem U343. Diferentemente do astrócito, o silenciamento do *HOXB2* em linhagem de GBM promove uma massiva *up*-regulação gênica, sendo que dos 50 principais genes diferencialmente expressos, 38 estão *up*-regulados (Figura 19B). Observa-se que, para uma boa parcela de genes, a sequência de shRNA 1 promove uma *up*-regulação mais intensa do que a sequência shRNA 2 (Figura 19A, parte inferior). Isso pode ser causado pela diferença de nível de silenciamento do gene *HOXB2* obtido através de cada shRNA (Figura 15).

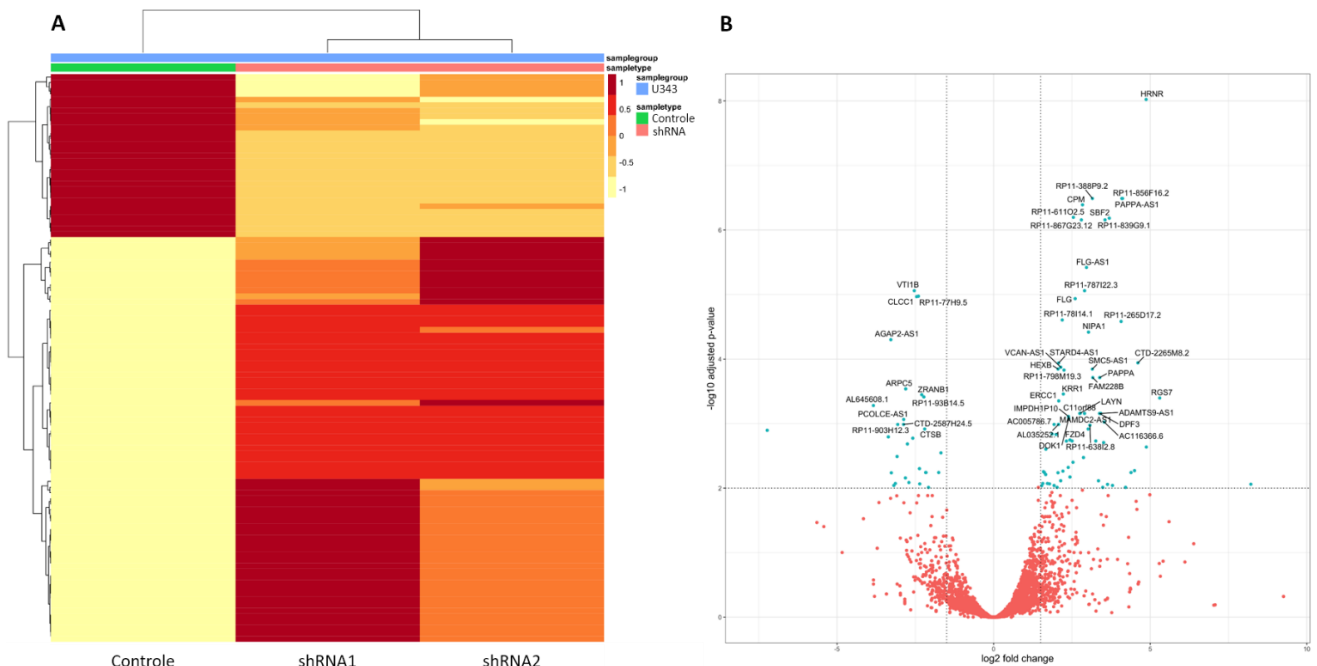


Figura 19. **Impacto do silenciamento do gene *HOXB2* no perfil de expressão gênica na linhagem U343.** **A.** Heatmap dos valores de expressão dos genes diferencialmente expressos nas amostras controle e shRNA. **B.** Volcano plot entre as amostras controle e shRNA, em azul os genes diferencialmente expressos..

A identificação da função biológica dos genes diferencialmente expressos traz interessantes resultados (Figuras 20 e 21).

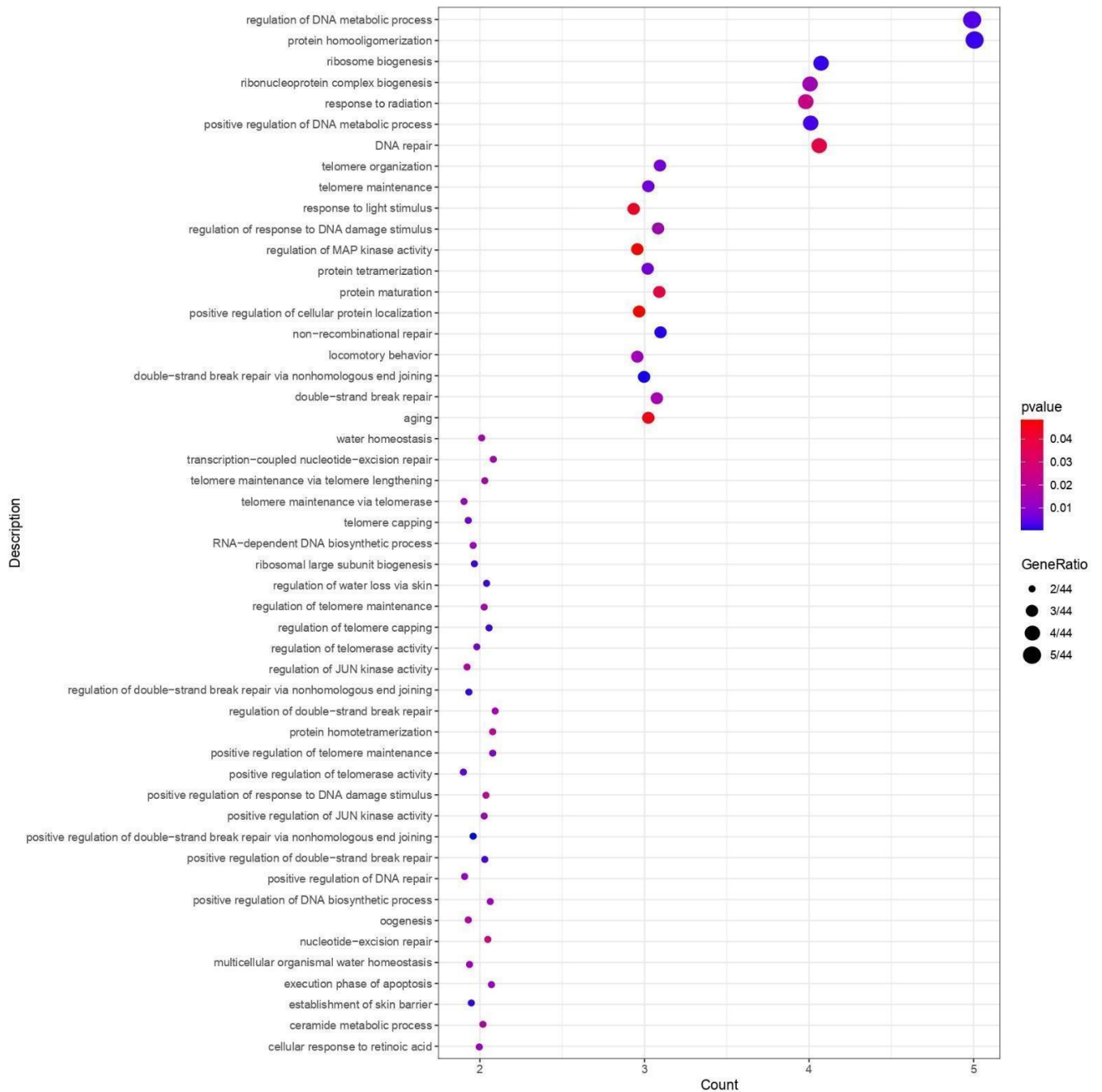


Figura 20. **Dot plot** das 50 principais vias biológicas **up-reguladas** na linhagem U343 após **silenciamento do gene HOXB2**. A cor dos pontos representa a significância estatística da via, e o diâmetro indica a quantidade de genes envolvidos em cada via.

Observa-se que as principais vias *up*-reguladas na linhagem U343 (Figura 20) são vias relacionadas ao metabolismo de DNA, manutenção dos telômeros e reparo do DNA, incluindo os mecanismos de reparo de quebra de fita dupla, reparo não recombinante, reparo de quebra de fita dupla através da junção de extremidades não homólogas e reparo por excisão de nucleotídeos. A intensa *up*-regulação das vias de reparo do DNA após o silenciamento do *HOXB2* pode sugerir a atuação negativa deste gene sobre as mesmas. É possível que a *up*-regulação do *HOXB2* em glioblastoma atue 'silenciando' as vias de reparo de DNA, o que contribui para a proliferação celular indefinida e escape da apoptose, uma vez que o sistema de reparo atua identificando as células mutadas, e na incapacidade de corrigir mutações, induz a célula à apoptose (Newsheen & Yang, 2012). Interessantemente, essas observações estão de acordo com os resultados obtidos nos ensaios funcionais, em que o silenciamento do gene *HOXB2* promoveu redução da proliferação celular através da indução de apoptose, bem como da senescência e paradas no ciclo celular.

Quanto às vias *down*-reguladas (Figura 21), observamos vias de regulação do citoesqueleto, organização dos filamentos de actina, polimerização e despolimerização da actina, ativação de neutrófilos e granulócitos, polimerização de proteínas, biossíntese de ácidos graxos e resposta ao fator de crescimento fibroblástico. Novamente, os resultados estão de acordo com a diminuição da taxa de proliferação celular observada nos ensaios funcionais e nas alterações morfológicas induzidas pelo silenciamento do *HOXB2*. Sabe-se que a organização do citoesqueleto celular através da actina é um importante fator relacionado à capacidade proliferativa e migratória das células, e que a desestruturação do citoesqueleto é um dos fatores que induzem paradas no ciclo celular (McNeil et al., 2020).

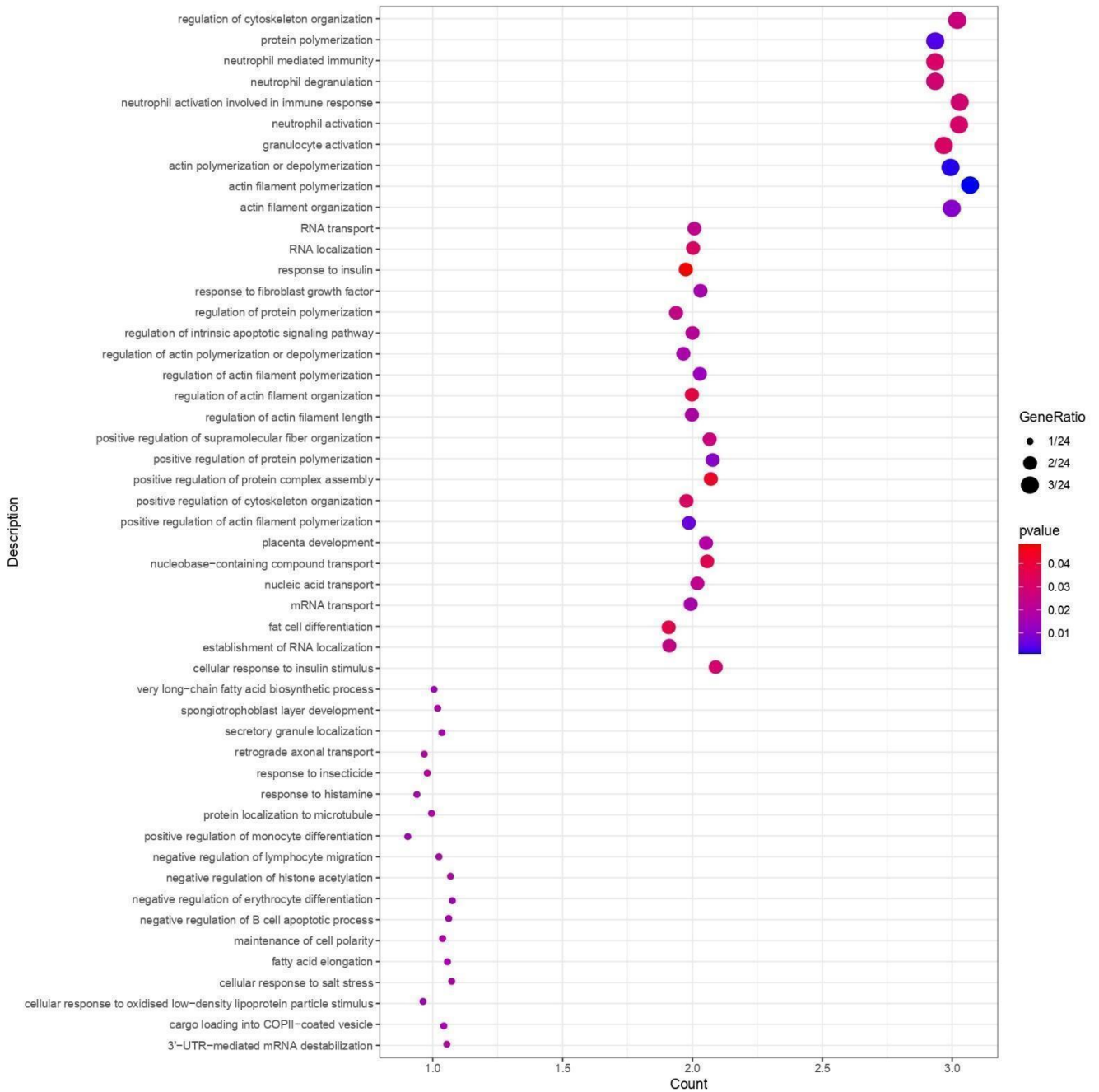


Figura 21. *Dot plot* das 50 principais vias biológicas *down-reguladas* na linhagem U343 após silenciamento do gene *HOXB2*. A cor dos pontos representa a significância estatística da via, e o diâmetro indica a quantidade de genes envolvidos em cada via.

lática (ou seja, há supressão da atividade mitocondrial), de modo que essa reprogramação metabólica permite o incremento da produção de macromoléculas como ATP, nucleotídeos, ácidos graxos, lipídeos de membrana e proteínas. Estas macromoléculas são essenciais para a singular capacidade proliferativa das células tumorais, além de permitir a evasão da apoptose e o incremento da sinalização celular (Hsu & Sabatini, 2008). Segundo Hsu & Sabatini (2008), a reprogramação metabólica pode ser causada pela ativação de oncogenes ou pelo próprio microambiente tumoral, e nesse contexto, é possível que o *HOXB2* atue como um oncogene na linhagem U87 através da reprogramação do metabolismo.

Considerando-se o silenciamento do *HOXB2* na linhagem U87 promove a recapitulação do metabolismo energético encontrado em células não tumorais, seria esperado uma redução na capacidade proliferativa, e possivelmente, o aumento na taxa de apoptose celular. Ambas essas observações estão de acordo com os resultados que obtivemos nos ensaios funcionais *in vitro*. Interessantemente, a redução na capacidade de proliferação pode ser explicada pelas vias *down*-reguladas após o silenciamento do *HOXB2* (Figura 24). Observamos vias importantes para o fenótipo proliferativo tais como, regulação dos processos metabólicos da amida, geração de precursores metabólicos e energia, regulação da secreção de proteínas e peptídeos, regulação dos processos metabólicos de lipídeos, processos metabólicos de ribo e nucleosídeos e regulação da tradução e regulação da matrix extracelular.

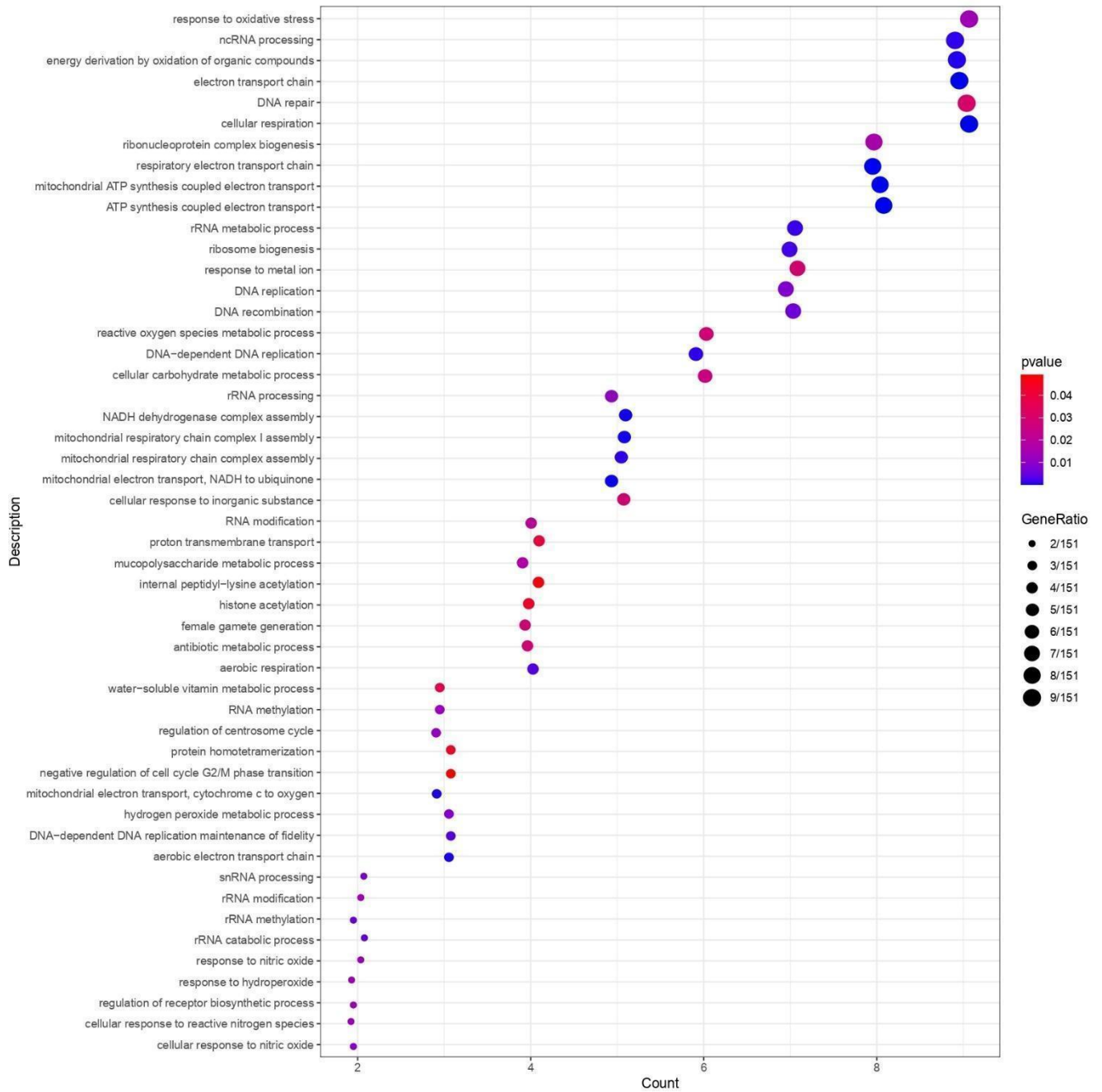


Figura 23. **Dot plot** das 50 principais vias biológicas *up-reguladas* na linhagem U87 após silenciamento do gene *HOXB2*. A cor dos pontos representa a significância estatística da via, e o diâmetro indica a quantidade de genes envolvidos em cada via.

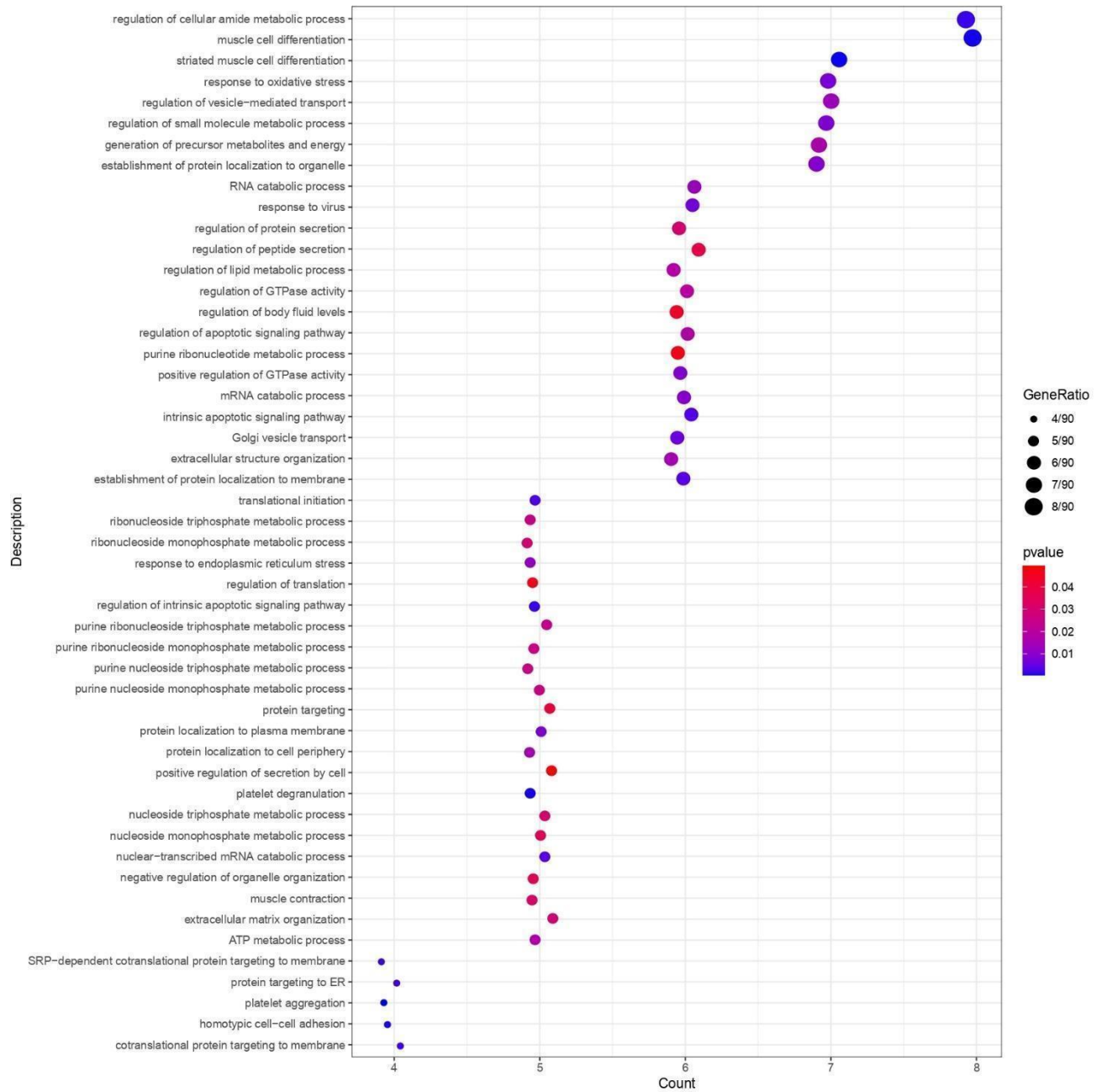


Figura 24. **Dot plot** das 50 principais vias biológicas **down-reguladas** na linhagem U87 após **silenciamento do gene HOXB2**. A cor dos pontos representa a significância estatística da via, e o diâmetro indica a quantidade de genes envolvidos em cada via.

4.5. Análise do impacto do silenciamento do gene *HOXB2* na conformação do genoma da linhagem U87

Nós aplicamos a técnica Promoter Capture Hi-C para compreender a configuração tridimensional do genoma da linhagem U87, bem como entender como a proteína *HOXB2* pode ser importante nessa organização. Nesse contexto, a linhagem U87 foi transduzida com a sequência de *short hairpin RNA 2* (shRNA 2), conforme protocolo descrito no tópico 3.9. Em seguida realizamos a análise do silenciamento por RT-PCR e *Western blot*, e os resultados podem ser visualizados na Figura 25. É possível observar que o nível de silenciamento de RNA é em torno de 90%, enquanto o de proteína, em torno de 50%. Para esta análise de expressão proteica utilizamos um anticorpo da marca LSBio, cordialmente doado pelo Laboratório do Prof. Peter Fraser.

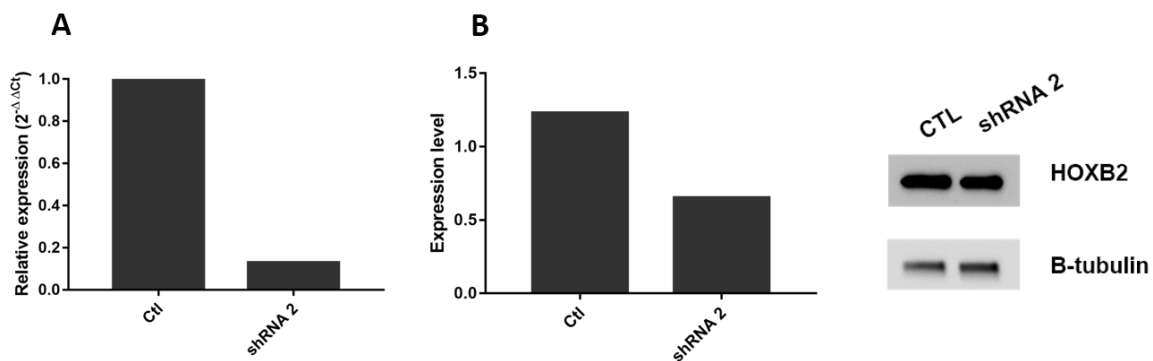


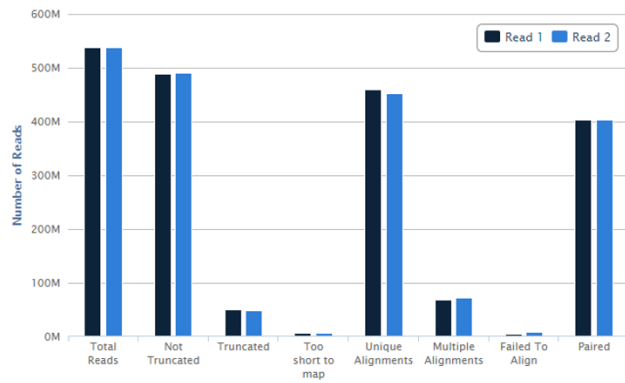
Figura 25. Níveis de expressão do gene *HOXB2* após transdução com a sequência de *shHOXB2* (shRNA2). A. Nível de expressão do gene *HOXB2* (RNA) após transdução. Gene *HPRT1* usado como controle endógeno. B. Nível da proteína *HOXB2* após transdução. B-tubulina usada como controle endógeno.

Após a confirmação do silenciamento, nós realizamos o protocolo experimental do PCHi-C, conforme etapas citadas no tópico 3.12.1 e protocolo detalhado em Apêndice. O sequenciamento foi realizado em replicadas biológicas no equipamento NovaSeq 6000 (Illumina), S2 *Flow Cell Type*, 100 ciclos. Para analisar a qualidade do sequenciamento, nós executamos a *pipeline* HiCUP (Wingett et al, 2015). A Figura 26 mostra os resultados obtidos após utilização dos scripts Truncater e Mapper do HiCUP, O genoma de referência foi o hg38. É possível observar que a maioria das *reads* são válidas, com uma pequena porção apresentando sequências truncadas ou pequenas demais para serem mapeadas. Além disso, a maioria das *reads* apresentaram alinhamentos únicos contra o genoma de referência. No total, obtivemos 3.98 bilhões de *reads*.

A.1

	Read 1	Read 2
Total Reads	537,945,396	537,945,396
Not Truncated	487,617,056	490,035,419
Truncated	50,328,340	47,909,977
Too short to map	6,781,974	6,543,315
Average length of truncated sequence	30.06	30.05

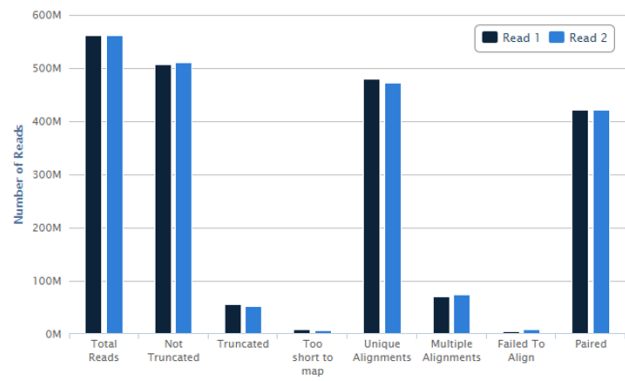
	Read 1	Read 2
Unique Alignments	459,081,713	451,711,102
Multiple Alignments	67,446,198	70,988,441
Failed To Align	4,635,511	8,702,538
Paired	402,791,433	402,791,433



A.2

	Read 1	Read 2
Total Reads	560,678,121	560,678,121
Not Truncated	505,876,736	509,087,017
Truncated	54,801,385	51,591,104
Too short to map	7,395,170	6,995,437
Average length of truncated sequence	30.04	30.05

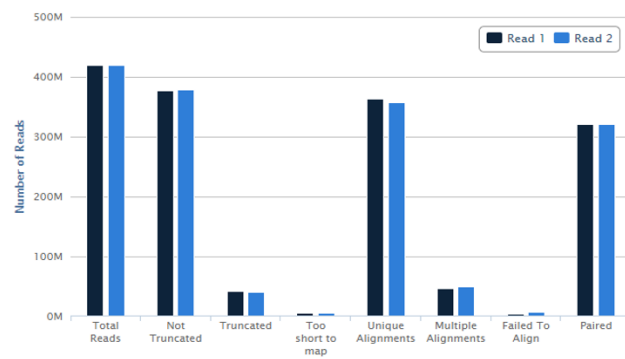
	Read 1	Read 2
Unique Alignments	479,265,366	471,849,194
Multiple Alignments	69,033,072	73,233,585
Failed To Align	4,984,513	8,599,905
Paired	420,611,939	420,611,939



B.1

	Read 1	Read 2
Total Reads	418,268,365	418,268,365
Not Truncated	376,226,007	378,061,057
Truncated	42,042,358	40,207,308
Too short to map	5,749,290	5,569,914
Average length of truncated sequence	30.04	30.01

	Read 1	Read 2
Unique Alignments	363,110,963	357,180,251
Multiple Alignments	45,995,772	49,411,940
Failed To Align	3,412,340	6,106,260
Paired	320,900,928	320,900,928



B.2

	Read 1	Read 2
Total Reads	390,912,788	390,912,788
Not Truncated	357,026,198	358,438,898
Truncated	33,886,590	32,473,890
Too short to map	4,676,249	4,587,549
Average length of truncated sequence	30.04	29.98

	Read 1	Read 2
Unique Alignments	341,569,201	336,502,352
Multiple Alignments	41,044,741	44,066,541
Failed To Align	3,622,597	5,756,346
Paired	303,751,692	303,751,692

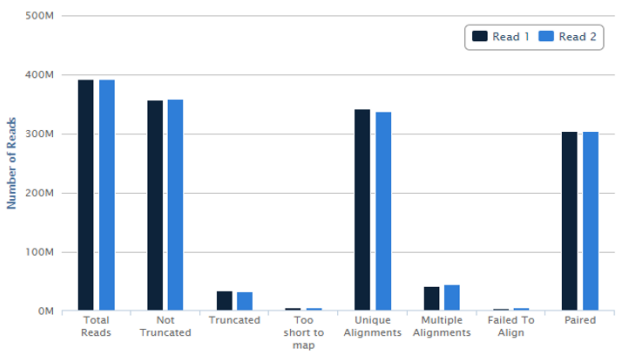


Figura 26. Relatório de qualidade das amostras sequenciadas, gerado pelos *scripts Truncater e Mapper*, do HiCUP. A1 e A2: Amostras controle. B1 e B2: Amostras shRNA2.

A Figura 27 mostra os resultados obtidos após utilização do *script Filter*, que identifica e remove artefatos comumente encontrados em bibliotecas de Hi-C, tais como *reads* de tamanho errado ou circulares. Ao calcular a porcentagem de *reads* válidas, nós obtivemos uma média de 86% de *reads* válidas nas amostras controle e 83.3% nas amostras shRNA2. O total obtido indica bibliotecas de alta qualidade, uma vez que valores aceitáveis estão entre 70% e 85% (Belton et al, 2012).

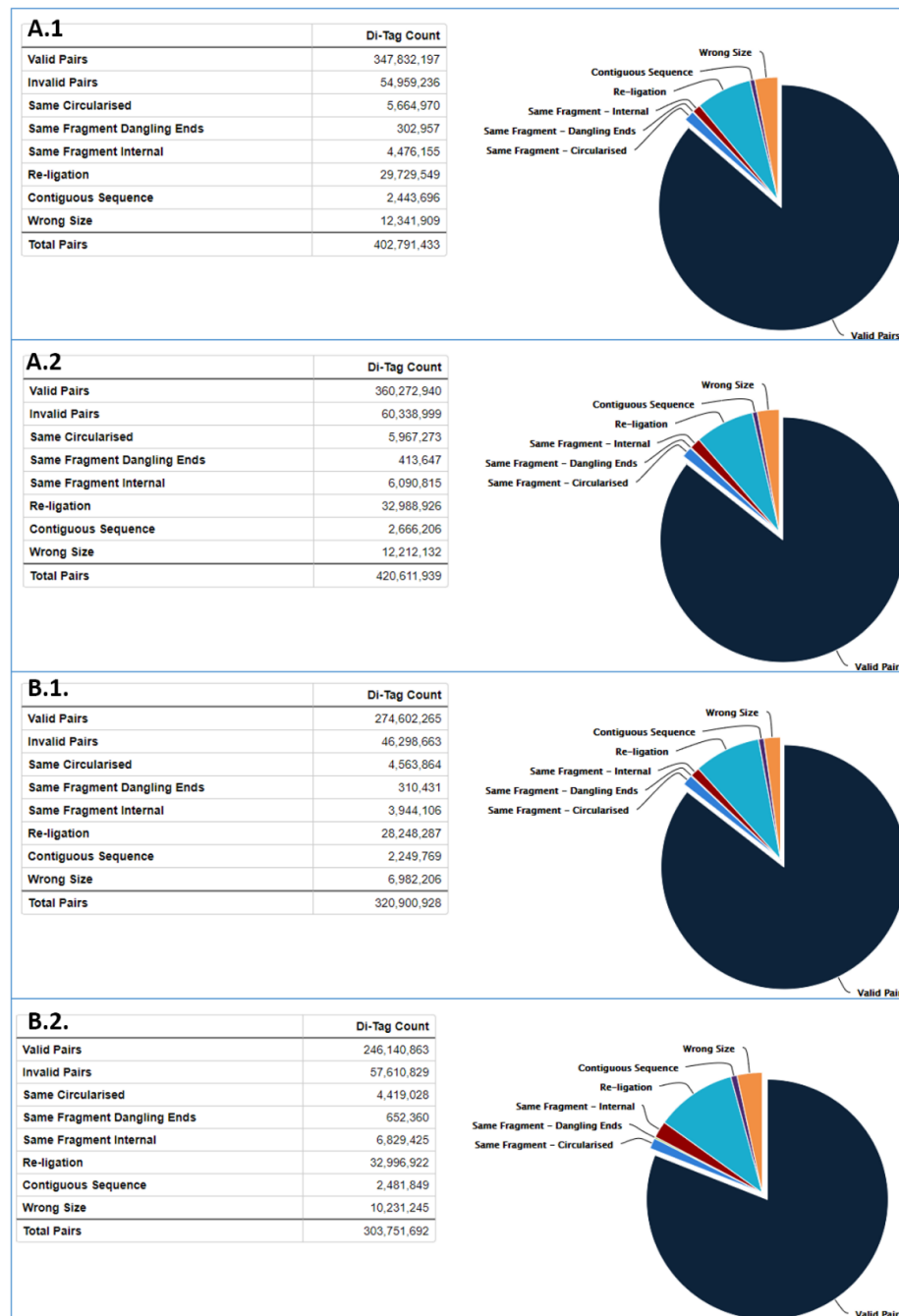


Figura 27. Relatório de qualidade das amostras sequenciadas, gerado pelo *script Filter*, do HiCUP. A1 e A2: Amostras controle. B1 e B2: Amostras shRNA2.

Após a conclusão da *pipeline* do HiCUP, nós usamos a ferramenta CHiCAGO (Cairns et al, 2016) para identificar as interações estatisticamente significativas, discutidas a seguir.

4.5.1. Análise CHiCAGO

Após a confirmação da qualidade das bibliotecas por meio da pipeline HiCUP, nós usamos a ferramenta CHiCAGO para identificar as interações estatisticamente significativas ($\text{score} > 5$) em cada condição. Foram identificadas as interações totais – presentes em ambas as condições; e as interações únicas, presentes em apenas uma das duas condições. A Figura 28 sumariza o número de interações significativas identificadas em cada condição, usando $\log_{10} > 1,5$.

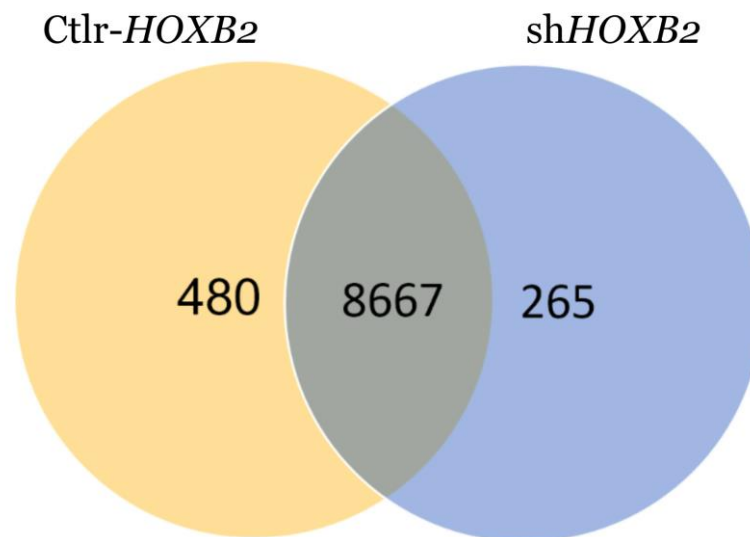


Figura 28. **Número de interações únicas estatisticamente significativas identificadas no controle (círculo amarelo) e na condição sh*HOXB2* (círculo azul).** A zona de interseção traz o número de interações totais e comuns a ambas as condições. $\log_{10} > 1,5$.

A Figura 29 fornece uma visão geral das interações em cada amostra e condição, com ênfase nas interações com score de \log_{10} maior que 1,5 (pontos amarelos). É possível observar que na condição sh*HOXB2* (Figura 29.D), há uma maior concentração de interações únicas estatisticamente significativas nos cromossomos 1 e 10, bem como uma menor concentração de interações no

cromossomo 12, em relação ao controle (Figura 29.C). Além disso, a condição controle é a única que apresenta interações exclusivas nos cromossomos 13, 14 e 15.

O padrão geral de interações genômicas (Figura 29) já permite uma primeira e envolvente visualização do impacto do silenciamento de *HOXB2* na conformação geral do genoma. A partir de agora, discutiremos as interações mais relevantes no contexto do nosso projeto.

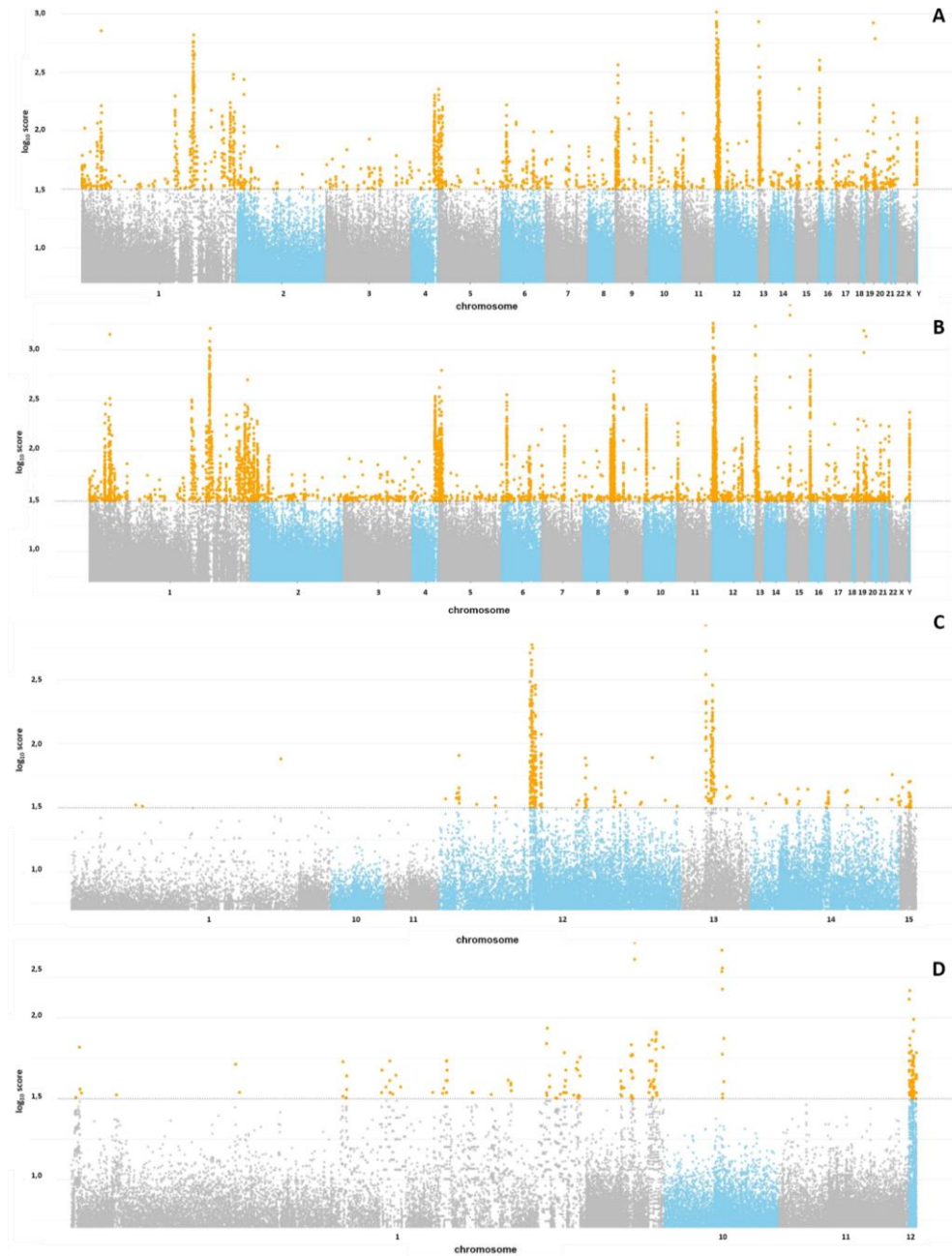


Figura 29. **Interações genômicas identificadas pela ferramenta ChiCAGO.** A e B. Interações totais nas amostras de controle e sh*HOXB2*, respectivamente. C e D. Interações únicas nas amostras de controle e sh*HOXB2*, respectivamente.

Analisando as 100 principais interações únicas

Analisar todas as interações genômicas estatisticamente significativas obtidas por nosso PChi-C representaria um desafio difícil de ser realizado. Dada a enorme complexidade dos resultados obtidos, é imprescindível estabelecer critérios para que os dados sejam devidamente explorados. Nesse contexto, nossa primeira etapa de análise consistiu em examinar as 100 principais interações únicas (com base no valor do score) em cada condição. Interessantemente, em ambas as condições, todas as 100 principais interações envolveram dois cromossomos diferentes – em *trans*. Na condição de controle, todas as interações apresentaram o alinhamento entre genes e regiões ‘vazias’ do genoma, o que também ocorreu em 95 das 100 principais interações únicas na condição *HOXB2* silenciado. Das cinco interações ‘válidas’ da condição sh*HOXB2*, quatro ocorreram entre a região promotora do gene *CD69* com o RNA longo não codificante AC018742.1, e uma entre a região promotora do gene *HES2* com o gene *PMP4*. O perfil de expressão desses genes foi visualizado nos nossos dados de RNA-seq, mas não foi constatada diferença estatisticamente significativa na expressão entre as condições controle e sh*HOXB2*.

Analisando a conformação tridimensional dos genes envolvidos em vias biológicas importantes no glioblastoma

Conforme apresentado no item 4.4, nós realizamos o enriquecimento das vias biológicas *up* e *down*-reguladas após o silenciamento do gene *HOXB2*. As vias biológicas enriquecidas na linhagem U87 foram principalmente vias metabólicas e de respiração celular, como a cadeia de transporte de elétrons, a síntese de ATP acoplada ao transporte de elétrons, a união de complexos NADH desidrogenase da cadeia respiratória mitocondrial, energia derivada do oxidação de compostos orgânicos, entre outros. Curiosamente, as anormalidades metabólicas são características compartilhadas pelos mais diversos tipos de tumores (Currie et al., 2013), conferindo vantagens seletivas para a sobrevivência e proliferação celular (Hsu & Sabatini, 2008). Em relação às vias reguladas negativamente, os principais processos envolvidos foram a regulação do metabolismo das amidas e da secreção de proteínas e peptídeos, a regulação da tradução e organização da matriz extracelular e a sinalização da apoptose.

Para entender se a expressão diferencial dos genes envolvidos nessas vias biológicas pode ser causada por mudanças nas interações (resultantes da ausência direta ou indireta da proteína *HOXB2*), selecionamos oito vias *up*-reguladas e oito

down-reguladas e seus respectivos genes envolvidos. A Tabela 4 mostra as vias selecionadas, com as primeiras oito sendo reguladas positivamente e as outras reguladas negativamente.

Entre os genes envolvidos em vias biológicas, oito apresentaram interações únicas: *ATP5PB*, *NDUFB11*, *TNFRSF1A*, *RPAIN*, *PRIMPOL*, *SPHK2*, *EIF4B* e *MARS*. A seguir, nós analisaremos cada interação.

Tabela 4. Vias biológicas reguladas diferencialmente após o silenciamento do gene *HOXB2* e seus respectivos genes envolvidos. Dados retirados do RNA-seq.

Via biológica	Genes envolvidos
Fosforilação oxidativa	<i>ATP5PB/NDUFB11/TEFM/COX2/ND2/COX1/ND3/ND4/ND1/COX3</i>
Síntese de ATP mitochondrial acoplada à cadeia de elétrons	<i>NDUFB11/COX2/ND2/COX1/ND3/ND4/ND1/COX3</i>
Resposta ao óxido nítrico	<i>CFLAR/CCNA2</i>
Checkpoint das fases G2/M do ciclo celular	<i>TICRR/DONSON</i>
Reparo de pareamento errado do DNA	<i>MCM9/MSH3</i>
Organização da matriz extracelular	<i>CFLAR/CDH1/TNFRSF1A/ICAM3/ITGAE/HAS3/CSGA/ LNACT1/JAM3/COL18A1/NOXO1</i>
Resposta ao estresse oxidativo	<i>CFLAR/ERCC1/VRK2/CCNA2/ENDOG/COX1/ND3/ND1/GPX3</i>
Reparo de DNA	<i>ERCC1/MCM9/MSH3/RPAIN/CCNH/POLG/TICRR/M EIOB/PRIMPOL</i>
Regulação positiva da biossíntese de esfingolipídeos	<i>SPHK2/RACK1</i>
Regulação positiva da biossíntese de ceramida	<i>SPHK2/RACK1</i>
Regulação da via de sinalização intrínseca da apoptose	<i>CLU/TPT1/P4HB/NOC2L/RACK1</i>
Regulação do processo celular metabólico da amida	<i>EIF4B/SPHK2/CLU/RPL13A/RPL10/ATP13A2/EEF2/ RACK1</i>
Regulação do processo metabólico do ATP	<i>SPHK2/GCKR/PDE12/TMSB4X</i>
Direcionamento de proteínas para a membrana celular	<i>RPL3/RPL13A/RPL10/RPL29</i>
Iniciação da tradução	<i>EIF4B/RPL3/RPL13A/RPL10/RPL29</i>
Resposta celular ao estímulo do fator de crescimento derivado de plaquetas	<i>MTSS2/MARS</i>

Gene *ATP5PB*

O gene *ATP5PB* codifica uma subunidade da ATP sintase mitocondrial, que catalisa a síntese de ATP utilizando um gradiente de prótons através da membrana interna durante a fosforilação oxidativa. Este gene é regulado positivamente após o silenciamento de *HOXB2*, e isso pode ser explicado por mudanças em suas interações. Conforme mostrado na Figura 30, podemos observar uma nova interação entre a região do promotor *ATP5PB* (seta vermelha) e um *enhancer* no gene *TMIGD3* (seta preta), na condição *shHOXB2*.

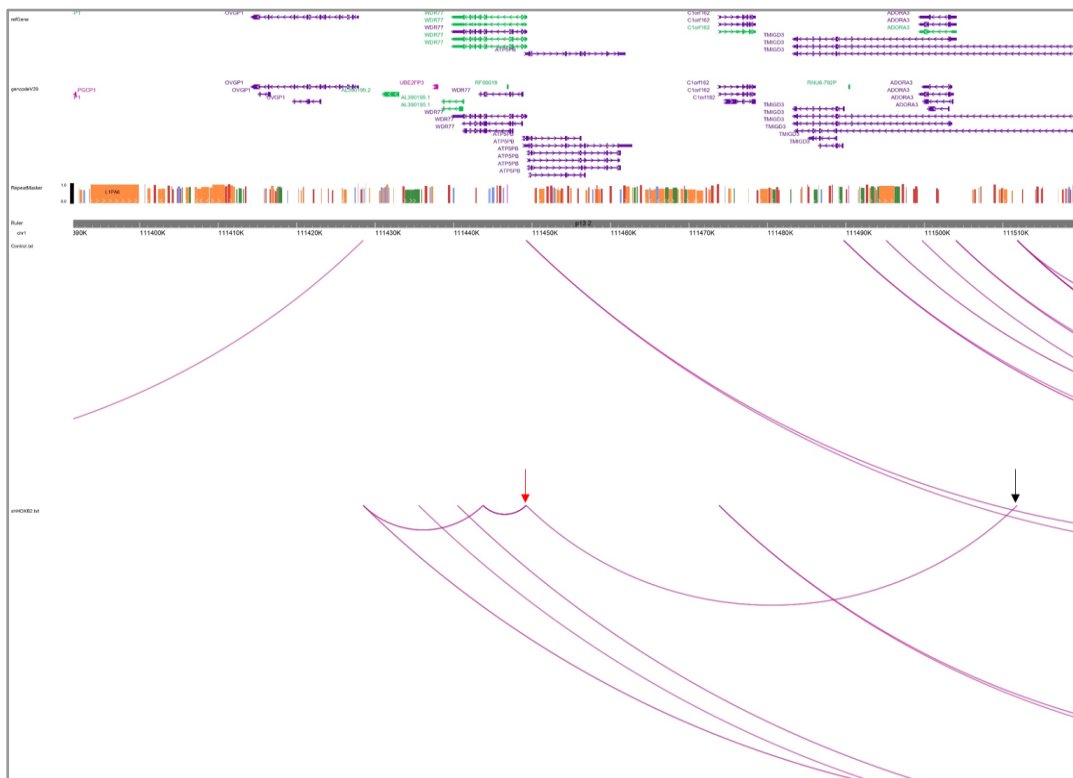


Figura 30. Interação única entre o promotor do gene *ATP5PB* (seta vermelha) e elemento regulador no gene *TMIGD3* (seta preta), na condição *shHOXB2*.

Gene *NDUF11*

O gene *NDUF11* codifica a subunidade acessória da enzima NADH desidrogenase (Complexo I) que atua transferindo elétrons do NADH para a cadeia respiratória na mitocôndria. Após o silenciamento do *HOXB2*, podemos ver uma nova interação entre a região do promotor *NDUF11* e um elemento regulador no gene *UBA1* (Figura 31), que pode contribuir para a *up*-regulação do gene *NDUF11*. Assim como o gene *ATP5PB*, o gene *NDUF11* também está envolvido na fosforilação oxidativa,

um processo que geralmente é "eliminado" em muitos tipos de câncer. Nas células normais, a obtenção de energia é garantida pela glicólise seguida do ciclo do ácido cítrico e da fosforilação oxidativa, ambas ocorrendo na mitocôndria (Heiden et al., 2009). Porém, a maioria das células tumorais apresenta altos índices de glicólise seguida de fermentação láctica, com supressão da atividade mitocondrial, o que permite o aumento da produção de macromoléculas como ATP, nucleotídeos, ácidos graxos, lipídios de membrana e proteínas. Essas macromoléculas são essenciais para a capacidade proliferativa única das células tumorais, além de permitirem a evasão da apoptose e o aumento da sinalização celular (Hsu & Sabatini, 2008). Assim, podemos sugerir que, no glioblastoma, a desregulação do *HOXB2* atua suprimindo ou reduzindo (de forma indireta) a expressão de genes relacionados ao metabolismo aeróbio. Quando o gene *HOXB2* é silenciado, ocorre uma *up*-regulação da expressão desses genes, o que pode ser explicado pelo surgimento de novas interações com *enhancers*.

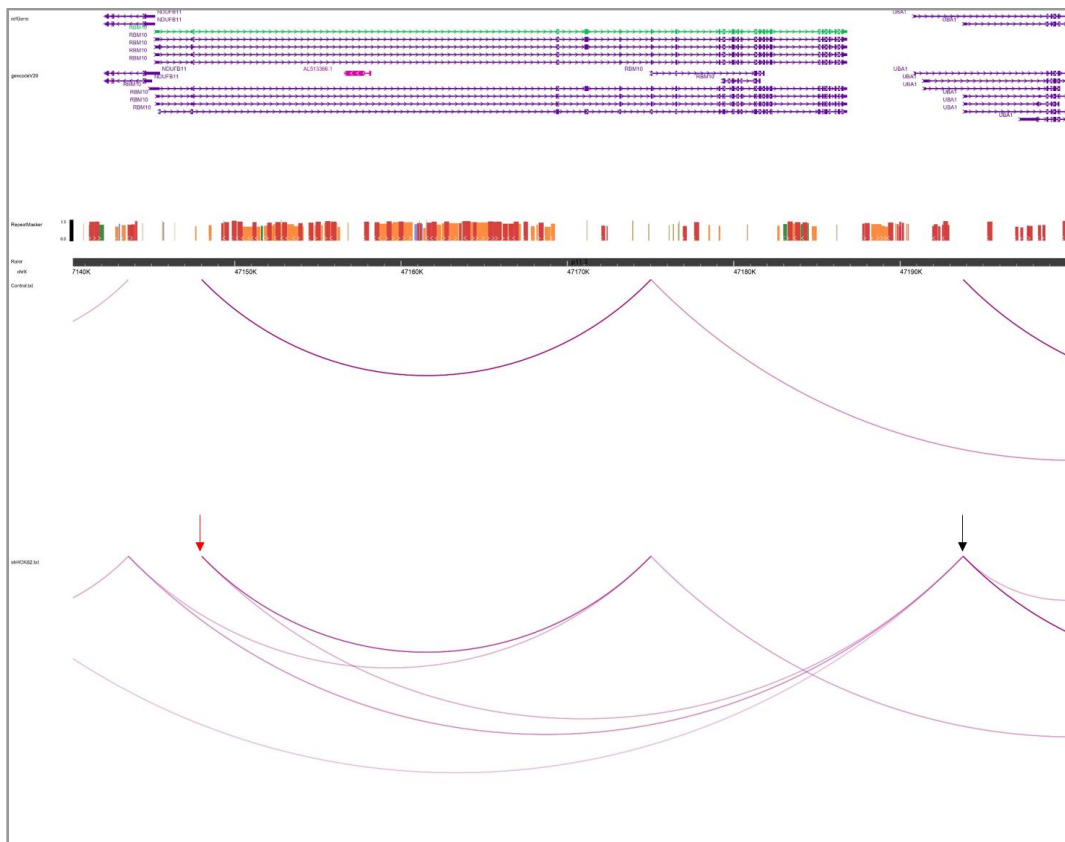


Figura 31. Interação única entre o promotor do gene *NDUF11* (seta vermelha) e elemento regulador no gene *UBA1* (seta preta), na condição *shHOXB2*.

Gene *TNFRSF1A*

O gene *TNFRSF1A*, denominado membro 1A da superfamília do fator de necrose tumoral, é o principal receptor para TNF-alfa que medeia a apoptose e funciona como um regulador da inflamação. Este gene é regulado positivamente após o silenciamento de *HOXB2* em glioblastoma, e isso pode ser explicado pelas duas novas interações envolvendo o promotor do *TNFRSF1A* e enhancers no gene *CD9* (Figura 32). Curiosamente, a regulação positiva de *TNFRSF1A* corresponde aos resultados do ensaio de viabilidade celular (Item 3.10.3), em que observamos que o silenciamento de *HOXB2* promove aumento significativo nas taxas de apoptose em linhagens de glioblastoma.

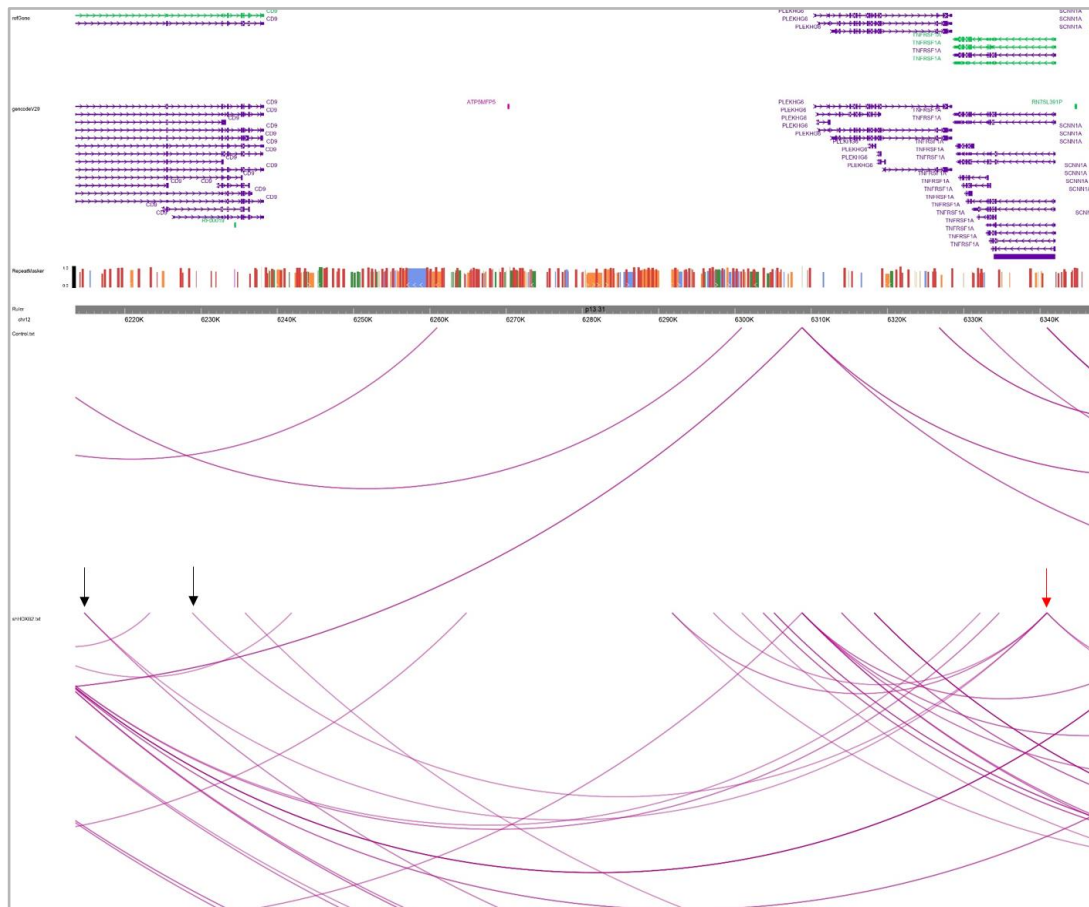


Figura 32. Interação única entre o promotor do gene *TNFRSF1A* (seta vermelha) e elemento regulador no gene *CD9* (seta preta), na condição *shHOXB2*.

Gene *RPAIN*

O gene *RPAIN* codifica a proteína de replicação RPA, que está principalmente envolvida no reparo do DNA e no metabolismo. É bem conhecido que várias vias de reparo podem ser defeituosas em muitos tipos de câncer, o que contribui para o aumento da proliferação e evasão da apoptose (Nowsheen & Yang, 2012). O gene *RPAIN* é regulado positivamente após o silenciamento de *HOXB2* e, como podemos ver na Figura 33, essa regulação positiva pode ser promovida pela nova interação entre *RPAIN* e um enhancer do gene *DHX33*.

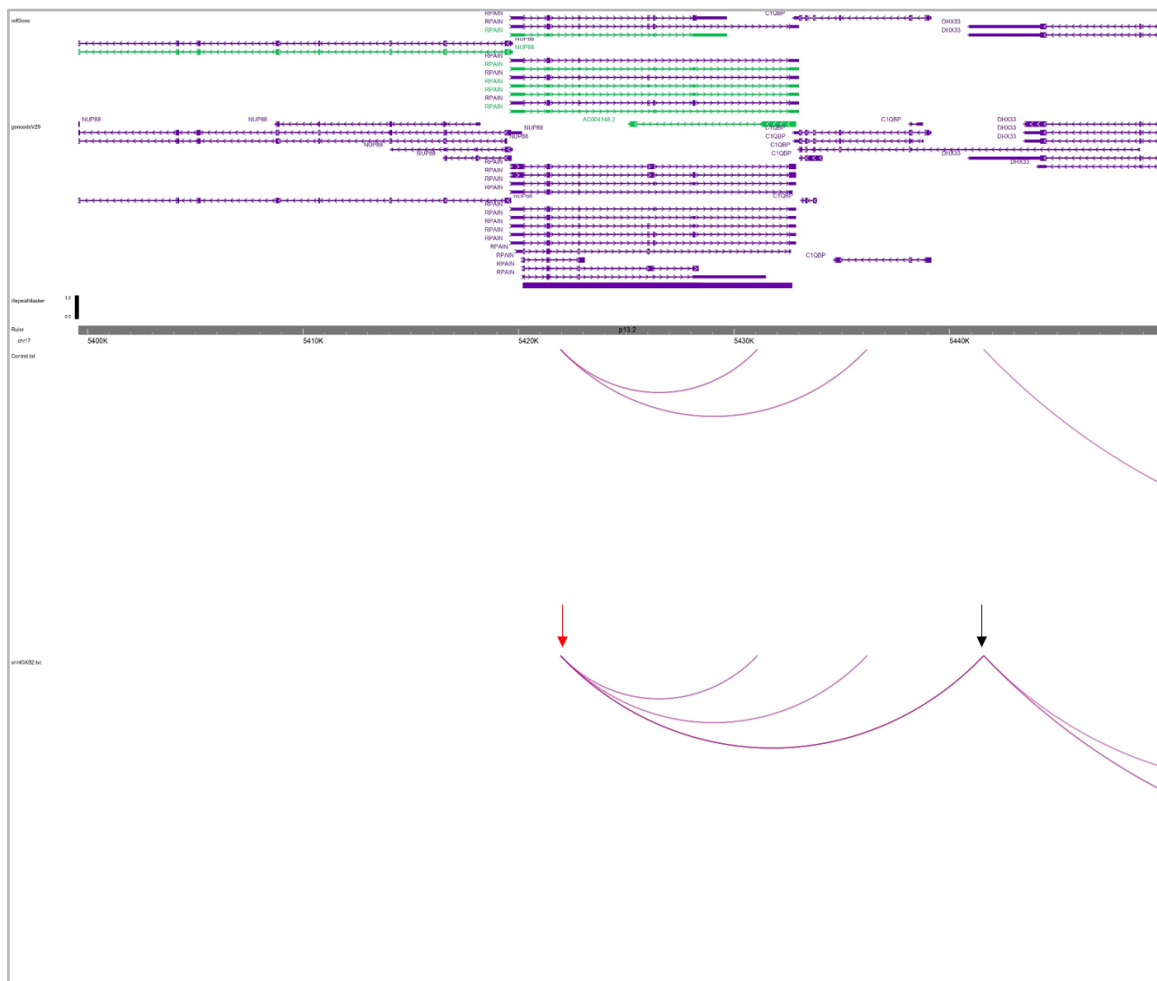


Figura 33. Interação única entre o promotor do gene *RPAIN* (seta vermelha) e elemento regulador no gene *DHX33* (seta preta), na condição *shHOXB2*.

Gene *PRIMPOL*

O gene *PRIMPOL* codifica uma DNA primase-polimerase e, assim como o gene *RPAIN*, atua no reparo do DNA. Conforme mostrado na Figura 34, após o silenciamento de *HOXB2*, podemos ver uma nova interação entre *PRIMPOL* e *CENPU*.

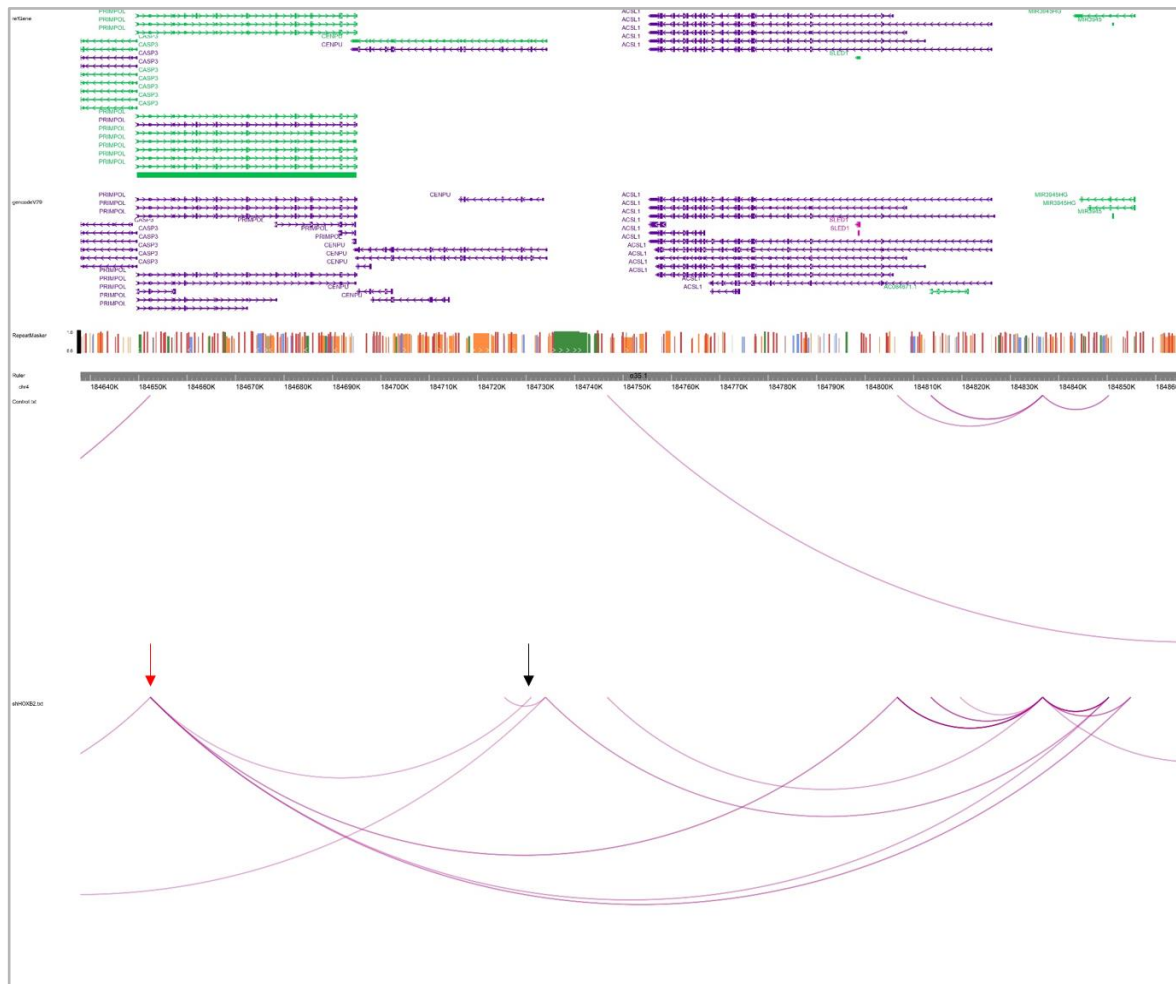


Figura 34. Interação única entre o promotor do gene *PRIMPOL* (seta vermelha) e elemento regulador no gene *CENPU* (seta preta), na condição *shHOXB2*.

Gene *SPHK2*

O gene *SPHK2* codifica uma quinase que catalisa a fosforilação da esfingosina para formar esfingosina-1-fosfato (SPP), um mediador lipídico com funções intra e extracelulares, como a regulação dos níveis intracelulares de ceramida, respiração mitocondrial e metabolismo lipídico. Olhando para a Figura 35, podemos ver quatro novas interações na condição *shHOXB2*, envolvendo ambos enhancers no gene *SPHK2* e no gene *DBP*. Considerando que o gene *SPHK2* é *down*-regulado após o silenciamento de *HOXB2*, podemos supor que as interações únicas são consequências indiretas do silenciamento de *HOXB2*.

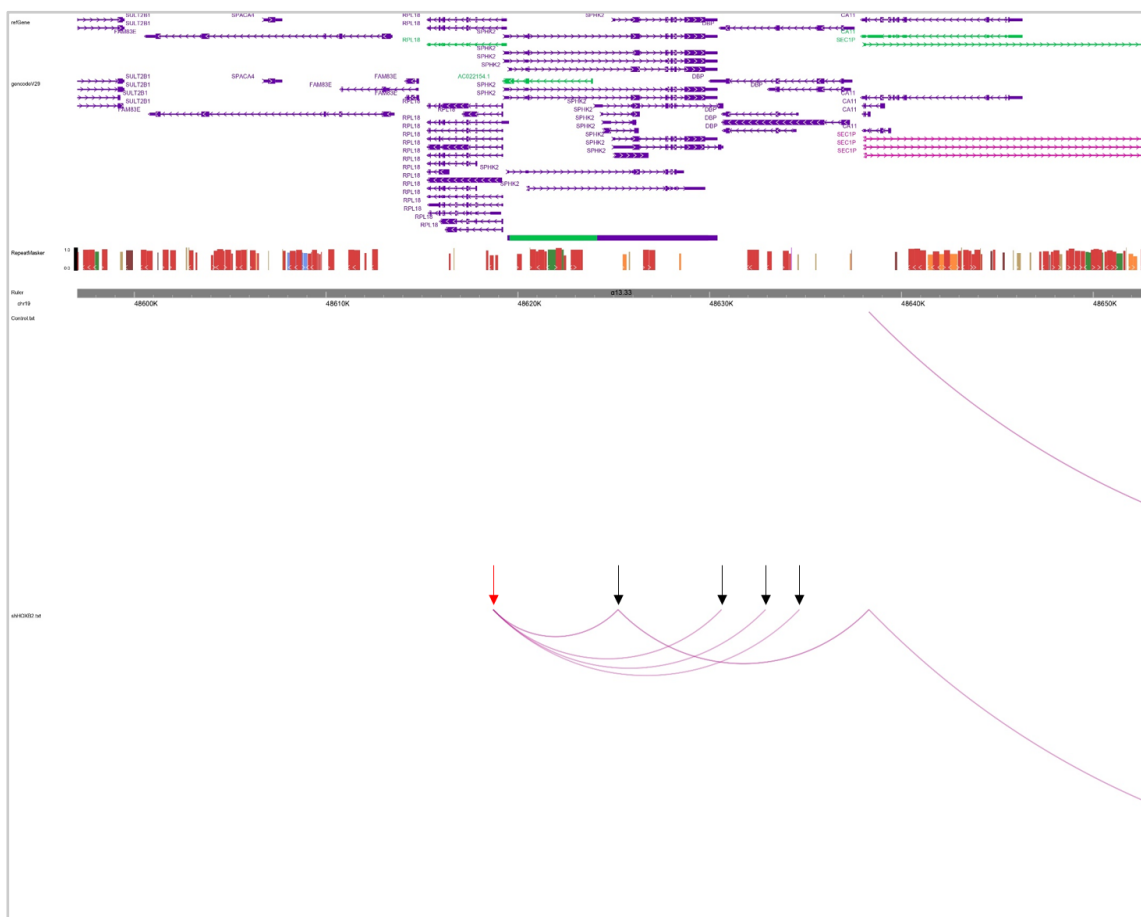


Figura 35. Interação única entre o promotor do gene *SPHK2* (seta vermelha) e elemento regulador no gene *SPHK2*, e três elementos reguladores no gene *DBP* (setas pretas), na condição *shHOXB2*.

Gene *EIF4B*

O gene *EIF4B* codifica o fator de iniciação da tradução eucariótica 4B, que é necessário para a ligação do RNAm aos ribossomos. Em nossos dados, podemos ver uma interação entre regiões do gene *EIF4B* que é perdida na condição *shHOXB2* (Figura 36). Isso pode explicar a *down*-regulação desse gene após o silenciamento do gene *HOXB2*, resultando em uma diminuição na biossíntese de proteínas.

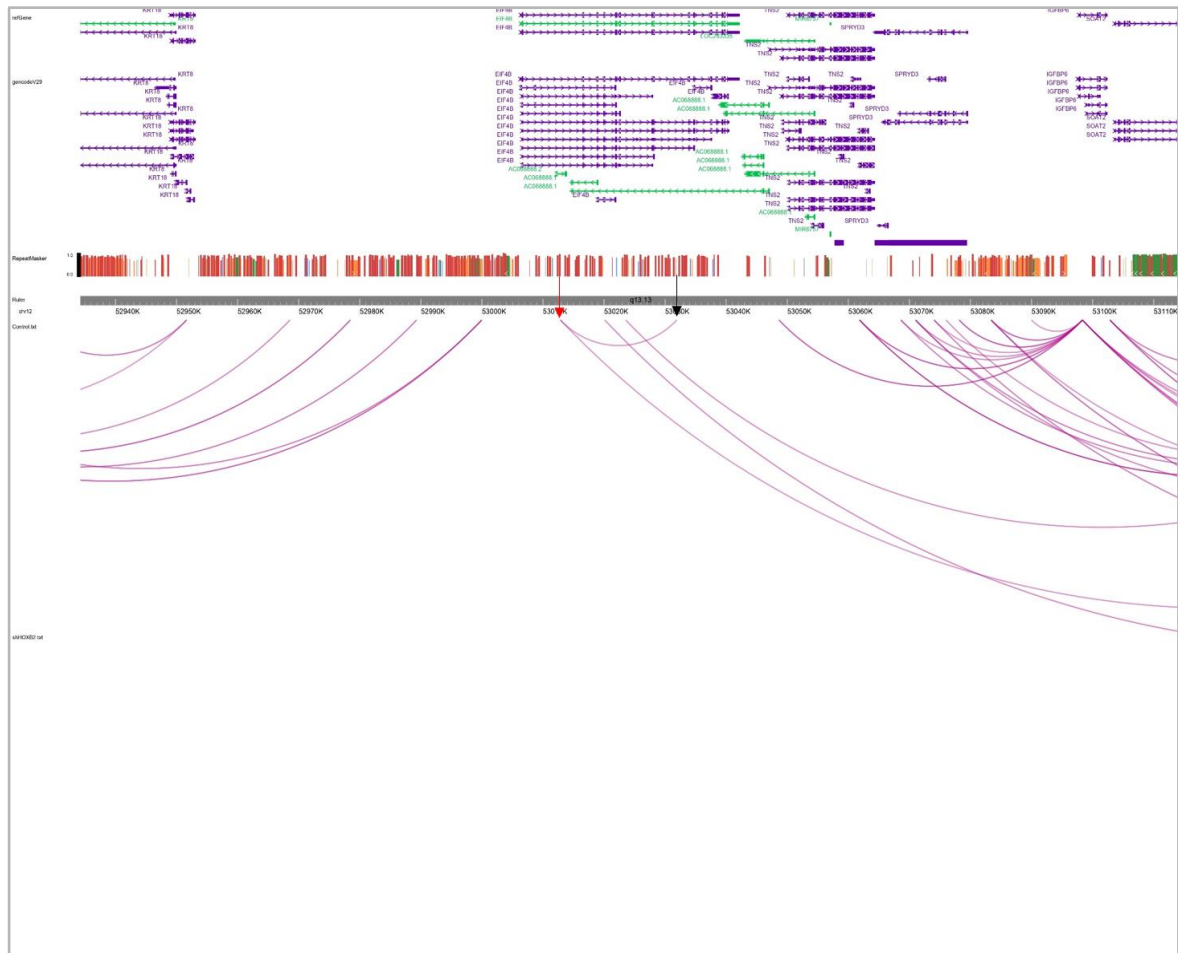


Figura 36. Interação única entre o promotor do gene *EIF4B* (seta vermelha) e elemento regulador no gene *EIF4B* (seta preta), na condição *shHOXB2*.

Gene *MARS*

O gene *MARS* codifica a metionil-tRNA sintetase, que desempenha um papel crítico na biossíntese de proteínas e está envolvida na resposta celular ao estímulo do fator de crescimento. Curiosamente, podemos ver três interações na condição controle que desaparecem após o silenciamento de *HOXB2* (Figura 37). Além disso, há mais uma interação na condição de controle que não pôde ser demonstrada (envolvendo o gene *OS9*). Esses resultados corroboram a *down*-regulação do gene *MARS* e podem explicar a diminuição da proliferação celular observada durante nosso ensaio *in vitro*.

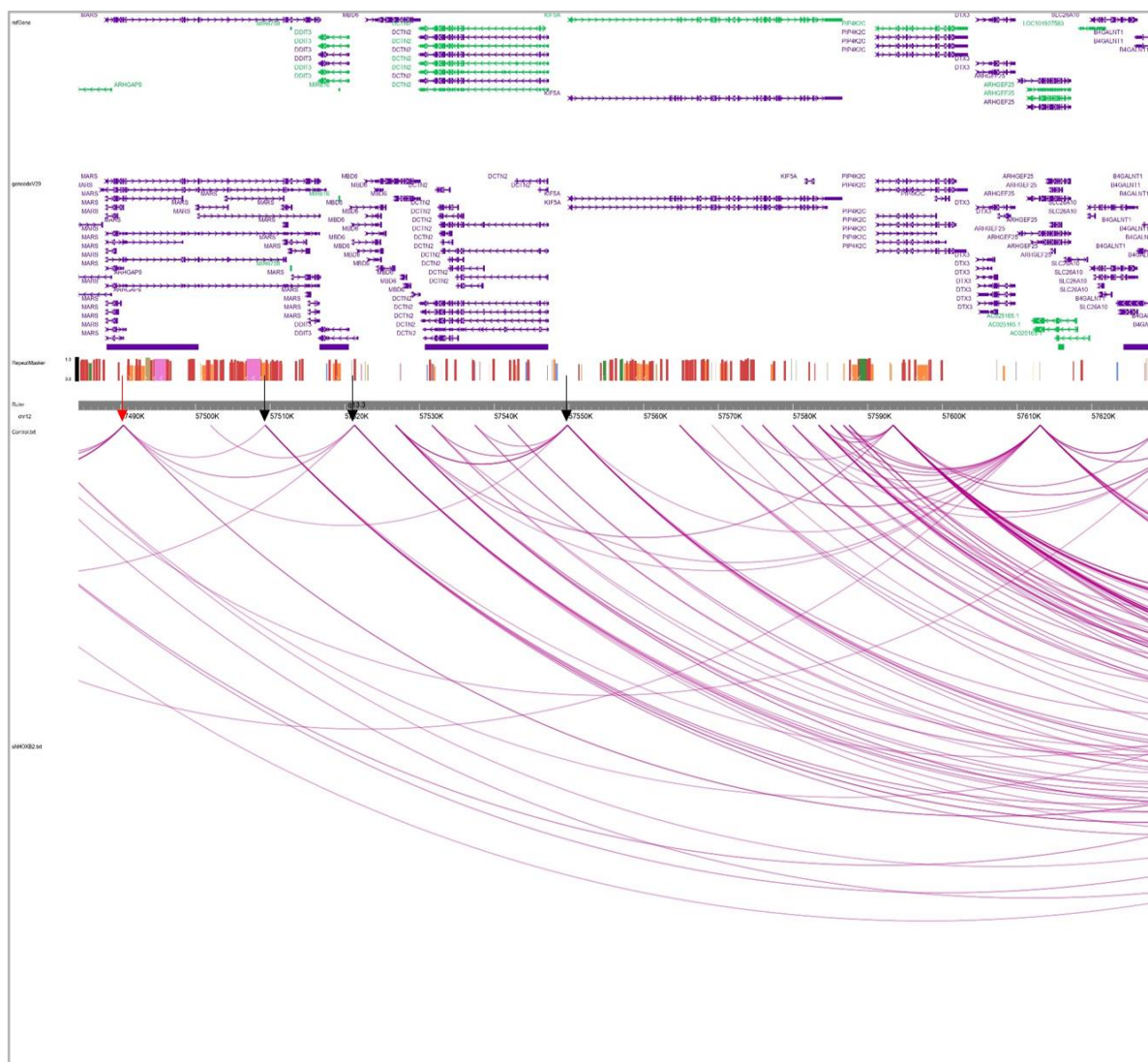


Figura 37. Interação única entre o promotor do gene *MARS* (seta vermelha) e elemento regulador no gene *MARS*, e três elementos reguladores no gene *DDIT3* e *KIF5A* (setas pretas), na condição *shHOXB2*.

Analisando a conformação tridimensional dos genes preditos *in silico* como alvos do gene *HOXB2*

Além de identificar as vias biológicas *up* e *down*-reguladas após o silenciamento de *HOXB2*, usamos nossos dados de RNA-seq para identificar os alvos do *HOXB2* (Item 4.7). Para realizar essa abordagem, usamos a contagem de abundância de transcritos como entrada para o pacote R CeTF (De Biagi et al., 2020). Esta abordagem permitiu a identificação de 42 alvos do gene *HOXB2* na linhagem U87, e destes, 16 apresentaram interações únicas após o silenciamento do *HOXB2* (*LMOD1*, *MAGED1*, *MAN1A2*, *NFE2L1*, *PSAP*, *RAB6B*, *VTI1B*, *SBF2*, *ANKRD13C*, *ASS1*, *ATCAY*, *CTSB*, *CACNA2D2*, *DPF3*, *F11R* e *NIPA1*). Selecionamos dois genes para ter uma visão mais próxima das interações únicas: *VTI1B* e *F11R*.

Gene *VTI1B*

O *VTI1B* é um gene que atua no transporte de vesículas, codificando a proteína de transporte de vesículas por meio da interação com t-SNAREs 1B. O transporte de vesículas é geralmente acentuado no câncer, principalmente através de vesículas extracelulares, que têm papéis cruciais no desenvolvimento e metástase (Xu et al., 2018). As vesículas extracelulares carregam moléculas como RNAs transferidos de células doadoras para células receptoras, promovendo mudanças fenotípicas nas células receptoras (Xu et al., 2018). Curiosamente, o *VTI1B* é *down*-regulado em nossos dados após o silenciamento de *HOXB2* e é previsto como alvo direto do *HOXB2*. Assim, podemos supor que o *HOXB2* atua em células de GBM promovendo a melhoria do transporte de vesículas por meio da *up*-regulação de genes como *VTI1B*, o que poderia ser explicado pelas quatro interações únicas entre esse gene e elementos regulatórios (no controle condição) nos genes *PLEHH1*, *PIGH*, *ARG2* e *RDH11* (Figura 38).



Figura 38. Interação única entre o promotor do gene *VTI1B* (seta vermelha) e elemento regulador nos genes *PLEHH1*, *PIGH*, *ARG2* e *RDH11* (setas pretas), na condição *shHOXB2*.

Gene *F11R*

O gene *F11R* codifica a molécula de adesão juncional A (JAM-A), promovendo a formação de junções herméticas, adesão de leucócitos e transdução de sinal. Chapouly e parceiros (2018) mostraram que os astrócitos podem regular positivamente o JAM-A em lesões inflamatórias em um modelo de esclerose múltipla, o que pode promover a migração de leucócitos durante a inflamação do SNC. Considerando esse fenótipo, é possível sugerir que a *down*-regulação do gene *F11R* no glioblastoma inibe a migração de leucócitos e, auxiliando para o bloqueio da resposta imune contra o tumor. Curiosamente, o gene *F11R* é *up*-regulado após o silenciamento de *HOXB2*, e isso pode ser explicado pelas as novas quatro interações únicas (Figura 39). Essas interações, na ausência do gene *HOXB2* devem envolver outro fator de transcrição, e seria viável assumir que esse fator de transcrição é um

alvo de *HOXB2*. Assim, o silenciamento de *HOXB2* poderia promover indiretamente a *up*-regulação de um fator de transcrição que também tem como alvo o gene *F11R*.

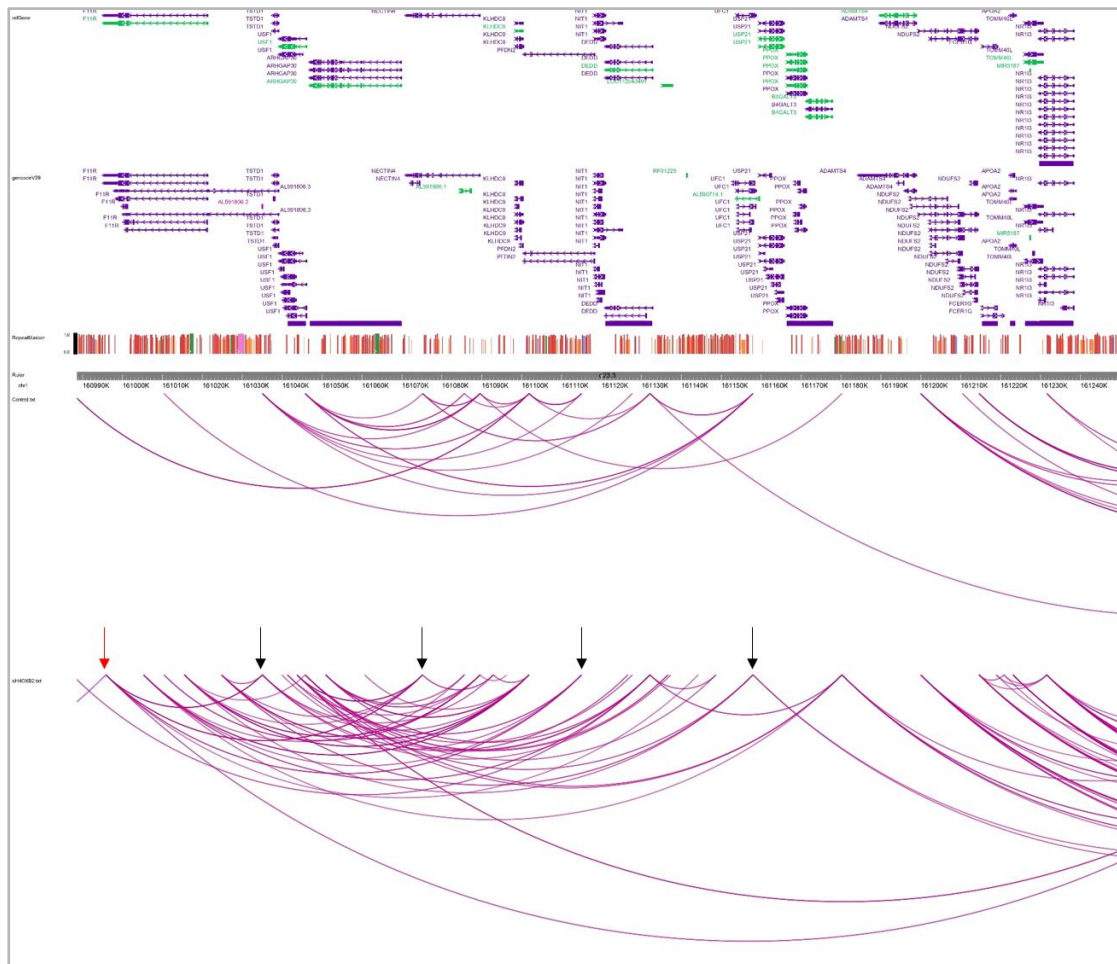


Figura 39. Interação única entre o promotor do gene *F11R* (seta vermelha) e elemento regulatório no gene *F11R*, e elementos regulatórios nos genes *NECTIN4*, *PFDN2* e *UFC1* (setas pretas), na condição *shHOXB2*.

4.6. Identificação dos alvos diretos do gene *HOXB2* em linhagens de glioblastoma

Para a conclusão desse objetivo, realizamos o protocolo de imunoprecipitação da cromatina, conforme protocolo descrito no tópico 3.13. Nesse contexto, partindo de um número inicial de 3,3 milhões de células por condição das linhagens ACBRI 371, U343 e U87, executamos as seguintes etapas: Cross-linking e lise celular, fragmentação do DNA por sonicação, imunoprecipitação dos complexos proteína/DNA, Eluição dos complexos proteína/DNA e reversão dos cross-links, purificação do DNA, quantificação do DNA e qPCR.

Para a etapa de fragmentação do DNA, realizamos a sonicação com amplitude de 25% e pulsos de 30 segundos, com 30 segundos de pausa entre cada pulso. Para as linhagens ACBRI-371 e U87, 12 pulsos foram suficientes para fragmentar o DNA

na faixa necessária (Entre 150 e 600 pb), enquanto na linhagem U343 foram necessários 20 pulsos. A Figura 40A mostra a fragmentação da cromatina nas três linhagens, após emprego de 12 pulsos, enquanto a Figura 40B mostra o DNA da linhagem U343, após 20 pulsos.

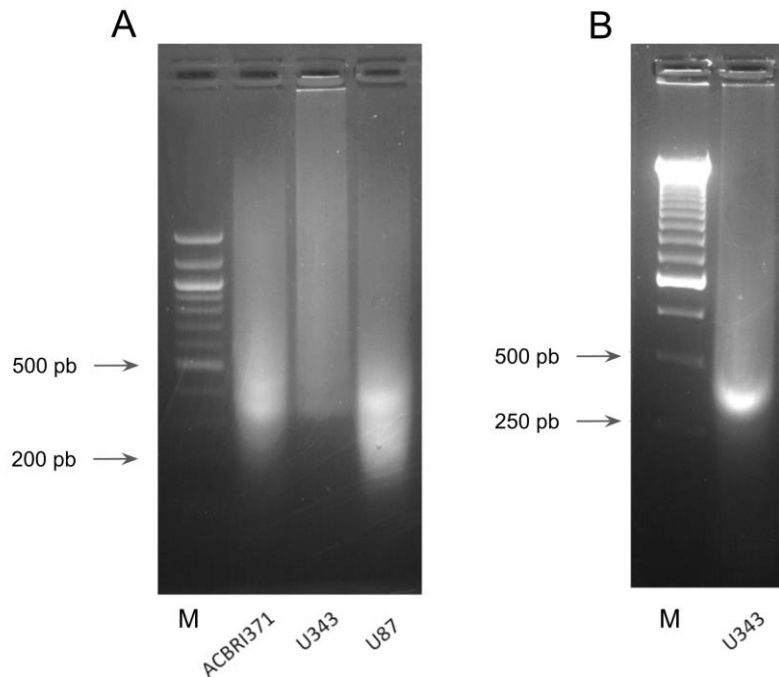


Figura 40. **Fragmentação mecânica da cromatina nas linhagens ACBRI 371, U343 e U87.** A. Amostras submetidas a 12 pulsos. B. Amostra submetida a 20 pulsos.

Todas as etapas subsequentes do protocolo foram realizadas nas linhagens U343 e U87. Devido a limitação de reagentes e anticorpo, não foi possível concluir o protocolo com o material da linhagem ACBRI 371. A tabela 5 mostra a quantificação de DNA, das amostras input e *HOXB2*, nas linhagens U343 e U87. Utilizamos o equipamento Qubit (Thermo Fisher).

Tabela 5. Concentração do DNA das amostras input e imunoprecipitadas com anti-*HOXB2*. Volume total de 15ul.

Amostra	Concentração ng/ul)
U343 input	1,20
U343 <i>HOXB2</i>	0,981
U87 input	0,450
U87 <i>HOXB2</i>	1,04

As amostras obtidas apresentam concentração adequada para o sequenciamento em larga escala, uma vez que é necessário pelo menos 5ng de DNA. Além da avaliação da concentração do DNA das amostras, é importante analisar se os fragmentos de DNA imunoprecipitados e do input possuem tamanho adequado para sequenciamento. Para tanto, realizamos a análise no *Bioanalyzer System*, utilizando o Kit e chip *Bioanalyzer High Sensitivity DNA*. Os resultados podem ser visualizados na Figura 41.

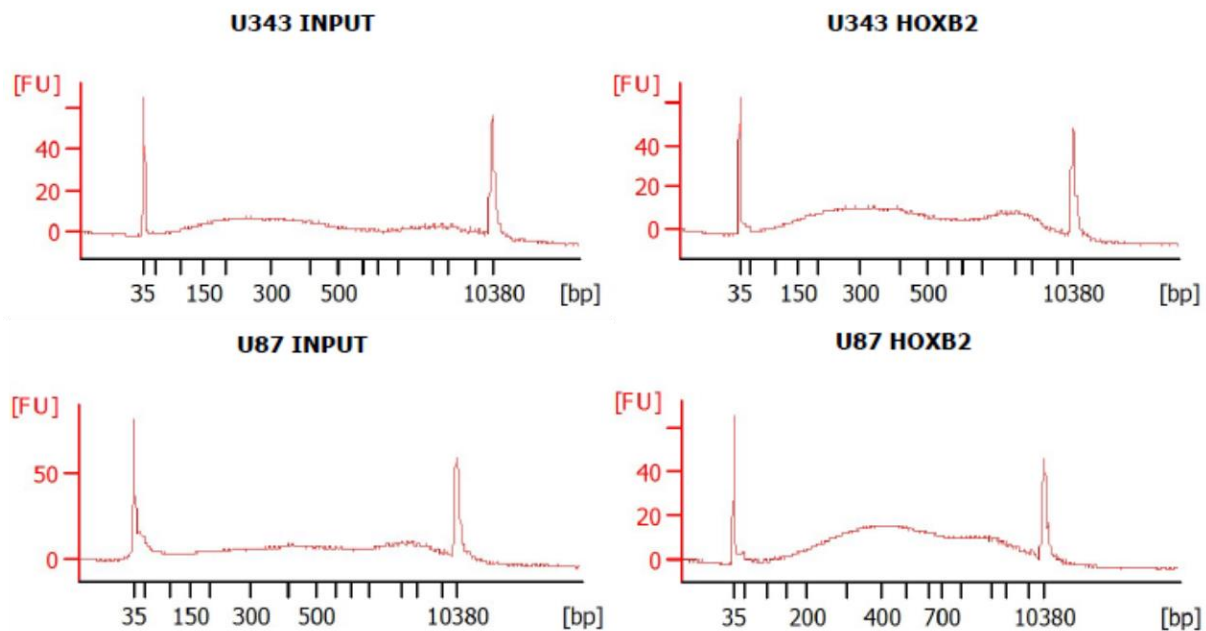


Figura 41. **Eletróferograma das amostras input e imunoprecipitadas com o anti-*HOXB2***. Eixo x: tamanho dos fragmentos em pares de base. Eixo y: Height Threshold.

Segundo os resultados obtidos, os fragmentos de DNA apresentam comprimento variável, partindo de 150 a 10 mil pares de bases. Nas amostras U343 Input, U343 *HOXB2* e U87 *HOXB2*, há uma concentração acentuada em torno de 200-500 pares de bases, tamanho ideal para sequenciamento. Na amostra U87 Input, a concentração é relativamente constante entre o tamanho de 300 a milhares de pares de bases. Em todas as amostras, o ideal seria obter um pico mais acentuado em torno de 200-500 pares de bases, o que geraria um sequenciamento de melhor qualidade. No entanto, acreditamos que o sequenciamento das nossas amostras já produzirá dados suficientemente relevantes, considerando-se os dados que já possuímos do RNA-seq e PChI-C. Atualmente estamos na etapa de sequenciamento das amostras.

4.7. Predição *in silico* dos alvos do gene *HOXB2*

Paralelamente às análises de ChiP, realizamos uma abordagem de bioinformática desenvolvida por um membro do nosso grupo, que visa identificar as vias gênicas potencialmente reguladas pelo *HOXB2* com base em seus alvos (Biagi et al, 2021), usando como entrada dados de expressão gênica. A abordagem inclui a análise de dois algoritmos do pacote CeTF, o RIF (Reverter et al., 2010), que identifica os fatores de transcrição com maior probabilidade de regular as vias gênicas relevantes no sistema biológico em estudo; e o PCIT (Reverter & Chan, 2008), que identifica correlações significativas em uma rede gênica ponderada. A Figura 42 traz a análise do enriquecimento das vias significativamente reguladas pelos alvos (Tabela 5) do *HOXB2*. Interessantemente, nós demonstramos em nosso ensaio de viabilidade celular (Item 3) que o silenciamento do *HOXB2* promove aumento significativo da taxa de apoptose em linhagens de GBM, o que pode ser explicado pela atuação dos seus alvos. Ainda, observamos a regulação do processamento de proteínas, via importante no contexto da proliferação tumoral, bem como a atuação desses genes no câncer de mama. De forma geral, as vias enriquecidas identificadas pelo pacote CeTF estão em consonância com as vias reguladas pelos genes diferencialmente expressos identificados pelo uso do pacote R/Bioconductor *clusterProfiler*, o que reforça a importância do *HOXB2* na progressão do GBM.

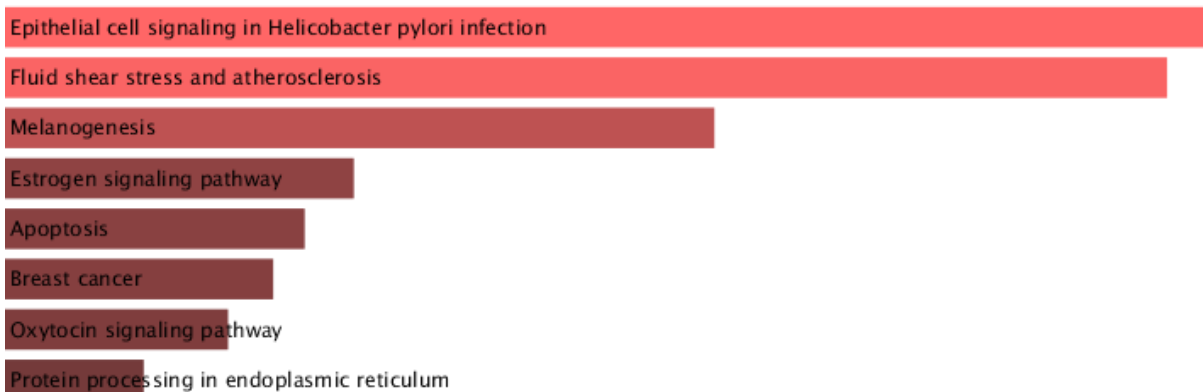


Figura 42. **Vias significativamente reguladas pelos alvos do *HOXB2***. Identificação realizada pelo pacote R CeTF. $p < 0,05$. A análise de enriquecimento foi realizada na plataforma Enrich R.

A tabela 6 traz os 100 alvos do *HOXB2* identificados pelo pacote R CeTF nas linhagens de glioblastoma U343 e U87. A lista inclui 19 lncRNA (em verde), 5 pseudogenes (em azul) e 76 genes codificantes (em preto). Os lncRNAs pertencem a classe de RNAs não codificantes, que possuem comprimento acima de 200 nucleotídeos e são importantes reguladores da expressão gênica a nível transcricional e pós-transcricional (Quinn & Chang, 2016). Diversos estudos têm descrito a atuação dos lncRNAs no câncer, inclusive em glioblastoma, em que, por exemplo, o lncRNA *HOTAIR* é importante para a progressão tumoral e quimiorresistência (Yuan et al, 2020). Avaliando o perfil de expressão dos lncRNAs alvos do gene *HOXB2* em nossos dados de RNA-seq, o *KIRREL-AS2* é o único que está *up*-regulado em condições com *HOXB2* silenciado em ambas as linhagens de GBM. Ainda não há estudos na literatura identificando o papel do *KIRREL-AS2* no desenvolvimento tumoral. Para tentar identificar as possíveis funções canônicas do *KIRREL-AS2*, usamos a plataforma FuncPred, que realiza a predição da função de lncRNAs a partir da inferência de coexpressão de lncRNAs com RNAs codificadores. O resultado desta análise não revelou associações que possam estar envolvidas diretamente na tumorigênese. As principais associações estavam relacionadas com o processo reprodutivo, tais como espermatogênese, fertilização, geração de gametas masculinos, motilidade dos espermatozoides, diferenciação das espermátides e meiose.

Tabela 6. Alvos do gene *HOXB2*, preditos *in silico*.

Gene				
<i>IL16</i>	<i>PGPEP1</i>	<i>AC034223.1</i>	<i>CNIH2</i>	<i>NIPA1</i>
<i>JUN</i>	<i>PNMA2</i>	<i>AC087752.4</i>	<i>CSP2</i>	<i>OR2I1P</i>
<i>KCTD4</i>	<i>PSAP</i>	<i>AC104532.2</i>	<i>CSPG4P11</i>	<i>PCA3</i>
<i>KIAA1755</i>	<i>RAB6B</i>	<i>ADCY2</i>	<i>CTRB2</i>	<i>PDZD2</i>
<i>KIF1B</i>	<i>RAPGEFL1</i>	<i>AKR1B1</i>	<i>CTSB</i>	<i>PGD</i>
<i>KIRREL3-AS2</i>	<i>RPL12P14</i>	<i>AL157786.1</i>	<i>DBT</i>	<i>ZNF546</i>
<i>L3MBTL2</i>	<i>RPL35P2</i>	<i>AL390816.1</i>	<i>DDIT3</i>	<i>ZNF549</i>
<i>LIMK2</i>	<i>RPS11</i>	<i>AL390816.2</i>	<i>DPF3</i>	<i>ZNF710</i>
<i>LINC01764</i>	<i>SBF2</i>	<i>AL391427.1</i>	<i>EGILA</i>	<i>ZNF814</i>
<i>LINC02352</i>	<i>SND1</i>	<i>ALG1L9P</i>	<i>CTD-2033D15.1</i>	<i>AC022034.4</i>
<i>LMF1</i>	<i>SUPT20H</i>	<i>ANKRD13C</i>	<i>ESR2</i>	<i>BAZ2B</i>
<i>LMOD1</i>	<i>TCF7</i>	<i>AP000662.1</i>	<i>F11R</i>	<i>CACNA2D2</i>
<i>LOC101928053</i>	<i>TMEM51-AS1</i>	<i>AP000769.2</i>	<i>FASN</i>	<i>CAMTA2</i>
<i>MAGED1</i>	<i>TSC22D2</i>	<i>AP001468.1</i>	<i>FBXO44</i>	<i>CCNI2</i>
<i>MAN1A2</i>	<i>TTC3</i>	<i>ARHGEF2-AS2</i>	<i>FDFT1</i>	<i>CDCP1</i>
<i>MMP24OS</i>	<i>TXN2</i>	<i>ARL3</i>	<i>FHOD3</i>	<i>HBP1</i>
<i>MYBL1</i>	<i>TYRP1</i>	<i>ASS1</i>	<i>FLG</i>	<i>HDDC2</i>
<i>MYCBP</i>	<i>VT11B</i>	<i>ATCAY</i>	<i>GIT1</i>	<i>HMGB2</i>
<i>NFE2L1</i>	<i>ZNF233</i>	<i>ATP13A2</i>	<i>GPR75</i>	<i>HNRNPUL1</i>
<i>NFE2L2</i>	<i>ZNF506</i>	<i>BAIAP2-DT</i>	<i>GRK2</i>	<i>HOXA2</i>

Em preto, azul e verde estão identificados, respectivamente: Genes; pseudogenes e lncRNA.

Buscamos avaliar também as funções dos genes codificantes preditos como alvos do *HOXB2*. A Tabela 7 mostra os genes codificantes que são diferencialmente expressos na condição *shHOXB2* (em relação ao controle) nas linhagens U343 e U87, mas não diferencialmente expressos na linhagem de astrócito (não alvos do *HOXB2* em astrócito). No total foram identificados 10 genes, em que quatro deles foram mais relevantes e serão discutidos individualmente a seguir.

Tabela 7. Alvos do gene *HOXB2*, preditos *in silico*, diferencialmente expressos na condição *shHOXB2* nas linhagens de GBM.

Gene	<i>shHOXB2</i> - U343	<i>shHOXB2</i> - U87
<i>LMF1</i>		
<i>PGPEP1</i>		
<i>PNMA2</i>		
<i>RAPGEFL1</i>		
<i>SBF2</i>		
<i>AKR1B1</i>		
<i>ANKRD13C</i>		
<i>DBT</i>		
<i>FASN</i>		
<i>FHOD3</i>		

Em vermelho estão identificados os genes *up*-regulados, e em azul os *down*-regulados.

Gene *FASN*

Um dos genes mais interessantes identificado como alvo do *HOXB2* em glioblastoma é o *FASN*, que codifica a enzima ácido graxo sintase. Esta enzima promove a síntese de ácidos graxos de cadeia longa a partir de acetil-CoA e a malonil-CoA, sendo peça chave no processo de lipogênese. Em células tumorais, altamente proliferativas, ácidos graxos são sintetizados *de novo* a fim de fornecer os lipídios necessários para a formação das membranas celulares e produção de energia através da β -oxidação (Flavin et al., 2010). Nesse sentido, o gene *FASN* é encontrado como *up*-regulado em diversos tipos tumorais (Flavin et al., 2010). Interessantemente, em nossos dados (Tabela 6), o gene *FASN* torna-se *down*-regulado com o silenciamento do gene *HOXB2*. Isso indica que a *up*-regulação do *HOXB2* em glioblastoma pode atuar indiretamente na *up*-regulação do gene *FASN*, que funciona como um oncogene através da produção de energia e incremento da proliferação celular.

Gene *PGPEP1*

Além do incremento da lipogênese em glioblastoma, os demais alvos do *HOXB2* mostram-se envolvidos em outras vias metabólicas e de sinalização celular. O gene *PGPEP1*, por exemplo, é responsável pela síntese de uma peptidase, categoria de enzimas cuja expressão pode ser encontrada como alterada em tumores (Perez et al., 2015). Alguns estudos têm demonstrado que as peptidases exercem papel fundamental na proliferação celular, invasão e angiogênese através da regulação da degradação da matriz extracelular e sinalização celular (Carl-McGrath et al., 2006, Wickström et al., 2011). Em nossas linhagens de GBM, o silenciamento do *HOXB2* desencadeia a *down*-regulação do gene *PGPEP1* (Tabela 2).

Gene *PNMA2*

O gene *PNMA2* compõe a família gênica *PNMA*, que está associada ao desenvolvimento de uma desordem paraneoplásica caracterizada por neurodegeneração, produção de auto-anticorpos e oncogênese (Maverakis, 2012). Segundo Lee e colaboradores (2016), em linhagem de tumor de mama, o gene *PNMA2* encontra-se regulado e promove o escape da apoptose e a quimiorresistência. Nesse sentido, é possível que, em nossas linhagens, a *down*-regulação do *PNMA2* causada pelo silenciamento do *HOXB2* esteja atrelada à indução da apoptose visualizada em nosso ensaio funcional *in vitro*.

Gene *ARK1B1*

O gene *AKR1B1* codifica uma enzima que promove a redução de aldeídos em álcoois, sendo frequentemente *up*-regulado em tumores, inclusive glioblastoma (Petrash e Laffin, 2012). Em nossas linhagens, o silenciamento do *HOXB2* leva à *down*-regulação deste gene, o que pode acarretar, por exemplo, na perda ou diminuição das suas funções. Segundo estudo realizado com linhagem tumoral de mama, a superexpressão do gene *AKR1B1* promove o incremento da migração celular, invasão e tumorigenicidade. É possível que em GBM o gene *AKR1B1* desempenhe funções semelhantes. A Figura 43 esquematiza os possíveis papéis dos genes *FASN*, *PGPEP1*, *PNMA2* e *ARK1B1* na tumorigênese.

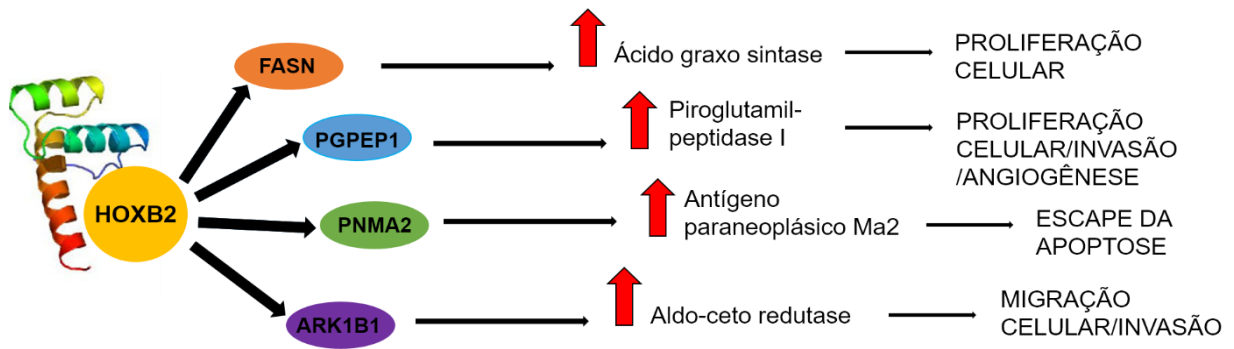


Figura 43. Representação esquemática dos possíveis papéis na tumorigênese de quatro genes preditos como alvos diretos do gene *HOXB2* em glioblastoma. Descrição baseada em informações retiradas da literatura.

A utilização do pacote R CeTF também permite visualizar as redes gênicas e como elas podem ser reguladas de acordo com um dado tratamento. A Figura 44 mostra a organização das redes gênicas nas linhagens de GBM (U343 e U87), nas condições de controle (à esquerda) e *shHOXB2* (à direita). Os pontos verdes representam genes (codificantes ou não codificantes) e os vermelhos, os genes que codificam fatores de transcrição (*Transcription factors* – TFs) (Figura 4). É nítido o impacto do silenciamento do gene *HOXB2* no número de interações numa rede gênica. Observa-se uma drástica diminuição nas interações gênicas e uma significativa redução no número de genes e fatores de transcrição. Na condição *shHOXB2* o empobrecimento das vias é tão drástico que temos um mesmo gene estabelecendo conexões com os demais envolvidos. Esses resultados mostram a influência do gene *HOXB2* na organização da rede gênica através da regulação de seus alvos diretos e indiretos.

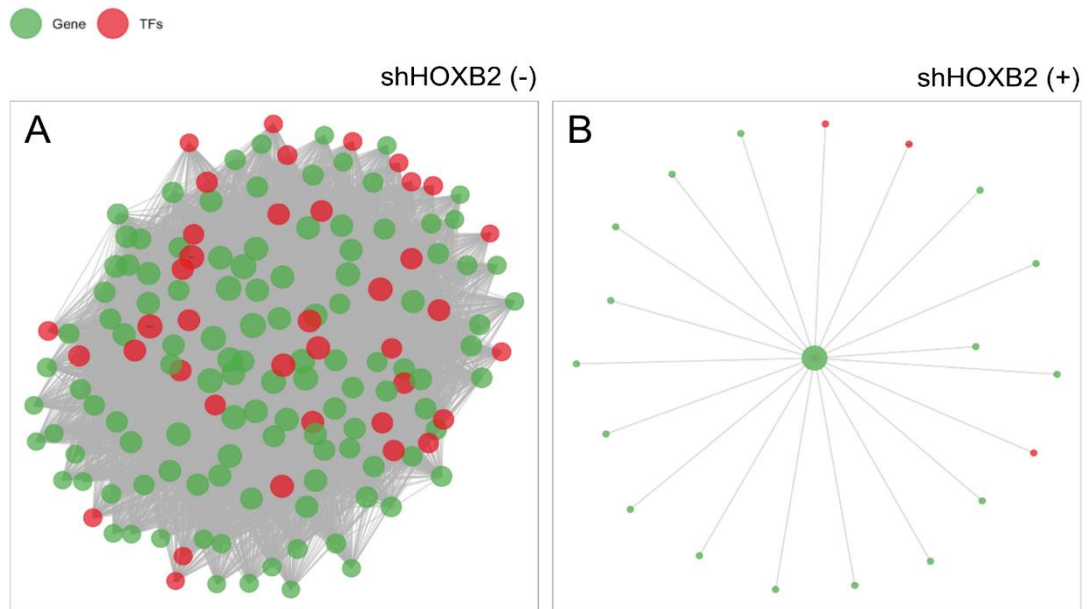


Figura 44. **Organização da rede gênica das linhagens de glioblastoma nas condições controle (à esquerda) e *shHOXB2* (à direita).** Pontos verdes representam genes (codificantes e não codificantes), e os vermelhos fatores de transcrição. Gráfico gerado pelo pacote R CeTF

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Conforme apresentado neste trabalho, o projeto revelou inúmeros resultados relevantes quanto ao papel do gene *HOXB2* no glioblastoma. Utilizando a metodologia de silenciamento por *short hairpin* RNA e ensaios *in vitro*, nós demonstramos que nas linhagens de GBM o gene *HOXB2* atua promovendo a proliferação celular/clonogenia, escape da apoptose/senescência e progressão do ciclo celular, processos vitais no contexto tumoral. A execução do RNA-seq nas amostras silenciadas para o *HOXB2* permitiu a compreensão do grande impacto que esse gene tem sobre o perfil geral de transcrição, bem como o entendimento dos resultados obtidos nos ensaios funcionais. Foram identificados diversos genes diferencialmente expressos e várias vias biológicas nos quais esses genes estão envolvidos, principalmente vias envolvidas no metabolismo celular (respiração celular e síntese de lipídios, proteínas e carboidratos), reparo de DNA, controle do ciclo celular/apoptose e resposta ao estresse oxidativo. Análises adicionais do RNA-seq permitiram, ainda, a elucidação *in silico* de potenciais alvos do *HOXB2*, cuja identificação dos alvos diretos poderá ser identificada pelo sequenciamento do material de ChiP. Por fim, a execução da técnica *Promoter Capture Hi-C*, realizada durante o estágio no exterior, permitiu compreender a organização do genoma na linhagem U87 (GBM) frente às interações do *HOXB2* em promotores e *enhancers*.

Em síntese, acreditamos que o nosso trabalho, utilizando metodologias variadas, incluindo ensaios *in vitro* e de NGS, produziu informações originais avançando no conhecimento do papel dos genes *HOX* na tumorigênese, em especial o do *HOXB2* em glioblastoma. Ainda, identificamos diversos alvos do *HOXB2* que podem ser explorados em estudos posteriores, visando a identificação de possíveis alvos terapêuticos.

6. CONCLUSÕES

As principais conclusões do presente estudo são:

1. A expressão elevada do gene *HOXB2* em glioblastoma promove a proliferação celular, escape da apoptose/senescência celular e progressão do ciclo celular, mecanismos que são vitais para a progressão tumoral. Esses fenótipos são resultado da atuação dos alvos diretos e indiretos do *HOXB2* sobre diversas vias biológicas, tais como reparo de danos ao DNA e metabolismo energético.
2. O gene *HOXB2* pode regular a expressão gênica de seus alvos através da organização tridimensional de interações entre regiões promotoras e *enhancers* de diversos genes.
3. Considerando que todos os resultados são originais, o presente estudo trouxe à luz algumas pistas de como o gene *HOXB2* pode atuar na regulação de processos biológicos críticos no curso da tumorigênese do glioblastoma. Além disso, conseguimos elencar um conjunto de alvos diretos e indiretos do *HOXB2* que poderão servir de alvos terapêuticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alami, Y. et al. *HOXC5* and *HOXC8* Expression Are Selectively Turned on in Human Cervical Cancer Cells Compared to Normal Keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 257, p. 738–745, 1999.

Angelucci, C & Sica, G. Multifaceted Functional Role of Semaphorins in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, v.20, 2144; doi:10.3390/ijms20092144. 2019.

American Brain Association. Disponível em <<http://www.abta.org/brain-tumor-information/types-of-tumors/glioblastoma.html?referrer=https://www.google.com.br>>. Acesso em: 16 de agosto de 2017.

Battlekar, S. et al. *HOX* genes and their role in the development of human cancers. *J Mol Med*, v. 92, p. 811-823, 2014.

Belton, J et al. Hi-C: A comprehensive technique to capture the conformation of genomes. *Methods*, v.58, p.268-276, 2012.

Boimel, P. et al. A functional in vivo screen for regulators of tumor progression identifies *HOXB2* as a regulator of tumor growth in breast cancer. *Genomics*, v. 98, p. 164-172, 2011.

Brennan, C. W., Verhaak, R. G., McKenna, A., Campos, B., Nounshmehr, H., Salama, S. R., et al. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462–477. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.034

Bridges, C.B. & Morgan, TH. The third-chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster*. The Lord Baltimore Press, 1923.

Cai, LY. et al. Identification of PRTFDC1 silencing and aberrant promoter methylation of GPR150, ITGA8 and *HOXD11* in ovarian cancers. *Life Sci*, v. 80, p. 1458–1465, 2007.

Cairns, et al. CHiCAGO: robust detection of DNA looping interactions in Capture Hi-C data. *Genome Biology*, 17:127, 2016.

Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M et al. Ectopeptidases in tumor biology: A review. *Histol Histopathol*. 2006. 21:1339-1353.

Chen J. et al. Heterogeneity in premature senescence by oxidative stress correlates with differential DNA damage during the cell cycle. *DNA Repair*, v. 4, p. 1140–1148, 2005.

Chen, H. et al. *HOXA5* acts directly downstream of retinoic acid receptor beta and contributes to retinoic acid-induced apoptosis and growth inhibition. *Cancer Res*, v. 67, p. 8007–8013, 2007.

Chopra, V. S. & Misha, R. K. “Mir”acles in *HOX* gene regulation. *Bioessays*, v. 28, p. 445–448, 2006.

Currie, E et al. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metabolism*, v.8, p. 153-161, 2013.

Darda, F.H. 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, p. 806-811, 2014.

Davenne, M. et al. *HOXA2* and *HOXB2* Control Dorsoventral Patterns of Neuronal Development in the Rostral Hindbrain. *Neuron*, v. 22, p. 677-691, 1999.

De Biagi C, et al. CeTF: an R package to Coexpression for Transcription Factors using Regulatory Impact Factors (RIF) and Partial Correlation and Information (PCIT) analysis. *bioRxiv*. 2020.

Fattah, R.A. et al. Differential expression of *HOX* genes in neoplastic and non-neoplastic human astrocytes. *Journal of Pathology*, v. 209, p. 15-24, 2006.

Flavin R, Peluso S, Nguyen P, Loda M. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol*. 2010. 6(4):551-562. doi:10.2217/fon.10.11.

Franken, N.A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.*, v. 1, p. 2315-2319, 2006.

Furuta J. et al. Silencing of Peroxiredoxin 2 and aberrant methylation of 33 CpG islands in putative promoter regions in human malignant melanomas. *Cancer Res*, v.66, p. 6080–6086, 2006.

Gary, R & Kindell, S. Quantitative assay of senescence-associated β -galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Analytical Biochemistry*, v. 343, p. 329–334, 2005.

Gaspar, N. et al. MGMT-independent temozolomide resistance in pediatric glioblastoma cells associated with a PI3-kinase-mediated *HOX*/stem cell gene signature. *Cancer Res*, v. 70, p. 9243-9252, 2010.

Gonzalez-Herrera, A. et al. Increased Expression of *HOXB2* and *HOXB13* Proteins is Associated with HPV Infection and Cervical Cancer Progression. *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 16, p. 1349-1353. 2015.

Gu, Z.; Eils, R.; Schlesner, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, v. 32, n. 18, p. 2847-9, 2016.

Heiden, M et al. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, v. 22, n. 324, p. 1029-1033, 2009.

Hershko, A. Y. et al. Methylation of *HOXA5* and *HOXB5* and its relevance to expression during mouse development. *Gene* v. 302, p. 65–72, 2003.

Homma, T., Fukushima, T., Vaccarella, S., Yonekawa, Y., Patre, P. L. D., Franceschi, S., et al. (2006). Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 846–854. doi: 10.1097/01.jnen. 0000235118.75182.94

Hsu, P & Sabatini, D. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell*, v. 134, p. 703-707, 2008.

Hur, H. et al. Analysis of *HOX* Gene Expression Patterns in Human Breast Cancer. *Mol Biotechnol*, v. 56, p. 64-71, 2014.

Inamura, K. et al. *HOXB2*, an Adverse Prognostic Indicator for Stage I Lung Adenocarcinomas, Promotes Invasion by Transcriptional Regulation of Metastasis-related Genes in HOP-62 Non-small Cell Lung Cancer Cells. *Anticancer Research*, v. 28, p. 2121-2128, 2008.

Levine, M. & Hoey, T. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell*, v. 55, p. 537-540, 1988.

Li, B. et al. CD133 in brain tumor: the prognostic factor. *Oncotarget*, v. 8, p. 11144-11159, 2017.

Liao, W.T. et al. *HOXB7* as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression. *Clin Cancer Res*, v.11, p.3569–3578, 2011.

Lindblad, O. et al. The role of *HOXB2* and *HOXB3* in acute myeloid leukemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 467, p. 742-747, 2015.

Luo, Z et al. The Enigmatic *HOX* Genes: Can We Crack Their Code? *Cancers*, v.11, 2019.

Maconochie, M. et al. Cross-regulation in the mouse *HOXB* complex: the expression of *HOXB2* in rhombomere 4 is regulated by *HOXB1*. *Genes & Development*, v. 11, p.1885-1895, 1997.

Maeda, K. et al. Altered expressions of *HOX* genes in human cutaneous malignant melanoma. *Int. J. Cancer*, v. 114, p. 436–441, 2005.

Manley, N. et al. *HOXB2* and *HOXB4* Act Together to Specify Ventral Body Wall Formation. *Developmental Biology*, v. 237, p. 130-144, 2001.

Mao, Z. et al. Replicatively senescent cells are arrested in G1 and G2 phases. *Aging*, v. 4, no. 6, 2012.

Marusyk, A., and Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1805, 105–117. doi: 10.1016/j.bbcan. 2009.11.002.

McNeil, M et al. Nuclear actin regulates cell proliferation and migration via inhibition of SRF and TEAD. *Molecular Cell Research*, v. 1867, n. 7, 2020.

Mcginnis, W. et al. A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell*, v. 37, p. 403-408, 1994.

Mcginnis, W. & Lemons, D. Genomic Evolution of *HOX* gene clusters. *Science*, v.313, p.1918 – 1922, 2006.

Mendoza, M. et al. Immortalised breast epithelia survive prolonged DNA replication stress and return to cycle from a senescent-like state. *Cell Death and Disease*, 2014.

Miao, J. et al. *HOXB13* promotes ovarian cancer progression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 104, p. 17093–17098, 2007.

Miyamoto, K. et al. Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers. *Int J Cancer*, v. 116, p. 407–414, 2005.

Moon, S.N. et al. *HOXC6* is Deregulated in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Modulates Bcl-2 Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 287, p. 35678-35688, 2012.

Moore, C et al. Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown. *Methods Mol Biol*, v.629, p. 141-158, 2010.

Netto, G. et al. Angiogênese em Glioblastomas: Contribuições no Prognóstico e Terapêutica. Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. 2016.

Nowsheen, S & Yang, E.S. The intersection between DNA damage response and cell death pathways. *Experimental Oncology*, v. 34, p.243-254, 2012.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 19, 764–772. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002, 2013.

Petrash JM, Laffin B. Expression of the aldo-ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in human cancers. *Frontiers in Pharmacology*. 2012. doi: 10.3389/fphar.2012.00104.

Phillips, H. S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W. F., Soriano, R. H., Wu, T. D. et al. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9, 157–173. doi: 10.1016/j.ccr.2006.02.019.

Quinn J, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat. Rev. Genet.* 2016. 17, 47–62. doi: 10.1038/nrg.2015.10.

Raunch, T. et al. Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 104, p. 5527–5532, 2007.

Reverter A, Chan EKF. Combining partial correlation and an information theory approach to the reversed engineering of gene co-expression networks. *Bioinformatics*. 2008.24: 2491–2497. pmid:18784117.

Reverter A, Hudson NJ, Nagaraj SH, Pérez-Enciso M, Dalrymple BP. Regulatory impact factors: unraveling the transcriptional regulation of complex traits from expression data. *Bioinformatics*. 2010.26: 896–904. pmid:20144946.

Rinn, JL. et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human *HOX* loci by noncoding RNAs. *Cell*, v. 129, p. 1311–1323, 2007.

Robinson, M. D.; McCarthy, D. J.; Smyth, G. K. EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, v. 26, n. 1, p.139-40, 2010.

Sasaki, Y. et al. Coordinated expression of ncRNAs and *HOX* mRNAs in the human *HOXA* locus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 357, p. 724–730, 2007.

Shah, N. & Sukumar, S. The *HOX* genes and their roles in oncogenesis. *Nature*, v.10, p. 361- 371, 2010.

Schoenfelder, S. et al. Promoter Capture Hi-C: High-resolution, Genome-wide Profiling of Promoter Interactions. *Journal of Visualized Experiments*, v. 136, 2018.

Scott, M. P. et al. The molecular organization of the Antennapedia locus of *Drosophila*. *Cell*, v. 35, p. 763–776, 1983.

Segara, D. et al. Expression of *HOXB2*, a Retinoic Acid Signaling Target in Pancreatic Cancer and Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Clin Cancer Res*, v. 11, p. 3587-3596, 2005.

Sessa, L. et al. Noncoding RNA synthesis and loss of Polycomb group repression accompanies the colinear activation of the human *HOXA cluster*. *RNA*, v. 13, p. 223–239, 2007.

Szerlip, N., Pedraza, A., Chakravarty, D., Azim, M., McGuire, J., Fang, Y., et al. (2012). Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3041–3046. doi: 10.1073/pnas.1114033109.

Szopa, W., Burley, T. A., Kramer-Marek, G., and Kaspera, W. (2017). Diagnostic and therapeutic biomarkers in glioblastoma: current status and future perspectives. *Biomed. Res. Int.* 2017:8013575. doi: 10.1155/2017/8013575.

Tabuse, M. et al. Functional analysis of *HOXD9* in human gliomas and glioma cancer stem cells. *Mol Cancer*, v.10, 2011.

Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.

Vieille-Grosjean, I & Huber, P. Transcription Factor GATA-1 Regulates Human *HOXB2* Gene Expression in Erythroid Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 4544-4550, 1995.

Xu, R et al. Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v.15, p.617–638,2018.

Yu, G.; Wang, L.; Han, Y.; He, Q. “*clusterProfiler*: an R package for comparing biological themes among gene *clusters*.” *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 16(5), 284-287. doi: 10.1089/omi.2011.0118. 2012.

Yuan, Z. et al. Exosome-Mediated Transfer of Long Noncoding RNA HOTAIR Regulates Temozolomide Resistance by miR-519a-3p/RRM1 Axis in Glioblastoma.

Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals, v.00. doi: 10. 1089/cbr.2019.3499. 2020.

Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>. 2016.

Wickström M, Larsson R, Nygren P, et al. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci.* 2011. 102:501-508.

Wingett, S. et al. HiCUP: pipeline for mapping and processing Hi-C data. *F1000 Res*, v. 4, 2015.

Zakany, D. & Zakany, J. The role of *HOX* genes during vertebrate limb development. Elsevier, v.17, p. 359-366, 2007.

Zhai, Y. et al. Gene Expression Analysis of Preinvasive and Invasive Cervical Squamous Cell Carcinomas Identifies *HOXC10* as a Key Mediator of Invasion. *Cancer Res*, v.67, p. 10163-10172, 2007.

Zhang, P. et al. Current Opinion on Molecular Characterization for GBM Classification in Guiding Clinical Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v.7, doi: 10.3389/fmolb.2020.562798. 2020.

Zhang, Y et al. Mitoguardin Regulates Mitochondrial Fusion through MitoPLD and Is Required for Neuronal Homeostasis. *Molecular Cell*, v.7, p.111-124, 2016.

8. APÊNDICE

8.1. Protocolo experimental da técnica *Promoter Capture Hi-C (PCHi-C)*

1. Formaldehyde fixation

NOTE: Start with a minimum of 20 million of cells per experiment.

1. For both adherent and suspension cell lines, collect the cell pellet through centrifugation.
2. Resuspend the cells in 20ml of culture medium (10% FBS). Add 2,85ml of paraformaldehyde 16%. Put the tubes in a roller (10rpm) for 10 minutes at room temperature.
3. Add 1,15ml of Glycine 2,5M. Put the tubes in a roller (10rpm) for 5 minutes at room temperature.
4. Centrifuge the cells at 600 x g and 4°C for 6 minutes.
5. Remove supernatant and resuspend cells (wash) in 20ml of PBS (pH 7,4). Split the total volume in 2 tubes (10 million of cells each).
6. Centrifuge the cells at 600 x g and 4°C for 6 minutes.
7. Remove the supernatant. The cell pellet can be stored at -80° for several months.

2. Cell lysis

1. Split the 10 million of cells in two tubes, each one containing 5 million of cells (replicates).
2. Resuspend cell pellet in 10 mL of freshly-prepared ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 0.2% (vol/vol) Igepal CA-630, 10 mM NaCl, and one tablet protease inhibitor cocktail) and mix. Incubate on ice for 30 min, mix occasionally by inverting. Centrifuge the nuclei at 760 x g and 4 °C for 5 min and remove supernatant.
3. Re-suspend cell pellet in 1 mL of ice-cold 1.25x restriction buffer 2 and transfer into a 1.5 mL tube. Spin the nuclei at 760 x g and 4 °C for 5 min and remove supernatant.
4. Re-suspend cell pellet in 358µL of 1.25x restriction buffer 2 (NEB, B7002S).
5. Add 11 µL of 10% (wt/vol) SDS per aliquot and shake at 950 rpm for 30 min at 37 °C in a thermomixer. If cell clumps appear, dissociate by pipetting, avoiding bubbles.

6. Add 75 μL of 10% Triton X-100 (vol/vol) per aliquot and shake at 950 rpm and 37 °C for 15 min in a thermomixer. If cell clumps appear, dissociate by pipetting, avoiding bubbles.
7. Add 12 μL of 100 U/ μL *Hind*III 100 (1,200 units in total) (NEB, R0104T) per aliquot and incubate at 37 °C overnight (O/N) while shaking at 950 rpm in a thermomixer.
8. On the following morning, add 5 μL of 100 U/ μL *Hind*III (500 units in total) (NEB, R0104T) per aliquot and incubate at 37 °C for 2 h while shaking at 950 rpm in a thermomixer.

3. Biotinylation of Restriction Fragment Overhangs

1. Prepare biotinylation master mix (for 4 reactions, 2 samples):

10X buffer2 (NEB, B7002S)	24,5ul
PCR water	8,16ul
10mM dCTP (Invitrogen, 18253013)	6,25ul
10mM dGTP (Invitrogen, 18254011)	6,25ul
10mM dTTP (Invitrogen, 18255018)	6,25ul
Biotin-14-dATP (Invitrogen, 19524016)	61,2ul (Biotin-14-dATP) +92ul water
DNA polymerase I large Klenow (NEB, M0210S)	70,8ul

2. Add 61,3 μL of biotinylation master mix per aliquot, mix, and incubate at 37 °C for 1 h shaking at 700 rpm (thermomixer) for 15 s, every 60 s. After 1 h, place aliquots on ice.

4. In-nucleus Ligation

1. Prepare ligation master mix.

T4 DNA ligase buffer (NEB, B0202S)	408ul (40,8ul 10x buffer + 367,2ul PCR water)
BSA (NEB, B9000S)	40,8ul
PCR water	1403,5ul
T4 DNA ligase	102ul (NEB, M0202S)

	25ul T4 DNA ligase (Invitrogen, 15224090)
--	--

2. Add 494,8 μ L of ligation master mix per aliquot mix and incubate at room temperature for 4 h (slow rotation/8rpm).

5. Reversal crosslinking DNA

1. Pellet nuclei by centrifuge at 2500 x g for 5 minutes. Discard the supernatant.
2. Resuspend pellet in 300 μ l of 10mM Tris-HCl, pH8; 0.5M NaCl; 1% SDS solution. Add 50 μ l of 20mg/ml proteinase K (NEB, P8102) and incubate at 55°C for 30 minutes.
3. Increase temperature to 68°C and incubate overnight to reverse cross-links.

6. DNA extraction

1. Cool tube at room temperature.
2. Add 2X volumes of pure ethanol and 35 μ l of 35M Sodium Acetate, mix by inverting and incubate at -80°C for 15 minutes.
3. Centrifuge at max speed, 2°C for 15 minutes. Keep the tubes on ice after spinning and carefully remove the supernatant by pipetting.
4. Resuspend in 800 μ l of 70% ethanol. Centrifuge at max speed for 5 minutes.
5. Remove all supernatant and wash the pellet once more with 800 μ l of 70% ethanol.
6. Dissolve the pellet in 130 μ l of 1X Tris buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8) and incubate at 37°C for 15 minutes to fully dissolve the DNA.
7. Measure DNA concentration using Nano Drop.

7. DNA Shearing and Size Selection

1. To make the biotinylated DNA suitable for high-throughput sequencing using Illumina sequencers, shear to a size of 300-500bp using the following parameters:

Instrument: Covaris LE220 (Covaris, Woburn, MA)
Volume of Library: 130 μ l in a Covaris microTUBE
Fill Level: 10
Duty Cycle: 15
PIP: 500
Cycles/Burst: 200
Time: 58 seconds

2. Warm a bottle of AMPure XP beads (Beckman Coulter, A63881) to room temperature. To increase yield, AMPure XP beads can be concentrated by removing some of the clear solution before the beads are mixed for use in the next steps.
3. Add exactly 120 μ l (0.6X volumes) of beads to the reaction. Mix well by pipetting and incubate at room temperature for 5 minutes.
4. Separate on a magnet. Transfer the clear solution to a fresh tube, avoiding any beads. The supernatant will contain fragments shorter than 500bp.
5. Add exactly 30 μ l of fresh AMPure XP beads to the solution. Mix by pipetting and incubate at room temperature for 5 minutes.
6. Separate on a magnet and keep the beads. Fragments in the range of 300-500bp will be retained on the beads. Discard the supernatant containing degraded RNA and short DNA fragments.
7. Keeping the beads on the magnet, wash twice with 700 μ l of 70% ethanol without mixing.
8. Leave the beads on the magnet for 5 minutes to allow remaining ethanol to evaporate.
9. To elute DNA, add 300 μ l of 1X Tris buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8), gently mix by pipetting, incubate at room temperature for 5 minutes, separate on a magnet, and transfer the solution to a fresh 1.5ml tube.
10. Quantify DNA by Qubit dsDNA High Sensitivity Assay (Life Technologies, Q32854) and use Tape Station to check DNA size distribution.

8. Biotin Pull-Down and Preparation for Illumina Sequencing

NOTE: Perform all the following steps in low-bind tubes.

1. Prepare for biotin pull-down by washing 150 μ l of 10mg/ml Dynabeads MyOne Streptavidin T1 beads (Life technologies, 65602) with 400 μ l of 1X Tween Washing Buffer (1X TWB: 5mM Tris-HCl (pH 7.5); 0.5mM EDTA; 1M NaCl; 0.05% Tween 20). Separate on a magnet and discard the solution.
2. Resuspend the beads in 300 μ l of 2X Binding Buffer (2X BB: 10mM Tris-HCl (pH 7.5); 1mM EDTA; 2M NaCl) and add to the reaction. Incubate at room temperature for 15 minutes with rotation to bind biotinylated DNA to the streptavidin beads.

3. Separate on a magnet and discard the solution.
4. Wash the beads by adding 600µl of 1X TWB and transferring the mixture to a new tube. Heat the tubes on a Thermomixer at 55°C for 2 min with mixing. Reclaim the beads using a magnet. Discard supernatant.
5. Repeat wash.
6. Resuspend beads in 100ul 1X NEB T4 DNA ligase buffer (NEB, B0202) and transfer to a new tube. Reclaim beads and discard the buffer.
7. To repair ends of sheared DNA and remove biotin from unligated ends, resuspend beads in 103µl of master mix:

For one sample	For 4 samples
88 ul 1xNEB T4 ligase buffer	352ul
5ul 10 mM dNTP (Invitrogen, 18427013)	20ul
5ul 10U/ul T4 PNK (NEB, M0201S)	20ul
4ul 3U/ul T4 DNA polymerase I (NEB, M0203S)	16ul
1ul 5U/ul DNA polymerase I Large Klenow (NEB, M0210S)	4ul

8. Incubate at room temperature for 1 hour. Separate on a magnet and discard the solution.
9. Wash the beads by adding 600µl of 1X TWB and transferring the mixture to a new tube. Heat the tubes on a Thermomixer at 55°C for 1 min with mixing. Reclaim the beads using a magnet. Discard supernatant.
10. Repeat wash.
11. Resuspend beads in 100µl 1X NEBuffer 2 and transfer to a new tube. Reclaim beads and discard the buffer.
12. Resuspend beads in 100µl of dATP attachment master mix:

For one sample	For 4 samples
90ul 1x NEB2	360ul
5 ul 10mM dATP (Invitrogen, 18252015)	20ul
5 ul 5U/ul Klenow ex mius (NEB, M0212S)	20ul

13. Incubate at 37°C for 30 minutes. Separate on a magnet and discard the solution.
14. Wash the beads by adding 600µl of 1X TWB and transferring the mixture to a new tube. Heat the tubes on a Thermomixer at 55°C for 2 min with mixing. Reclaim the beads using a magnet. Discard supernatant.
15. Repeat wash.
16. Resuspend beads in 100µl 1X Quick ligation reaction buffer (NEB, B6058) and transfer to a new tube. Reclaim beads and discard the buffer.
17. Resuspend in 50µl of 1X NEB Quick ligation reaction buffer.
18. Add 2µl of NEB DNA Quick ligase (NEB, M2200). Add 3µl of an NEBNext Index primer for Illumina. Incubate at 25°C for 15 minutes. Add 3ul USER Enzyme and incubate at 37°C for 15 minutes (NEBNext, Multiplex Oligos for Illumina Kit, E7500S).
19. Incubate at room temperature for 15 minutes. Separate on a magnet and discard the solution.
20. Wash the beads by adding 600µl of 1X TWB and transferring the mixture to a new tube. Heat the tubes on a Thermomixer at 55°C for 2 min with mixing. Reclaim the beads using a magnet. Remove supernatant.
21. Repeat wash.
22. Resuspend beads in 100µl 1X NEB2 buffer and transfer to a new tube. Reclaim beads and discard the buffer.
23. Resuspend in 60µl of 1X NEB2 buffer.

9. Hi-C Library Amplification

1. Prepare PCR master mix for each sample: 30 µL of 5x Phusion buffer; 2 µL index primer; 2 µL of universal primer; 4,2 µL of dNTP mix (10 mM each); 1,8 µL of Phusion polymerase and 50 µL of H2ONEB (NEBNext, Multiplex Oligos for Illumina Kit, E7500S / NEB Phusion High-Fidelity PCR Kit, E0553L)
2. Mix PCR master mix with the beads (150 µL in total), divide in 3 aliquots of 50 µL, and amplify by PCR using the following conditions:

30s at 98 °C

7 cycles of: 10 s at 98 °C; 30 s at 65 °C; 30 s at 72 °C

7 min at 72 °C

3. Collect PCR reactions into a new tube, reclaim beads on the magnetic separation stand, and transfer supernatant into a new tube. (Freeze the beads at -20°C).
4. Purify the library DNA using SPRI beads.
 - 4.1. Mix SPRI beads, transfer 460 µL of beads in a new tube, and bring to RT for 15 min. Add 450 µL of SPRI beads to the PCR reactions (final volume 950 µL), incubate for 5 min at RT, and spin sample in a benchtop centrifuge for 2–3 s to collect sample.
 - 4.2. Open the lid, place the sample on the magnetic separation stand for 5 min, and remove supernatant.
 - 4.3. Keeping the beads on the magnetic separation stand, add 1 mL of 70% ethanol (vol/vol) to sample tube over an area clear of beads, leave for 30 s, and discard supernatant.
 - 4.4. Repeat step 15.4.3 twice more.
 - 4.5. Dry beads at 37 °C in a thermomixer (tube lid open) for no more than 5 min.
 - 4.6. Add 55 µL of 1x Tris buffer to the sample, mix, and incubate for 10 min at 37 °C, shaking at 950 rpm in a thermomixer.
 - 4.7. Spin sample in a benchtop centrifuge for 2–3 s, open the lid and place the tube on the magnetic separation stand for 5 min. Transfer clear supernatant into a new tube and discard beads.
 - 4.8. Quantify the concentration of the Hi-C library. After 7 rounds of PCR amplification, we routinely obtain 500–1,500 ng of Hi-C library.

10. Hybrid In-solution Capture

NOTE: Blocker and buffer (SHS1-4) solutions below are from the SureSelect Target Enrichment Box 1 (Agilent, 5190-8645).

1. Transfer 500 ng to 1 µg of Hi-C library into a new tube and evaporate sample on a vacuum Concentrator (45 °C; vacuum pressure: level 30.0, ramp 5) until dry.
2. Re-suspend evaporated Hi-C library by adding 3.6 µL of H₂O (molecular biology grade), 2.5 µL of blocker 1, 2.5 µL of blocker 2, and 0.6 µL of custom blocker.
3. Transfer sample into a well of a new PCR tube strip, close with a PCR cap strip and place on ice. Label as "D" (for Hi-C DNA).
4. Prepare the hybridization buffer: 12.5 µL of SHS1 buffer; 0.5 µL of SHS2 buffer; 5 µL of SHS3 buffer; 6.5 µL of SHS4 buffer.

5. Incubate at 65 °C for 5 min in a thermomixer. Transfer into a well of a new PCR tube strip, close with a PCR cap strip and keep at RT. Label as "H" (for hybridization buffer).
6. Into a well of a new PCR tube strip, mix 5 µL of 100 ng/µL biotinylated RNA probes (store at -80 °C and thaw on ice just before use) (Agilent, SureSelect XT Custom 3-5.9Mb, 5190-4831); 0.5 µL of SRNase B (RNase inhibitor) and 1.5 µL of H₂O (molecular biology grade).
7. Close the PCR tube strip with a PCR cap strip and place on ice. Label as "R" (for RNA).
8. Set up PCR machine using the following parameters: 5 min at 95 °C; 25 h at 65 °C; lid heated; 29 µL PCR reaction volume. NOTE: Proceed as quickly as possible during all procedures while the PCR machine is running in order to avoid sample evaporation.
9. Place the "D" PCR tube strip in the PCR machine, close the PCR machine lid, and start the PCR reaction. When the PCR program reaches 65 °C, open the PCR machine lid and place the "H" PCR tube strip in the PCR machine. Close the PCR machine lid and incubate for 3 min. Open the PCR machine lid, place the "R" PCR tube strip on the PCR machine, and close the PCR machine.
10. After 2 min, open the PCR machine lid and all PCR tube strips. Transfer 13 µL of well "H" into well "R", then all volume of well "D" into well "R". Pipet up and down 3 times to mix the reaction, close the PCR tube strip, remove the "H" and "D" PCR tube strips, and close PCR machine lid. Incubate the reaction at 65 °C for 18-24 h.

11. Isolation of Promoter Fragment-containing Ligation Products

NOTE: The following steps are recommended to be done with SureSelect Target Enrichment Kit ILM PE Full Adapter (Agilent, 931107).

1. Pre-warm 1.5 mL of wash buffer 2 per sample at 65 °C in advance.
2. Add 60 µL of streptavidin-coupled magnetic beads into a new tube, place on the magnetic separation stand for 1 min and remove supernatant.
3. Wash beads three times with 200 µL of 1x binding buffer. NOTE: For each wash step during the post-capture isolation of promoter-containing ligation products, re-suspend beads in the corresponding buffer, rotate for 3 min at RT and 15 rpm on a rotating wheel, softly spin the tube in a benchtop centrifuge for 2–3 s to collect sample, place the tube on the magnetic separation stand for 3 min, and remove supernatant.

4. Re-suspend beads in 200 μ L of 1x binding buffer. Open the PCR machine and the PCR tube strip (while the PCR program is still running) and transfer the hybridization reaction into the tube with the magnetic beads. Incubate at RT for 30 min on a rotating wheel at 3 rpm.
5. Reclaim beads on the magnetic separation stand and remove the clear supernatant. Re-suspend beads into 500 μ L of wash buffer 1, mix, and incubate for 10 min at 20 $^{\circ}$ C while shaking at 950 rpm in a thermomixer.
6. Reclaim beads on the magnetic separation stand for 3 min and remove the clear supernatant. Re-suspend beads into 500 μ L of wash buffer 2, mix and incubate 5 min at 65 $^{\circ}$ C while shaking at 950 rpm in a thermomixer. Repeat step 17.5 twice more.
7. Reclaim beads on the magnetic separation stand, remove the clear supernatant and re-suspend beads in 200 μ L of 1x restriction buffer 2. Reclaim beads on the magnetic separation stand, remove supernatant and re-suspend beads into 20 μ L of 1x restriction buffer 2.

12. PCHi-C Library Amplification

1. Prepare PCR master mix (for each sample): 50 μ L of 5x PCR buffer (Phusion buffer), 6ul universal primer, 6 μ L of index primer; 7 μ L of dNTP mix (10 mM each), 3 μ L of Phusion polymerase, and 159 μ L of H₂O.
2. Mix PCR master mix with the beads (251 μ L in total), divide in 5 aliquots of 50 μ L, and PCR-amplify using the following conditions:
30 s at 98 $^{\circ}$ C
5 cycles of: 10 s at 98 $^{\circ}$ C, 30 s at 65 $^{\circ}$ C, 30 s at 72 $^{\circ}$ C
7 min at 72 $^{\circ}$ C
3. Collect all PCR reactions in a new tube, reclaim the beads on the magnet, and transfer supernatant (251 μ L; contains PCHi-C library) in to a new tube.
4. Purify the PCHi-C library using SPRI beads (0.9x), following the steps described above under 9.4.
5. Quantify the concentration and the size of the PCHi-C library.

9. ANEXO

9.1. Parecer da Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto



Ribeirão Preto, 18 de dezembro de 2020

O projeto de pesquisa intitulado “Análise de vias gênicas reguladas pelo gene HOXB2 em Glioblastoma” em nome de **Natália Volgarine Scaraboto** orientada pelo **Dr. Wilson Araújo da Silva Junior** foi avaliado pela Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio) e pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO), recebendo o parecer **APROVADO** e registrado sob número de processo: **297/2019.003-02**.

Lembramos que deverá ser apresentado a CIBio, o relatório anual da pesquisa.

Simone Kashima Haddad
Presidente da CIBio
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

9.2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Ribeirão Preto, 22 de JULHO de 2019

Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Márcia Guimarães Villanova
MD. Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Do HCFMRP e da FMRP-USP



Senhora Coordenadora,

Eu, Natália Volgarine Scaraboto, mestranda do Programa de Pós-graduação do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), orientada pelo Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior (FMRP-USP), venho, por meio desta, solicitar a dispensa de análise do CEP do meu projeto de pesquisa, intitulado "Análise de vias gênicas reguladas pelo gene HOXB2 em Glioblastoma".

O projeto de pesquisa, cujo resumo segue em anexo, tem empregado como material de estudo linhagens celulares humanas, que foram adquiridas de empresas da área de biologia molecular. As linhagens celulares são amplamente utilizadas na pesquisa biológica e para tais não é requerido aprovação de comitê de ética. Esclareço que a natureza da solicitação de dispensa neste momento é exclusivamente devido às documentações exigidas pela FAEPA para a concessão de auxílio para participação em eventos.

Atenciosamente,

NATÁLIA VOLGARINE SCARABOTO

Não há necessidade de submissão ao
Comitê de Ética em Pesquisa:

Dra. Márcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
do HC e FMRP-USP
22/07/2019