

**RENATA BISI ALVES**

**EFEITO DA INIBIÇÃO DE TBX2 EM CARCINOMA DE CÉLULAS  
NÃO PEQUENAS DE PULMÃO CULTIVADAS EM MODELOS BI- E  
TRIDIMENSIONAIS**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Biologia de Sistemas do Instituto  
de Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências.**

**São Paulo**

**2021**

**RENATA BISI ALVES**

**EFEITO DA INIBIÇÃO DE TBX2 EM CARCINOMA DE CÉLULAS  
NÃO PEQUENAS DE PULMÃO CULTIVADAS EM MODELOS BI- E  
TRIDIMENSIONAIS**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Biologia de Sistemas do Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do Título  
de Mestre em Ciências.**

**Área de concentração: Biologia  
Celular, Tecidual e do  
Desenvolvimento.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gláucia Maria  
Machado-Santelli**

**Versão Original**

**São Paulo**

**2021**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Bisi-Alves, Renata

Efeito da inibição de TBX2 em carcinoma de células não pequenas de pulmão cultivadas em modelos bi- e tridimensionais / Renata Bisi-Alves; orientadora Gláucia Maria Machado-Santelli. -- São Paulo, 2021.

97 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Neoplasias. 2. Biologia Celular. 3. Biologia Molecular. 4. Fatores de Transcrição. 5. Processos Neoplásicos. I. Machado-Santelli, Gláucia Maria, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Renata Bisi Alves

Título da Dissertação/Tese: Efeito da inibição de TBX2 em carcinoma de células não pequenas de pulmão cultivadas em modelos bi- e tridimensionais.

Orientador(a): Gláucia Maria Machado-Santelli.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

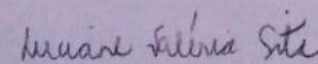


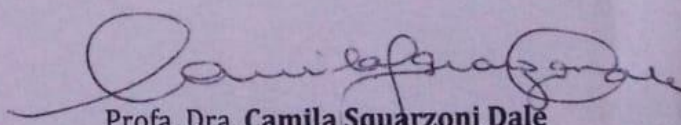
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000  
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **916/2017** referente ao projeto intitulado: ***"Efeito da inibição da expressão de Tbx2 em células não pequenas de carcinoma de pulmão cultivadas em modelo Bi- e tridimensionais"*** sob a responsabilidade de ***Renata Bisi Alves*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Gláucia Maria Machado-Santelli***, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 31 de outubro de 2017.

  
Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA ICB/USP

  
Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**  
Coordenadora CEPSH ICB/USP

Dedico este trabalho a meu pai, o qual sempre me incentivou a ser independente, tenaz e curiosa em relação ao autoconhecimento e à busca pela verdade, através de experiências autênticas. Te amo, meu Zé Colmeia!

## Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, por acreditarem em mim e por terem me apoiado sempre. Enfim, os agradeço por simplesmente serem meus pais! Amo vocês! E sou imensamente grata, pelo carinho, pelo apoio, pela fé posta em mim, mas, sobretudo, pelos erros e falhas, os quais não possuem valor mensurável, sendo de extrema importância. Obrigada, Paizão e obrigada, Chuchuquinha!

Agradeço aos meus amigos, Anali, Léo, Evelyne, Ingrid, Tatá, Bibi, e Marcelita por terem iluminado meus dias plúmbeos, apáticos e solitários. Em muitas ocasiões vocês fizeram uma grande diferença na minha vida, foram a literal “Luz no fim do túnel”! Em particular, Anali e Léo, vocês são a família que tive a sorte de encontrar! Vi amo, belli! Con tutto il mio cuore!

Agradeço à Prof por tudo! Você não tem ideia do respeito e admiração que tenho por você! Sou grata pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela inspiração, pela compreensão e sou grata pela pessoa que você é! Alguém com o pensamento crítico, humilde perante o conhecimento, sempre curiosa, inspirada e inspiradora, compreensível e, sobretudo, amiga! Ti voglio tanto bene!

Agradeço à Tania pelo carinho, ajuda e compreensão! Eu não teria conseguido sem teu apoio, preocupação e paciência. Você é uma pessoa maravilhosa e sou grata por ter te conhecido!

Agradeço aos meus colegas, Paula, Marcelo, Adam, Bruna, Julyane, Beatriz, Lívia e Letícia, vocês me ensinaram muito, tanto sobre ciência, quanto sobre mim mesma! Agradeço pelos desafios, críticas, inspirações, litígios, risadas, nossas “happy hours” com cerveja e tequila. Vocês adicionaram muito conhecimento na minha vida. Obrigada, pessoal!

## **Agradecimento Financeiro**

Um agradecimento especial aos órgãos de apoio, pois sem eles este projeto não poderia ter sido realizado: FAPESP e CAPES, em particular, à CNPq (processo nº 170171/2017-5). Muito obrigada.



“Onde quer que estejas,  
Cava profundamente;  
A teus pés está a nascente.  
Deixa os obscurantistas gritar:  
“Embaixo está sempre – o inferno!””  
Friedrich Nietzsche – A Gaia Ciência

## RESUMO

Bisi-Alves, Renata, Efeito da inibição de TBX2 em carcinoma de células não pequenas de pulmão cultivadas em modelos bi- e tridimensionais. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2021.

O fator de transcrição T-box2 (TBX2) é altamente expresso em tecidos fetais humanos pulmonares e possui um papel importante na organogênese dos pulmões. A superexpressão de TBX2 foi observada em diferentes tipos de câncer, promovendo proliferação, resistência a quimioterápicos, migração e invasão de células tumorais. O papel de TBX2 no câncer de pulmão, entretanto, ainda não é bem compreendido. Nesse estudo foi investigado o efeito do *knockdown* de TBX2 na proliferação, morfologia e formação de esferoides, da linhagem A549 de adenocarcinoma. O *knockdown* de TBX2 foi feito usando um plasmídeo de expressão shRNA alvo-específico. A proliferação das células com o *knockdown* e controles foi avaliada através dos ensaios de viabilidade celular, ciclo celular e índice mitótico. A formação de culturas 3D foi avaliada usando microscopia de luz, de contraste de fase, de fluorescência e eletrônica. Os resultados do ensaio de viabilidade celular, ciclo celular e índice mitótico não mostraram diferenças relevantes entre A549shTBX2 e os controles (A549 e A549shControl). Ocorreu um discreto aumento de células viáveis (2%), de células na fase S (5%) e do índice mitótico (3%) das células de A549shTBX2 em relação aos controles. Quanto à formação de esferoides, as micrografias de contraste de fase evidenciaram a incapacidade das células com *knockdown* de TBX2 de formar esferoides em relação aos controles, exibindo agregados celulares pouco compactos que se desagregaram já no 7º dia em cultura. Foi feito ensaio de ciclo celular dos esferoides que mostrou um aumento notável do percentual de células em SubG0 de A549shTBX2 (26,02%) em relação aos controles, A549 (4,69%) e A549shControl (6,41%), ocorrendo concomitantemente diminuição do percentual de células nas fases S, G1 e G2/M do ciclo. Esses resultados foram confirmados pelas imagens de microscopia eletrônica, as quais mostraram a presença de células apoptóticas, necroptóticas, completa ausência de interações intracelulares e células com estresse do retículo endoplasmático. Indicando que o *knockdown* de TBX2 diminui a resistência à anoikis, provavelmente à causa do aumento da expressão de E-caderina, cujo gene é um alvo de repressão transcricional bem conhecido de TBX2.

**Palavras-chave:** Esferoides. Anóikis. Câncer de pulmão. Estresse do retículo endoplasmático.

# ABSTRACT

Bisi-Alves, Renata, Effects of TBX2 inhibition in non-small cell lung carcinoma cultivated in bi- and tridimensional models. [Dissertation (Master Thesis in Tissue and Cellular Biology)]. São Paulo: Institute of Biomedical Science, São Paulo University; 2021.

T-box2 transcriptional factor (TBX2) is highly expressed in fetal lung tissue and has an important role in lung organogenesis. Overexpression of TBX2 was observed in different types of cancer, promoting proliferation, chemotherapy resistance, migration and invasion of tumor cells. However, the role of TBX2 in lung cancer is still unclear. In this study the effect of TBX2 negative regulation, in proliferation, morphology and spheroid formation, in A549 adenocarcinoma cells was investigated. The knockdown of TBX2 was obtained using a shRNA expression plasmid targeting TBX2 transcripts. Proliferation of knockdown cells and controls was evaluated through cellular viability, cell cycle and mitotic index assay. Spheroid formation was assessed by light, phase contrast, fluorescence and transmission electron microscopy. Cellular viability, cell cycle and mitotic index assay didn't show significant differences amongst A549shTBX2 and controls. A549shTBX2 cells presented a slight increase in viable cells (2%), cells in S phase (5%) and mitotic index (3%) compared to controls. Phase contrast images showed cell aggregates formation that did not display a condensed organization, and on the 7<sup>th</sup> day the aggregates dissociated completely. Cell cycle analysis of spheroids (controls) and aggregates revealed a substantial increase in SubG0 cell population (26.02%) in A549shTBX2 aggregates, compared to controls, A549 (4.69%) e A549shControl (6.41%), with decrease of S, G1, G2/M cell population. These results were confirmed by TEM images, that revealed apoptotic and necrotic cells, absence of intercellular interactions and cells with endoplasmic reticulum stress. Suggesting that knockdown of TBX2 decreased anoikis resistance in NSCLC cells, probably due to the increased E-cadherin expression, a well known TBX2 transcriptional repression target.

**Keywords:** Spheroids. Anoikis. Lung cancer. Endoplasmic reticulum stress.

# SUMÁRIO

<b>1 Introdução.....</b>	<b>13</b>
1.1 CARACTERIZAÇÃO DE TBX2.....	17
1.2 O PAPEL DE TBX2 NO CÂNCER DE PULMÃO.....	19
<b>2 Metodologia.....</b>	<b>21</b>
2.1 CULTURA DE CÉLULAS EM MONOCAMADA E ESFEROIDES.....	22
2.2 TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS ESTUDADAS.....	22
2.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE TBX2 NAS LINHAGENS ESTUDADAS.....	23
2.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	24
2.5 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DA MONOCAMADA E ESFEROIDES.....	25
2.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DOS ESFEROIDES.....	26
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
<b>3 Resultados.....</b>	<b>28</b>
3.1 CURVA DE CRESIMENTO DE A549 E LC-HK2.....	29
3.2 EXPRESSÃO PROTEICA DE TBX2 NAS LINHAGENS DE NSCLC.....	30
3.3 <i>KNOCKDOWN</i> DE TBX2 EM CÉLULAS DA LINHAGEM A549shTBX2.....	32
3.4 EFEITO DO <i>KNOCKDOWN</i> DE TBX2 NA VIABILIDADE CELULAR, CICLO CELULAR E ÍNDICE MITÓTICO.....	40
3.5 EFEITO DO <i>KNOCKDOWN</i> DE TBX2 NA MORFOLOGIA DE A549 EM MONOCAMADA.....	47
3.6 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DOS EFEROIDES DAS LINHAGENS A549 E LC-HK2.....	54

3.7 O KNOCKDOWN DE TBX2 INIBE A FORMAÇÃO DE ESFEROIDES.....	57
3.8 O KNOCKDOWN DE TBX2 PROMOVE ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E MORTE EM ESFEROIDES DE A549.....	71
<b>4 Discussão.....</b>	<b>82</b>
<b>5 Conclusão.....</b>	<b>88</b>
<b>Referências.....</b>	<b>90</b>

# 1 Introdução

O câncer de pulmão é o tipo de câncer com maior incidência e mortalidade no mundo, sendo que as estimativas para o ano de 2018 foram de 2,1 milhões de novos casos e 1,8 milhão de mortes (Bray et al., 2018). No Brasil a estimativa é de 17.760 novos casos de pulmão entre homens e 12.440 nas mulheres, ao ano, no triênio 2020-2022 (INCA, 2020). O prognóstico para o câncer de pulmão é muito desfavorável, com cerca de 10% de sobrevida em 5 anos na maioria dos países (Stewart e Wild, 2014). Os altos índices de letalidade do câncer de pulmão são em parte causados pelo diagnóstico tardio, o qual geralmente ocorre quando os pacientes já se encontram em estágio avançado da doença, apresentando metástases distantes e resistência à quimioterapia (IARC, 2014).

O câncer de pulmão, a algumas décadas atrás, podia ser classificado como carcinoma de células não pequenas de pulmão (*Non-Small Cell Lung Carcinoma*, NSCLC) ou como carcinoma de células pequenas de pulmão (*Small Cell Lung Cancer*, SCLC), sendo o carcinoma de células não pequenas de pulmão o subtipo mais frequente (80-85% dos casos) (Spence et al., 2017). Essa classificação era, em parte, devido às limitadas opções de tratamento.

Nos estádios iniciais (estadiamento I e II) a abordagem terapêutica mais utilizada para o tratamento de NSCLC é a ressecção cirúrgica, entretanto cerca de 60% dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão se encontram em um estágio avançado (estadiamento III e IV), cuja abordagem clássica consiste em quimio e radioterapia. Novas estratégias terapêuticas como o uso combinado de agentes a base de platina e/ou taxano, alvos moleculares ou imunoterapia já estão sendo adotadas e obtiveram bons resultados, aumentando a sobrevida dos pacientes tratados (Reck et al., 2013). Não obstante o melhoramento alcançado com novas estratégias terapêuticas, a resistência a certos quimioterápicos, a toxicidade de certos tratamentos e ausência de marcadores moleculares em uma porção dos pacientes com câncer ainda são fatores limitantes (Spence et al., 2017).

Em vários países o diagnóstico feito por meio de alterações gênicas (*EGFR*, *KRAS* e *BRAF*) e rearranjos gênicos (*ALK* e *ROS1*), seguido por terapias alvo-específicas já estão sendo adotados e usados nas diretrizes padrão no tratamento de câncer de pulmão, resultando no melhoramento do quadro clínico dos pacientes. Contudo, a taxa de sobrevivência continua sendo de 5 anos,

sendo menor que 20% e a descoberta de novos marcadores moleculares e potenciais alvos terapêuticos ajudaria a melhorar a eficácia das abordagens terapêuticas atualmente adotadas (Osmani et al., 2018; Pennel et al., 2019).

Os genes da família T-box codificam proteínas que regulam a expressão gênica em várias fases da embriogênese, participando na determinação do destino celular nas fases embrionárias iniciais, na organogênese de diferentes órgãos e na regulação do desenvolvimento de estruturas extraembrionárias (Naiche et al., 2005). A descoberta do primeiro gene da família T-box, o gene *Brachyury*, ou *T*, foi feita em um estudo que investigava camundongos portadores de uma mutação, cujo fenótipo heterozigoto manifestava uma cauda curta e o homozigoto causava letalidade embrionária (Showell et al., 2004).

Em humanos, a importância dos genes da família T-box no desenvolvimento pode ser observada através da manifestação de algumas síndromes. A síndrome ulnar-mamária, por exemplo, é causada por mutações no *TBX3* e seus portadores manifestam hipoplasia, nos membros superiores, nas mamas e genitais, anomalias dentárias, retardo no crescimento e da puberdade (em meninos). Mutações no gene *TBX5* são responsáveis pela síndrome de Holt-Oram, caracterizada por malformação de membros superiores e cardiopatia congênita. Por fim, a síndrome de DiGeorge é causada por deleções ou translocações do 22q11, onde está localizado o gene *TBX1*, e manifesta um conjunto de fenótipos diferentes que podem incluir fenda labial e palatina, anomalias cardíacas e imunológicas, hipoparatiroidismo, distúrbios de aprendizagem e esquizofrenia (Ghosh et al., 2017; Packham e Brook, 2003).

Os fatores de transcrição da família T-box são caracterizados por um domínio de ligação ao DNA, o domínio T-box, o qual se liga a uma sequência de nucleotídeos parcialmente palindrômica conhecida como elemento-T ou elemento de ligação T-box (Papaioannou, 2014). Análises filogenéticas indicam que a família de genes T-box é muito antiga e provavelmente surgiu em um ancestral comum dos metazoários e, após um evento de duplicação genômica no início da evolução dos vertebrados, ocorreu irradiação da família T-box ao longo das linhagens evolutivas individuais por meio de duplicações gênicas (Papaioannou, 2001). A família T-box é dividida em 5 subfamílias (T, Tbx1, Tbx2,



Tbx6 e Tbr1) e sua classificação é embasada na homologia do domínio T-box entre seus membros (Wilson e Conlon, 2002).

O fator de transcrição T-box 2 (TBX2) é membro da subfamília Tbx2 e durante o desenvolvimento participa no desenvolvimento de pulmões, coração, membros, glândulas mamárias e estruturas craniofaciais (Abrahams et al., 2010; Law et al., 1995). E, por meio da ativação ou repressão transcricional de seus genes alvos, TBX2 modula alguns processos necessários para o desenvolvimento, como diferenciação de células progenitoras, proliferação e migração celular. Além disso, medeia várias vias de sinalização celular, como BMP4, FGF2, Wnt/ $\beta$ -catenina e TGF- $\beta$ 1 (Cheng et al., 2008; Cho et al., 2006; Li et al., 2013; Li et al., 2014; Liu et al., 2013; Willmer et al., 2017).

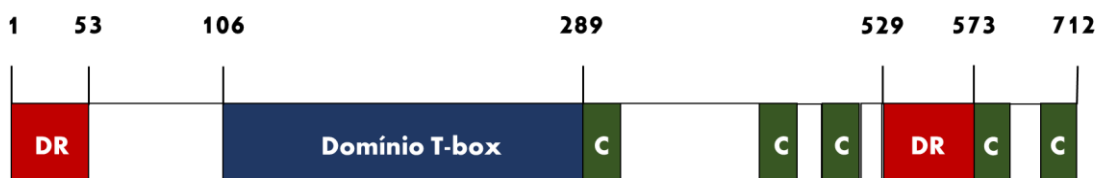
Além da significativa contribuição de TBX2 no desenvolvimento, nos últimos anos vários estudos têm relatado seu envolvimento no câncer. A superexpressão de TBX2 foi observada em melanoma (Vance et al., 2005), glioblastoma (Yi et al., 2017), rhabdomyosarcoma (Mohamad et al., 2018; Zhu et al., 2016), câncer de mama (Crawford et al., 2019; D'Costa et al., 2014; Redmond et al., 2010), próstata (Du et al., 2017), câncer gástrico (Liu et al., 2018), nasofaringe (Lv et al., 2017), laringe (Huang et al., 2014) e neuroblastoma (Decaestecker et al., 2018). O papel de TBX2 no câncer envolve vários aspectos importantes que caracterizam a oncogênese como, por exemplo, proliferação, migração, invasão, evasão da apoptose, senescência e anoikis e resistência a quimioterápicos (Lu et al., 2010; Wansleben et al., 2014). Isso ocorre mediante a repressão transcricional de supressores tumorais (D'Costa et al., 2014; Du et al., 2017; Redmond et al., 2010).

Não obstante muitos estudos tenham sido feitos demonstrando o papel de TBX2 em vários tipos de câncer, sua relevância no câncer de pulmão ainda não está clara. Os escassos estudos encontrados são bem contraditórios, mostrando que TBX2 atua ora na promoção ora na repressão do câncer de pulmão (Khalil et al., 2017; Nehme et al., 2019; Yu et al., 2020; Zhang e Guo, 2014). O presente estudo se propõe de investigar o efeito da modulação da expressão de TBX2 em linhagens de carcinoma de células não pequenas de pulmão avaliando alguns aspectos que caracterizam a biologia tumoral, como proliferação, morfologia e formação de esferoides.

## 1.1 CARACTERIZAÇÃO DE TBX2

O *TBX2* pertence à subfamília *Tbx2*, à qual pertencem também o *TBX3*, *TBX4* e *TBX5*. E, acredita-se que essa subfamília teve início a partir de um único gene primordial, o qual primeiro deu origem à dois grupos de genes por crossover desigual, *Tbx2/Tbx3* e *Tbx4/Tbx5*, que em seguida foram duplicados, resultando em quatro genes, *Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx4* e *Tbx5* (Agulnik et al., 1996). Os genes *TBX2* e *TBX3* são aqueles filogeneticamente mais próximos um do outro, apresentando homologia de 95% na região de ligação ao DNA, embora *TBX2* esteja localizado no cromossomo 17 (q23) junto com o *TBX4*, e o *TBX3* no 12 (q24) junto com *TBX5* (Law et al., 1995).

A região de ligação ao DNA, o domínio T-box, do *TBX2* está situada entre os aminoácidos 106 e 289, sendo que uma mutação no aminoácido 122 (Arg122Ala) causa a perda total da capacidade de ligação ao DNA (Sinha et al., 2000). E ao contrário da maioria dos membros da família T-box, o *TBX2* pode agir como um potente repressor transcricional. De fato, *TBX2* possui dois domínios de repressão da transcrição (*repression domains*, RD), um localizado na região amino-terminal, entre os aminoácidos 1 e 53, e o outro localizado na região carboxi-terminal, entre os aminoácidos 529 e 573 (Figura 1). Todavia, o domínio repressor localizado na região carboxi-terminal é considerado como aquele dominante, pois sua deleção causa uma drástica redução da repressão enquanto a deleção do RD amino-terminal causa uma redução menos acentuada (Paxton et al., 2002).



**Figura 1:** Representação esquemática da proteína *TBX2*. Em vermelho: Domínio Repressor (DR) localizada na região N-terminal, posição 1-53 e Domínio repressor localizado na região C-terminal da proteína, que se estende do aminoácido 529 ao 573. Em azul: Domínio de ligação ao DNA, T-box, que se estende do aminoácido 106 ao 289. Em verde: Regiões de aminoácidos conservadas em diferentes espécies (C), cuja função é desconhecida (Law et al, 1995; Paxton et al., 2002; Sinha et al., 2000).

Durante o desenvolvimento de camundongos *Tbx2* inibe a expressão de *Cdkn1a* (p21) e *Cdkn1b* (p27), dois inibidores de ciclinas dependentes de quinase (*Cyclin Dependent Kinase*, CDK), permitindo o crescimento e o desenvolvimento de pulmões. Em um estudo feito por Lüdtke e colaboradores (2013), camundongos com *Tbx2* nocauteado (*Tbx2*<sup>-/-</sup>) apresentaram pulmões hipoplásicos, exibindo ramificações reduzidas. E ainda, tanto no compartimento epitelial quanto no mesenquimal ocorreu uma drástica diminuição da proliferação celular e a diferenciação celular mesenquimal ocorreu prematuramente. Além disso, a expressão de p21 e p27 no mesênquima dos camundongos nocaute aumentou consideravelmente, enquanto a deleção de *Cdkn1a* e *Cdkn1b* fez com que a deficiência no crescimento e no desenvolvimento dos pulmões fosse abolida. Esses resultados demonstram que a função de repressor transcricional é extremamente importante no desenvolvimento. Em humanos, TBX2 está envolvido no desenvolvimento de vários tecidos e órgãos, como rins, membros, pulmões, glândulas mamárias, coração e estruturas craniofaciais, sendo expressos ainda em alguns tecidos adultos (Abrahams et al., 2010; Law et al., 1995).

Enquanto a expressão de *Tbx2* em camundongos inibe p21 e p27, permitindo o desenvolvimento dos pulmões, em mioblastos primários de camundongos a expressão de *Tbx2* é inicialmente elevada e diminui gradualmente conforme as células vão se diferenciando, sendo que a expressão ectópica de *Tbx2* em mioblastos de murino imortalizados inibiu a diferenciação através da regulação negativa de TNNI2, ACTA1 e p21 (Zhu et al., 2014).

Em melanócitos o fator de transcrição PAX3 (*Paired box homeotic gene 3*) exerce funções importantes no desenvolvimento e na maturação (pigmentação) por meio da modulação transcricional de diferentes genes. Em um estudo, realizado por Liu e colaboradores (2013) foi observado que TBX2 é positivamente regulado por PAX3 em melanócitos humanos primários, e ainda, que essa regulação ocorre por ligação direta de PAX3 ao promotor de *TBX2* (-781 a -777) que, além disso, pode ser induzida pelo fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2, *Fibroblast Growth Factor 2*) (Liu et al., 2014). Esses estudos indicam que o TBX2 está envolvido no desenvolvimento de vários

tecidos e que as vias de sinalização através das quais ele age podem variar dependendo do contexto celular.

## 1.2 O PAPEL DE TBX2 NO CÂNCER DE PULMÃO

Em alguns tipos de câncer, como melanoma e câncer de mama, o envolvimento de TBX2 na proliferação, resistência à quimioterápicos e formação de metástases foi extensivamente investigado tanto através de estudos correlacionais quanto estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* (Abrahams et al., 2007; Abrahams et al., 2010; Chang et al., 2016; Douglas, Papaioannu, 2013; Peres et al., 2010; Rowley, Grothey, Couch, 2004; Vance et al., 2005; Wang et al., 2017). E, o quadro delineado por essas investigações mostra que o fator de transcrição TBX2 contribui de forma crítica no câncer, através dos mesmos mecanismos regulatórios observados adotados durante a embriogênese (Papaioannu, 2014; Wilson, Conlon, 2002). Especificamente, repressão transcricional de inibidores do ciclo celular (Jacobs et al., 2000; Lingbeek et al., 2002; Vance et al., 2010), de genes envolvidos na diferenciação celular, integridade tecidual e transição epitélio-mesenquimal (Du et al., 2017; Liu et al., 2013; Mohamad et al., 2018; Nadana ey al., 2017; Zhu et al., 2014). E, embora existam variações nos mecanismos de regulação da expressão de TBX2 (amplificação gênica, TGF- $\beta$ , PKC), nos cofatores (Rb1, EGR1, PML-IV, HDAC1) e alvos transcricionais (PTEN, e-caderina, p14ARF, p21, p27, CST6), seu papel no câncer parece inequívoco (Abrahams et al., 2007; D'Costa et al., 2014; Douglas, Papaioannu, 2013; Jacobs et al., 2000; Li et al, 2014; Martin et al., 2012; Mohamad et al., 2018; Redmond et al., 2010; Sinclair et al., 2002; Teng et al., 2009; Vance et al., 2005; Vance et al., 2010; Zhu et al., 2014).

No câncer de pulmão o papel de TBX2 se apresenta ambíguo, não obstante sua contribuição no desenvolvimento dos pulmões esteja bem estabelecida (Fujino et al., 2017; Law et al., 1995; Li et al., 2004; Lüdtke et al., 2013; Lüdtke et al., 2016). Os primeiros, dos ainda poucos, estudos sobre o envolvimento de TBX2 no câncer de pulmão foram estudos correlacionais que

analisam a expressão de TBX2 (mRNA e proteínas) em amostras de tumores de pacientes acometidos por câncer de pulmão que atribuem a alta expressão de TBX2 um valor prognóstico negativo (Hu et al., 2014; Zhang, Guo, 2014).

Estudos mais recentes, não independentes, avaliaram a expressão de transcritos de TBX2 em amostras de tecidos normais de pulmão, através de análises *in silico* (GTEx (Genotype tissue expression) datasets), comparando-as com a expressão de TBX2, usando RNAseq, em amostras de lesões pré-malignas e de adenocarcinoma, concluindo que a baixa expressão de TBX2 possui um valor prognóstico negativo. Estudos *in vitro*, realizados pelo mesmo grupo de pesquisadores, avaliaram o efeito da expressão ectópica de TBX2 em linhagens de NSCLC nas quais TBX2 é epigeneticamente supresso, observando redução na proliferação e viabilidade celular (Khalil et al., 2017; Khalil et al., 2018; Nehme et al., 2019).

No último ano, Yu e colaboradores (2020) avaliaram o efeito do knockdown de TBX2 em linhagens celulares de NSCLC, observando diminuição da proliferação, invasão e migração e parada do ciclo celular. E, estudos *in silico* realizados no mesmo estudo, concluíram que a alta expressão gênica de TBX2 poderia ser usada como marcador prognóstico negativo em NSCLC, contradizendo completamente os resultados observados por Khalil e colaboradores (2018). Assim, muito ainda precisa ser investigado sobre o papel de TBX2 no câncer de pulmão, a fim de elucidar as contradições até agora reportadas, agregando conhecimento na busca de novas terapias.

## 2 Metodologia

## 2.1 CULTURA DE CÉLULAS EM MONOCAMADA E ESFEROIDES

As linhagens celulares A549 (carcinoma de células não pequenas de pulmão) e BEAS-2B (células epiteliais de brônquios humanos imortalizadas) foram obtidas pela ATCC (*American Type Culture Collection*), enquanto a linhagem LC-HK2 foi estabelecida no laboratório (BONALDO et al., 1991). As culturas em monocamada foram cultivadas em meio DMEM-F12, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Para a formação dos esferoides, as células foram cultivadas em placas com o fundo recoberto de agarose (1%) e mantidas nas condições das células em monocamada. A maioria dos experimentos com os esferoides foram feitos após 7 dias de cultura, com exceção da curva de crescimento e imunofluorescência, nos quais os esferoides foram mantidos em cultura por 14 dias. O inóculo inicial de células plaqueadas para a formação de esferoides em placas de 60mm foi de  $4 \times 10^5$  células/placa. Para formação de esferoides em placas de 96 poços foi utilizado um inóculo inicial de  $1 \times 10^4$  células/poço.

## 2.2 TRANSFECCÃO E SELEÇÃO DAS CÉLULAS TRANSFECTADAS

O knockdown de TBX2 nas linhagens A549 e LC-HK2, foi feito com o vetor de expressão shRNA, pSuper.neo/GFP (Oligoengine), contendo sequências alvo-específicas para os transcritos de TBX2. O controle expressa uma sequência de nucleotídeos não específica. Os plasmídeos foram fornecidos pela Dra. Sharon Prince do Departamento de Biologia Humana da Universidade de Cape Town (PERES et al., 2010). As células de A549 e LC-HK2 foram plaqueadas em placa de 35mm com uma densidade de  $3 \times 10^4$  e  $4 \times 10^4$  células/mL, respectivamente. Após 48 horas as células foram incubadas por 4 horas com meio Opti-MEM (Gibco) sem soro, contendo uma mistura de DNA

plasmidial (3-5 $\mu$ g) e Lipofectamina 2000 (Invitrogen®) na proporção de 1:3 (DNA:Lipofectamina). Após 48 horas as células transfectadas foram transferidas para placas de 60mm e foram tratadas por cerca de 10-12 dias com G418 (Sigma®) para seleção das células transfectadas. Os clones foram coletados com anel de clonagem.

## 2.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE TBX2 NAS LINHAGENS ESTUDADAS

A expressão proteica de TBX2 nas linhagens estudadas e nas células transfectadas foi avaliada por meio de Western Blot. As proteínas totais foram extraídas usando o tampão RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1,0%, ácido deoxicolato de sódio 0,5% em Tris 50 mM-HCl, pH=7,5), contendo uma mistura com inibidores de proteases e fosfatases (NaF e ortovanadato) (Sigma-Aldrich). As proteínas foram quantificadas com o método de BCA (Pierce Inc Rockford, IL, USA). A leitura da absorbância foi realizada por espectrofotômetro utilizando o filtro de 595 nm. Seguidamente, foram diluídas em tampão de amostra contendo 3% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 150 mM Tris pH 6.8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol e incubadas por 5 minutos a 95°C. Foram carregados 30  $\mu$ g de proteína por poço de um gel de poliacrilamida 12% (preparado com 1,5M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). A eletroforese foi feita seguindo o método SDS-PAGE. O padrão de peso molecular utilizado foi o Precision Plus Protein Kaleidoscope Bio-Rad. Após a separação, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Amersham Bioscience).

Após a transferência as membranas foram bloqueadas com 5% de leite em TBS-tween (TTBS) por 1 hora. As membranas foram incubadas por 16 horas a 4°C em agitação com os anticorpos, anti-TBX2 (*rabbit polyclonal*) da Proteintech (1:500) e anti- $\beta$ -actina (*mouse monoclonal*) Abcam (1:10000), usada para a normalização. As membranas foram então incubadas com os anticorpos secundários, *Goat Anti-Rabbit IgG* (HRP) e *Goat Anti-mouse IgG* (HRP), Abcam,



com diluição de 1:2000. As membranas foram reveladas por quimioluminescência com o kit Pierce ECL Plus, ThermoFisher, conforme as recomendações do fabricante. As bandas foram quantificadas usando o programa UN-SCAN-IT gel6.1.

## 2.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular das células com o knockdown de TBX2 e os controles foi avaliada usando *Trypan blue*. As células foram plaqueadas em placas de 35mm com um inóculo inicial de  $3 \times 10^4$  células ( $1,5 \times 10^4$  células/mL) e as células viáveis e não viáveis foram quantificadas no 4° e 6° dias de cultivo na câmara de Neubauer. O meio foi trocado a cada 2 dias. A quantificação foi feita em triplicatas e os experimentos foram repetidos 3 vezes.

A avaliação da distribuição das populações de células nas diferentes fases do Ciclo Celular foi feita por meio do ensaio de Ciclo Celular e determinação do índice mitótico. Para o ensaio de Ciclo Celular, as células foram plaqueadas em placas de 35mm com uma densidade inicial de  $3 \times 10^4$  células. No 4° dia de cultivo as células foram fixadas em metanol (75%) por 1 hora a 4°C e incubadas por 24 horas a 4°C em uma solução contendo iodeto de propídeo (30µg/mL) e RNAase (3mg/mL). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo Guava EasyCycle mini (Millipore Biosciences Tescicula, CA, Estados Unidos da América). A avaliação do Ciclo Celular dos esferoides foi feita no 7° dia de cultivo. Os esferoides foram tripsinizados por 10 min antes da fixação e coloração com iodeto de propídeo.

A determinação do índice mitótico foi feita com a marcação do núcleo e dos microfilamentos de actina como descrito na avaliação da morfologia. As células foram plaqueadas sobre lamínulas em placas de Petri de 35mm com uma densidade inicial de  $3 \times 10^4$  células e no 4° dia em cultura foram fixadas e marcadas. As células mitóticas (em prófase, anáfase, metáfase, telófase e citocinese) foram quantificadas com o auxílio do microscópio de fluorescência e

do programa ImageJ, contando-se um mínimo de 1000 células (interfásicas e mitóticas).

## 2.5 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DA MONOCAMADA E DOS ESFEROIDES

As células foram plaqueadas sobre lamínulas em placas de Petri de 35mm com um inóculo inicial de  $3 \times 10^4$  células e foram mantidas em cultura por 4 dias. As células foram então fixadas com uma solução de formaldeído (3,7%) e PBSA por 30 min. As células foram então lavadas 3x com tampão PBSA e permeabilizadas com Triton X-100 (0,5%) por 15min. Após a lavagem com PBSA, as células foram incubadas em câmara úmida, a temperatura ambiente, por 16 horas com os anticorpos primários, anti- $\alpha$ - e anti- $\beta$ -tubulina (*mouse*), *Cell Signaling*, com a diluição de 1:50. As células foram novamente lavadas e incubadas por 2 horas em câmara úmida e escura com anticorpo secundário (1:200), *Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555* (1:200), *Cell Signaling*. As células foram lavadas e incubadas por 15 minutos em câmara escura com DAPI (1 $\mu$ g/mL). Após a lavagem as lamínulas foram montadas sobre lâminas histológicas com 10 $\mu$ L de solução protetora de fluorescência (*anti-fading-Vectashield Burlingame, CA, Estados Unidos da América*). As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência *LionHeart FX Automated Microscope* (BioTek). Para a detecção dos microfilamentos de actina, as células foram incubadas por 2 horas em câmara escura e úmida com *Alexa Fluor<sup>TM</sup> 633 Phalloidin*, (1:50), ThermoFisher.

Para a imunomarcação dos esferoides, as células de A549, A549shControl e A549shTBX2 foram plaqueadas em placas de 60mm, nas condições descritas em culturas de células. Os esferoides foram mantidos em cultura por 7 e 14 dias, depois foram coletados das placas, lavados com PBSA e fixados por 1 hora sob agitação (45rpm) com solução de formaldeído (3,7%). Após 3 lavagens com PBSA, os esferoides foram permeabilizados com solução de Triton X-100 (0,5%) por 1 hora sob agitação (45rpm) e lavados. Em seguida, os esferoides foram incubados com os mesmos anticorpos primários da

monocamada, por 16 horas sob agitação a temperatura ambiente. Depois da lavagem, os esferoides foram incubados com o anticorpo secundário por 4 horas, sob agitação (45rpm) no escuro, e novamente lavados. Os esferoides foram então incubados por 30 min com DAPI (1µg/mL) sob agitação e novamente lavados. Os esferoides foram então transferidos para lâminas histológicas com 10µL de solução protetora e montados com lamínulas. A detecção dos microfilamentos de actina foi feita usando o mesmo reagente da monocamada, incubando os esferoides por 4 horas em ambiente escuro sob agitação.

## 2.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DOS ESFEROIDES

Os esferoides foram plaqueados em placas de Petri de 60mm e mantidos em cultura por 7 dias. Os esferoides foram então lavados com PBSA e fixados com a solução de glutaraldeído 2,5% com formaldeído 2% por 2 horas a temperatura ambiente. Após a fixação os esferoides foram submetidos a 3 banhos de 5 minutos em tampão cacodilato de sódio. Em seguida, foi feita a pós-fixação com uma solução de tetróxido de ósmio (1%) em tampão cacodilato de sódio. Os esferoides foram lavados em água destilada e seguiram para uma gradual desidratação etílica (50, 70, 80, 90 e 2 x 100% etanol).

Posteriormente, o material ficou imerso em óxido de propileno durante 10 minutos (2 banhos de 5 minutos), seguindo para um banho de uma mistura de resina mais óxido de propileno (1:1) por 5 horas. A mistura foi substituída por resina pura por mais 5 horas. A inclusão das células foi feita em formas de silicone preenchidas com a mesma resina, sendo esta polimerizada após 72 horas em estufa a 65 °C.

Após o desgaste dos blocos de resina, foram feitos cortes em ultramicrótomo com espessura de 7 µm, sendo estes montados em lâmina de vidro, corados com azul de toluidina e visualizados ao microscópio de luz. Uma vez escolhida a região de interesse no bloco, foram feitos cortes na espessura de 70 a 90 nm, sendo posteriormente colocados em telas de cobre (200 *mesh*).

O material foi contrastado em uma solução de acetato de uranila (4%), posteriormente lavados em água e colocados em uma solução de citrato de chumbo (10%). Após serem novamente lavados, as telas de cobre foram acondicionadas em um porta-telas e mantidas em ambiente resfriado. O material foi fotografado utilizando o microscópio eletrônico de transmissão Tecnai FEI G<sup>2</sup>20 (FEI Company™).

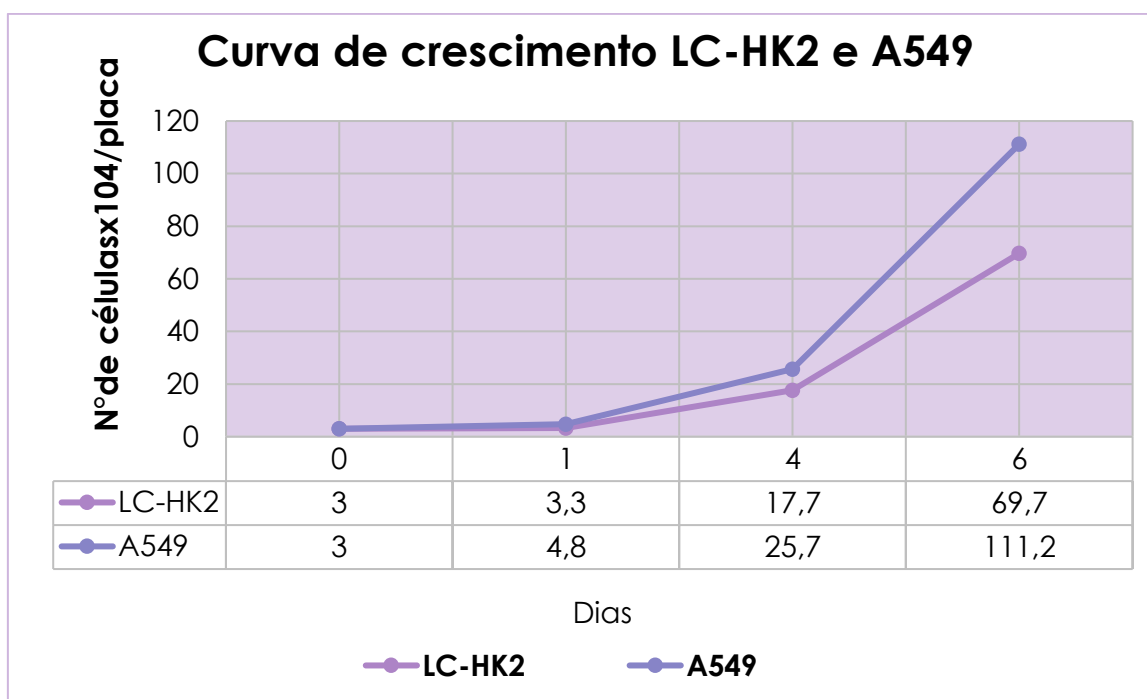
## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados obtidos foram efetuadas usando o programa Graphpad Prism 7. Os testes para determinar as diferenças entre os grupos amostrais transfectados e tratados e seus respectivos controles usados foram: *one-way* ANOVA, *two-way* ANOVA (*multiple comparisons by Tukey*) e Test t de Student. As diferenças entre os grupos amostrais foram consideradas significantes a  $p \leq 0,05$ .

# 3 Resultados

### 3.1 CURVA DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS A549 E LC-HK2

Foi feita a curva de crescimento das linhagens A549 e LC-HK2 (Figura 2) com o propósito de padronizar as condições de crescimento de ambas as linhagens celulares nos experimentos subsequentes. As células das duas linhagens foram plaqueadas em placas de Petri de 35mm com uma densidade inicial de  $3 \times 10^4$  células por placa e cultivadas nas condições descritas na metodologia, sendo que o meio de todas as placas foi trocado a cada dois dias. As células foram então tripsinizadas e quantificadas na câmara de Neubauer no 1°, 4° e 6° dias de cultivo em triplicatas. Os valores médios das triplicatas estão indicados no gráfico da figura 1. As células da linhagem A549 apresentaram maior proliferação do que as da linhagem LC-HK2, alcançando a fase log entre o 4° e o 6° dia. Por sua vez, as células da linhagem LC-HK2 apresentaram menor proliferação, indicando provavelmente a necessidade de uma concentração de células maior no inóculo inicial para promover o crescimento, isto é, maior dependência de interação célula-célula.

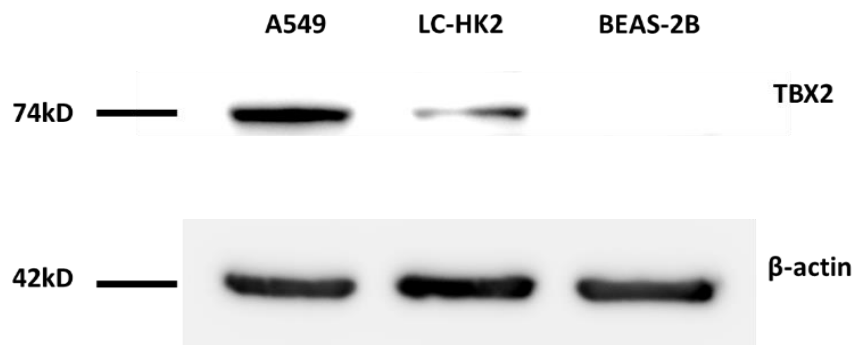


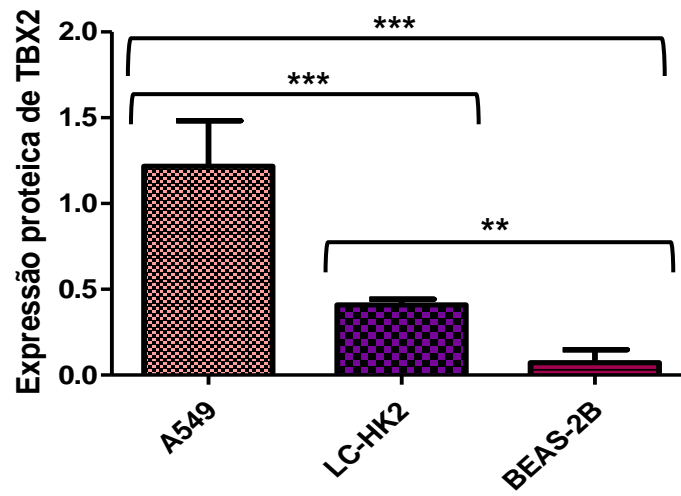
**Figura 2:** Gráfico das curvas de crescimento das linhagens A549 e LC-HK2 no 1°, 4° e 6° dia após o plaqueamento (dia 0) com uma densidade inicial de  $3 \times 10^4$  células por placa. Valores indicados no gráfico são as médias das triplicatas.

## 3.2 EXPRESSÃO PROTEICA DE TBX2 NAS CÉLULAS DAS LINHAGENS DE NSCLC

A expressão proteica de TBX2 nas linhagens de NSCLC, A549 e LC-HK2, e na linhagem de pulmão imortalizada e não tumoral BEAS-2B foi avaliada por Western Blot. A quantificação da expressão proteica de TBX2 foi feita usando o software UN-SCAN-IT(gel 6.1), sendo que a expressão da  $\beta$ -actina de cada linhagem foi usada para a normalização. O Western Blot foi repetido três vezes de forma independente. As células da linhagem A549 apresentaram os maiores níveis de expressão proteica de TBX2, duas vezes maior que LC-HK2. As células da linhagem não tumoral, BEAS-2B, apresentaram os menores níveis de expressão de TBX2 (Figuras 3A e 3B). A análise estatística da variância (*One way ANOVA*) mostrou diferença significativa entre A549 e LC-HK2 ( $p < 0,0001$ ) e A549 e BEAS-2B ( $p < 0,0001$ ). Além disso, foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os níveis de expressão de LC-HK2 e BEAS-2B (Figura 3A e 3B).

**A**



**B**

**Figura 3:** A: Expressão proteica de TBX2 nas linhagens A549, LC-HK2 e BEAS-2B. A  $\beta$ -actina foi usada como controle para a normalização. B: Expressão proteica de TBX2 nas linhagens A549, LC-HK2 e BEAS-2B. Os valores apresentados no gráfico são as médias das triplicatas. Barras acima das colunas representam o desvio padrão. \*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,05$ .

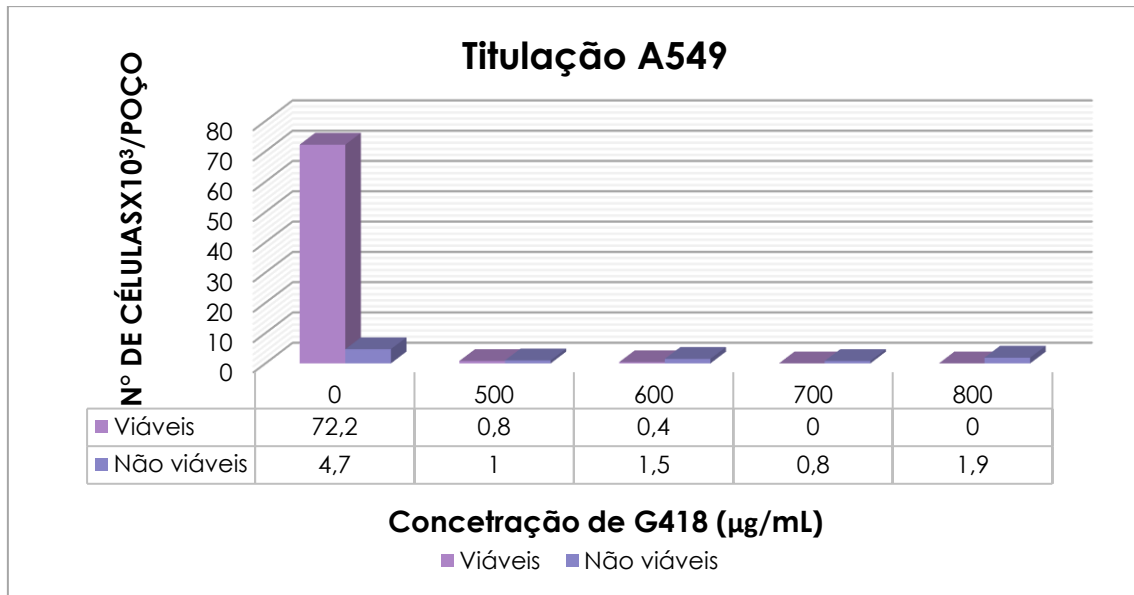


### 3.3 KNOCKDOWN DE TBX2 EM CÉLULAS DA LINHAGEM A549

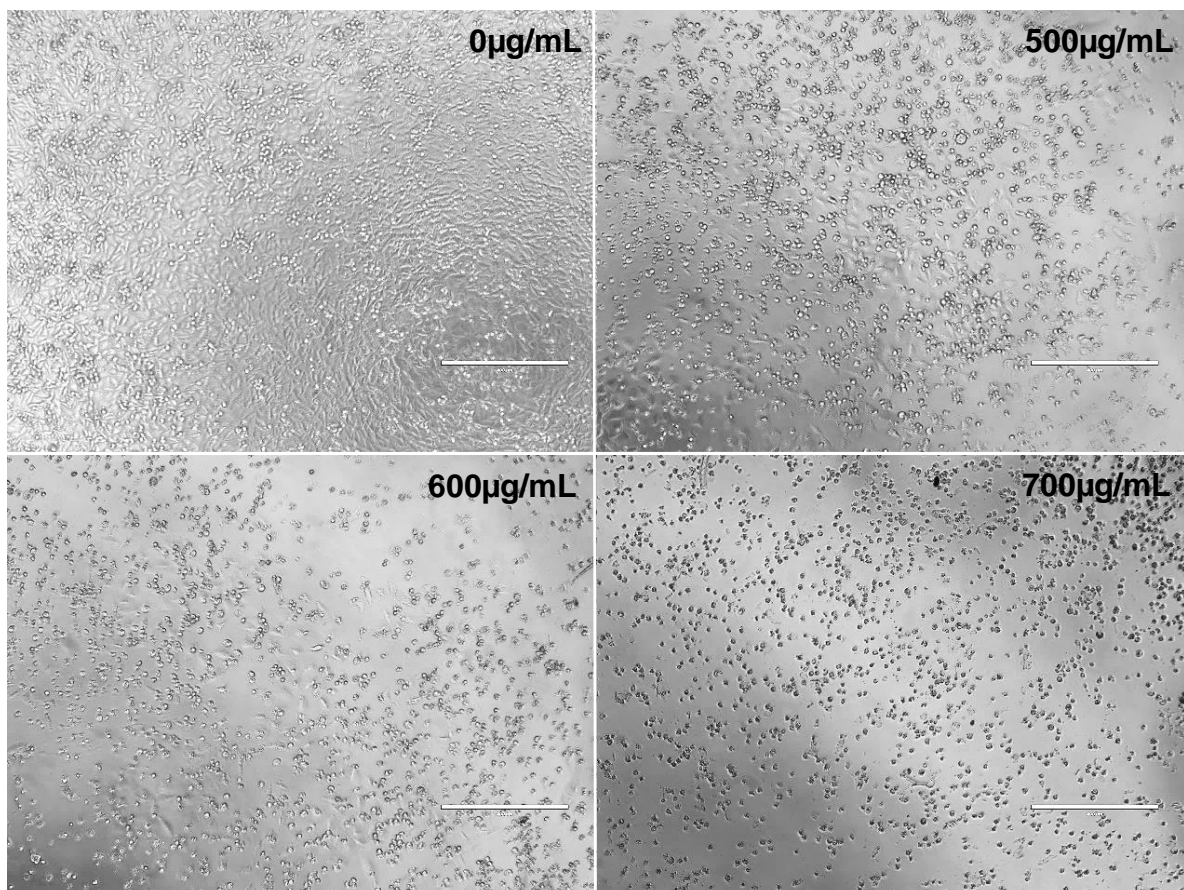
Antes de efetuar a transfecção e eventual seleção das células transfectadas, foi feita uma curva de titulação com geneticina, G418 (Sigma®), em ambas as linhagens, com o propósito de determinar a concentração mais adequada para cada linhagem. O G418 (geneticina) é um antibiótico de amplo espectro que inibe a síntese de polipeptídios e proteínas interferindo na atividade da subunidade ribossomal 80S (em eucariotos). Os plasmídeos de expressão shRNA usados na transfecção possuem um gene de resistência à neomicina, entretanto, a geneticina é um antibiótico análogo à neomicina, permitindo a seleção das células transfectadas.

As concentrações usadas na curva de titulação da linhagem A549 são próximas àquelas indicadas pelo fabricante de G418, enquanto as concentrações usadas para a linhagem LC-HK2 são próximas àquelas já utilizadas no laboratório (Cortez et al., 2016). As células da linhagem A549 foram cultivadas em placas de 96 poços, com uma densidade inicial de  $1,5 \times 10^3$  células por poço, e tratadas após 24 horas com as concentrações de 500, 600, 700 e 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , como indicadas na figura 4. O meio contendo G418 foi trocado a cada 2 dias. As células foram tripsinizadas e quantificadas no sétimo (não mostrado no gráfico) e no décimo dia de tratamento. A avaliação da viabilidade celular foi feita usando *Trypan blue*, que permitiu a identificação das células não viáveis (representadas em laranja no gráfico). No décimo dia de tratamento a diferença na viabilidade das células tratadas com as quatro concentrações de G428 apresentou-se mais evidente, por conseguinte foram estabelecidos 10 dias de tratamento como limite mínimo para a seleção de células transfectadas, na concentração de  $700\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figuras 4 e 5).

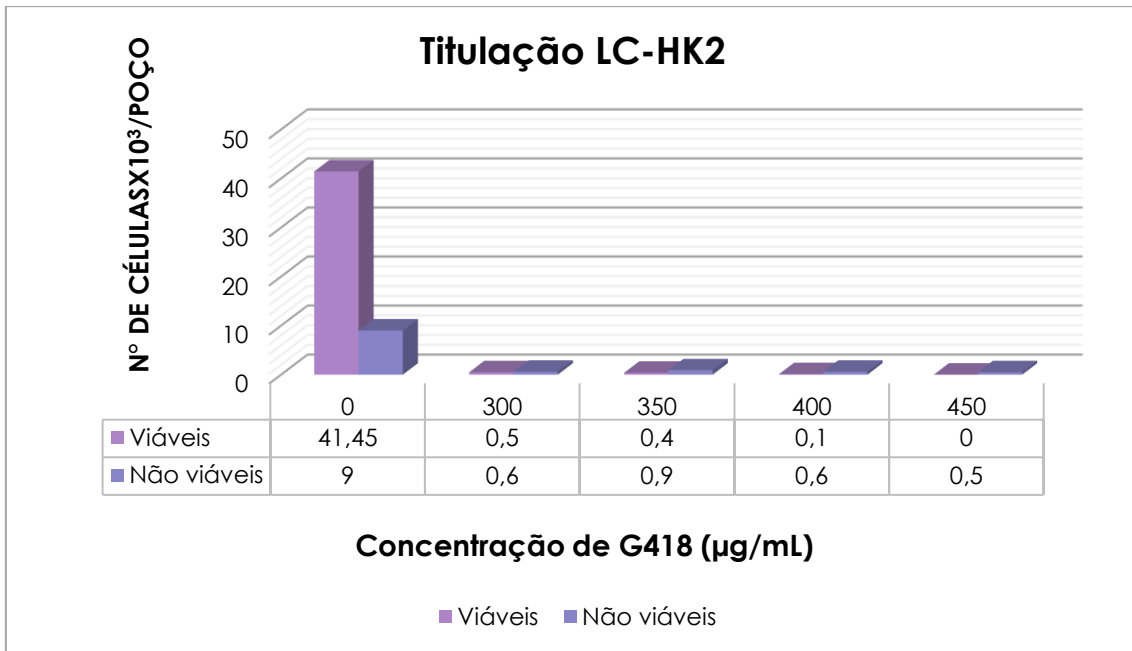
As células da linhagem LC-HK2 foram plaqueadas com densidade inicial de  $2 \times 10^3$  células por poço nas mesmas condições das células da linhagem A549 e a viabilidade celular foi avaliada da mesma forma. As concentrações de G418 usadas, porém, foram de 300, 350, 400, 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 5). A concentração estabelecida para a seleção de células transfectadas dessa linhagem foi de 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figuras 6 e 7).



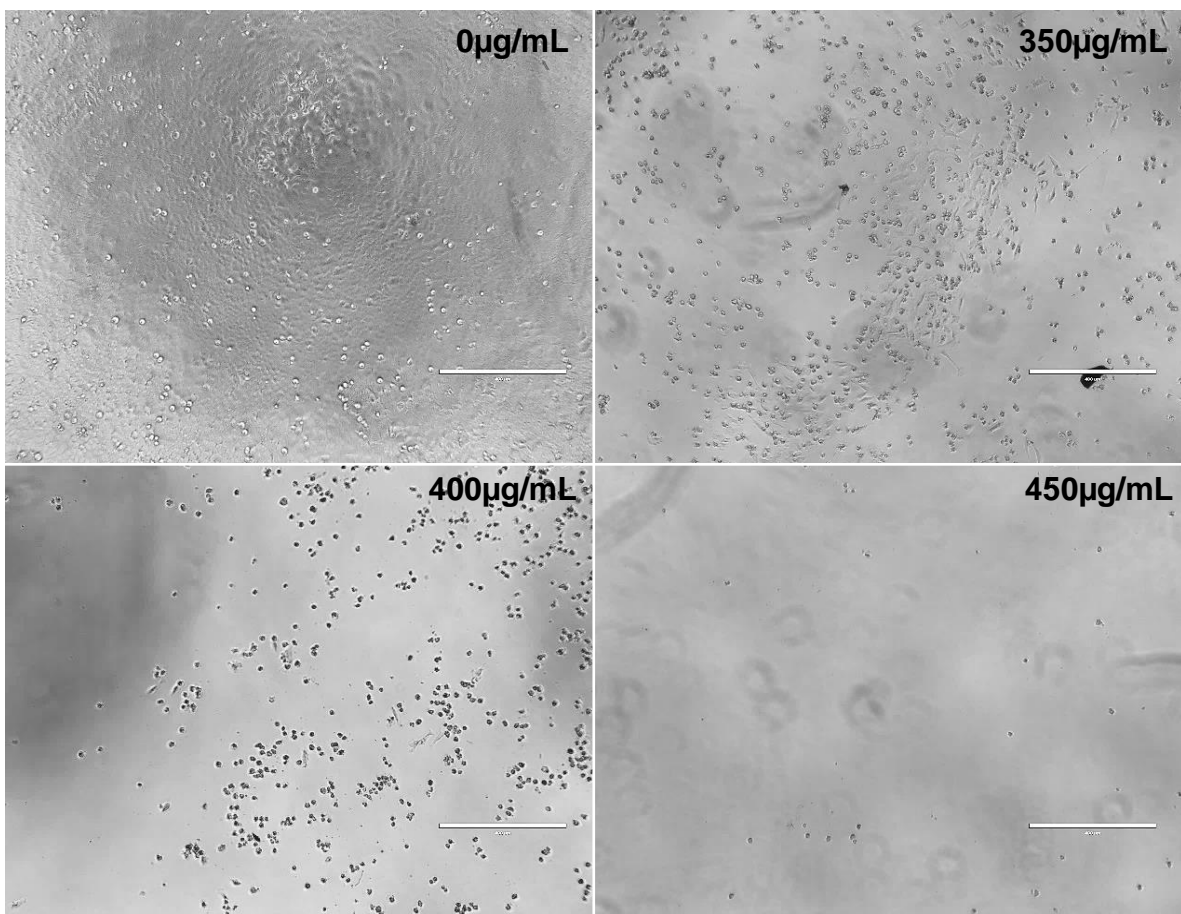
**Figura 4:** Gráfico da viabilidade celular da linhagem A549 no 10º dia de tratamento com 4 concentrações distintas de G418 e o controle negativo (0  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 5:** Micrografias de Contraste de fase de células da linhagem A549 no 10º dia de tratamento com G418. Acima de cada micrografia estão indicadas 4 concentrações usadas. Barras: 400 $\mu\text{m}$ .



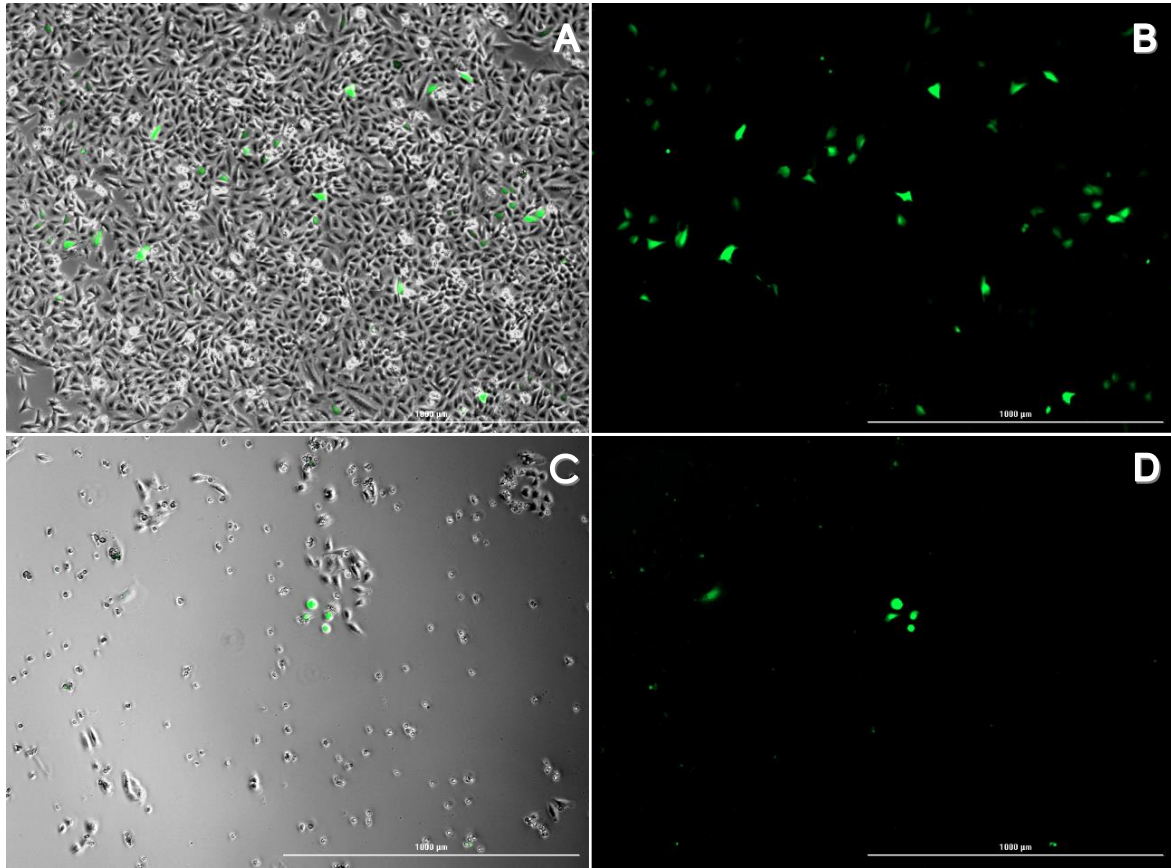
**Figura 6:** Gráfico da viabilidade celular da linhagem LC-HK2 no 10º dia de tratamento com 4 concentrações distintas de G418 e o controle negativo (0 µg/mL).



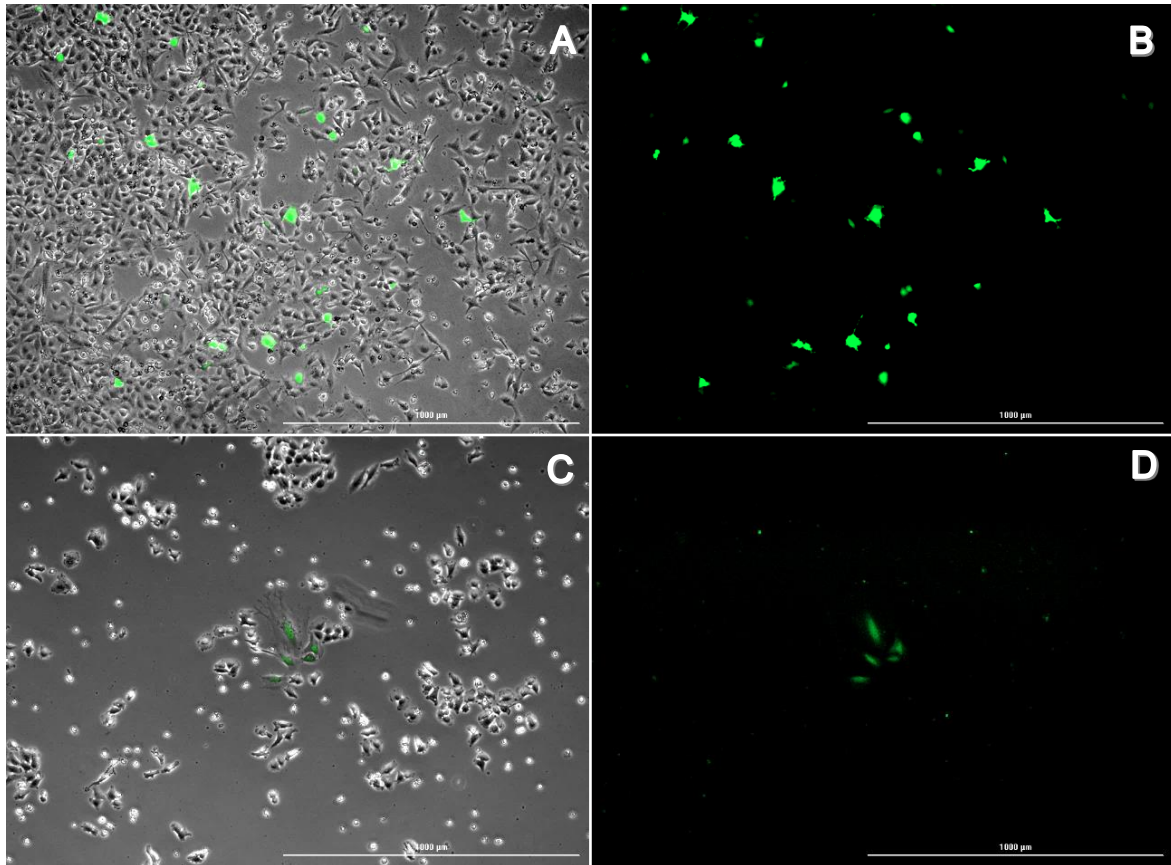
**Figura 7:** Micrografias de Contraste de fase de células da linhagem LC-HK2 no 10º dia de tratamento com G418. Acima de cada micrografia estão indicadas as concentrações usadas. Barras: 400µm

As linhagens LC-HK2 e A549 foram transfectadas como reportado na metodologia. A linhagem LC-HK2 apresentou baixa eficiência de transfecção, dificultando o estabelecimento de células transfectadas (Figura 8). Após 15 dias de seleção nenhuma das células transfectadas proliferou o suficiente em cultura para alcançar a confluência adequada para a coleta com o anel de clonagem (Figura 9), mesmo depois de várias tentativas. A transfecção da linhagem A549 apresentou maior eficiência e clones de células transfectadas com ambos os plasmídeos foram coletadas com o anel de clonagem após cerca de 12-13 dias de seleção (Figuras 10 e 11).

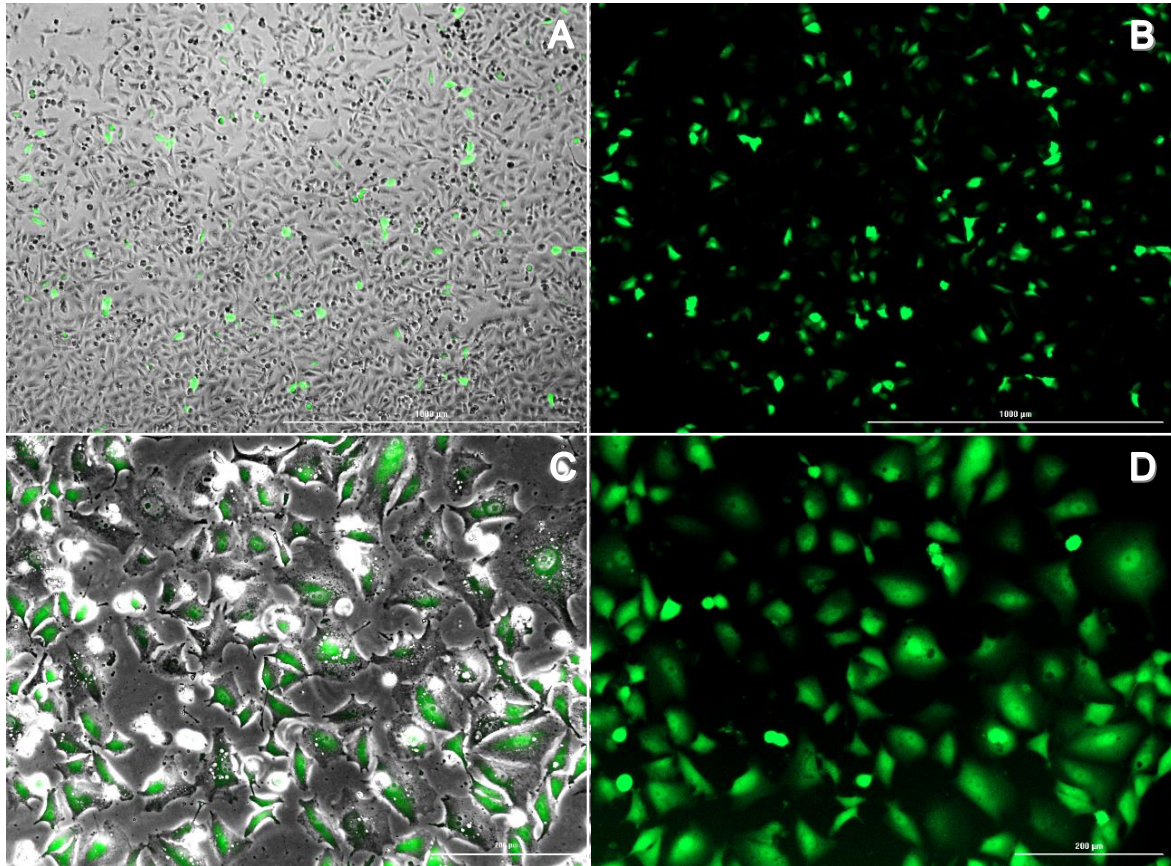
Após a seleção dos clones de A549shTBX2 e A549shControl, as células foram plaqueadas em garrafas de 25cm<sup>2</sup> e após 4, 5 e 7 passagens, foi feita a extração de proteínas totais e, em seguida, o ensaio de Western Blot (12A). A quantificação da expressão proteica de TBX2 foi feita usando o software UN-SCAN-IT (gel 6.1). A expressão da  $\beta$ -actina de cada linhagem foi usada para a normalização. Como mostrado na figura 9A, a expressão proteica relativa das células submetidas ao knockdown de TBX2 apresentou-se menor do que os controles. Por sua vez, os controles (A549 e A549shControl) não apresentaram diferenças relevantes entre si. A análise estatística da variância (*One way ANOVA*) da média das triplicadas mostrou que essa diferença foi significativa ( $p < 0,0001$ ) (Figura 12B).



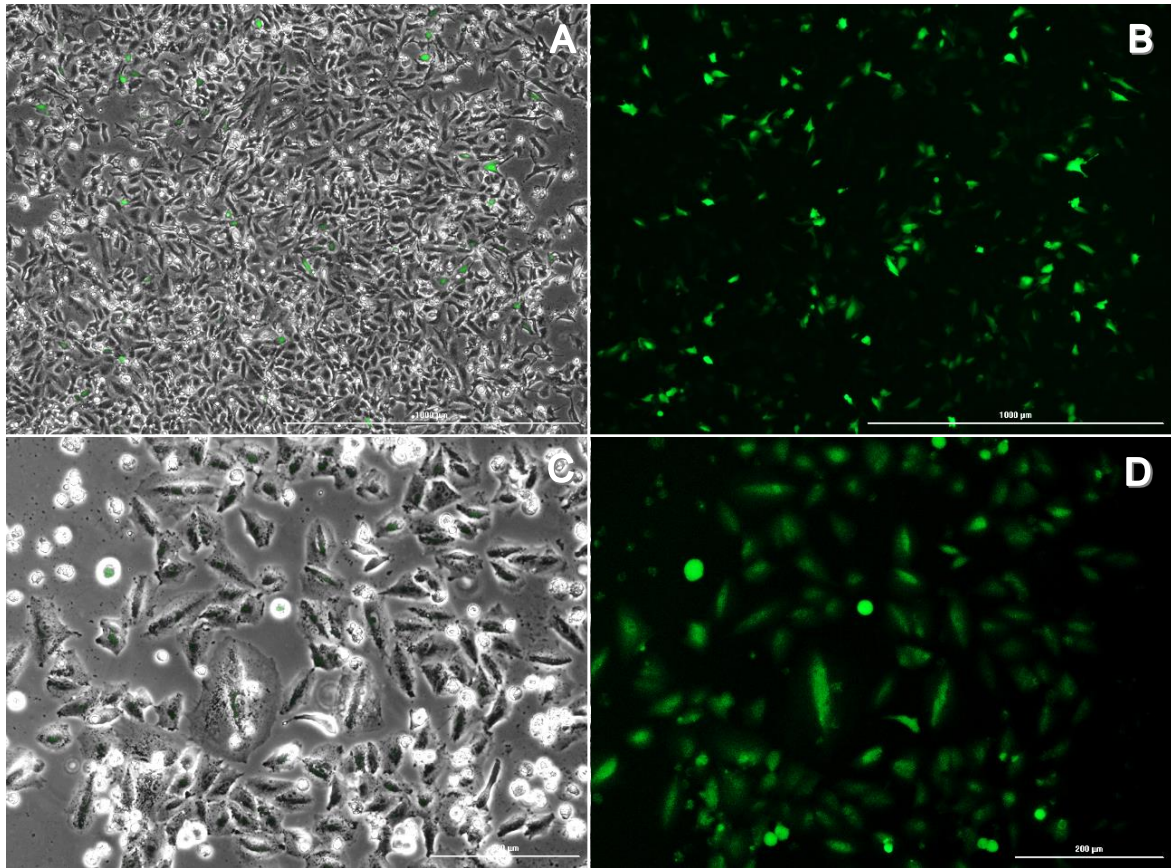
**Figura 8:** Micrografias de contraste de fase e fluorescência (A e C) e fluorescência (B e D) de células da linhagem LC-HK2 transfectadas com os plasmídeos shControl-GFP. A e B: micrografias das células transfectadas com shControl-GFP após 48h da transfecção. C e D: após 12 dias de seleção com G418. Barras: 1000μm.



**Figura 9:** Micrografias de contraste de fase e fluorescência (A e C) e fluorescência (B e D) de células da linhagem LC-HK2 transfectadas com o plasmídeo shTBX2-GFP. A e B: micrografias das células transfectadas com shTBX2-GFP após 48h da transfecção. B e C: células transfectadas após 12 dias de seleção com G418. Barras: 1000µm.

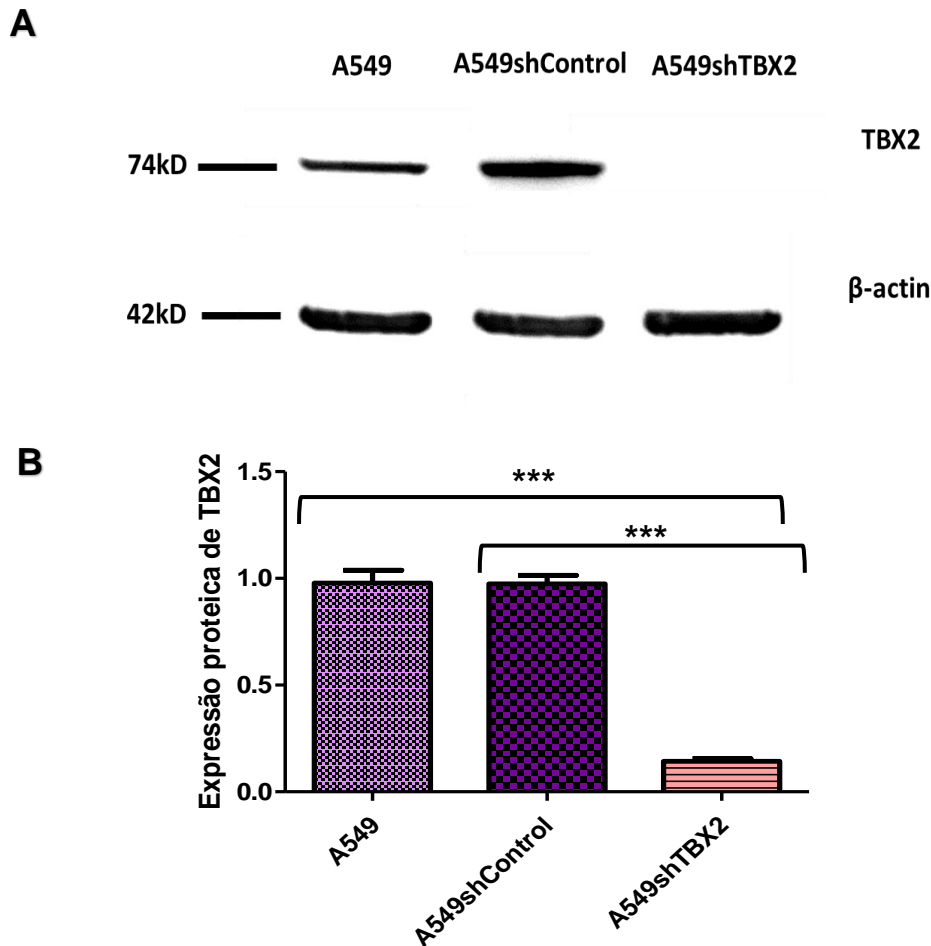


**Figura 10:** Micrografias de contraste de fase e fluorescência (A e C) e fluorescência (B e D) de células da linhagem A549 transfectadas com o plasmídeos shControl-GFP. A e B: micrografias das células transfectadas com shControl-GFP após 48h da transfecção. C e D: micrografias das células transfectadas após 12 dias de seleção com G418. Barras: 200 e 1000 $\mu$ m.



**Figura 11:** Micrografias de contraste de fase e fluorescência (A e C) e fluorescência (B e D) de células da linhagem A549 transfectadas com o plasmídeo shTBX2-GFP. A e B: micrografias das células transfectadas com shTBX2-GFP após 48h da transfecção. C e D: células transfectadas após 12 dias de seleção com G418. Barras: 200 e 1000 $\mu$ m.



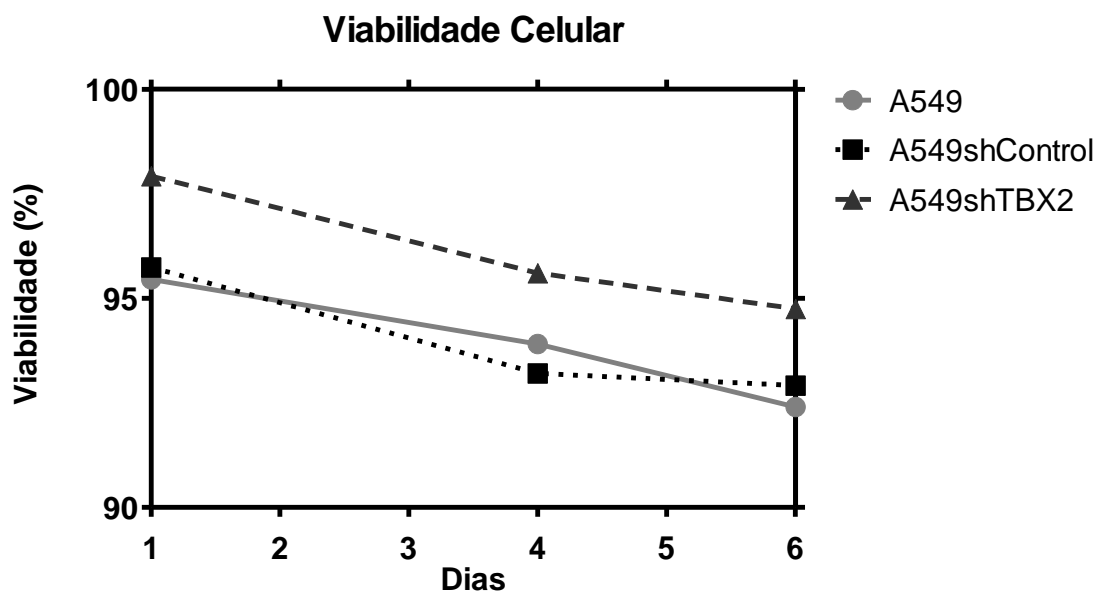


**Figura 12:** A: Expressão proteica de TBX2 nas linhagens A549, A549shControl e A549shTBX2. A  $\beta$ -actina foi usada como controle para a normalização. B: Expressão proteica de TBX2 nas linhagens A549, A549shControl e A549shTBX2. Os valores apresentados no gráfico são as médias das triplicatas. Barras acima das colunas representam o desvio padrão. \*\*\* p < 0,0001.

### 3.4 EFEITO DO *KNOCKDOWN* DE TBX2 NA VIABILIDADE, CICLO CELULAR E ÍNDICE MITÓTICO

O efeito do *knockdown* de TBX2 na linhagem A549 foi avaliado por meio do ensaio de viabilidade celular, do ciclo celular e índice mitótico. No ensaio de viabilidade celular as células foram coradas com *Trypan blue* e as células viáveis e não viáveis foram contadas na câmara de Neubauer no 1°, 4° e 6° dia de cultivos (Figura 13). Cada experimento foi realizado em triplicata de forma independente. Os valores reportados no gráfico é o resultado da equação: (N°

de células viáveis  $\div$  N° total de células)  $\times$  100 = % de células viáveis. Como é possível observar no gráfico da figura 13, as células A549shTBX2 não apresentaram diferenças relevante no percentual de células viáveis, cerca de 2% tanto no 4° quanto no 6° dia de cultivo.



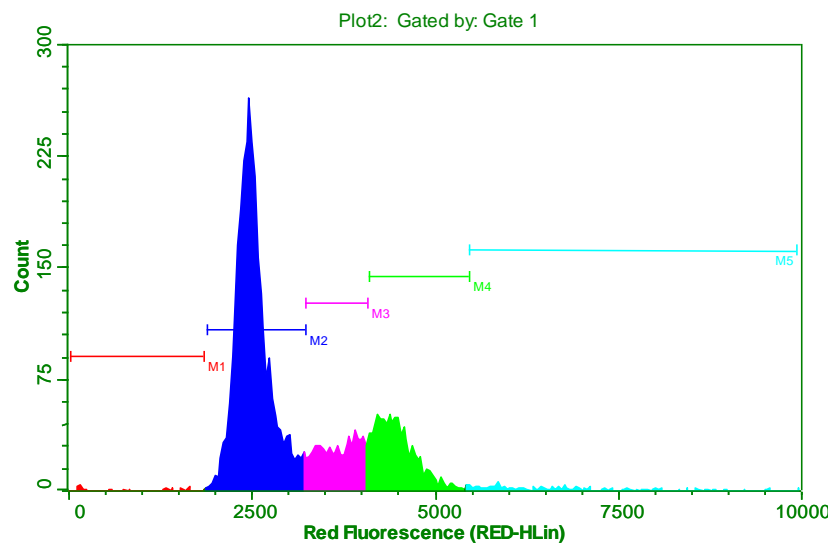
**Figura 13:** Gráfico do ensaio de viabilidade celular de A549, A549shControl e A549shTBX2 efetuado no 1°, 4° e 6° dias de cultivo, a partir de uma densidade inicial de  $3 \times 10^4$  células por placa (Dia 0).

As fases do ciclo celular nas células com o *knockdown* de TBX2 e nos controles (A549 e A549shControl) foram avaliadas como descrito na metodologia, por citometria de fluxo. A análise do ciclo celular mostrou um aumento do percentual da população de células na fase S de cerca 5% em relação aos controles (Tabela 1 e figura 14). As diferenças observadas entre as células com *knockdown* de TBX2 e controles foram modestas, não apresentando algum valor significativo.

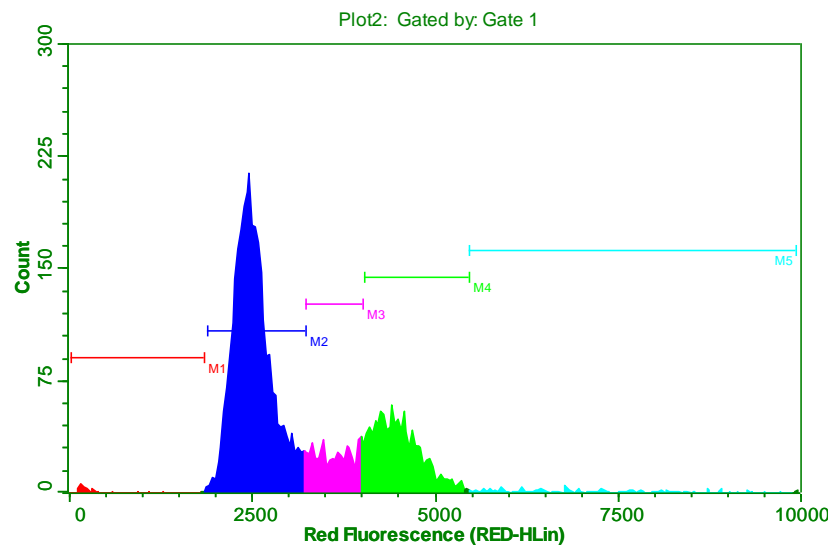
**Tabela 1:** Análise do ciclo celular das células da linhagem A549 não transfectadas, das células transfectadas com o plasmídeo de controle e das células transfectadas com shTBX2.

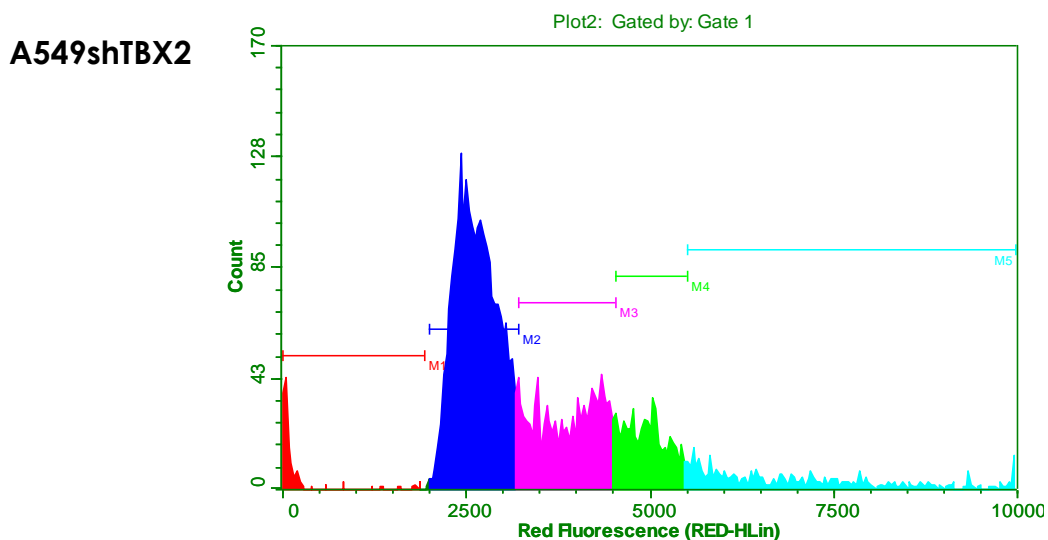
	A549	A549shControl	A549shTBX2
<b>G0/G1</b>	58,56%	58,14%	53%
<b>S</b>	26,45%	27,44%	31,7%
<b>G2/M</b>	15%	14,42%	15,3%

**A549**



**A549shControl**



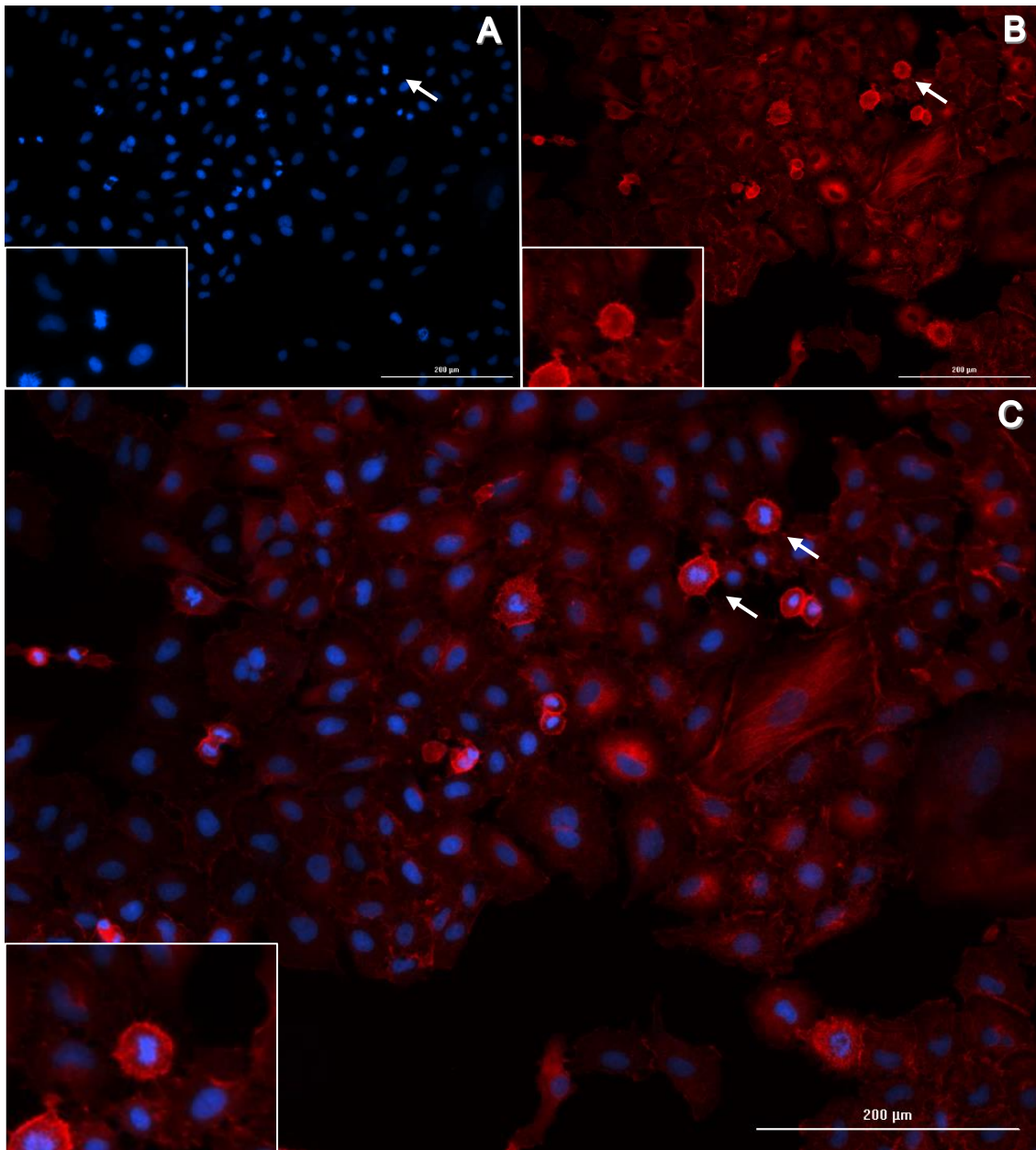


**Figura 14:** Perfil do ciclo celular de A549, A549shControl e A549shTBX2. M1(vermelho): hipodiplóides; M2(azul): G1; M3(rosa):S; M4(verde):G2/M; M4(verde coral):hipertetraplóides.

A avaliação do índice mitótico foi feita no 4º dia de cultivo (fase log) após o plaqueamento com densidade inicial de  $3 \times 10^4$  células por placa. As células foram fixadas e coradas com DAPI e Faloidina Alexa flúor-633. Sucessivamente, as células foram visualizadas no microscópio de fluorescência e fotografadas (Figuras 15-17). As células mitóticas e interfásicas foram contadas com o programa ImageJ. Para calcular o índice mitótico foram contadas um mínimo de 1000 células. Os resultados evidenciaram que a diferença do índice mitótico entre A549shTBX2 e controles (A549 e A549shControl) foi menor de 3% (Tabela 2).

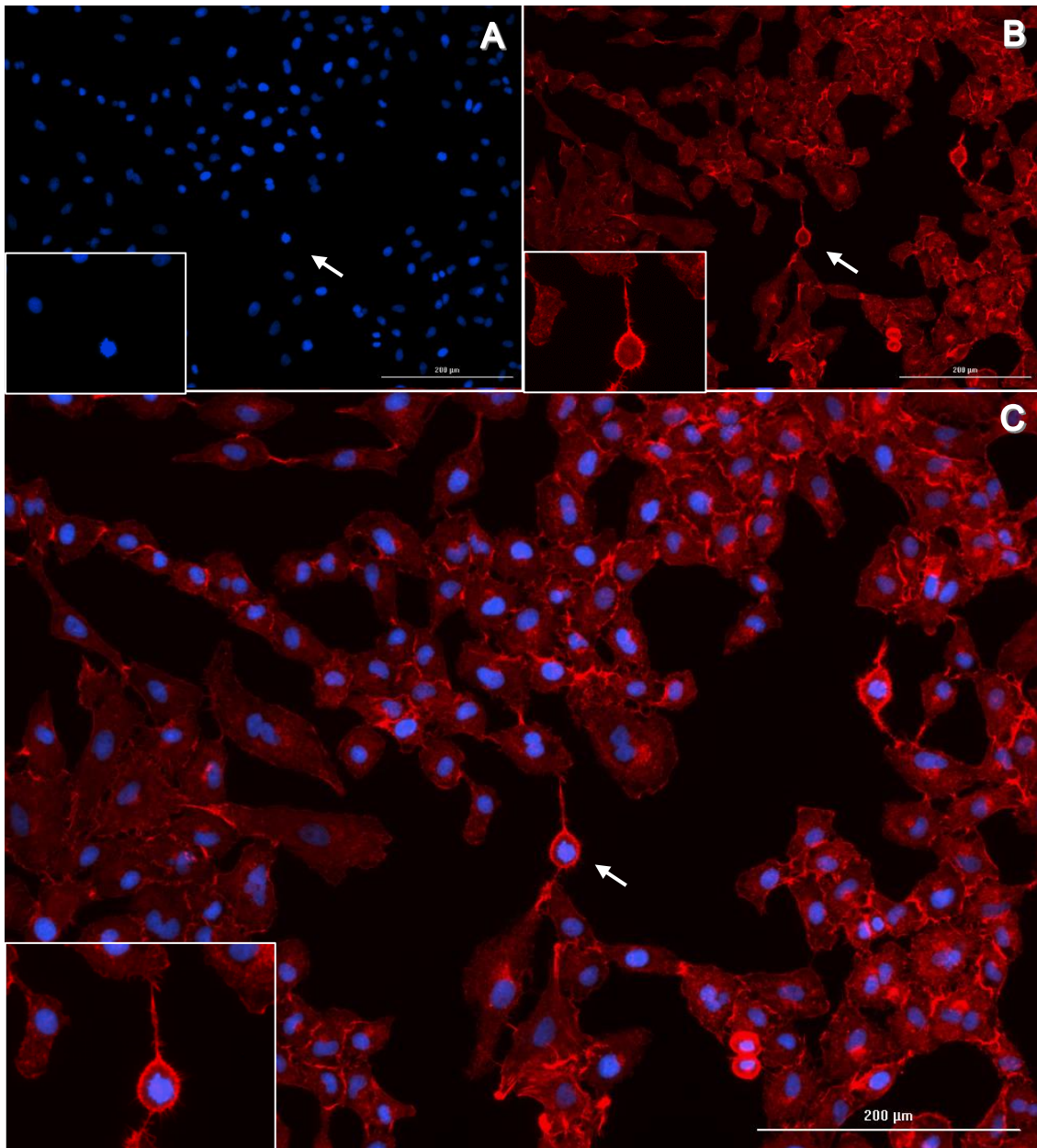
Os resultados da viabilidade celular, do ciclo celular e índice mitótico juntos não revelaram diferenças significativas entre A549shTBX2 e controles.

## A549



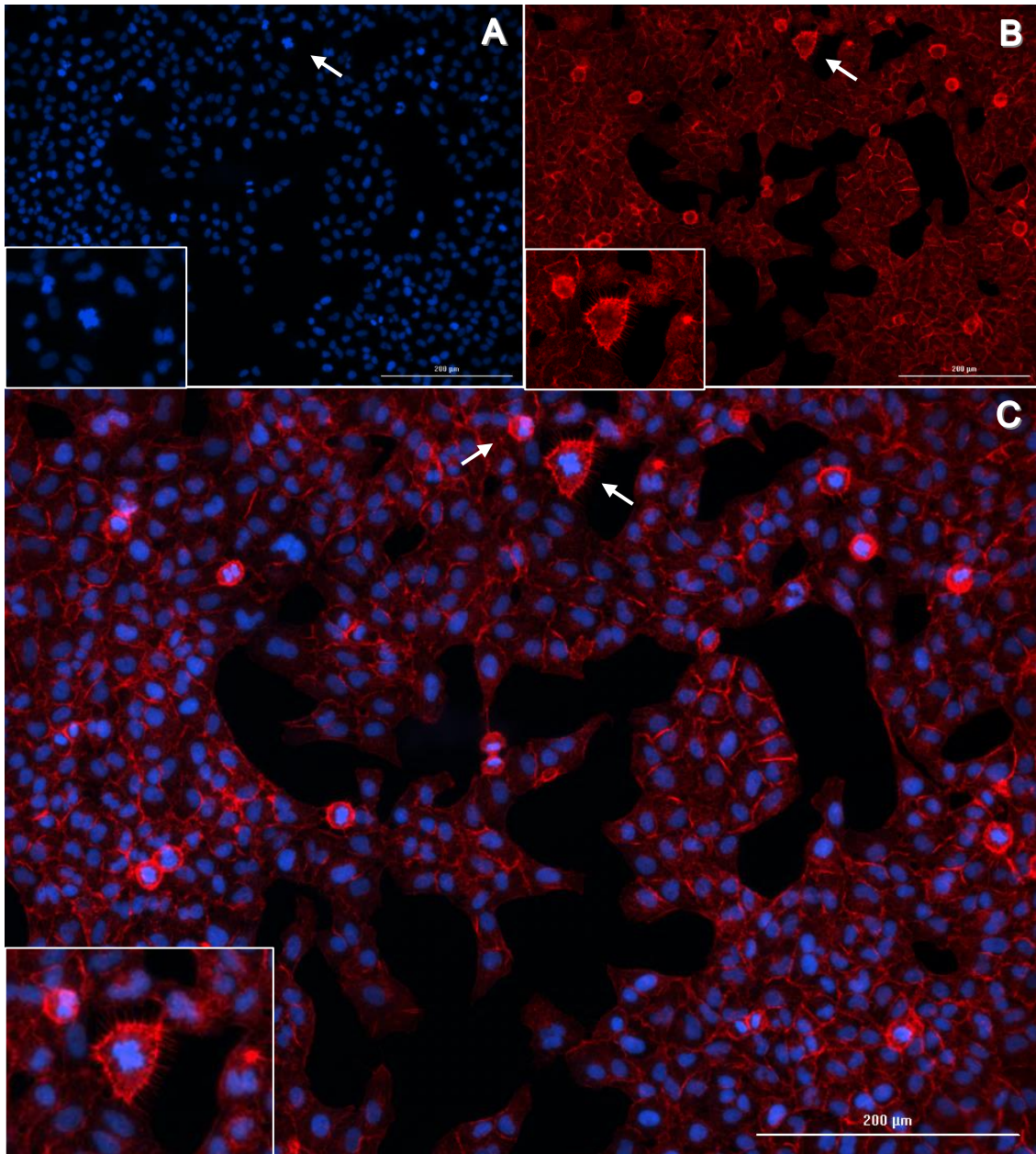
**Figura 15:** Imagens obtidas no microscópio de fluorescência *Lion Heart* de células da linhagem A549. Em A é possível observar os núcleos das células corados com DAPI. Em B pode ser observado o citoesqueleto de actina das células marcado com Faloidina Alexa Fluor-633. Na imagem C citoesqueleto de actina e núcleo podem ser observados juntos. Quadros no canto inferior à esquerda de cada imagem está em destaque uma célula mitótica. As setas indicam algumas células em mitoses das imagens destacadas nos quadros. Barras: 200µm.

### A549shControl



**Figura 16:** Imagens obtidas no microscópio de fluorescência *Lion Heart* de células da linhagem A549shControl. Em A é possível observar os núcleos das células corados com DAPI. Em B pode ser observado o citoesqueleto de actina das células marcado com Faloidina Alexa Fluor-633. Na imagem C citoesqueleto de actina e núcleo podem ser observados juntos. Quadros no canto inferior à esquerda de cada imagem está em destaque uma célula mitótica. As setas indicam algumas células em mitoses das imagens destacadas nos quadros. Barras: 200μm.

## A549shTBX2



**Figura 17:** Imagens obtidas no microscópio de fluorescência *Lion Heart* de células da linhagem A549shTBX2. Em A é possível observar os núcleos das células corados com DAPI. Em B pode ser observado o citoesqueleto de actina das células marcado com Faloidina Alexa Fluor-633. Na imagem C citoesqueleto de actina e núcleo podem ser observados juntos. Quadros no canto inferior à esquerda de cada imagem está em destaque uma célula mitótica. As setas indicam algumas células em mitoses das imagens destacadas nos quadros. Barras: 200μm.

**Tabela 2:** Análise do índice mitótico das células da linhagem A549 não transfectadas, das células transfectadas com o plasmídeo de controle (shControl) e das células transfectadas com shTBX2.

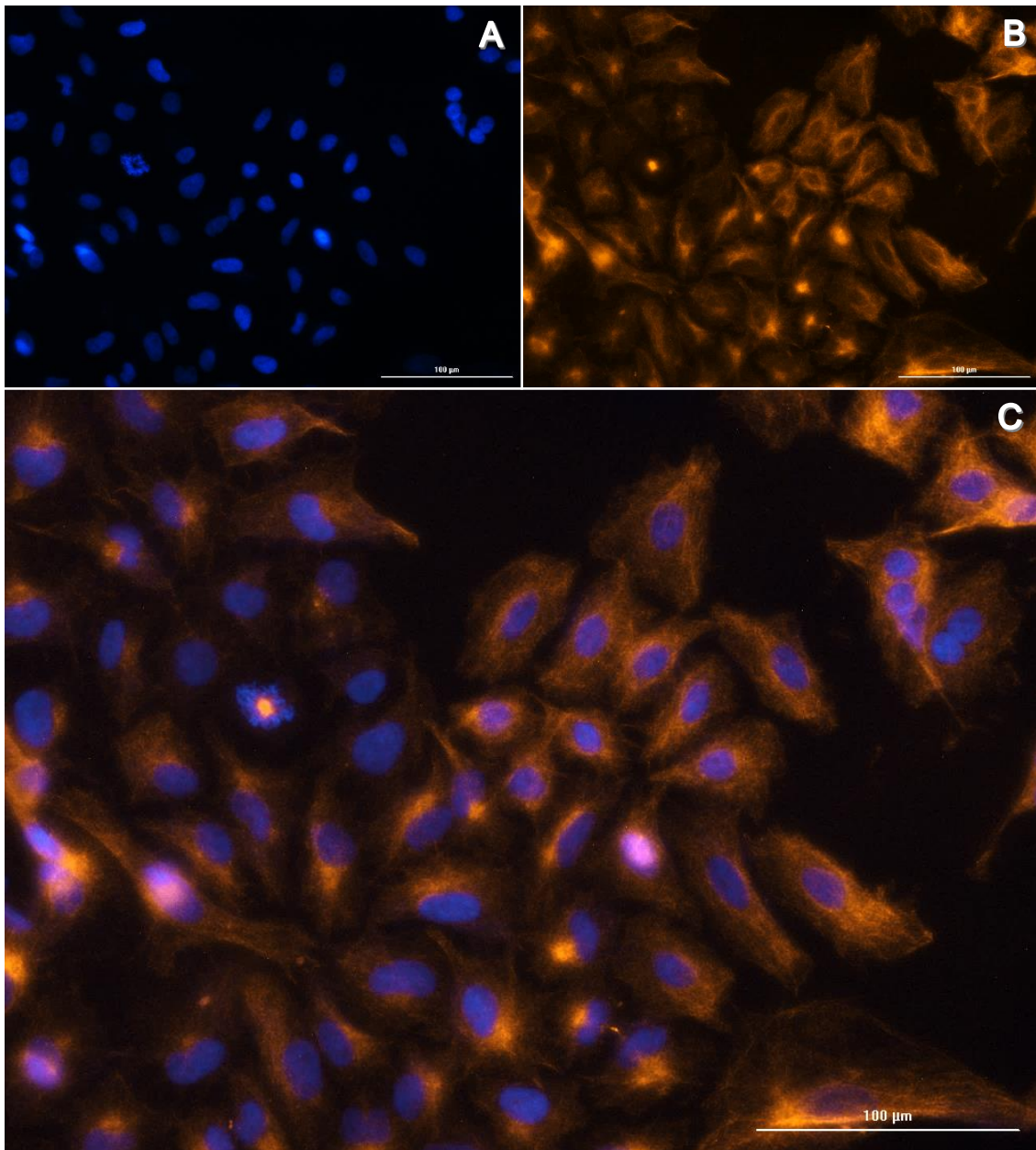
	<b>Células Interfásicas</b>	<b>Células mitóticas</b>	<b>Total</b>	<b>Índice Mitótico</b>
<b>A549</b>	1495	69	1564	0,0441 (4,41%)
<b>A549shControl</b>	1091	51	1142	0,0446 (4,46%)
<b>A549shTBX2</b>	1177	91	1268	0,0717 (7,17%)

### 3.5 EFEITO DO *KNOCKDOWN* DE TBX2 NA MORFOLOGIA DE A549 EM MONOCAMADA

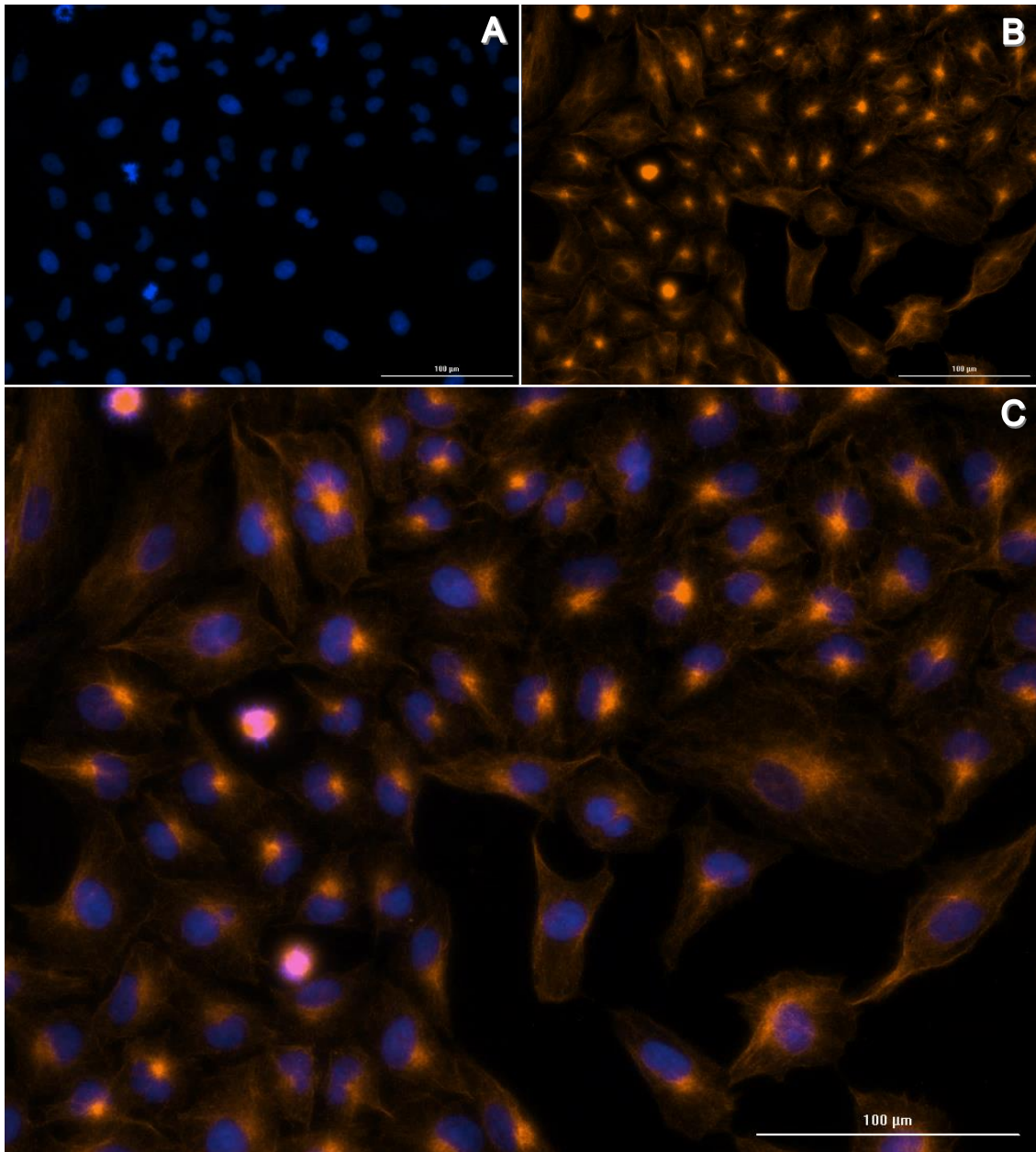
Com o propósito de investigar se o nocaute de TBX2 poderia influenciar na morfologia das células estudadas, foi feito ensaio de imunofluorescência e coloração como reportado na metodologia, focando no citoesqueleto de actina, nos microtúbulos e no núcleo. As células foram imunomarcadas e coradas e fotografadas no microscópio de fluorescência. As micrografias de fluorescência não mostraram diferenças morfológicas no citoesqueleto de actina e microtúbulos entre as células avaliadas (*knockdown* e os controles). Entretanto, foi observado nas células A549shTBX2 um aumento do número de células binucleadas (Figuras 18-23).



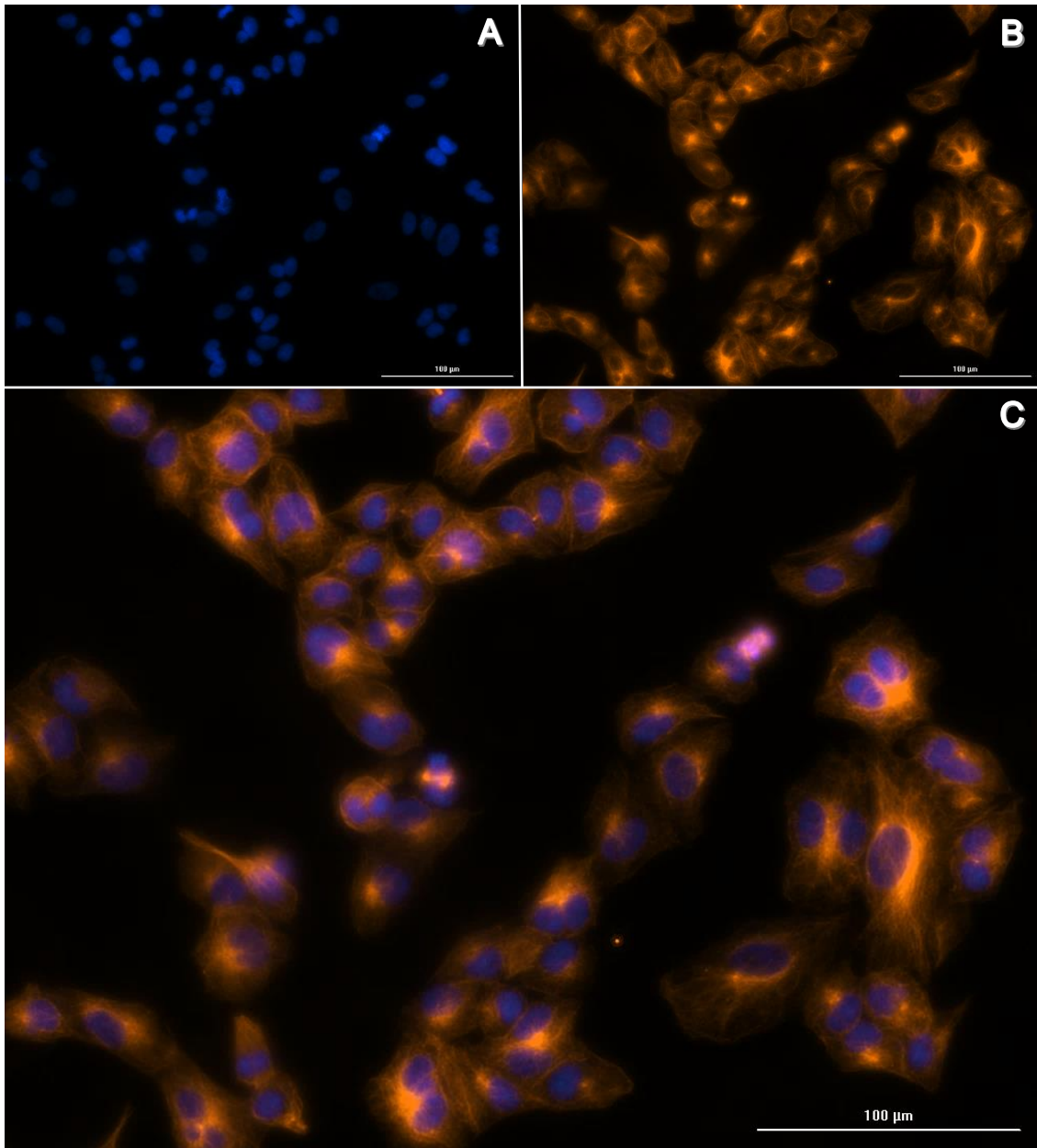
## A549



**Figura 18:** Imagens obtidas no microscópio de fluorescência *Lion Heart* de células da linhagem A549. Em A são mostrados os núcleos das células corados com DAPI. Em B podem ser observados os microtúbulos. Para a imunomarcagem dos microtúbulos foram usados os anticorpos primários anti- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina (mouse) e secundário, anti-mouse-Alexa Fluor- 555. Na imagem C os microtúbulos e núcleo podem ser observados juntos. Barras: 100 $\mu$ m.

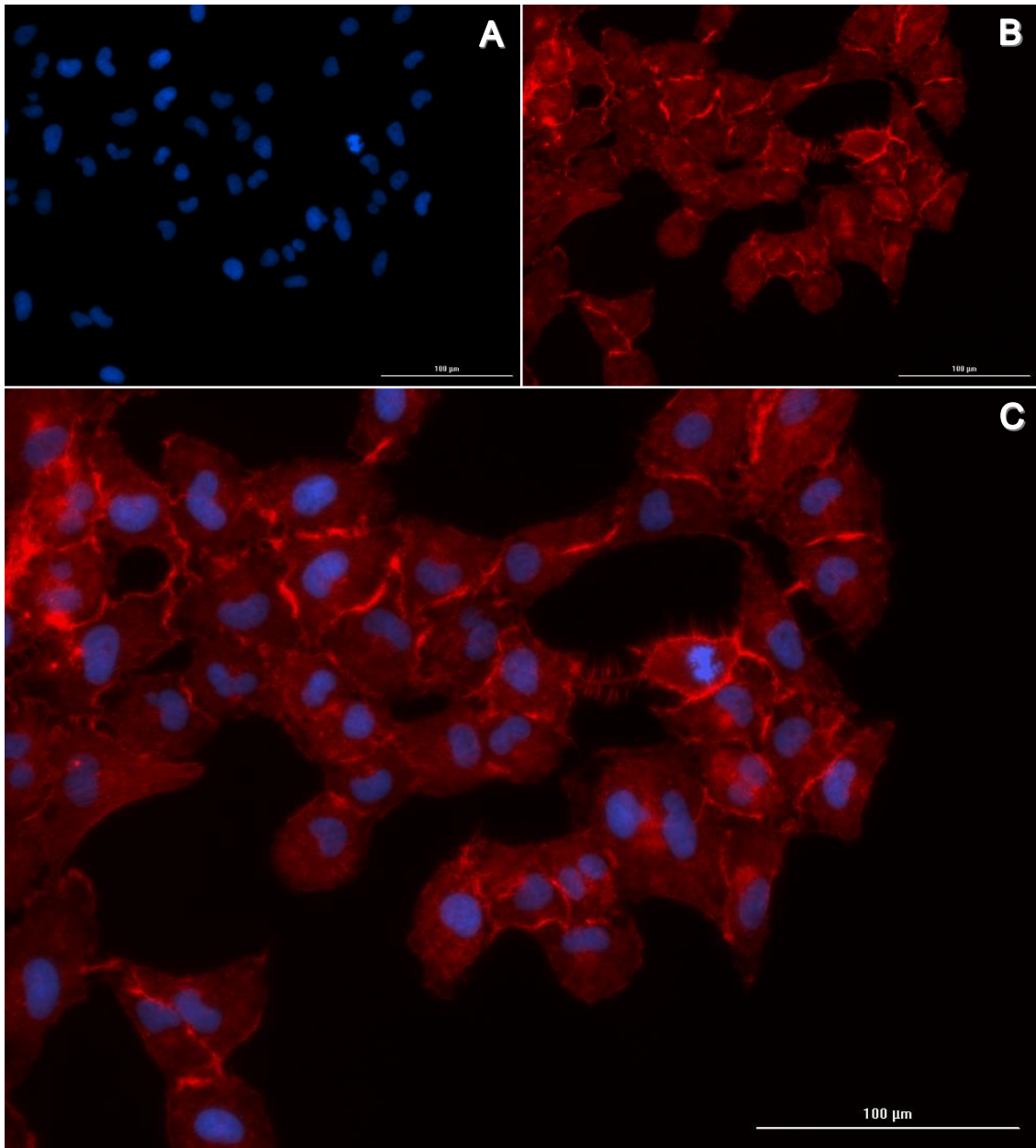
**A549shControl**

**Figura 19:** Imagens obtidas no microscópio de fluorescência *Lion Heart* de células da linhagem A549shControl. Em A são mostrados os núcleos das células corados com DAPI. Em B podem ser observados os microtúbulos. Para a imunomarcação dos microtúbulos foram usados os anticorpos primários anti- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina (mouse) e secundário, anti-mouse-Alexa Fluor- 555. Na imagem C os microtúbulos e núcleo podem ser observados juntos. Barras: 100 $\mu$ m.

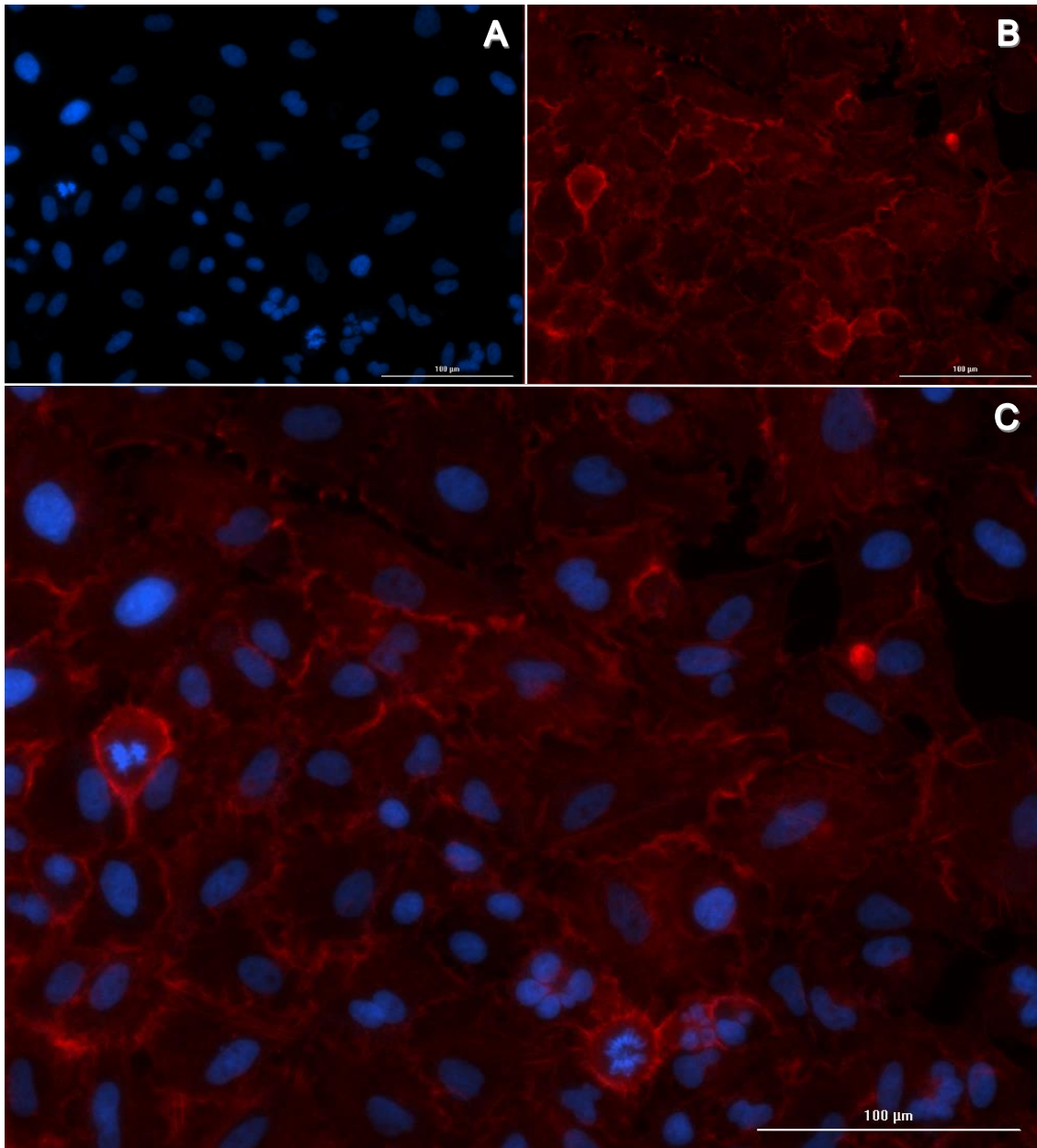
**A549shTBX2**

**Figura 20:** Imagens obtidas no microscópio de fluorescência *Lion Heart* de células da linhagem A549shTBX2. Em A são mostrados os núcleos das células corados com DAPI. Em B podem ser observados os microtúbulos. Para a imunomarcação dos microtúbulos foram usados os anticorpos primários anti- $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina (mouse) e secundário anti-mouse-Alexa Fluor- 555. Na imagem C os microtúbulos e núcleo podem ser observados juntos. Barras: 100 $\mu$ m.

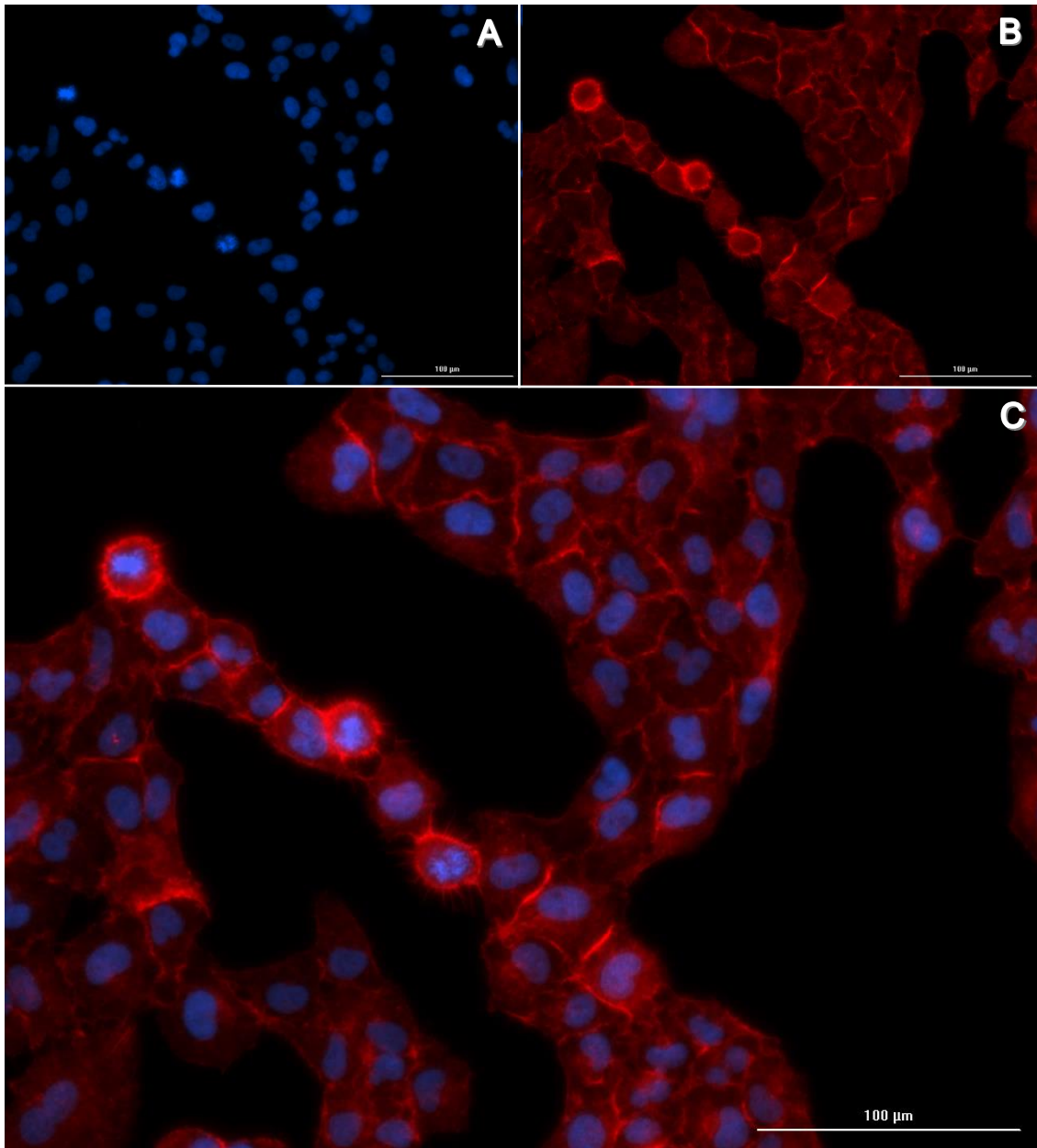
## A549



**Figura 21:** Imagens obtidas no microscópio de fluorescência *Lion Heart* de células da linhagem A549. Em A é possível observar os núcleos das células corados com DAPI. Em B pode ser observado o citoesqueleto de actina das células marcado com Faloidina Alexa Fluor-633. Na imagem C citoesqueleto de actina e núcleo podem ser observados juntos. Barras: 100μm.

**A549shControl**

**Figura 22:** Imagens obtidas no microscópio de fluorescência *Lion Heart* de células da linhagem A549shControl. Em A é possível observar os núcleos das células corados com DAPI. Em B pode ser observado o citoesqueleto de actina das células marcado com Faloidina Alexa Fluor-633. Na imagem C citoesqueleto de actina e núcleo podem ser observados juntos. Barras: 100μm.

**A549shTBX2**

**Figura 23:** Imagens obtidas no microscópio de fluorescência *Lion Heart* de células da linhagem A549shTBX2. Em A é possível observar os núcleos das células corados com DAPI. Em B pode ser observado o citoesqueleto de actina das células marcado com Faloidina Alexa Fluor-633. Na imagem C citoesqueleto de actina e núcleo podem ser observados juntos. Barras: 100μm.

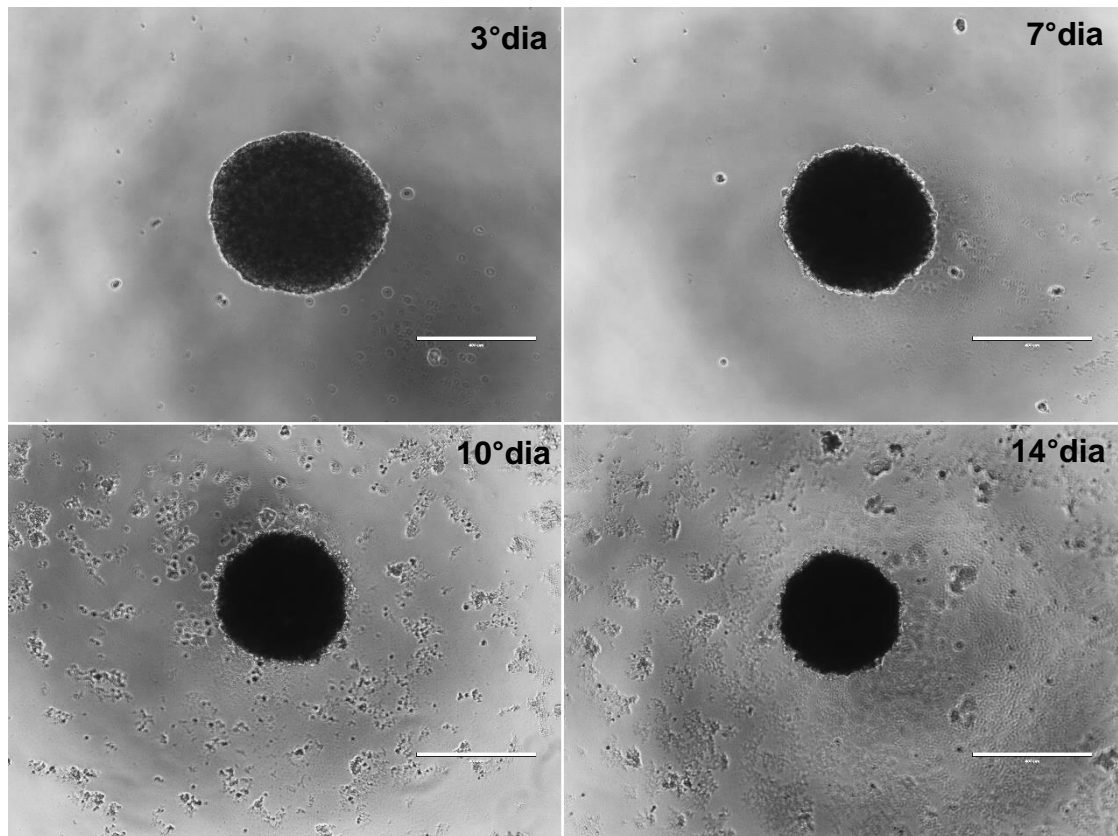
### 3.6 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DOS ESFEROIDES DAS LINHAGENS A549 E LC-HK2

As linhagens HK2 e A549 foram plaqueadas em placas de 96 poços com o fundo de agarose (1%), com densidade inicial de  $1 \times 10^4$  por poço. As culturas foram mantidas por 14 dias, os esferoides foram fotografados com microscópio de luz invertido (Figuras 24 e 26) e os diâmetros dos esferoides foram medidos no 3°, 7°, 10°, 14° dia de cultivo, usando o software ImageJ. Foram medidos 20 esferoides de cada linhagem nos dias preestabelecidos.

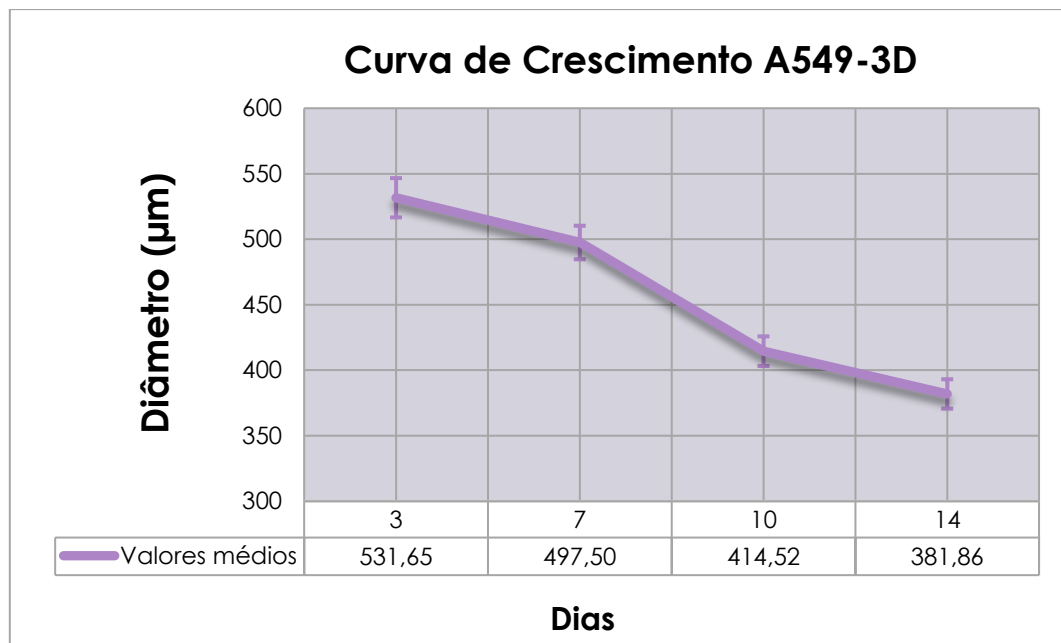
Após o terceiro dia em cultura os esferoides da linhagem LC-HK2 apresentaram uma pronunciada redução de seus diâmetros. Com um leve recupero no sétimo dia, a partir do qual o diâmetro dos esferoides se manteve relativamente estável, com discretas oscilações até o décimo quarto dia (Figuras 26 e 27).

Por outro lado, a redução do diâmetro dos esferoides da linhagem A549 apresentou-se contínua a partir do terceiro dia (Figuras 24 e 25) e após o décimo dia muitos esferoides começaram a se desfazer. A partir da curva de crescimento dos esferoides foi estabelecido que os experimentos seguintes com os esferoides seriam feitos no sétimo dia de cultivo, o qual representaria um tempo de cultivo intermediário entre a formação e a dissolução dos esferoides de ambas as linhagens.

## A549



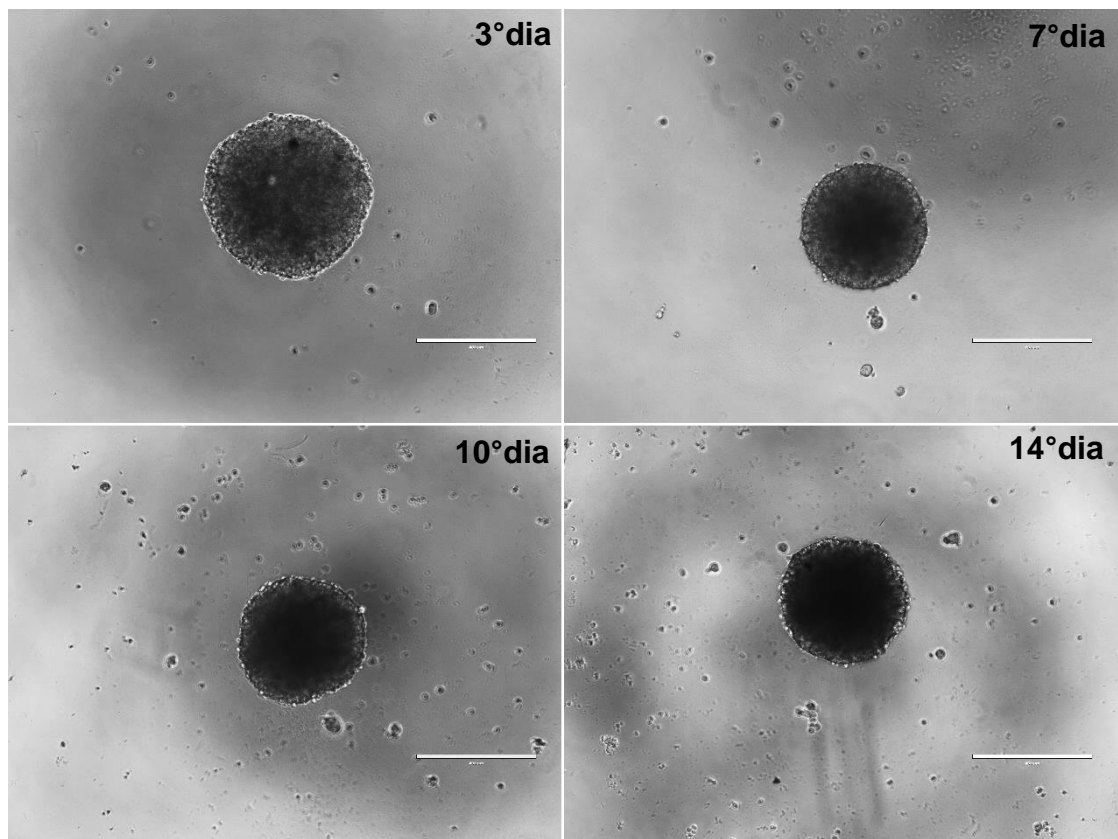
**Figura 24:** Micrografias de contraste de fase de esferoides da linhagem A549 com 3, 7, 10 e 14 dias de cultivo. Barras: 400µm.



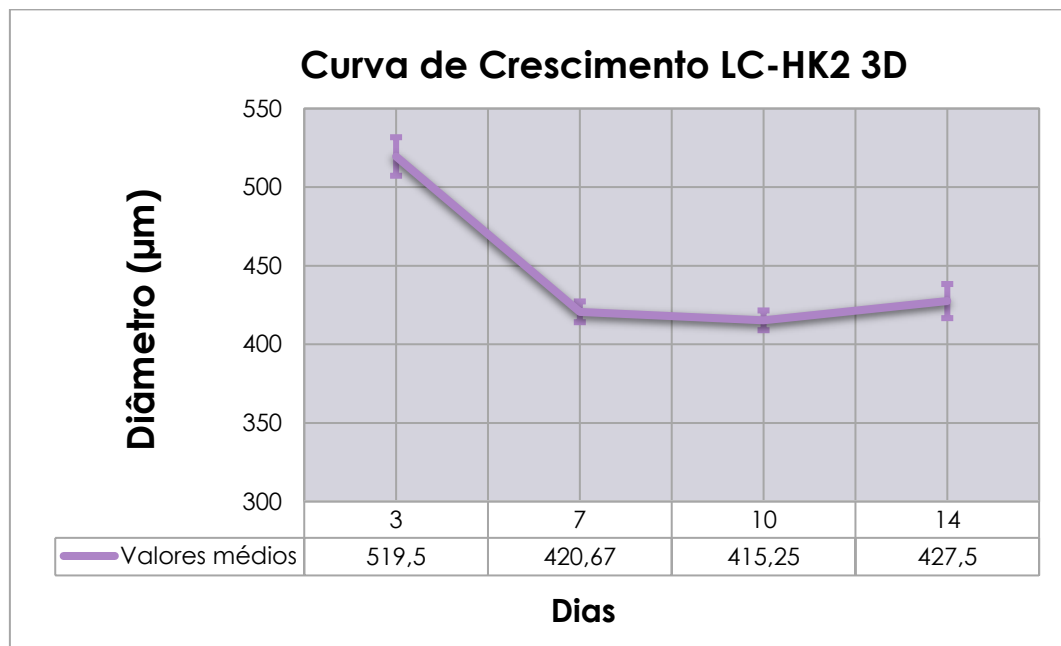
**Figura 25:** Gráfico da média do diâmetro dos esferoides da linhagem A549 nos dias 3, 7, 10 e 14 de cultivo. Os valores médios foram obtidos medindo 20 esferoides para cada dia indicado no gráfico. Barras verticais representam o desvio padrão.



## LC-HK2



**Figura 26:** Micrografias de contraste de fase dos esferoides de LC-HK2 com 3, 7, 10 e 14 dias de cultivo. Barras: 400 $\mu$ m.

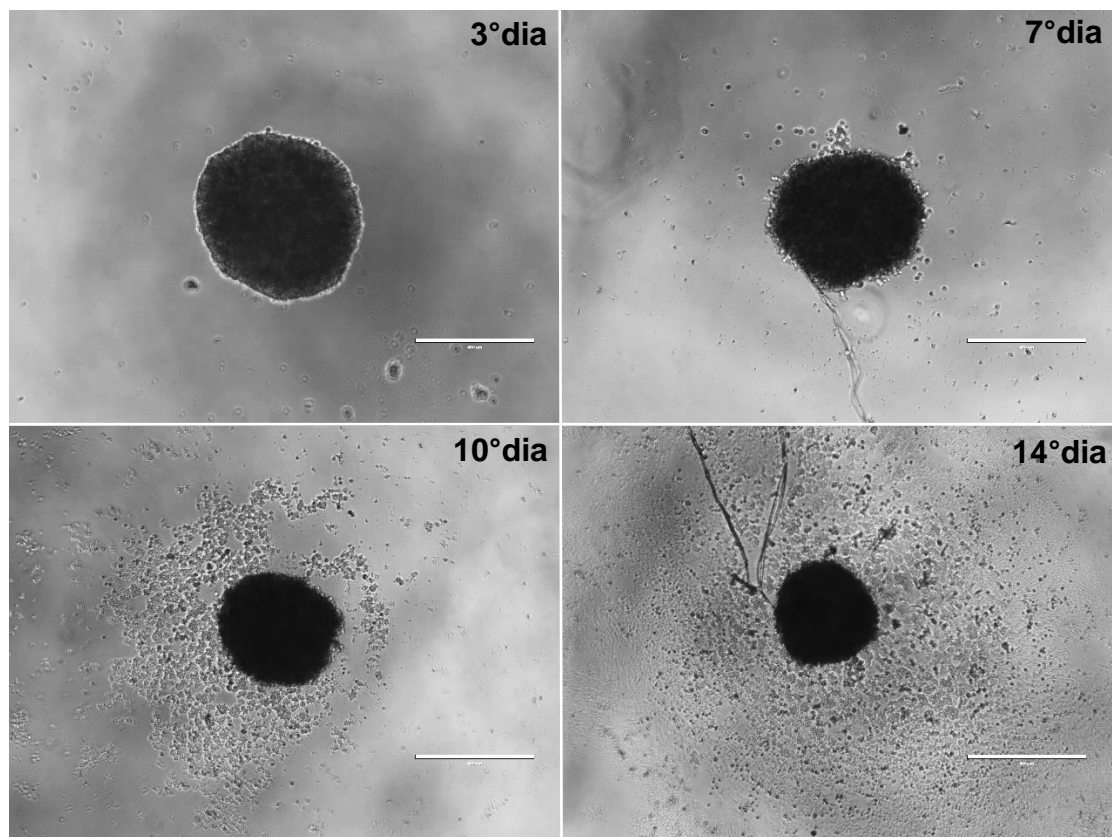


**Figura 27:** Gráfico da média do diâmetro dos esferoides da linhagem LC-HK2 nos dias 3, 7, 10 e 14 de cultivo. Os valores médios foram obtidos medindo 20 esferoides para cada dia indicado no gráfico. Barras verticais representam o desvio padrão.

### 3.7 O *KNOCKDOWN* DE TBX2 INIBE A FORMAÇÃO DE ESFEROIDES

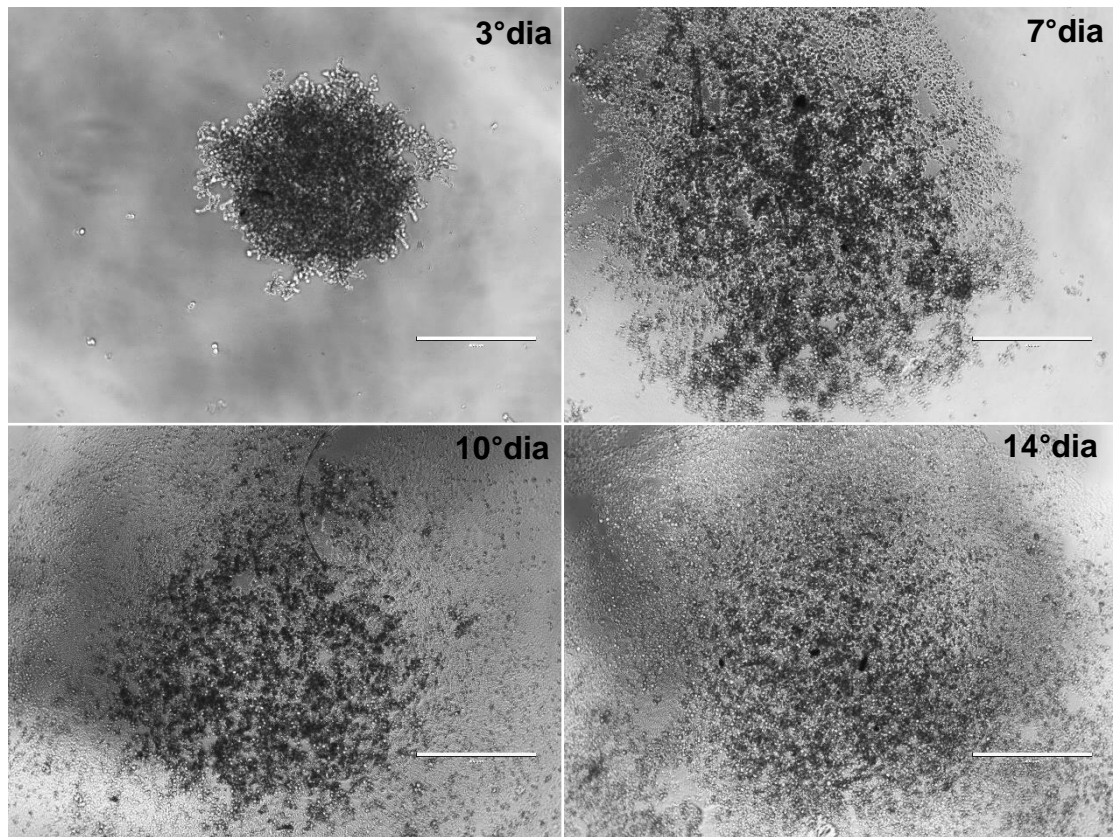
As células da linhagem A549 transfectadas foram plaqueadas em placas de 96 poços usando a mesma metodologia aplicada na curva de crescimento das linhagens A549, não transfectada, e LC-HK2. As micrografias da figura 28 mostram que os esferoides formados a partir das células da linhagem A549 transfectadas com o plasmídeo de controle apresentaram, como esperado, morfologia e diâmetro semelhantes às células não transfectadas (Figura 24). Por outro lado, as células com o *knockdown* de TBX2 formaram agregados celulares no 3º dia de cultivo e já no 7º dia de cultivo as células se dissociaram (Figura 29).

#### A549shControl



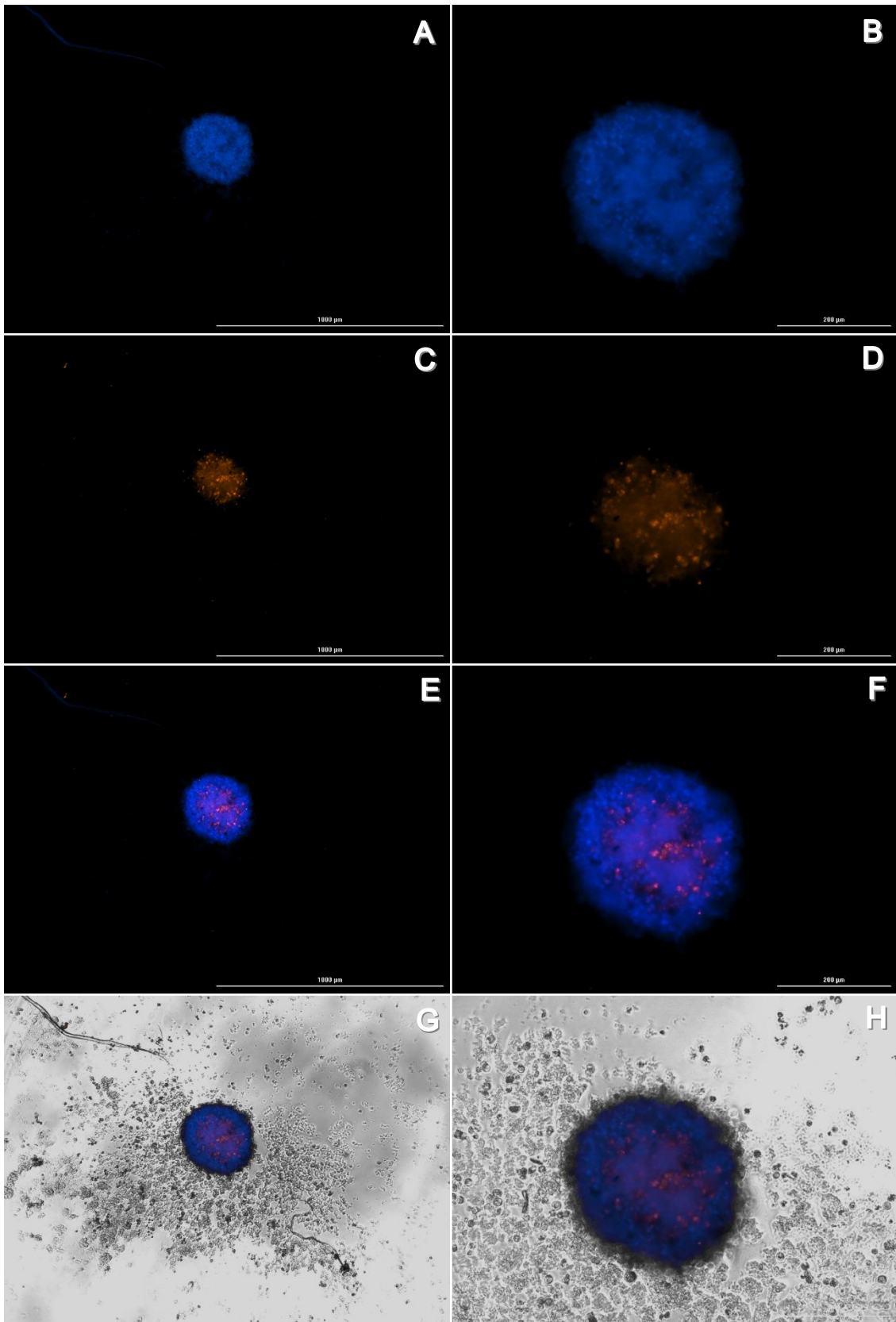
**Figura 28:** Micrografias de contraste de fase dos esferoides de A549shControl com 3, 7, 10 e 14 dias de cultivo. Barras: 400μm.

### A549shTBX2

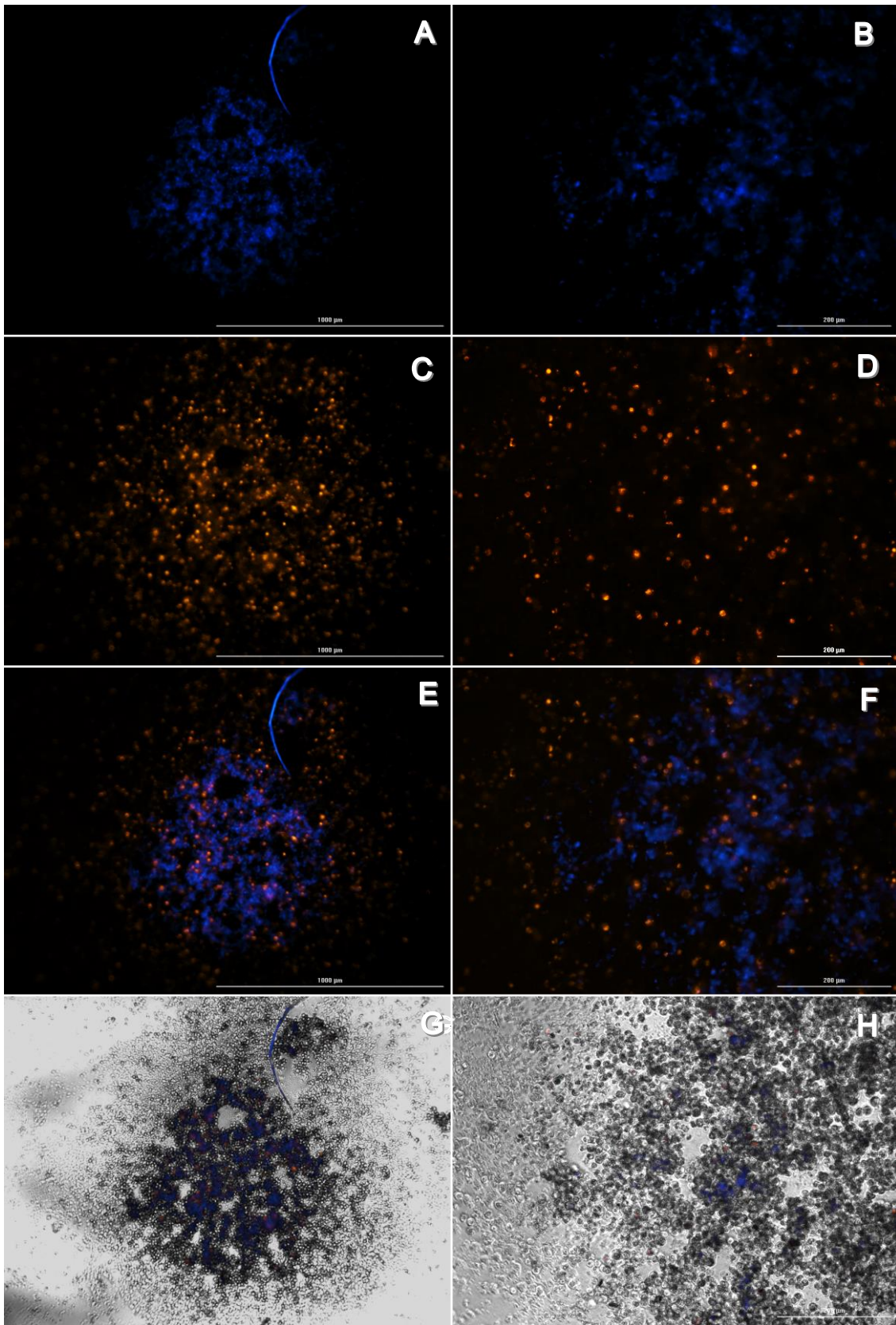


**Figura 29:** Micrografias de contraste de fase dos esferoides de A549shTBX2 com 3, 7, 10 e 14 dias de cultivo. Barras: 400µm.

No 10° dia de cultura as células de A549shTBX2 e os esferoides de A549shControl de alguns poços foram incubados por cerca de 1 hora com iodeto de propídeo (10µg/mL) e Hoechst (20µg/mL) e visualizados no microscópio de fluorescência, *Lion Heart*. O Hoechst pode ser usado para identificar as células vivas em cultura, enquanto o iodeto de propídeo marca as células não viáveis, cujas membranas se tornaram permeáveis ao iodeto. As micrografias da figura 30 mostram que a maioria das células dos esferoides do controle são viáveis, com uma concentração de células não viáveis nas camadas mais internas dos esferoides. Contudo, as células com o *knockdown* de TBX2 apresentaram um padrão distinto de distribuição, isto é, a maioria das células viáveis estavam localizadas na parte central daquilo que teria permanecido dos esferoides e as não viáveis apresentaram um padrão de distribuição aleatório (Figura 31).



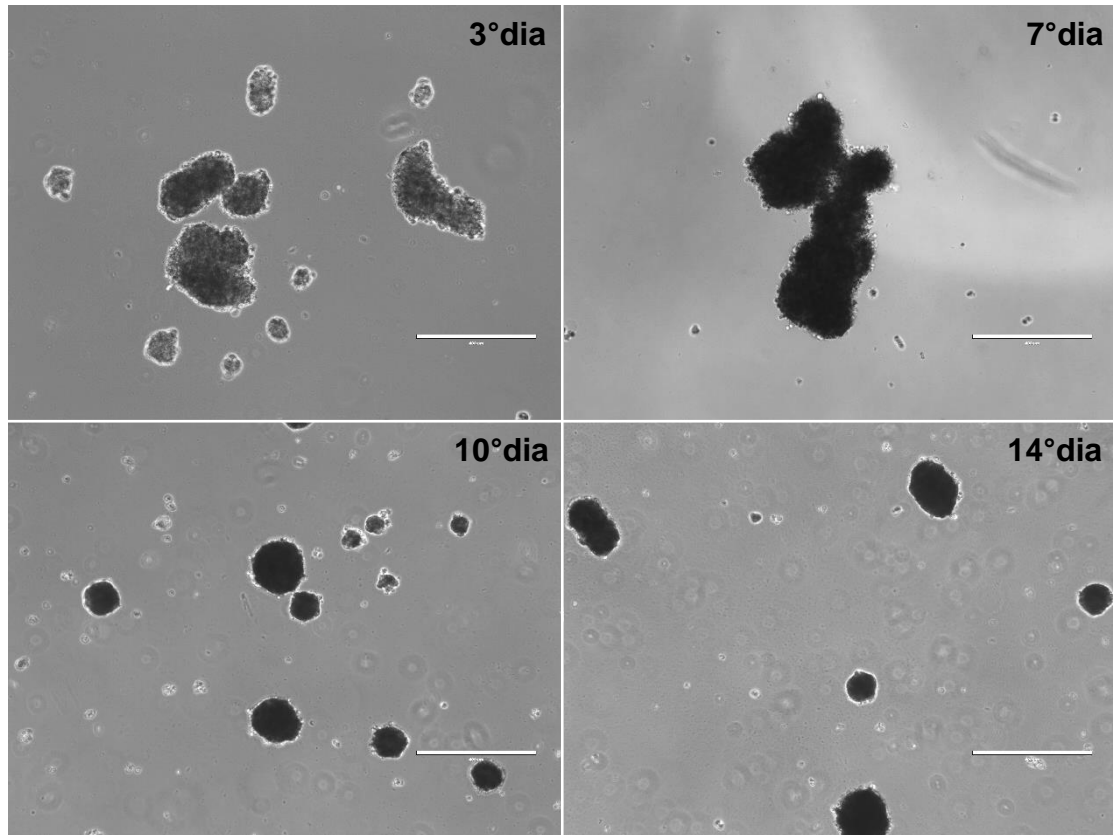
**Figura 30:** Micrografias de Fluorescência e Contraste de Fase dos esferoides de A549shControl. A e B: Hoechst; C e D: Iodeto de Propídeo; E e F: Hoechst e Iodeto de propídeo; G e H: Micrografias de Contraste de fase e fluorescência unidas. Barras:1000 e 200 $\mu$ m.



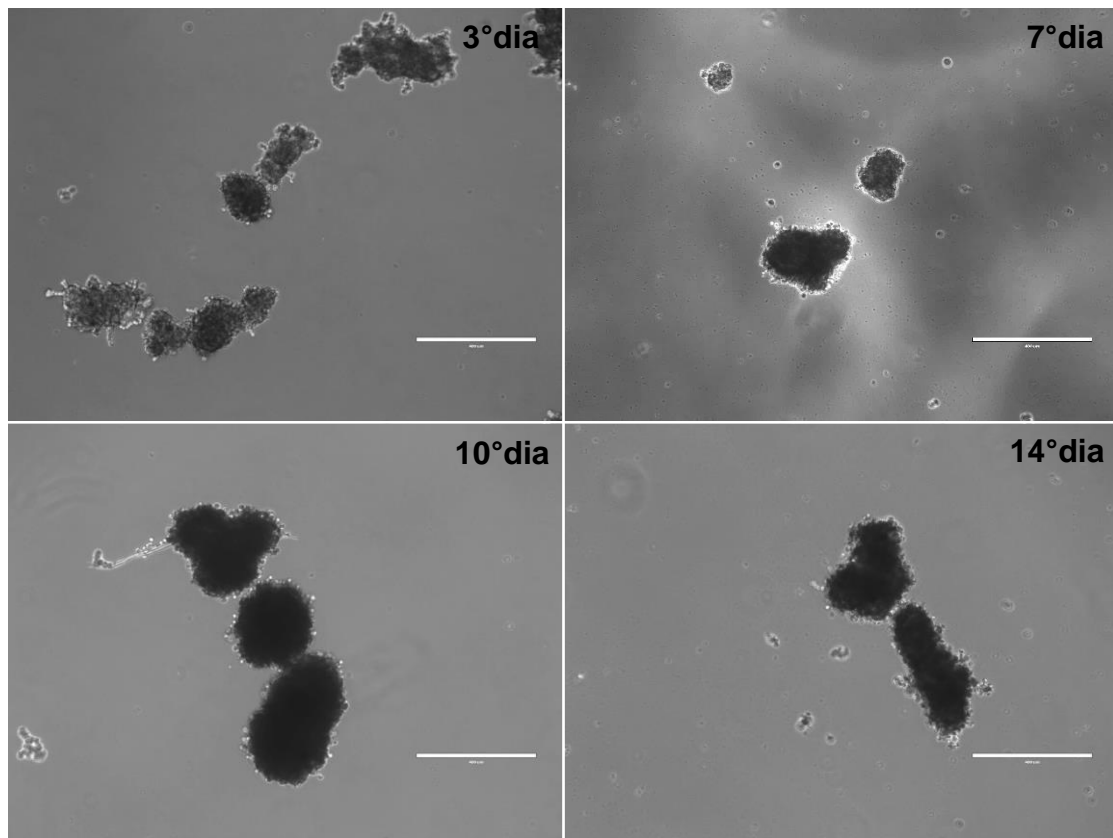
**Figura 31:** Micrografias de Fluorescência e Contraste de Fase dos esferoides de A549shTBX2. A e B: Hoechst; C e D: Iodeto de Propídeo; E e F: Hoechst e Iodeto de propídeo; G e H: Micrografias de Contraste de fase e fluorescência. Barras:1000 e 200μm.

As células com o *knockdown* de TBX2 foram então plaqueadas em placas de 60mm de diâmetro, cobertas com agarose (1%) com uma densidade inicial de  $8 \times 10^4$  células/mL ( $4 \times 10^5$  células/placa) com o intento de avaliar se os esferoides poderiam se formar em condições experimentais diferentes. Os esferoides cultivados em placas de 60mm geralmente apresentam maior variabilidade em seus diâmetros, como exemplificado nas micrografias dos esferoides de A549 mostrados na figura 32. Além disso, os esferoides cultivados em placas de 96 poços, devido ao espaço limitado, estão submetidos a condições físico-químicas ambientais potencialmente estressantes para as células, como tensão superficial do meio, aumento da osmolaridade e diminuição do pH. Conseqüentemente, outras variáveis, de maior relevância, poderiam estar agindo em conjunto com o *knockdown* de TBX2, impedindo a formação de esferoides.

As células de A549shControl e A549shTBX2 foram cultivadas em suspensão por um período de 14 dias. Os esferoides das células A549shControl apresentaram-se semelhantes aos esferoides das células da linhagem A549 não transfectadas (Figuras 32 e 33). Entretanto, as células A549shTBX2 não formaram esferoides e permaneceram em condição de agregados pouco compactos, de vários tamanhos, por 14 dias (Figura 34).

**A549**

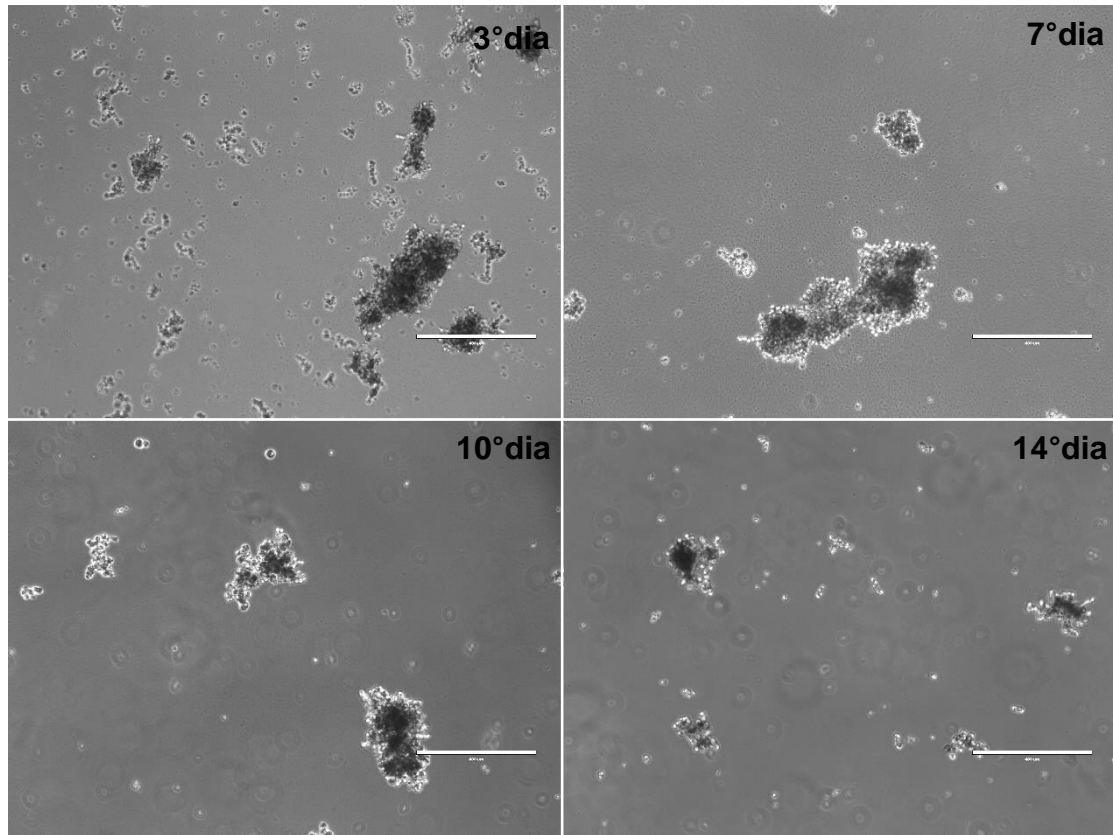
**Figura 32:** Micrografias de contraste de fase dos esferoides de A549 cultivadas em placas de 60mm no 3°, 7°, 10° e 14° dias de cultura. Barras: 400μm.

**A549shControl**

**Figura 33:** Micrografias de contraste de fase dos esferoides de A549shControl cultivadas em placas de 60mm no 3°, 7°, 10° e 14° dias de cultura. Barras: 400μm.



### A549shTBX2



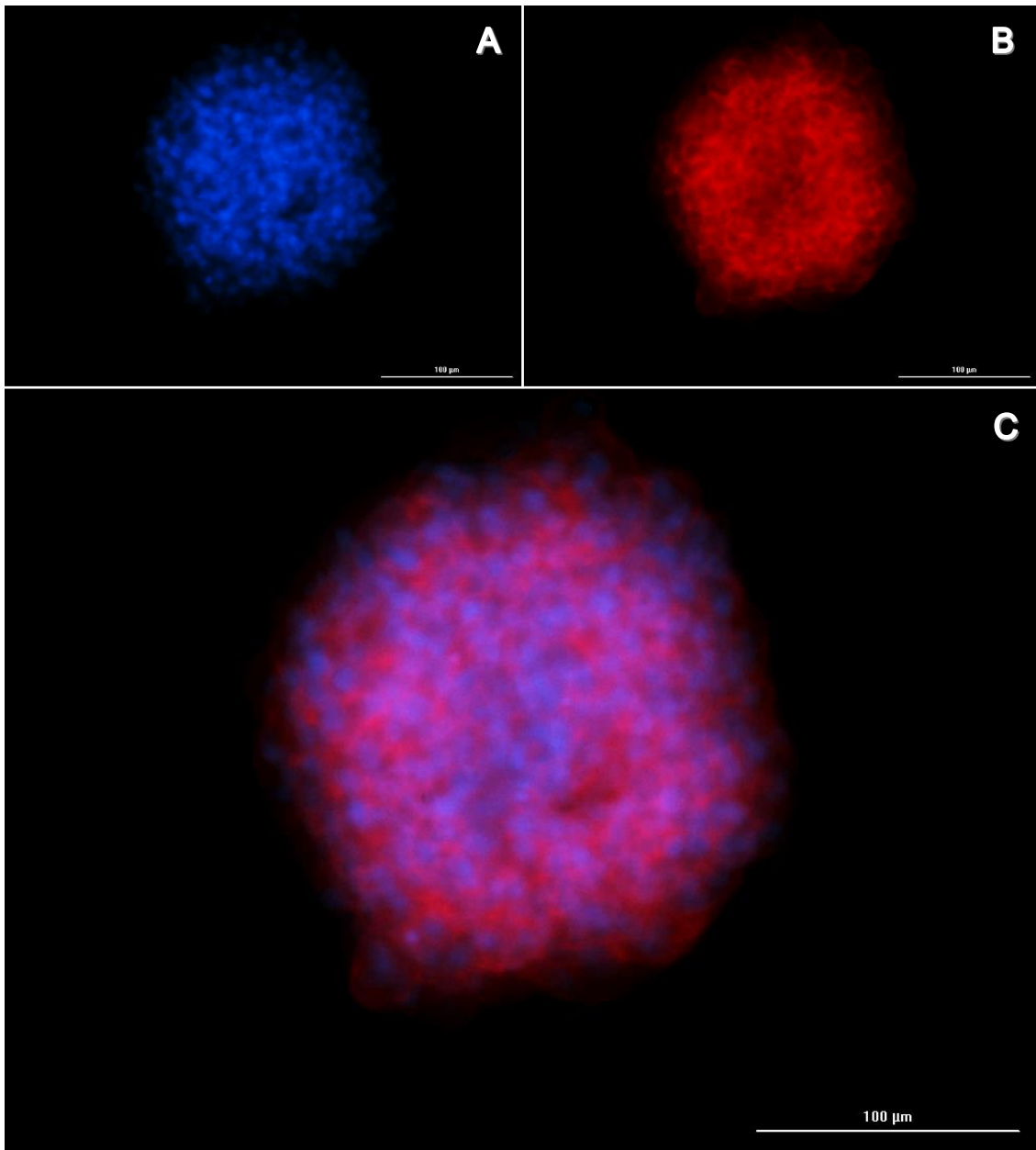
**Figura 34:** Micrografias de contraste de fase dos agregados de A549shTBX2 cultivadas em placas de 60mm no 3°, 7°, 10° e 14° dias de cultura. Barras: 400µm.

Os esferoides de A549, A549shControl e os agregados de A549shTBX2 foram coletados no 14° dia e submetidos a coloração com Faloidina Alexa Fluor-633 e o núcleo com DAPI a fim de investigar possíveis diferenças entre essas estruturas. Os esferoides foram visualizados no microscópio de fluorescência e fotografados. As imagens de microscopia de fluorescência apresentadas nas figuras 35, 36 e 37 não revelaram nenhuma diferença considerável entre as células controle e as células com baixa expressão de TBX2 cultivadas em suspensão. Não foram observados aumento de células apoptóticas ou anomalias na organização do citoesqueleto de actina. A única característica distintiva constatada entre as culturas tridimensionais dos controles e de A549shTBX2 foi o arranjo menos compacto das células nocauteadas. Visto que muitos dos agregados possuíam diâmetro pequeno e baixa densidade, muito material foi perdido no decorrer dos experimentos. Por conseguinte, os

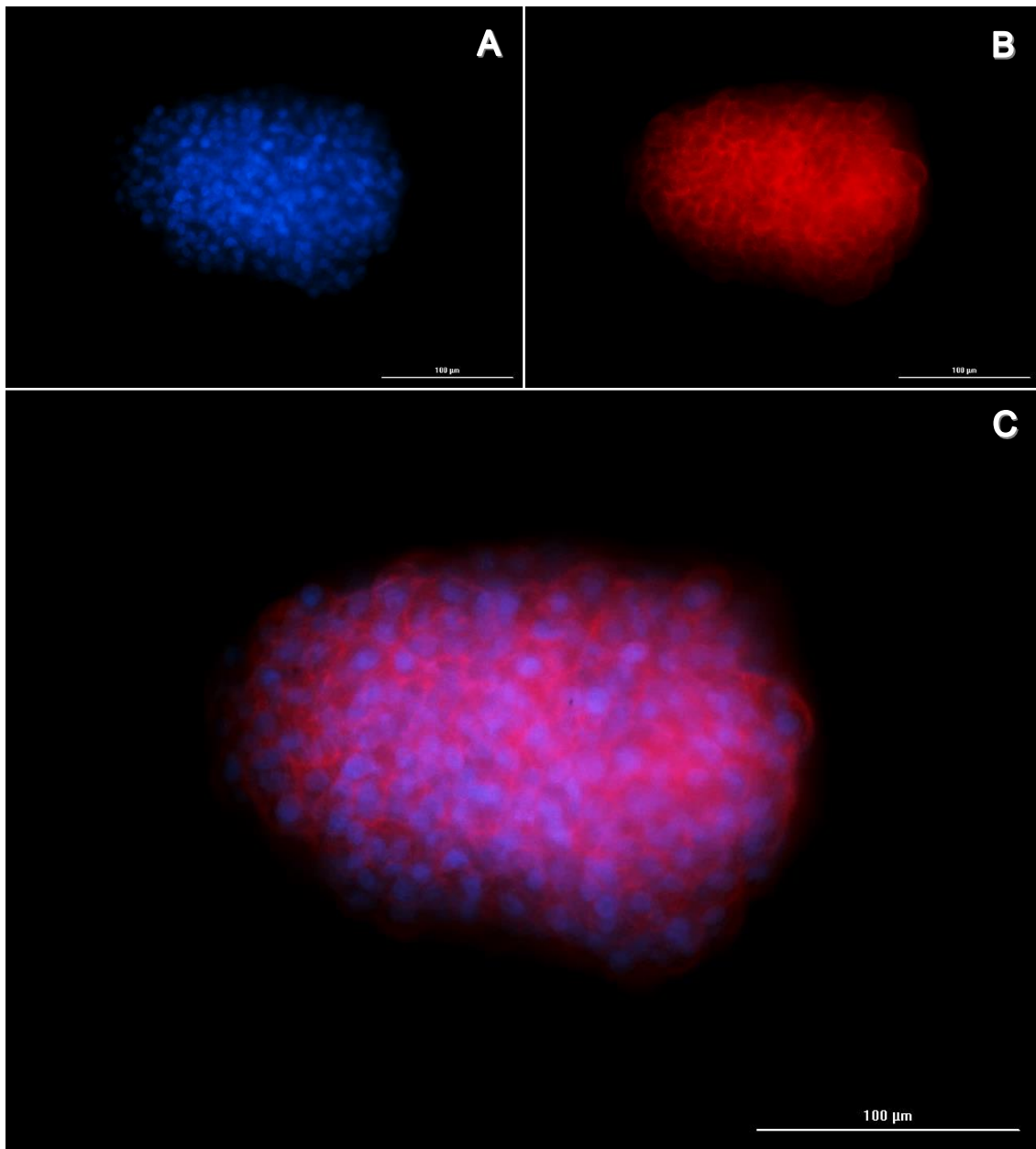
agregados observados nas imagens talvez não representem fielmente a resposta das células nocauteadas na ausência de adesão a um substrato.

A população de células dos esferoides dos controles (A549 e A549shControl) e de A549shTBX2 foram analisadas por meio do ensaio de Ciclo Celular. As células foram plaqueadas em placas de 60mm e no 7º dia de cultura, foram fixadas e coradas com iodeto de propídeo, como descrito na metodologia. Os experimentos foram repetidos três vezes de forma independente. Os resultados da análise do Ciclo Celular são mostrados na tabela 3. A distribuição das populações de células de A549 e A549shControl nas fases do ciclo celular não diferiram muito. Como esperado em esferoides, mais de três quartos das células dos controles se encontravam em G1 (79,12% de A549 e 79,24% de A549shControl). Por outro lado, foi observada uma redução no percentual de células nas S e G2/M (Tabela 3) e um aumento discreto da população de células hipodiplóides (SubG0). As células de A549shTBX2, todavia, apresentaram um acréscimo percentual considerável da população hipodiplóide de 26,1%, e, conseqüentemente, um decréscimo do percentual da população de células nas outras fases do ciclo (Tabela 3 e Figura 38). Esse aumento da população de células em SubG0 indica que o *knockdown* de TBX2 reduziu a resistência das células da linhagem A549 à anoikis, que resultou no aumento de morte celular das células cultivadas em suspensão e, por conseguinte, inibindo a formação de esferoides.

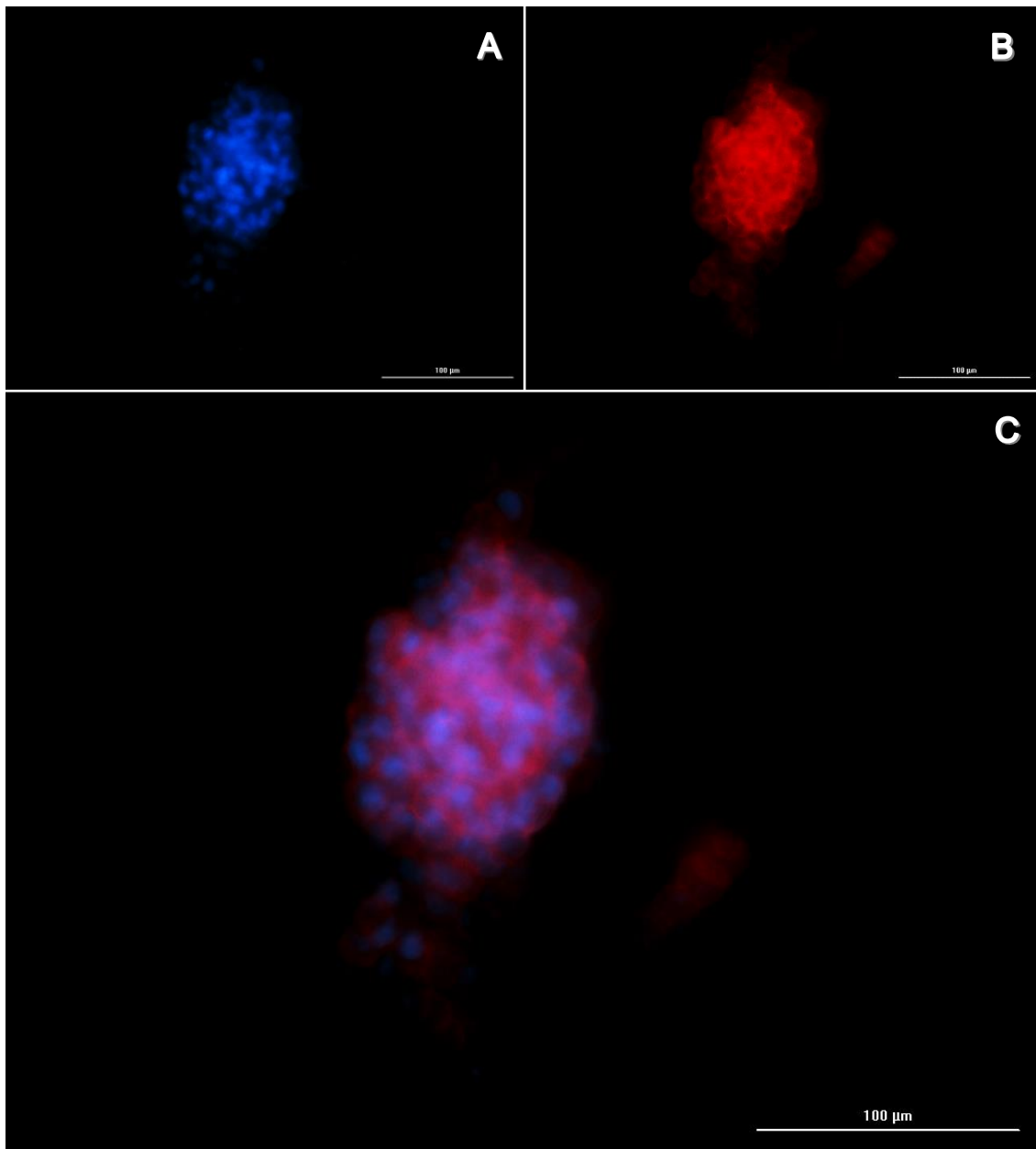
## A549



**Figura 35:** Imagens obtidas no microscópio de fluorescência *Lion Heart* de esferoides da linhagem A549. Em A é possível observar os núcleos das células corados com DAPI. Em B pode ser observado o citoesqueleto de actina das células marcado com Faloidina Alexa Fluor-633. Na imagem C citoesqueleto de actina e núcleo podem ser observados juntos. Barras: 100μm.

**A549shControl**

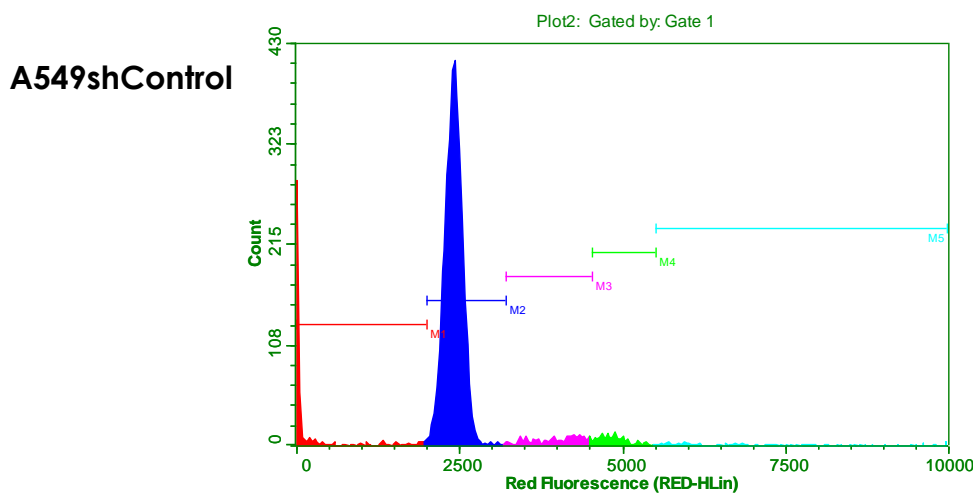
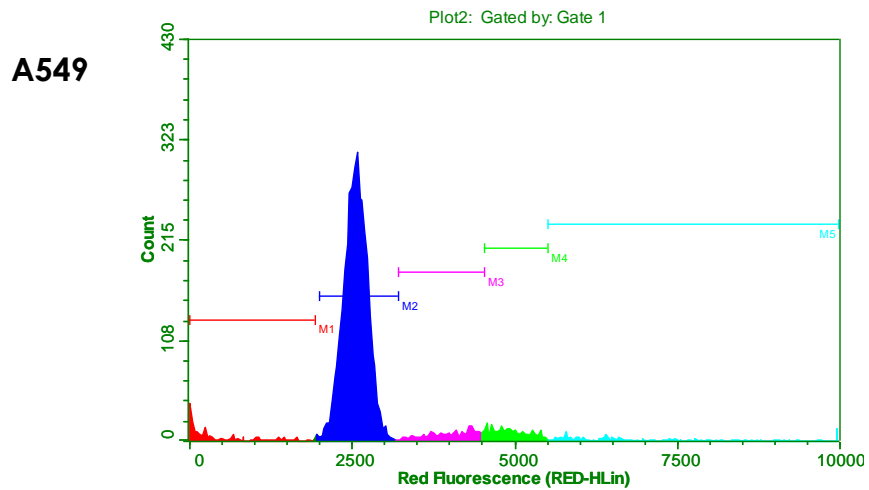
**Figura 36:** Imagens obtidas no microscópio de fluorescência *Lion Heart* de esferoides de A549shControl. Em A é possível observar os núcleos das células corados com DAPI. Em B pode ser observado o citoesqueleto de actina das células marcado com Faloidina Alexa Fluor-633. Na imagem C citoesqueleto de actina e núcleo podem ser observados juntos. Barras: 100μm.

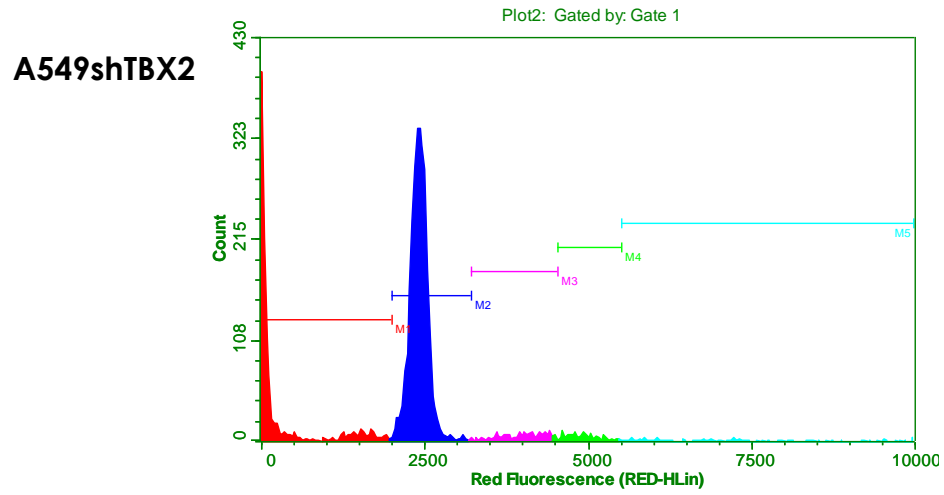
**A549shTBX2**

**Figura 37:** Imagens obtidas no microscópio de fluorescência *Lion Heart* de agregados de A549shTBX2. Em A é possível observar os núcleos das células corados com DAPI. Em B pode ser observado o citoesqueleto de actina das células marcado com Faloidina Alexa Fluor-633. Na imagem C citoesqueleto de actina e núcleo podem ser observados juntos. Barras: 100μm.

**Tabela 3:** Análise do ciclo celular das células dos esferoides de A549 não transfectadas, das células transfectadas com o plasmídeo de controle e das células transfectadas com shTBX2.

	A549	A549shControl	A549shTBX2
<b>SUBG0</b>	4,62%	6,42%	26,1%
<b>G0/G1</b>	79,12%	79,24%	63,5%
<b>S</b>	6,4%	6,04%	4,2%
<b>G2/M</b>	6,14%	5,1%	3,3%
<b>Hipertetraplóides</b>	3,72%	3,2%	2,9%





**Figura 38:** Perfil do ciclo celular dos esferóides de A549 e A549shControl e dos agregados de A549shTBX2. M1(vermelho): hiplodiplóides; M2(azul): G1; M3(rosa):S; M4(verde):G2/M; M4(verde coral):hipertetraplóides.

### 3.8 O *KNOCKDOWN* DE TBX2 PROMOVE STRESS DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E MORTE EM ESFEROIDES DE A549

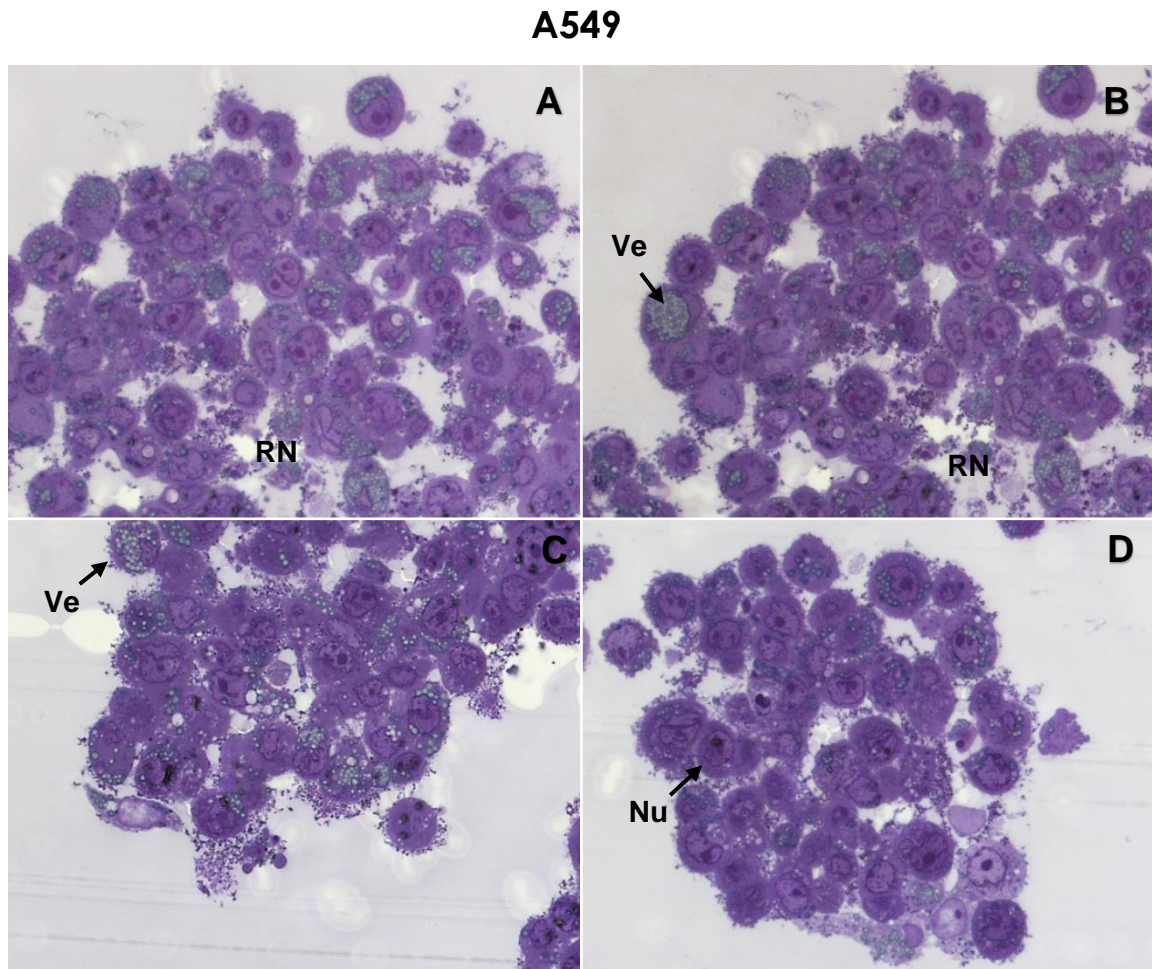
Os esferoides de A549, A549shControl e A549shTBX2 foram plaqueadas em placas de 60mm de diâmetro, cobertas com agarose (1%), cultivados por 7 dias e fixados com uma solução glutaraldeído e formaldeído e foram processados para microscopia eletrônica de transmissão, como descrito em materiais e métodos. As micrografias das figuras 39 - 41 mostram que os esferoides de A549 apresentam uma certa heterogeneidade, com regiões onde as células estão em grande atividade de síntese e regiões, mais internas, é possível observar a presença de células necróticas, provavelmente devido à falta de nutrientes, oxigênio e diminuição do pH (Amaral, Machado-Santelli, 2011; Costa et al., 2016). Nas células em atividade de síntese podem ser observados núcleos grandes com nucléolos proeminentes, abundância de eucromatina e vesículas de secreção, as quais provavelmente secretam surfactantes, considerando o tipo celular pulmonar. Nas regiões necróticas podem ser observados restos celulares e células em estado mais ou menos avançado de morte celular. As imagens também mostram locais de interação entre as células dos esferoides, onde podem ser encontradas junções intercelulares.

As micrografias dos esferoides de A549shControl (Figuras 42 - 44) revelam um padrão semelhante de heterogeneidade, com regiões onde as células estão em atividade de síntese e regiões necróticas, assim como locais onde ocorrem interações entre as células.

Os agregados de A549shTBX2, contudo, não apresentam o mesmo padrão de distribuição (Figuras 45-48). Regiões onde ocorrem células em fase de síntese e células que não são mais viáveis (necróticas, apoptóticas ou necroptóticas) apresentam distribuição aleatória. Nas células viáveis o retículo endoplasmático se apresenta como longas estruturas membranosas lineares, onduladas ou espiraladas que estão difundidas por todo o citoplasma, sugerindo stress do retículo. O stress do retículo pode também ser observado nas micrografias de contraste de fase dos cortes semi-finos como várias estruturas esféricas semelhantes a vacúolos (Figuras 45C-F). Por fim, foi possível constatar

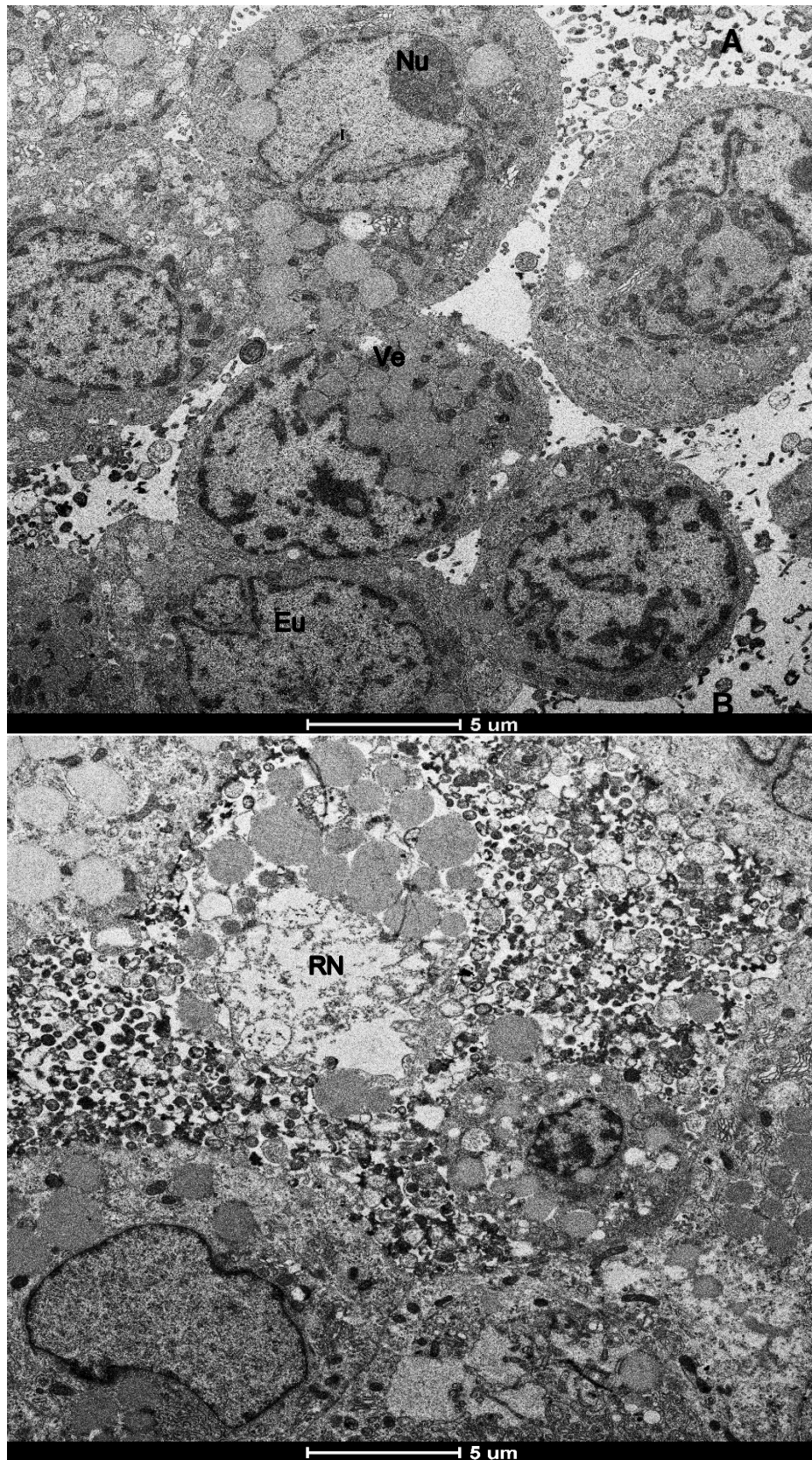


a total ausência de locais de interação intercelulares nas células dos agregados de A549shTBX2, indicando que as junções intercelulares não estão presentes.



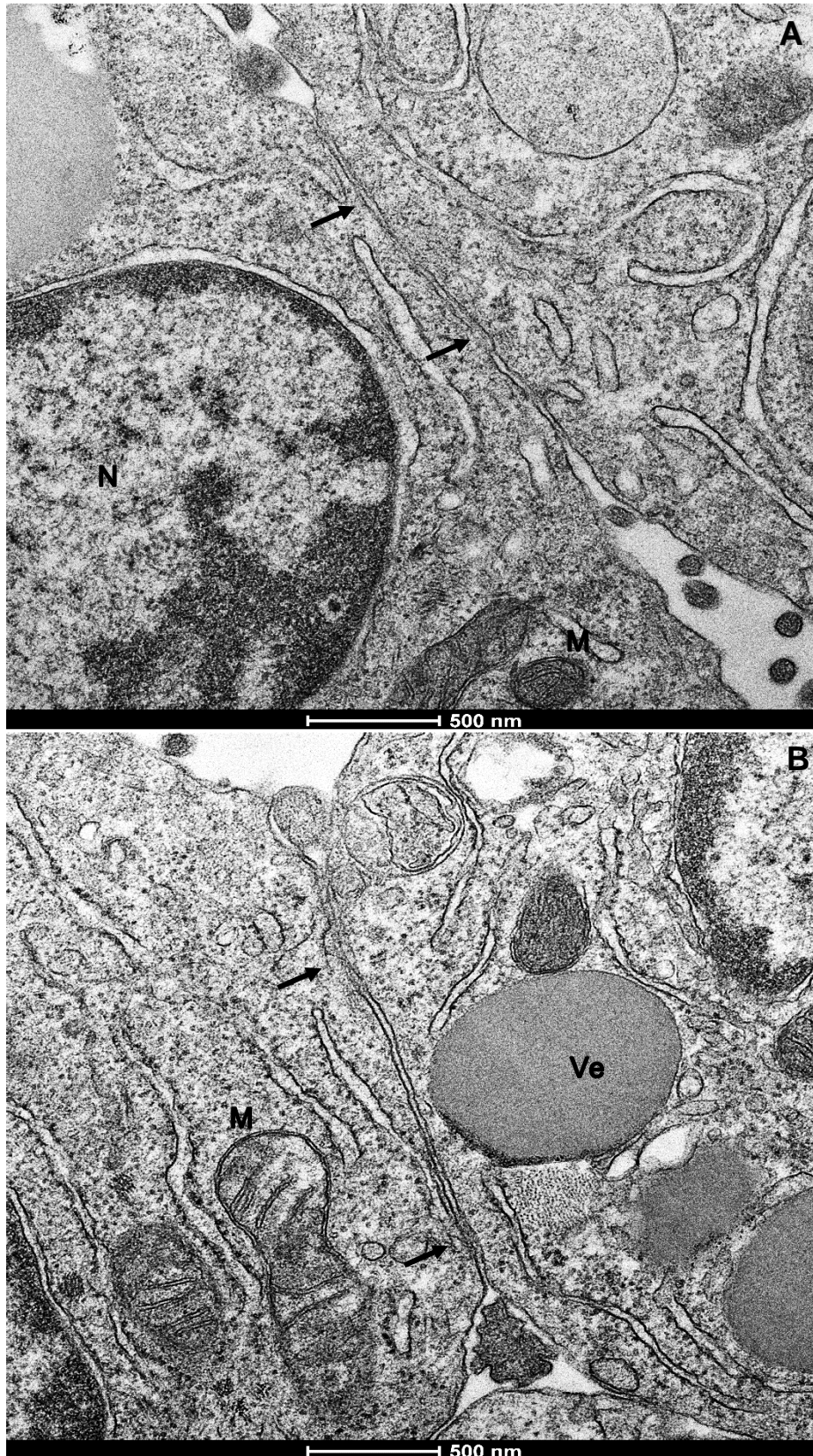
**Figura 39:** Imagens de microscopia de luz de cortes semi-finos corados com azul de toluidina (A, B, C e D) dos esferoides de A549 com 7 dias em cultura. RN (região necrótica); Nu (nucléolo); Ve (vesículas de secreção, cinza). Aumento da objetiva: 40x.

## A549

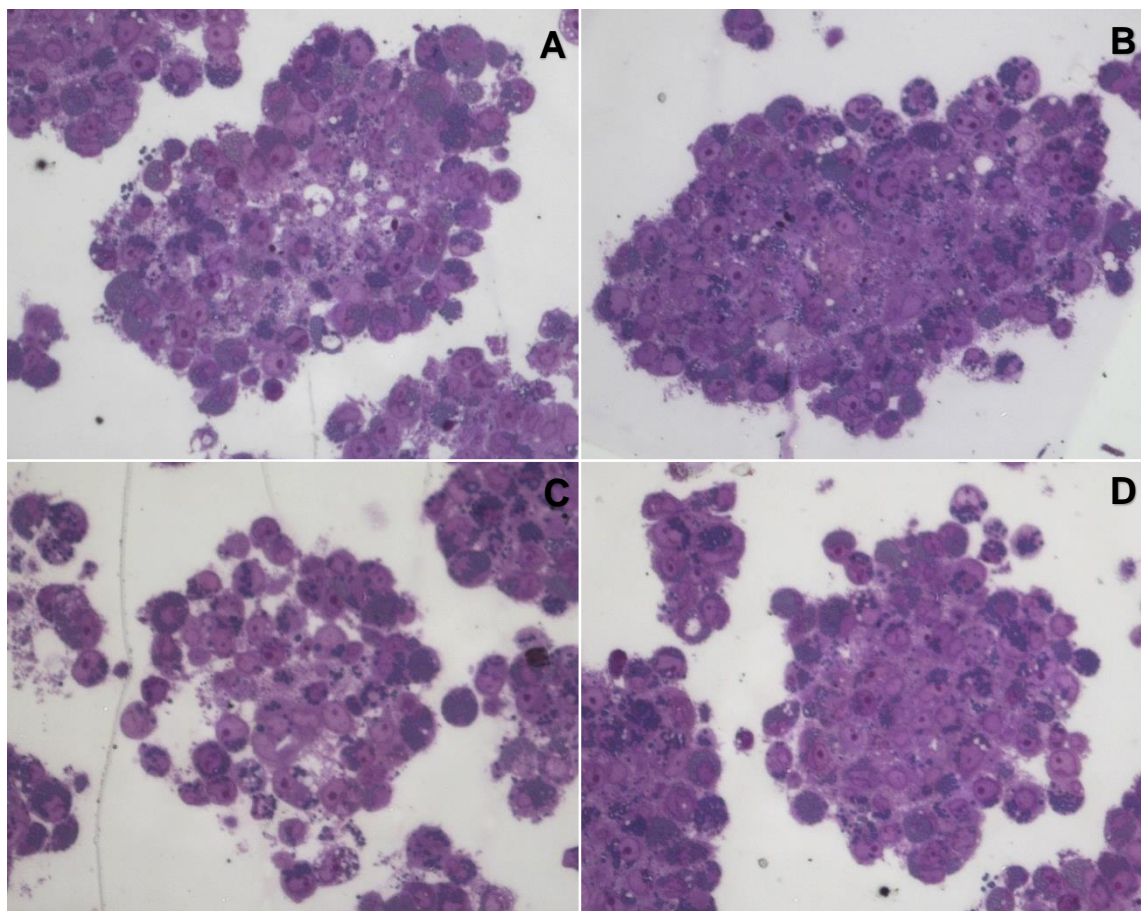


**Figura 40:** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (A e B) dos esferoides de A549 com 7 dias em cultura. A: Ve (vesículas de secreção); Nu (nucléolo); Eu (eucromatina). B: RN (região necrótica). Aumento das imagens de microscopia eletrônica: x1700. Barras: 5µm.

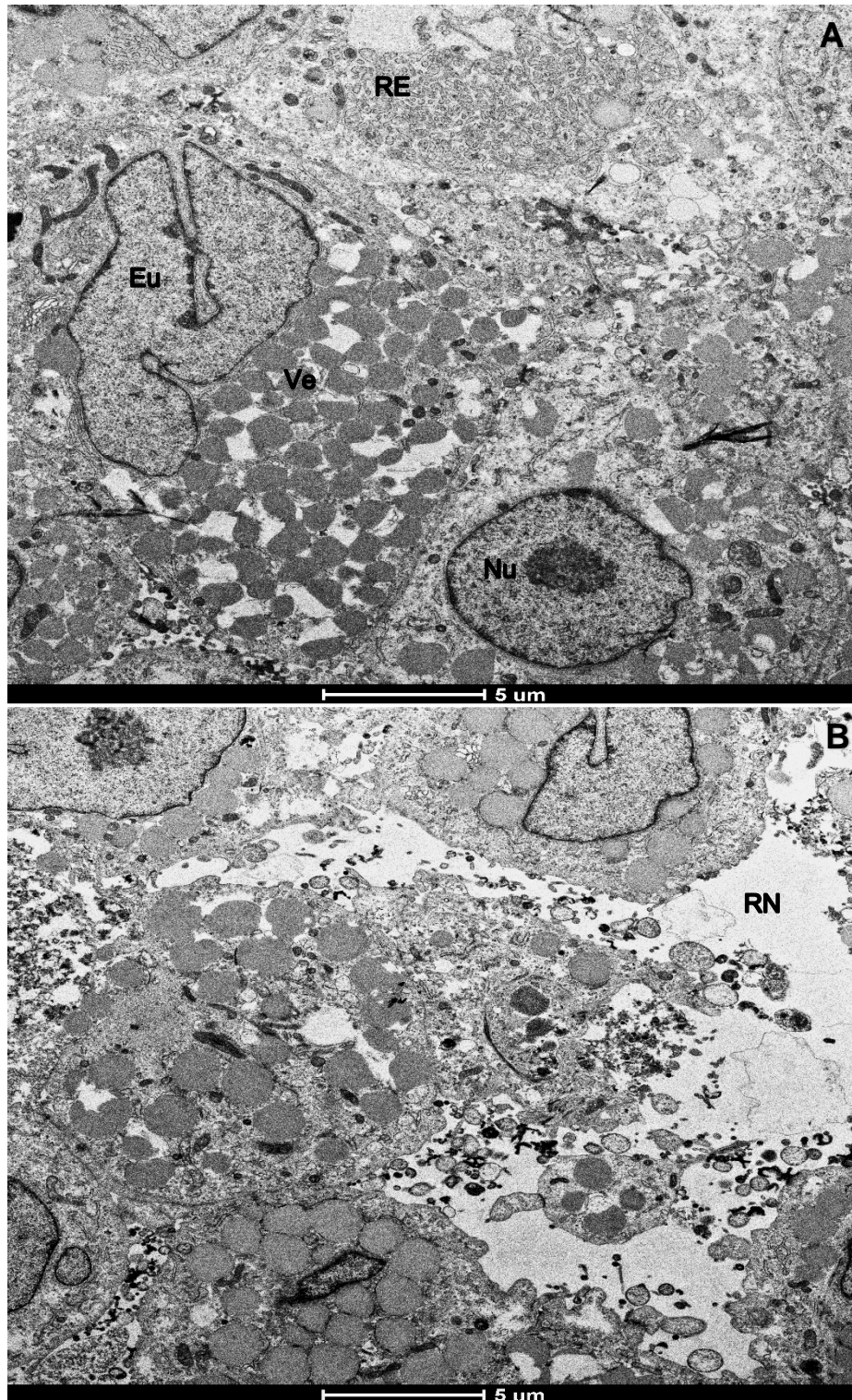
## A549



**Figura 41:** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos esferoides de A549 com 7 dias em cultura, mostrando em detalhes compartimentos celulares e regiões de contato entre as células. A: N (núcleo), M (mitocôndria); B: Ve (vesícula de secreção), M (mitocôndria). As setas indicam locais onde ocorrem junções intercelulares. Aumento das imagens de microscopia eletrônica 14500x. Barras: 500nm.

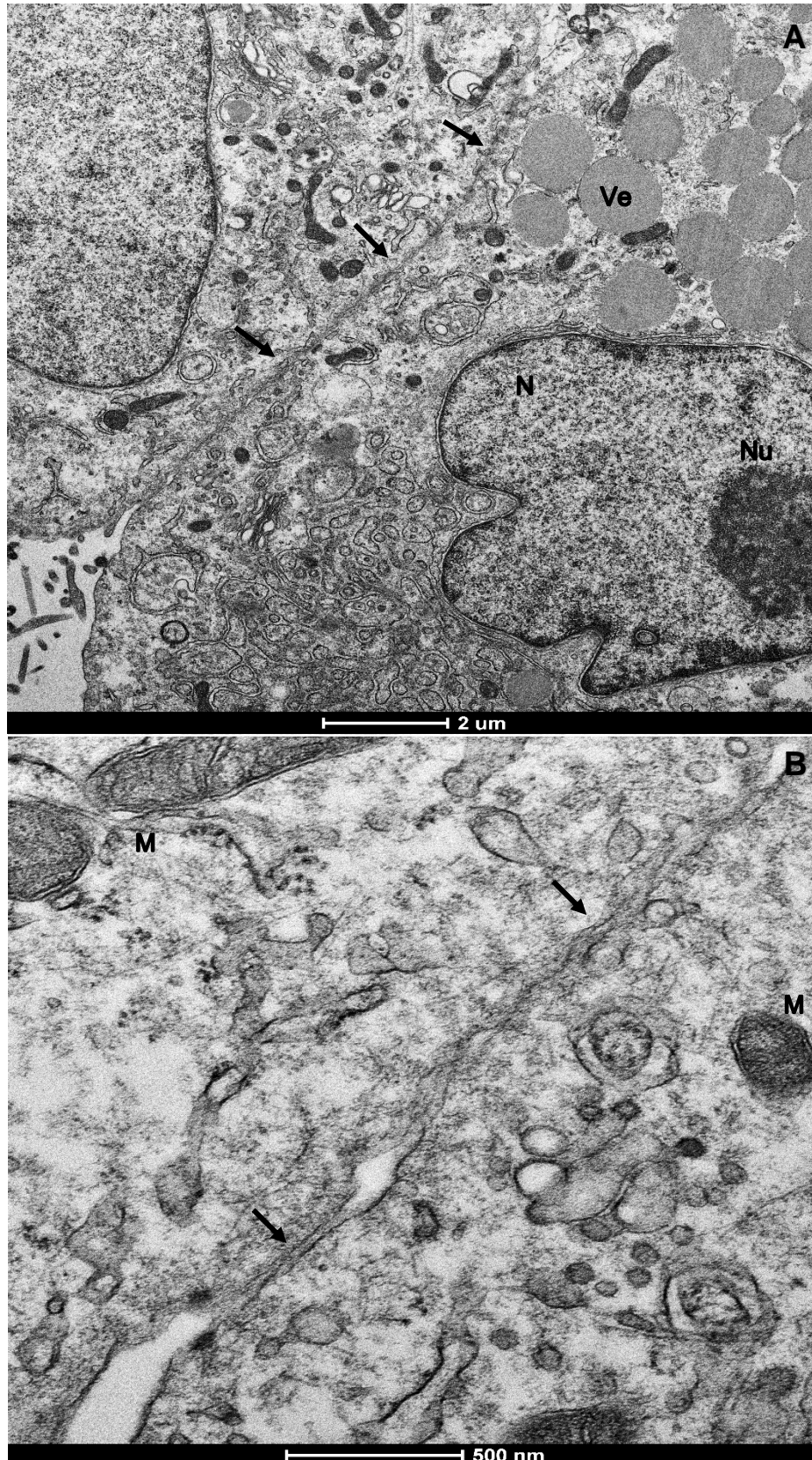
**A549shControl**

**Figura 42:** Imagens de microscopia de luz de cortes semi-finos corados com azul de toluidina (A, B, C e D) dos esferoides de A549shControl com 7 dias em cultura. As micrografias mostram 2 cortes semi-finos dos mesmos esferoides (A e B; C e D) em diferentes seções. Em B e D é possível observar as camadas mais superficiais, enquanto em A e C é possível observar as camadas mais internas. Aumento da objetiva: 20x.

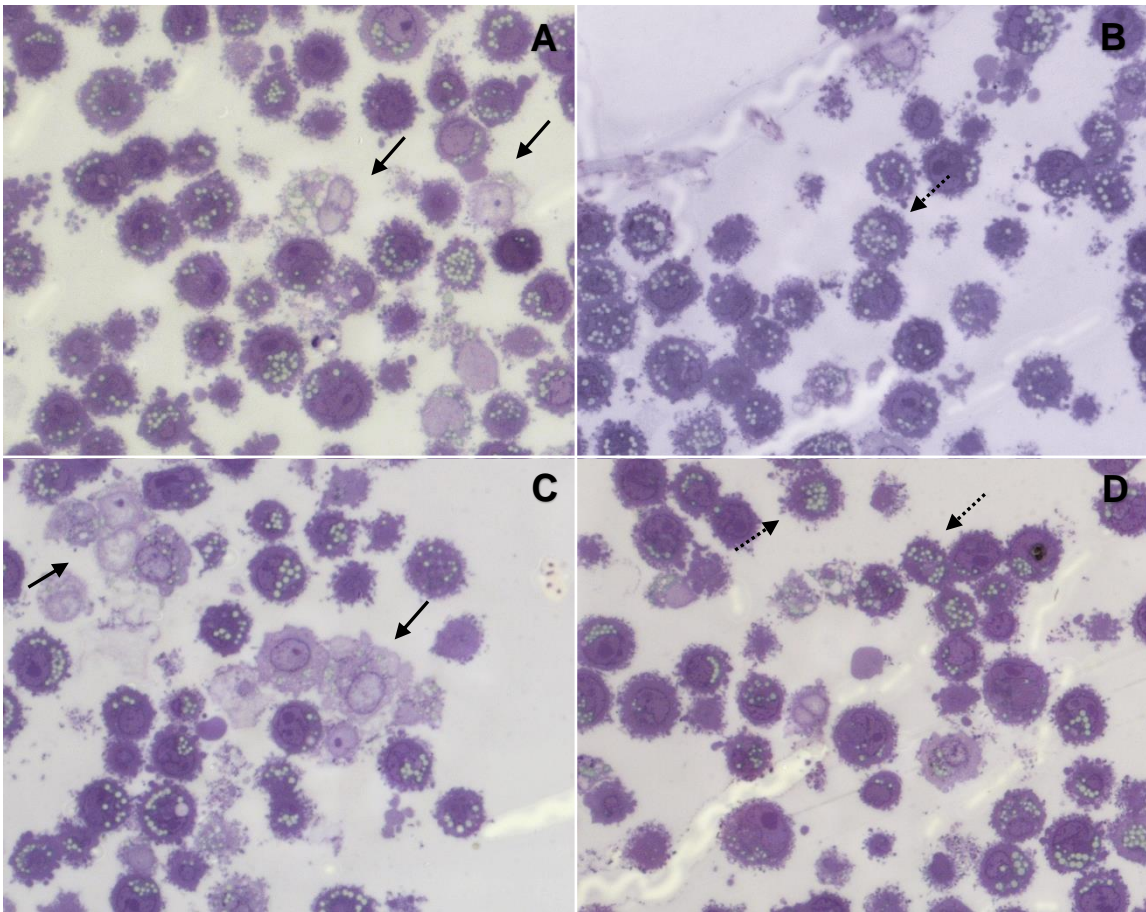
**A549shControl**

**Figura 43:** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (A e B) dos esferoides de A549shControl com 7 dias em cultura. A: Ve (vesículas de secreção); Nu (nucléolo); Eu (eucromatina); RE (retículo endoplasmático). B: RN (região necrótica). Aumento das imagens de microscopia eletrônica: x1700. Barras: 5µm.

## A549shControl

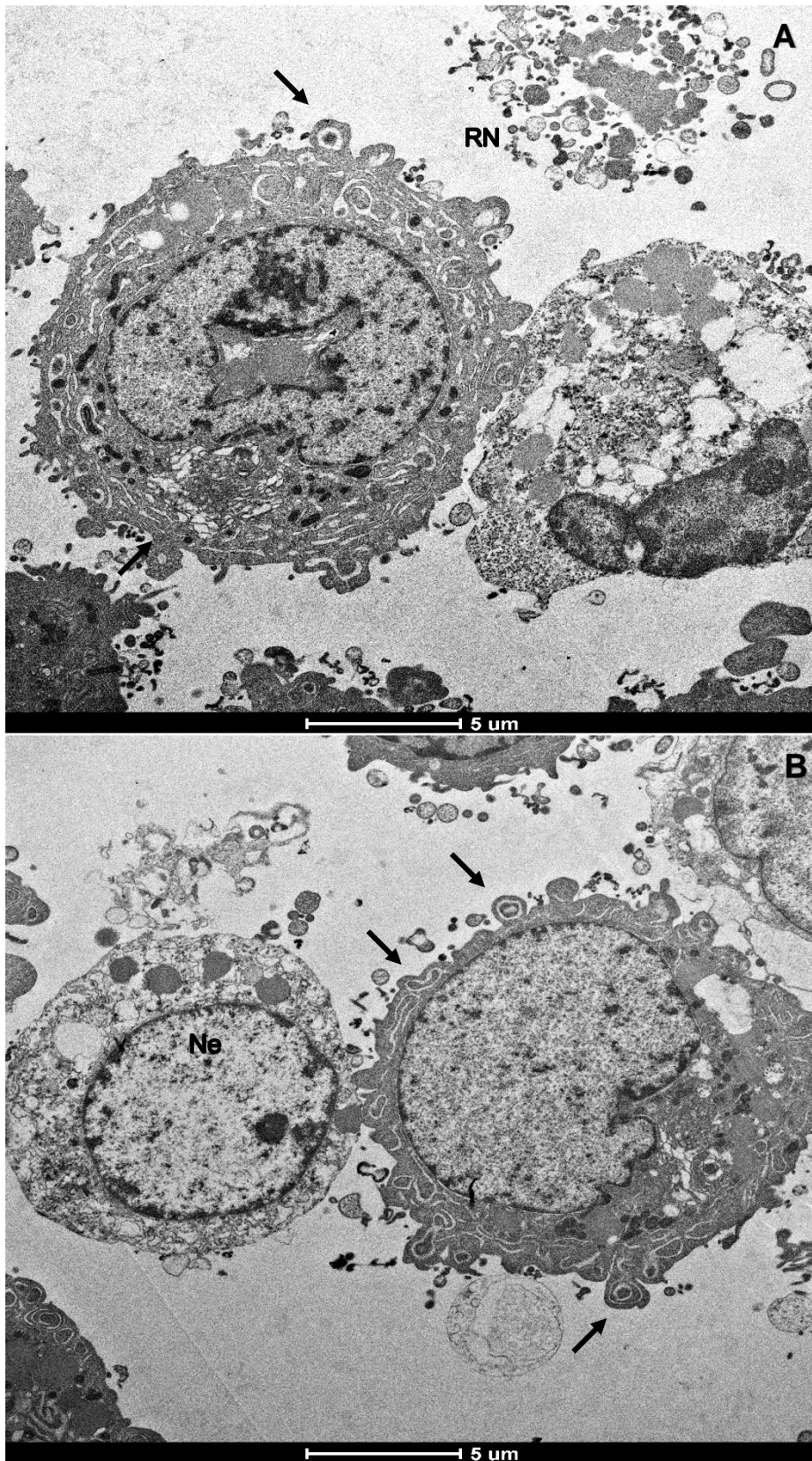


**Figura 44:** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos esferoides de A549shControl com 7 dias em cultura, mostrando em detalhes compartimentos celulares e regiões de contato entre as células. A: N (núcleo), Nu (nucléolo), Ve (vesícula de secreção); B: M (mitocôndria). As setas indicam locais de interação intercelulares. Aumento das imagens de microscopia eletrônica 3500x e 19000x. Barras: 2μm e 500nm.

**A549shTBX2**

**Figura 45:** Imagens de microscopia de luz de cortes semi-finos corados com azul de toluidina (A, B, C e D) dos agregados de A549shTBX2 com 7 dias em cultura. As setas em A e C mostram stress do retículo. Em B e D as setas com traços mostram células não-viáveis. Aumento da objetiva: 20x.

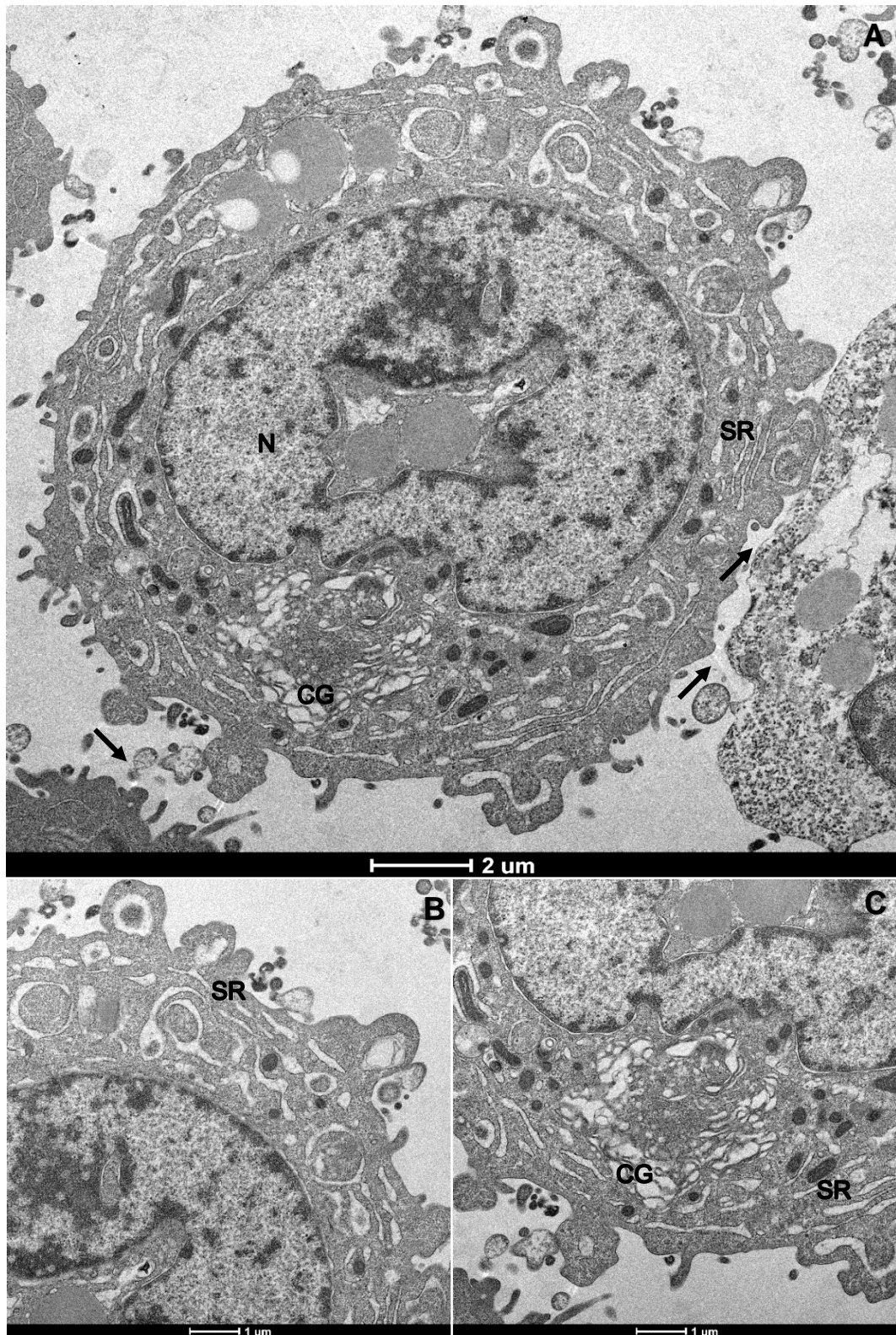
## A549shTBX2



**Figura 46:** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (A e B) dos agregados de A549shTBX2 com 7 dias em cultura. A: RN (região necrótica); B: Ne (necroptose), setas em A e B, mostram stress do retículo. Aumento das imagens de microscopia eletrônica: x1700. Barras: 5μm.

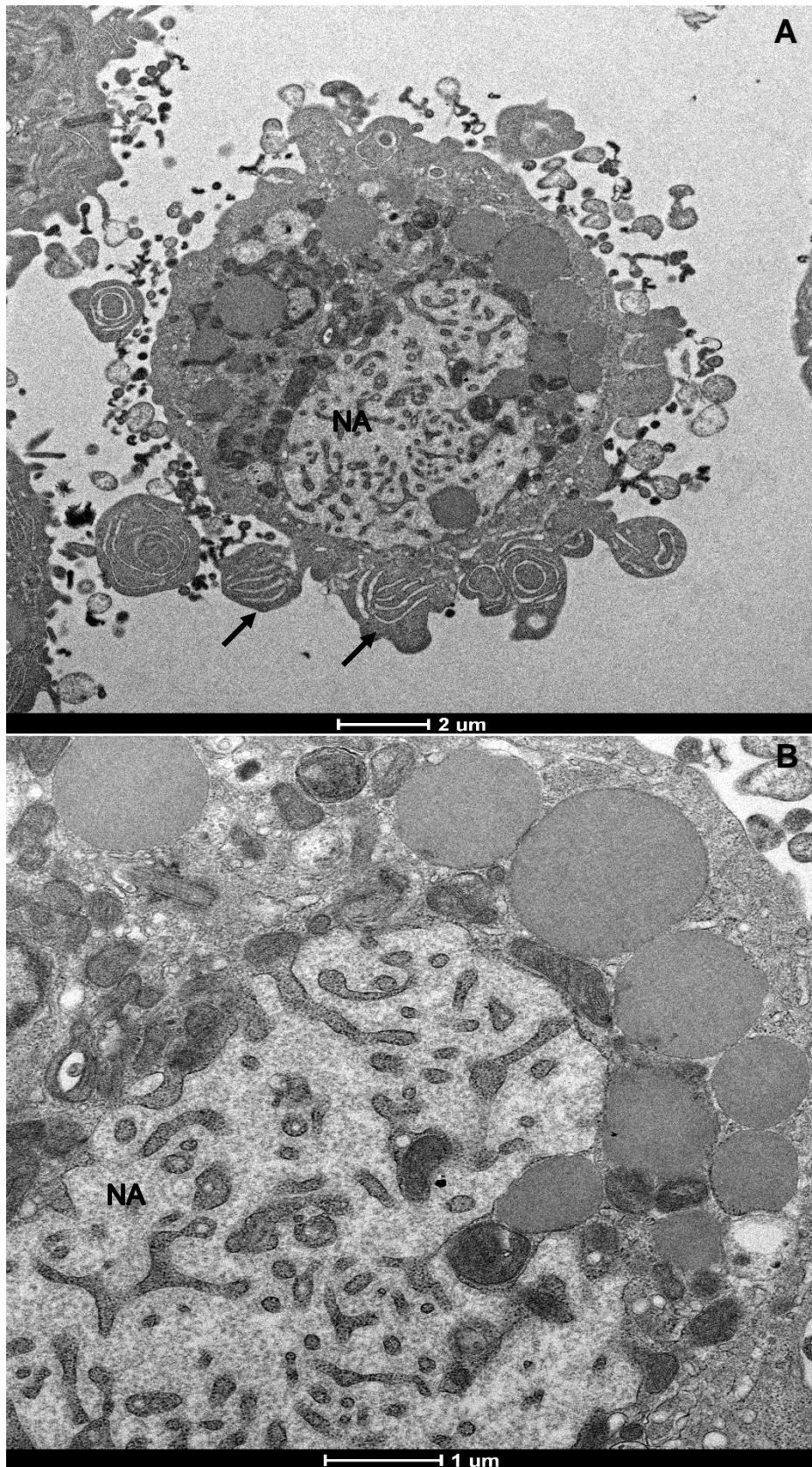


## A549shTBX2



**Figura 47:** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos esferoides de A549shTBX2 com 7 dias em cultura, mostrando uma célula com stress do retículo. A, B e C: CG (complexo de Golgi); SR (stress do retículo); N (núcleo). As setas indicam a ausência de interações intercelulares. Aumento das imagens de microscopia eletrônica 2500x e 6500x. Barras: 2 $\mu$ m e 1 $\mu$ m.

## A549shTBX2



**Figura 48:** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos esferoides de A549shTBX2 com 7 dias em cultura, mostrando uma célula em apoptose. A: NA (núcleo apoptótico); B: NA (núcleo apoptótico). As setas indicam estresse do retículo. Aumento das imagens de microscopia eletrônica 2500x e 6500x. Barras: 2µm e 1µm.

# 4 Discussão

TBX2 desempenha um papel fundamental durante o desenvolvimento dos pulmões em embriões de camundongos, regulando negativamente a expressão gênica de inibidores do ciclo celular, *Cdkn1a* (p21) e *Cdkn1b* (p27), e de antagonistas da via Wnt, *Frzb* (Frizzled Related Protein) e *Shisa3* (Shisa Family Member 3) (Lüdtke et al., 2013; Lüdtke et al., 2016). E, em células multi-potentes de pulmão humano, a ativação da via Axl, um receptor tirosina-quinase, promove a expressão transcricional de TBX2, o qual contribui para a transição epitélio-mesenquimal do fenótipo celular, através da modulação negativa de genes envolvidos na especialização celular, como *E-caderina* e *ZO-1*. (Fujino, Kubo e Maciewicz, 2017). Esse mecanismo de repressão transcricional de inibidores do ciclo celular (supressores tumorais) e de genes que participam da especialização celular foi observado em alguns tipos de câncer cuja expressão proteica de TBX2 é elevada, como no câncer gástrico (Liu et al., 2018), de mama (Crawford et al., 2019; D'Costa et al., 2014; Redmond et al., 2010), próstata (Du et al., 2017), nasofaringe (Lv et al., 2017), laringe (Huang et al., 2014), rabdomiossarcoma (Mohamad et al., 2018; Zhu et al., 2016), glioblastoma (Yi et al., 2017), neuroblastoma (Decaestecker et al., 2018) e melanoma (Vance et al., 2005).

Embora o papel de TBX2 nesses tipos de câncer parece seguir mecanismos semelhantes, promovendo a proliferação, isso não se aplica para o câncer de pulmão. Os estudos publicados até o momento são contraditórios, ora atribuindo ao TBX2 a função de supressor tumoral (Khalil et al., 2017; 2018; Nehme et al., 2019) ora envolvido em processos oncogênicos (Hu, Um e Zhang, 2014; Yu et al., 2020; Zhang, Guo, 2014). Os resultados da avaliação da proliferação celular obtidos nesse trabalho mostraram que o *knockdown* de TBX2 promoveu um discreto aumento da viabilidade celular em células da linhagem A549, sendo que esse discreto aumento poderia ser atribuído à parada das células de A549shTBX2 na fase S ou G2/M, ao aumento de células binecluídas ou poderia ser um evento puramente estocástico (Davis et al., 2008; Wansleben et al., 2013). Não obstante esses estudos poderiam dar respaldo à discreta diferença mostrada nos resultados apresentadas nesse trabalho, estes devem ser considerados com cautela. Assim como muitos fatores de transcrição, TBX2 pode ser regulado por cofatores (EGR1, HDAC1) que irão determinar seus alvos ou conjunto de alvos, dependendo do estímulo e contexto celular (D'Costa et al.,

2014; Mohamad et al., 2018; Redmond et al., 2010; Vance et al., 2005; Zhu et al., 2016).

A formação de metástases a partir de um tumor primário é um processo composto por várias etapas, conhecido como cascata invasão-metástase (Talmadge, Fidler, 2010). As etapas iniciais dessa cascata são caracterizadas pela aquisição de propriedades fenotípicas que permitem as células de sair do sítio primário, alcançando tecidos distantes. Em carcinomas essa mudança fenotípica é caracterizada pela perda de polaridade celular, adesão célula-célula, obtenção de capacidades migratórias e a capacidade de reorganizar a matriz extracelular. Esse processo biológico celular é denominado transição epitélio-mesenquimal (TEM), no qual as células perdem seus traços fenotípicos epiteliais e convergem para um fenótipo mesenquimal. As vias de sinalização TEM são, de forma geral, iniciadas pela ativação de receptores que desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular, as quais são coordenadas por fatores de transcrição TEM (Snail, Slug, Twist, Zeb1 e Zeb2). Esses fatores de transcrição fazem repressão transcricional de genes que contribuem na formação do fenótipo epitelial, induzindo concomitantemente a expressão transcricional de genes que caracterizam o fenótipo mesenquimal (Lambert, Pattabiraman, Weinberg, 2016; Pearson, 2019).

Em estudos correlacionais e análises *in silico* (data sets) TBX2 foi associado à presença de metástases, acometimento linfonodal e tempo reduzido de sobrevivência livre de metástase (Du et al., 2017; Jolly et al., 2019; Lv et al., 2017; Nadana et al., 2017; Wang et al., 2012; Yu et al., 2020). Em modelos celulares de câncer de mama, próstata, nasofaringe, gástrico e carcinoma adrenocortical TBX2 promove migração e invasão através da transição epitélio-mesenquimal, contribuindo, assim, para resistência à anoikis (Ismail, Bateman, 2009; Jolly et al., 2019; Liu et al., 2018; Lv et al., 2017; Nandana et al., 2017; Wang et al., 2012). O mesmo fenômeno foi observado em linhagens de carcinoma de células não pequenas de pulmão (A549 e HCI-1299), corroborando com os resultados obtidos no presente estudo, no qual o knockdown de TBX2 inibiu a formação de esferoides e reduziu a resistência à anoikis (Kumar et al., 2011; Yu et al., 2020). Como observado nas microscopias de fluorescência (Figura 31) e de luz de cortes semifinos (Figura 45) o

knockdown de TBX2 inibiu a formação de esferoides. E, como mostrado nas imagens do ensaio de viabilidade com Iodeto de propídeo e Hoechst, as células dos agregados não apresentaram um padrão de organização geralmente observado em esferoides (Figura 31), no qual as células não viáveis estão concentradas nas camadas mais centrais dos esferoides e as viáveis nas camadas mais externas, representada pelo controle (Figura 30).

No câncer TBX2 é capaz de promover a TEM, que confere resistência à anoikis, por meio da repressão transcricional direta de *CDH1* (E-caderina), regulação negativa de outros marcadores do fenótipo epitelial e supressão de mediadores e efetores da via de sinalização de anoikis (p14ARF, p21, ZO1,  $\beta$ -catenina). Além disso, TBX2 promove a expressão, direta ou indiretamente, de marcadores do fenótipo mesenquimal, como WNT3A, N-caderina, Vimentina, MMP9, MMP2, Snail, Twist (Crawford et al., 2019; Du et al., 2017; Lingbeek, et al., 2002; Liu et al., 2018; Nadana et al., 2017; Yi et al., 2017; Wang et al., 2012).

Em células epiteliais a repressão transcricional de *E-caderina* é uma etapa crítica para a sobrevivência da célula em suspensão, salvo algumas exceções (células sem expressão endógena de e-caderina). De fato, sua expressão aumenta quando as células perdem adesão ao substrato, induzindo anoikis. Dois mecanismos pró-sobrevivência foram bem caracterizados em linhagens de NSCLC, NRAGE/TBX2 e TLE1/ZEB1. NRAGE (Neurotrophin Receptor-Interacting MAGE Homolog) geralmente é considerado um supressor tumoral, sendo capaz de promover apoptose, entretanto sua função depende de sua localização dentro da célula (Paoli et al., 2019; Zhang, Zhou, Xue, 2016). Com a perda de adesão, o complexo e-caderina/anquirina-G sequestram NRAGE no citoplasma, promovendo anoikis. A repressão transcricional de *e-caderina* e, posteriormente de *anquirina-G*, permite a NRAGE se deslocar para o núcleo, no qual NRAGE forma um complexo com TBX2 inibindo diretamente a expressão de *p14ARF*, conferindo resistência à anoikis (Kumar et al., 2011).

Outro mecanismo de resistência à anoikis observado na linhagem A549 de adenocarcinoma e BEAS-2B (linhagem não tumoral imortalizada) é por meio do complexo TLE1/ZEB1/HDAC, o qual inibe diretamente a expressão transcricional de *e-caderina*. A via de anoikis observada nessas linhagens é regulada pela perda de adesão da integrina, a qual promove o deslocamento de

Bit-1 (uma proteína mitocondrial) para o citoplasma. No citoplasma Bit-1 forma um complexo com AES (Transcriptional Amino Enhancer Slip) e inibe a supressão transcricional de e-caderina por TLE1/ZEB1/HDAC, induzindo apoptose independente de caspase (Yao et al., 2016; Yao et al., 2017). Nos resultados observados no presente estudo em células da linhagem A549, é provável que TBX2 participe de forma independente na repressão transcricional da *e-caderina* ou participe do complexo repressor TLE1/ZEB1/HDAC.

O retículo endoplasmático (RE) exerce várias funções celulares, como local de síntese e modificações pós-traducionais de muitas proteínas, síntese e armazenamento de lipídeos, regulação e armazenamento de cálcio e coordenação de respostas metabólicas e do destino celular, desencadeadas por variações energéticas intracelulares, mantendo a homeostase celular (Alberts et al., 2014). Perturbações no funcionamento do RE causam estresse do retículo que ativa mecanismos de resposta adaptativas que variam de acordo com a condição e/ou agente perturbador e intensidade e/ou duração do estresse (Hetz, 2012). Os fatores que desencadeiam estresse do retículo podem ser intrínsecos, relacionados a certas doenças (diabetes e doenças neurodegenerativas), ou extrínsecos, como perturbações no microambiente celular (depleção de nutrientes, hipóxia, mudanças no pH), produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, reactive oxygen species) e mudanças na temperatura. Em resposta ao estresse do RE a via de sinalização *Unfolded Protein Response* (UPR) é ativada como mecanismo de resposta adaptativa que ajuda a célula a superar o estresse restaurando a homeostase e o normal funcionamento do retículo endoplasmático, entretanto se o estresse é mantido por muito tempo a resposta pró-sobrevivência UPR pode falhar ou desencadear uma via de sinalização pró-apoptótica (Almanza et al., 2019).

Em células epiteliais a perda de adesão ao substrato pode causar uma drástica redução da entrada de glicose na célula, levando a uma diminuição nos níveis de ATP e progressivo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Schafer et al., 2009). Com a redução de ATP e acúmulo de ROS ocorre estresse do retículo e, posteriormente, ativação da quinase PERK (*Protein kinase RNA-like (PKR-like) endoplasmic reticulum kinase*) envolvida na resposta UPR (Avivar-Valderas et al., 2011).

O estresse do retículo endoplasmático observados nas células dos agregados de A549shTBX2 (Figuras 45-48) pode ter sido desencadeado pelo acúmulo de ROS, induzido pela perda de adesão. A constante ativação da resposta UPR ou falha na resposta UPR, levando à morte celular poderia também explicar a presença de células necroptóticas observadas nos agregados de A549shTBX2 (Figura 46), visto que a via de sinalização necroptose pode ser ativada por estresse do retículo (Kishino et al., 2019).



# 5 Conclusão

O *knockdown* de TBX2 não teve efeito significativo na viabilidade das células de NSCLC da linhagem A549. Entretanto muito ainda precisa ser investigado, visto que foi observado, em células da mesma linhagem, que o *knockdown* de TBX2 promoveu diminuição da viabilidade celular. Conseqüentemente, o papel de TBX2 na viabilidade de NSCLC ainda precisa ser elucidado.

A morfologia das células de A549shTBX2 sofreram algumas alterações em relação aos controles, com o aumento de células binucleadas. As causas dessas alterações serão investigadas e melhor caracterizadas futuramente.

Como mostrado nos resultados, o *knockdown* de TBX2 inibiu a formação de esferoides e promoveu estresse do retículo, corroborando com vários estudos que reportam o envolvimento de TBX2 na transição epitélio-mesenquimal, por meio da repressão transcricional da *e-caderina*, e resistência à anoikis. Em seguida, tanto a expressão de *e-caderina*, quanto os mecanismos de resistência/sensibilidade à anoikis em células de A549shTBX2 e controles serão avaliados.

# Referências

1. Abrahams, A.; Mowla, S.; Parker, M.I.; Goding, C.R.; Prince, S. UV-mediated regulation of the anti-senescence factor Tbx2. *J Biol Chem*. 2008 Jan 25;283(4):2223-30. doi: 10.1074/jbc.M705651200. Epub 2007 Nov 19. PMID: 18025091.
2. Abrahams, A.; Parker, M.I.; Prince, S. The T-box Transcription Factor Tbx2: Its Role in Development and Possible Implication in Cancer. *IUBMB Life*. 2010 Feb; 62(2):92-102. DOI:10.1002/iub.275.
3. Agulnik, S.I.; Garvey, N.; Hancock, S.; Ruvinsky, I.; Chapman, D.L.; Agulnik, I.; Bollag, R.; Papaioannout, V.; Silver, L.M. Evolution of Mouse T-box Genes by Tandem Duplication and Cluster Dispersion. *Genetics*, 1996, 144: 249-254.
4. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular biology of the cell*, 6th ed. New York: Garland Science/Taylor & Francis LLC; 2014 Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmb.2003.494031049999/full>.
5. Almanza, A., Carlesso, A., Chintha, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., de Bellerocche, J., Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman, A. M., Healy, S., ... Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS journal*, 286(2), 241–278. <https://doi.org/10.1111/febs.14608>
6. Avivar-Valderas, A., Salas, E., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J. A., Nagi, C., Debnath, J., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2011). PERK integrates autophagy and oxidative stress responses to promote survival during extracellular matrix detachment. *Molecular and cellular biology*, 31(17), 3616–3629. <https://doi.org/10.1128/MCB.05164-11>
7. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2020 Jul;70(4):313. PMID: 30207593.
8. Bonaldo, M.F.; Pestano, M.C.; Ribeiro, M.C.; Machado-Santelli, G.M.; Mori, L.O. A. Comparative characterization of a human large cell lung carcinoma cell line and the xenograft derived cell line. *Cell biology International Reports*, p. 229–241, 1991.
9. Chang, F.; Xing, P.; Song, F.; Du, X.; Wang, G.; Chen, K.; Yang, J. The role of T box genes in the tumorigenesis and progression of cancer. *Oncology Letters*, 2016, Oct 19, 12(6):4305-4311. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5296>.
10. Cheng, P., Tian, D., Liu, M. The role of TBX2 in pancreatic cancers and its regulation by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, Jul 2008, Vol.7 (7):404-409. DOI:10.1007/s10330-008-0054-7
11. Cho, K. W.; Kim, J. Y.; Song, S. J.; Farrell, E.; Eblaghie, M. C.; Kim, H. J.; Tickle, C.; Jung, H. S. Molecular interactions between Tbx3 and Bmp4 and a model for dorsoventral positioning of mammary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(45), 16788-93. Doi: 10.1073/pnas.0604645103
12. Conlon, F.L., Fairclough, L., Price, B.M.J, Casey, E.S., Smith, J.C. Determinants of T box protein specificity. *Development*. 2001, Oct; 128 (19): 3749-58

13. Davis, E., Teng, H., Bilican, B., Parker, M.I., Liu, B., Carriera, S., Goding, C.R., Prince, S. Ectopic Tbx2 expression results in polyploidy and cisplatin resistance. *Oncogene*, 2008, Feb 7;27(7):976-84. DOI: 10.1038/sj.onc.1210701.
14. Douglas, N.C., Papaioannou, V.E. The T-box Transcription Factors TBX2 and TBX3 in Mammary Gland Development and Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 18, 143–147 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10911-013-9282-8>
15. Crawford NT, McIntyre AJ, McCormick A, D'Costa ZC, Buckley NE, Mullan PB. TBX2 interacts with heterochromatin protein 1 to recruit a novel repression complex to EGR1-targeted promoters to drive the proliferation of breast cancer cells. *Oncogene*. 2019 Aug;38(31):5971-5986. doi: 10.1038/s41388-019-0853-z. Epub 2019 Jun 28. PMID: 31253870; PMCID: PMC6677575.
16. D'Costa, Z.C., Higgins, C., Ong, C.W., Irwin, G.W., Boyle, D., McArt, D.G., McCloskey, K., Buckley, N.E., Crawford, N.T., Thiagarajan, L., Murray, J.T., Kennedy, R.D., Mulligan, K.A., Harkin, D.P., Waugh, D.J.J., Scott, C.J., Tellez, M.N., Williams, R., Mullan, P.B. TBX2 represses CST6 resulting in uncontrolled legumain activity to sustain breast cancer proliferation: a novel cancer-selective target pathway with therapeutic opportunities. *Oncotarget*, 2014, 5 (6):1609-1620. DOI: 10.18632/oncotarget.1707.
17. Decaestecker B, Denecker G, Van Neste C, Dolman EM, Van Loocke W, Gartlgruber M, Nunes C, De Vloed F, Depuydt P, Verboom K, Rombaut D, Loontjens S, De Wyn J, Kholosy WM, Koopmans B, Essing AHW, Herrmann C, Dreidax D, Durinck K, Deforce D, Van Nieuwerburgh F, Henssen A, Versteeg R, Boeva V, Schleiermacher G, van Nes J, Mestdagh P, Vanhauwaert S, Schulte JH, Westermann F, Molenaar JJ, De Preter K, Speleman F. TBX2 is a neuroblastoma core regulatory circuitry component enhancing MYCN/FOXM1 reactivation of DREAM targets. *Nat Commun*. 2018 Nov 19;9(1):4866. doi: 10.1038/s41467-018-06699-9. PMID: 30451831; PMCID: PMC6242972.
18. Du, W.L., Fang, Q., Chen, Y., Teng, J.W., Xiao, Y.S., Xie, P., Jin, B., Wang, J.Q. Effect of silencing the T-box transcription factor TBX2 in prostate cancer PC3 and LNCaP cells. *Molecular Medicine Reports* 16: 6050-6058, 2017. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7361>.
19. Fujino N, Kubo H, Maciewicz RA. Phenotypic screening identifies Axl kinase as a negative regulator of an alveolar epithelial cell phenotype. *Lab Invest*. 2017 Sep;97(9):1047-1062. doi: 10.1038/labinvest.2017.52. Epub 2017 May 29. PMID: 28553934.
20. Ghosh, T.K.; Brook, J.D.; Wilsdon, A. Current Topics in Developmental Biology, 2017; 122:383-415. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.08.006>.
21. Hu B, Mu HP, Zhang YQ, Su CY, Song JT, Meng C, Liu DX. Prognostic significance of TBX2 expression in non-small cell lung cancer. *J Mol Histol*. 2014 Aug;45(4):421-6. doi: 10.1007/s10735-014-9569-0. Epub 2014 Feb 16. PMID: 24531749.
22. Huang, Y., Li, Z., Zhong, Q., Li, G., Zhang, Y., Huang, Z. Association of TBX2 and P21 expression with clinicopathological features and survival of laryngeal squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2014, Dec 15; 7(12):5394-402.

23. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro, 2019.
24. Ismail A, Bateman A. Expression of TBX2 promotes anchorage-independent growth and survival in the p53-negative SW13 adrenocortical carcinoma. *Cancer Lett.* 2009 Jun 18;278(2):230-240. doi: 10.1016/j.canlet.2009.01.006. Epub 2009 Feb 11. PMID: 19216023.
25. Jacobs, J.J.L., Keblusek, P., Robanus-Maandag, E., Kristel, P., Lingbeek, M., Nederlof, P.M., Van Welsem, T., Van de Vijver, M.J., Koh, E.Y., Daley, G.Q., Van Lohuizen, M. Senescence bypass screen identifies *TBX2*, which represses *Cdkn2a* (*p19ARF*) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nature Genetics*, Vol.26, p.291–299, 2000.
26. Jolly MK, Ware KE, Xu S, Gilja S, Shetler S, Yang Y, Wang X, Austin RG, Runyambo D, Hish AJ, Bartholf DeWitt S, George JT, Kreulen RT, Boss MK, Lazarides AL, Kerr DL, Gerber DG, Sivaraj D, Armstrong AJ, Dewhirst MW, Eward WC, Levine H, Somarelli JA. E-Cadherin Represses Anchorage-Independent Growth in Sarcomas through Both Signaling and Mechanical Mechanisms. *Mol Cancer Res.* 2019 Jun;17(6):1391-1402. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0763. Epub 2019 Mar 12. PMID: 30862685; PMCID: PMC6548594.
27. Khalil AA, Sivakumar S, Lucas FAS, McDowell T, Lang W, Tabata K, Fujimoto J, Yatabe Y, Spira A, Scheet P, Nemer G, Kadara H. TBX2 subfamily suppression in lung cancer pathogenesis: a high-potential marker for early detection. *Oncotarget.* 2017 Aug 4;8(40):68230-68241. doi: 10.18632/oncotarget.19938. PMID: 28978111; PMCID: PMC5620251.
28. Khalil, A.A.; Dekmak B, Boulos F, Kantrowitz J, Spira A, Fujimoto J, Kadara H, El-Hachem N, Nemer G. Transcriptomic Alterations in Lung Adenocarcinoma Unveil New Mechanisms Targeted by the TBX2 Subfamily of Tumor Suppressor Genes. *Front Oncol.* 2018 Oct 30;8:482. doi: 10.3389/fonc.2018.00482. PMID: 30425966; PMCID: PMC6218583.
29. Kishino A, Hayashi K, Maeda M, Jike T, Hidai C, Nomura Y, Oshima T. Caspase-8 Regulates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Necroptosis Independent of the Apoptosis Pathway in Auditory Cells. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 24;20(23):5896. doi: 10.3390/ijms20235896. PMID: 31771290; PMCID: PMC6928907.
30. Kumar S, Park SH, Cieply B, Schupp J, Killiam E, Zhang F, Rimm DL, Frisch SM. A pathway for the control of anoikis sensitivity by E-cadherin and epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol.* 2011 Oct;31(19):4036-51. doi: 10.1128/MCB.01342-10. Epub 2011 Jul 11. PMID: 21746881; PMCID: PMC3187352.
31. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell.* 2017 Feb 9;168(4):670-691. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.037. PMID: 28187288; PMCID: PMC5308465.
32. Law, D.J., Gebuhr, T., Garvey, N., Agulnik, S.I., Silver, L.M. Identification, characterization and localization to chromosome 17q21-22 of the human TBX2 homolog, member of a conserved developmental gene family. *Mamm Genome.* 1995; 6:793-797.

33. Li Y, Zhang H, Choi SC, Litingtung Y, Chiang C. Sonic hedgehog signaling regulates Gli3 processing, mesenchymal proliferation, and differentiation during mouse lung organogenesis. *Dev Biol.* 2004 Jun 1;270(1):214-31. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.03.009. PMID: 15136151.
34. Li, J., Weinberg, M. S., Zerbini, L., & Prince, S. The oncogenic TBX3 is a downstream target and mediator of the TGF- $\beta$ 1 signaling pathway. *Molecular biology of the cell*, 2013, 24(22), 3569-76. Doi: 10.1091/mbc.E13-05-0273.
35. Li, J., Ballim, D., Rodriguez, M., Cui, R., Goding, C. R., Teng, H., Prince, S. The anti-proliferative function of the TGF- $\beta$ 1 signaling pathway involves the repression of the oncogenic TBX2 by its homologue TBX3. *The Journal of biological chemistry*, 2014, 289(51), 35633-43. Doi: 10.1074/jbc.M114.596411.
36. Lingbeek ME, Jacobs JJ, van Lohuizen M. The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T-site in the initiator. *J Biol Chem.* 2002 Jul 19;277(29):26120-7. doi: 10.1074/jbc.M200403200. Epub 2002 May 8. PMID: 12000749.
37. Liu, F., Cao, J., Lv, J., Dong, L., Pier, E., Xu, X.G., Wang, R., Xu, Z., Goding, C., Cui, R. Tbx2 expression is regulated by PAX3 in the melanocyte lineage. *Pigment Cell Melanoma Research*, 2013, Jan, 26 (1): 66-77. Doi:10.1111/pcmr.12029
38. Liu X, Miao Z, Wang Z, Zhao T, Xu Y, Song Y, Huang J, Zhang J, Xu H, Wu J, Xu H. TBX2 overexpression promotes proliferation and invasion through epithelial-mesenchymal transition and ERK signaling pathway. *Exp Ther Med.* 2019 Jan;17(1):723-729. doi: 10.3892/etm.2018.7028. Epub 2018 Nov 28. PMID: 30651856; PMCID: PMC6307397.
39. Lu, J., Li, X.P., Dong, Q., Kung, H., He, M.L. TBX2 and TBX3: The special value for anticancer drug targets. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010 1806, 268–274. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.07.001>
40. Lüdtke TH, Farin HF, Rudat C, Schuster-Gossler K, Petry M, Barnett P, Christoffels VM, Kispert A. Tbx2 controls lung growth by direct repression of the cell cycle inhibitor genes *Cdkn1a* and *Cdkn1b*. *PLoS Genet.* 2013;9(1):e1003189. doi: 10.1371/journal.pgen.1003189. Epub 2013 Jan 17. PMID: 23341776; PMCID: PMC3547831.
41. Lüdtke TH, Rudat C, Wojahn I, Weiss AC, Kleppa MJ, Kurz J, Farin HF, Moon A, Christoffels VM, Kispert A. Tbx2 and Tbx3 Act Downstream of Shh to Maintain Canonical Wnt Signaling during Branching Morphogenesis of the Murine Lung. *Dev Cell.* 2016 Oct 24;39(2):239-253. doi: 10.1016/j.devcel.2016.08.007. Epub 2016 Oct 6. PMID: 27720610.
42. Lv, Y.; Si, M.; Chen, N.; Li, Y.; Ma, X.; Yang, H.; Zhang, L.; Zhu, H.; Xu, G.; Wu, G.P.; Cao, C. TBX2 over-expression promotes nasopharyngeal cancer cell proliferation and invasion. *Oncotarget*, Advance Publications, 2017. Doi:10.18632/oncotarget.17084.
43. Martin, N., Benhamed, M., Nacerddine, K., Demarque, M.D., van Lohuizen, M., Dejean, Bischof, A. O. Physical and functional interaction between PML and TBX2 in the establishment of cellular senescence. *EMBO Journal*, 2012, Jan 4;31(1):95-109. DOI: 10.1038/emboj.2011.370.

44. Mohamad, T., Kazim, N., Adhikari, A., Davie, J.K. EGR1 interacts with TBX2 and functions as a tumor suppressor in rhabdomyosarcoma. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, (26), 18084-18098. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24726>.
45. Nandana S, Tripathi M, Duan P, Chu CY, Mishra R, Liu C, Jin R, Yamashita H, Zayzafoon M, Bhowmick NA, Zhau HE, Matusik RJ, Chung LW. Bone Metastasis of Prostate Cancer Can Be Therapeutically Targeted at the TBX2-WNT Signaling Axis. *Cancer Res.* 2017 Mar 15;77(6):1331-1344. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0497. Epub 2017 Jan 20. PMID: 28108510; PMCID: PMC5783646.
46. Naiche, L.A., Harrelson, Z., Kelly, R.G., Papaioannou, V.E. T-box genes in vertebrate development. *Annu. Rev. Genet.* 39, 2005, 219–239. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.105925>
47. Nehme E, Rahal Z, Sinjab A, Khalil A, Chami H, Nemer G, Kadara H. Epigenetic Suppression of the T-box Subfamily 2 (TBX2) in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 7;20(5):1159. doi: 10.3390/ijms20051159. PMID: 30866410; PMCID: PMC6429281.
48. Osmani L, Askin F, Gabrielson E, Li QK. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Semin Cancer Biol.* 2018 Oct;52(Pt 1):103-109. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.11.019. Epub 2017 Nov 26. PMID: 29183778; PMCID: PMC5970946.
49. Packham, E.A., Brook, J.D. T-box genes in human disorders. *Human Molecular Genetics*, 2003, Ap.; v.12, Issue suppl\_1, 2, p.R37–R44. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg077>.
50. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1833(12):3481-3498. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.026. Epub 2013 Jul 2. PMID: 23830918.
51. Papaioannou, V. T-box genes in development: From hydra to humans. *International Review of Cytology*, Academic Press, V. 207, 2001, p.1-70. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(01\)07002-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(01)07002-4).
52. Papaioannou, V. The T-box gene Family: emerging roles in development, stem cells and cancer. *Development*, 2014, 141: 3819-3833; Doi: 10.1242/dev.104471
53. Paxton C, Zhao H, Chin Y, Langner K, Reecy J. Murine Tbx2 contains domains that activate and repress gene transcription. *Gene.* 2002 Jan 23;283(1-2):117-24. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00878-2. PMID: 11867218.
54. Pearson GW. Control of Invasion by Epithelial-to-Mesenchymal Transition Programs during Metastasis. *J Clin Med.* 2019 May 10;8(5):646. doi: 10.3390/jcm8050646. PMID: 31083398; PMCID: PMC6572027.
55. Pennell NA, Arcila ME, Gandara DR, West H. Biomarker Testing for Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Real-World Issues and Tough Choices. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2019 Jan;39:531-542. doi: 10.1200/EDBK\_237863. Epub 2019 May 17. PMID: 31099633.
56. Peres, J.; Davis, E.; Mowla, S.; Bennett, D.C.; Li, J.A.; Wansleben, S.; Prince, S. The Highly Homologous T-Box Transcription Factors, TBX2 and TBX3, Have Distinct Roles



in the Oncogenic Process. *Genes & Cancer*, v.1, n.3, p.272-282, 2010. Doi: 10.1177/1947601910365160.

57. Prince, S., Carreira, S., Vance, K.W., Abrahams, A., Goding, C.R. Tbx2 Directly Represses the Expression of the p21WAF1 Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. *Cancer Research*, 2004, 64, 1669–1674. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3286.

58. Reck, M.; Heigener, D.F.; Mok, T.; Soria, J.C.; Rabe, K.F. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments. *Lancet*. 2013 Aug 24; 382 (9893): 709-19. Doi: 10.1016/S0140-6736(13)61502-0

59. Redmond, K.L., Crawford, N.T., Farmer, H., D'Costa, Z.C., O'Brien, G.J., Buckley, N.E., Kennedy, R.D., Johnston, P.G., Harkin, D.P., Mullan, P.B. T-box 2 represses NDRG1 through an EGR1-dependent mechanism to drive the proliferation of breast cancer cells. *Oncogene*, 2010, 29, 3252–3262.

60. Rowley, M., Grothey, E. & Couch, F.J. The Role of Tbx2 and Tbx3 in Mammary Development and Tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 109–118 (2004). <https://doi.org/10.1023/B:JOMG.0000037156.64331.3f>

61. Sinclair, C.S., Adem, C., Naderi, A., Soderberg, C.L., Johnson, M., Wadum, L., Couch, V.L., Sellers, T.A., Schaid, D., Slezak, J., Fredericksen, Z., Ingle, J.N., Hartmann, L., Jenkins, R.B., Couch, F.J. TBX2 Is Preferentially Amplified in BRCA1- and BRCA2-related Breast Tumors. *Cancer Research*, Jul 1, 2002 (62) (13) 3587-3591.

62. Sinha, S., Abraham, S., Gronostajski, R. M., Campbell, C. E. Differential DNA binding and transcription modulation by three T-box proteins, T, TBX1, and TBX2. *Gene*, 2000, 258, 15–29. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00417-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00417-0)

63. Showell, C.; Binder, O.; Conlon, F.L. T-box genes in early embryogenesis. *Developmental Dynamics*, 2004 Jan; 229(1):201-18. Doi: 10.1002/dvdy.10480.

64. Spence, M.M; Hui, R.L.; Chang, J.T.; Schottinger, J.E.; Millares, M.; Rashid, N. Treatment Patterns and Overall Survival associated with First-Line Systemic Therapy for Patients with Advance Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy*, 23(2):195-205, 2017.

65. Stewart, B. W.; Wild, C. P. (Ed.). *World Cancer Report: 2014*. Lyon: IARC, 2014. <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>.

66. Teng H, Ballim RD, Mowla S, Prince S. Phosphorylation of histone H3 by protein kinase C signaling plays a critical role in the regulation of the developmentally important TBX2 gene. *J Biol Chem*. 2009 Sep 25;284(39):26368-76. doi: 10.1074/jbc.M109.021360. Epub 2009 Jul 24. PMID: 19633291; PMCID: PMC2785324.

67. Vance, K.W., Carreira, S., Brosch, G., Goding, C.R. Tbx2 Is Overexpressed and Plays an Important Role in Maintaining Proliferation and Suppression of Senescence in Melanomas. *Cancer Research*, 2005, 65: (6). Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3045

68. Wang, B., Lindley, L.E., Fernandez-Vega, V., Rieger, M.E., Sims, A.H., Briegel, K.J. The T Box Transcription Factor TBX2 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasion of Normal and Malignant Breast Epithelial Cells. *PLoS One*. 2012; 7(7): e41355. Doi: 10.1371/journal.pone.0041355

69. Wang Q, Lu F, Lan R. RNA-sequencing dissects the transcriptome of polyploid cancer cells that are resistant to combined treatments of cisplatin with paclitaxel and docetaxel. *Mol Biosyst.* 2017 Sep 26;13(10):2125-2134. doi: 10.1039/c7mb00334j. PMID: 28825433.
70. Wansleben S, Davis E, Peres J, Prince S. A novel role for the anti-senescence factor TBX2 in DNA repair and cisplatin resistance. *Cell Death Dis.* 2013 Oct 10;4(10):e846. doi: 10.1038/cddis.2013.365. PMID: 24113180; PMCID: PMC3824674.
71. Wansleben, S., Peres, J., Hare, S., Goding, C.R., Prince, S. T-box transcription factors in cancer biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, V. 1846 (2), 2014, 380-391. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.08.004>
72. Willmer, T., Cooper, A., Peres, J., Omar, R., Prince, S. The T-Box transcription factor 3 in development and cancer. *Biosci Trends.* 2017 Jul 24;11(3):254-266. doi: 10.5582/bst.2017.01043
73. Wilson, V., Conlon, F.L. The T-box family. *Genome Biology*, 2002, 3(6): reviews 3008.1–3008.7. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-6-reviews3008>
74. Yao X, Pham T, Temple B, Gray S, Cannon C, Chen R, Abdel-Mageed AB, Biliran H. The Anoikis Effector Bit1 Inhibits EMT through Attenuation of TLE1-Mediated Repression of E-Cadherin in Lung Cancer Cells. *PLoS One.* 2016 Sep 21;11(9):e0163228. doi: 10.1371/journal.pone.0163228. PMID: 27655370; PMCID: PMC5031426.
75. Yao X, Pham T, Temple B, Gray S, Cannon C, Hardy C, Fletcher K, Ireland SK, Hossain A, Chen R, Abdel-Mageed AB, Biliran H. TLE1 inhibits anoikis and promotes tumorigenicity in human lung cancer cells through ZEB1-mediated E-cadherin repression. *Oncotarget.* 2017 Jul 31;8(42):72235-72249. doi: 10.18632/oncotarget.19703. PMID: 29069783; PMCID: PMC5641126.
76. Yi, F., Du, J., Ni, W, Liu, W., Tbx2 confers poor prognosis in glioblastoma and promotes temozolomide resistance with change of mitochondrial dynamics. *OncoTargets and Therapy* 2017:10 1059–1069.
77. Yu H, Zhao F, Li J, Zhu K, Lin H, Pan Z, Zhu M, Yao M, Yan M. TBX2 Identified as a Potential Predictor of Bone Metastasis in Lung Adenocarcinoma via Integrated Bioinformatics Analyses and Verification of Functional Assay. *J Cancer.* 2020 Jan 1;11(2):388-402. doi: 10.7150/jca.31636. PMID: 31897234; PMCID: PMC6930436.
78. Zhang, Z.; Guo, Y. High TBX2 expression predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Neoplasma* v.61, n. 4, 2014. Doi:10.4149/neo\_2014\_059
79. Zhu B, Zhang M, Byrum SD, Tackett AJ, Davie JK. TBX2 blocks myogenesis and promotes proliferation in rhabdomyosarcoma cells. *Int J Cancer.* 2014 Aug 15;135(4):785-97. doi: 10.1002/ijc.28721. Epub 2014 Jan 27. PMID: 24470334; PMCID: PMC4051830.
80. Zhu, B., Zhang, M., Williams, E.M., Keller, C., Mansoor, A., Davie, J.K. TBX2 represses PTEN in rhabdomyosarcoma and skeletal muscle. *Oncogene.* 2016 Aug. 11; 35(32): 4212–4224. Doi:10.1038/onc.2015.486