

**Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Biologia de Sistemas**

Bárbara dos Santos Passaia

**Identificação de novos alvos do fator de
transcrição POD1/TCF21 em culturas de
células de tumores humanos**

São Paulo
2020

Bárbara dos Santos Passaia

Identificação de novos alvos do fator de transcrição POD1/TCF21 em culturas de células de tumores humanos

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia Morfofuncional

Orientadora: Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi

São Paulo

2020

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)

dos Santos Passaia, Barbara
Identificação de novos alvos do fator de
transcrição POD1/TCF21 em culturas de células de
tumores humanos / Barbara dos Santos Passaia;
orientadora Claudimara Ferini Pacicco Lotfi. -- São
Paulo, 2020.
124 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. TCF21. 2. Córtex adrenal. 3. Tumor
adrenocortical. 4. ChIP-Seq. 5. CACNA1B. I. Ferini
Pacicco Lotfi, Claudimara, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Barbara dos Santos Passaia

Título da Tese: Identificação de novos alvos do fator de transcrição POD1/TCF21 em culturas de células de tumores humanos

Orientador: Claudimara Ferini Pacicco Lotfi

A Comissão Julgadora do trabalho de Defesa da 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:.....

Ao meu pai, Reinaldo, por todo amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, que me apoiou em todos os momentos da minha vida. Espero que de alguma forma você saiba que estive pensando em você durante essa etapa. Te amarei eternamente.

À minha mãe, pelo amor que expressa no dia a dia, no cuidado e proteção. Por estar sempre ao meu lado.

À minha avó, pelo amor incondicional. Pela eterna proteção.

Ao meu namorado, Caio, pelo amor, paciência e conselhos sempre atenciosos. Pela felicidade que sua presença me traz.

À minha orientadora, Dra. Claudimara Lotfi, pela oportunidade que me deu quando eu não tinha conhecimento algum da rotina de um laboratório, pela paciência durante os últimos oito anos e por ter me formado como pesquisadora.

À Dra. Maria Candida Fragoso, do LIM-42 da Faculdade de Medicina-USP, pelo auxílio para obter os dados clínicos e moleculares dos pacientes.

Ao Dr. Antonio Lerario, por disponibilizar seu tempo para auxiliar com as análises de bioinformática.

Ao Dr. Matheus Henrique, pela colaboração para obtenção do sistema CRISPR/dCas9.

Ao Dr. Carlos Menck, por disponibilizar o seu laboratório para realização de alguns experimentos.

À Dra. Bruna Bargieri, pelo empréstimo do anticorpo anti-CXCR4.

Aos amigos que fiz no laboratório, em especial a Thais, Jean, Eduarda, Fernanda, Kelly e Suellen, pelo companheirismo, risadas e cafés. E aos antigos colegas e amigos de laboratório, Ismael, Isadora e Barbara, pelos momentos de descontração que tornaram essa jornada mais agradável.

Aos colegas de departamento, pela amizade e auxílio em alguns momentos de dificuldades.

Aos meus amigos, em especial a Carol e Renata, por todo o apoio e risadas proporcionadas.

Aos meus amigos da Pacto, por serem um refúgio no Butantã, por estarem ao meu lado nos momentos bons e ruins e por tornarem esses anos agradáveis.

À CAPES e CNPq pelo investimento financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fapesp, pelo investimento financeiro concedido para o desenvolvimento desse trabalho (processo nº 2016/12381-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP))

Aos pacientes e familiares, por cederem amostras tão valiosas para o avanço dos estudos em tumores adrenocorticais.

RESUMO

Passaia BP. Identificação de novos alvos do fator de transcrição POD1/TCF21 em culturas de células de tumores humanos. [Tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

Tumores adrenocorticais (ACT) podem ser benignos, denominados adenomas, ou malignos, denominado carcinomas. Carcinomas adrenocorticais são raros e de prognóstico restrito. Em crianças, ACTs geralmente tem prognóstico favorável. TCF21 está menos expresso em carcinomas adrenocorticais do que em adenomas e é considerado um supressor tumoral em diversos tipos de câncer. TCF21 é capaz de inibir a expressão endógena de SF1/NR5A1 (fator esteroideogênico 1) e das enzimas esteroideogênicas através da ligação no sítio E-box do promotor de SF1/NR5A1 de culturas de células de carcinomas adrenocorticais humanos e culturas normais de adrenais de rato. Além disso, a expressão combinada dos genes TCF21-BUB1B e TCF21-SF1 tem valor de prognóstico, respectivamente, em tumores adrenocorticais de pacientes adultos e pediátricos. Em conjunto, esses dados sugerem que TCF21 pode ter um amplo papel como regulador da transcrição em células tumorais. Nesse estudo tivemos como hipótese que a identificação de outros alvos controlados por TCF21 poderiam contribuir no entendimento do seu papel e importância nas células tumorais. Foi utilizado o método de ChIP-Seq para identificação de prováveis 70 sequências-alvo de TCF21 em células modificadas para superexpressar TCF21 em linhagem de células de carcinoma adrenocortical, células H295R pCMVMycTCF21. As cinco sequências mais frequentes identificadas foram as dos genes PRDM7, CNTNAP2, CACNA1B, PTPRN2 e KCNE1B. Resultados para validação por qRT-PCR mostraram que TCF21 regula positivamente a expressão de PRDM7 e CNTNAP2 e negativamente a expressão de CACNA1B. Em carcinomas adultos e pediátricos a expressão de CACNA1B, que codifica para o canal de cálcio Ca v2.2, está mais elevada em comparação aos adenomas. No entanto, esse aumento não está relacionado com a sobrevida geral em tumores adultos. Além disso, o bloqueio seletivo de Ca v2.2 em células H295R e em células de carcinoma adrenocortical adulto, ACC-T227, não alterou a viabilidade celular. A falta de relação com sobrevida geral e a manutenção da viabilidade celular após bloqueio de Ca v2.2 sugere que pode haver um efeito ainda não detectado do controle de TCF21 sobre Ca v2.2 e canais de cálcio em tumores adrenocorticais. A análise da relação dos alvos de TCF21 observadas nas amostras de hepatocarcinoma de pacientes, utilizando os dados do The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) e validação em células HepG2, mostraram que TCF21 diminui a expressão genica de ATP10A e aumenta da expressão de PTPRN2 in vitro. Nossos resultados sugerem que a expressão de CACNA1B / canal Ca v2.2 pode ter valor diferencial e ser importante na tumorigênese adrenocortical em pacientes adultos e pediátricos, mas novas abordagens e estudos são necessários.

Palavras-chave: TCF21. Córtex adrenal. Tumor adrenocortical. ChIP-Seq. CACNA1B.

ABSTRACT

Passaia BP. Identification of new targets for the POD1 / TCF21 transcription factor in human tumor cell cultures. [Thesis (Doctorate in Sciences)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2020.

Adrenocortical tumors (ACT) can be benign, called adenomas, or malignant, called carcinomas. Adrenocortical carcinomas are rare and have a poor prognosis. In children, ACTs generally have a favorable prognosis. TCF21 is less expressed in adrenocortical carcinomas than in adenomas and is considered a tumor suppressor in several types of cancer. TCF21 is able to inhibit the endogenous expression of SF1/NR5A1 (Steroidogenic factor 1) and steroidogenic enzymes by binding to the E-box site of the SF1/NR5A1 promoter from human adrenocortical carcinoma cell cultures and normal rat adrenal cultures. In addition, the combined gene expression of TCF21-BUB1B and TCF21-SF1 have prognostic value in adrenocortical tumors of adult and pediatric patients, respectively. Taken together, these data suggest that TCF21 may have a comprehensive role as a regulator of transcription in tumor cells. In this study, we hypothesized that the identification of other targets controlled by TCF21 could contribute to the understanding of their role and importance in tumor cells. The ChIP-Seq method was used to identify 70 target sequences of TCF21 in cells modified to overexpress TCF21 in adrenocortical carcinoma cell line, H295R pCMVMycTCF21 cells. The five most frequent sequences identified were PRDM7, CNTNAP2, CACNA1B, PTPRN2 and KCNE1B genes. Results for qRT-PCR validation showed that TCF21 regulates positively the PRDM7 and CNTNAP2 expression and negatively the CACNA1B expression. In adult and pediatric patients, CACNA1B expression, which codes for the calcium channel Ca v2.2, is higher in carcinomas than in adenomas. However, this increase is not related to overall survival in adult tumors. In addition, selective Ca v2.2 blocking in H295R cells and adult adrenocortical carcinoma cells, ACC-T227, did not alter cell viability. The lack of relationship with overall survival and maintenance of cell viability after Ca v2.2 block suggests that there may be an undetected effect of TCF21 control on Ca v2.2 in adrenocortical tumors. Analysis of the relationship of TCF21 targets observed in hepatocarcinoma samples from patients, using data from The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) and validation in HepG2 cells, showed that TCF21 decreases ATP10A gene expression and increases PTPRN2 gene expression in vitro. Our results suggest that the expression of CACNA1B / Ca v2.2 channel may have a differential value and be important in adrenocortical tumorigenesis in adult and pediatric patients, but new approaches and studies are needed.

Keywords: TCF21. Adrenal cortex. Adrenocortical tumor. ChIP-Seq. CACNA1B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A glândula suprarrenal humana.....	16
Figura 2 – Tipos celulares do desenvolvimento da glândula adrenal.....	17
Figura 3 – Esquema sobre os componentes do sistema de ativação CRISPR/dCas9.....	31
Figura 4 – Etapas do protocolo de ensaio de imunoprecipitação de cromatina.....	37
Figura 5 – Etapas do protocolo de preparação da biblioteca Illumina para sequenciamento.....	40
Figura 6 – Expressão relativa de TCF21 nas células HEK293 transduzidas com o sistema CRISPR/dCas9.....	47
Figura 7 – Expressão relativa de TCF21 nas células HepG2 transduzidas utilizando o sistema CRISPR/dCas9.....	47
Figura 8 – Expressão relativa de TCF21 nas células H295R transduzidas com o sistema CRISPR/dCas9.....	48
Figura 9 – Análise da expressão de TCF21.....	49
Figura 10 - Eletroforese microfluída das amostras das bibliotecas de DNA para sequenciamento.....	50
Figura 11 – Análise da expressão de mRNA por qPCR em células H295R pcMVMycTC21.....	54
Figura 12– Análise da expressão de mRNA por qPCR em células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21.....	55
Figura 13 - Expressão relativa dos genes CXCL12 e RUNX1T1 em adenomas (ACA) e carcinomas (ACC) de adultos.....	56
Figura 14 - Expressão relativa dos genes CXCL12 e RUNX1T1 entre em adenomas (ACA) e carcinomas (ACC) pediátricos.....	57
Figura 15 - Expressão relativa do gene CXCR4 entre em adenomas (ACA) e carcinomas (ACC).....	58
Figura 16 - Expressão proteica de CXCL12.....	59
Figura 17 - Expressão CXCL12.....	60
Figura 18 - Expressão relativa de CXCL12 em 79 amostras de pacientes com ACC adulto.....	61
Figura 19 - Expressão relativa de CXCL12.....	62
Figura 20 - Expressão de β catenina em células H295R pBABE-CXCL12.....	63

Figura 21 - Análise da expressão de mRNA por qRT-PCR em células H295R pCMVMycTCF21.....	67
Figura 22 - Expressão proteica de CACNA1B, canal de cálcio Ca v2.2.....	68
Figura 23 - Expressão gênica em células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 e SCR.....	69
Figura 24 - Expressão relativa de CACNA1B em adenomas (ACA) e carcinomas (ACC).....	69
Figura 25 - Expressão de Ca v2.2.....	70
Figura 26 - Análise de viabilidade através do ensaio de MTS.....	71
Figura A – Curva de crescimento das células HEK293 CRISPR/dCas9/TCF21 e CRISPR/dCas9/SCR.....	92
Figura B – Ensaio de viabilidade (MTS) das células HEK293 CRISPR/dCas9/TCF21 e CRISPR/dCas9/SCR.....	92
Figura C – Curva de crescimento das células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 e CRISPR/dCas9/SCR.....	93
Figura D – Ensaio de viabilidade (MTS) das células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 e CRISPR/dCas9/SCR.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estágios da evolução de carcinomas adrenocorticais.....	22
Tabela 2 - Dados clínicos dos pacientes.....	29
Tabela 3 - Sequências da região promotora de TCF21.....	32
Tabela 4 – Antibióticos e concentrações utilizadas para a seleção.....	33
Tabela 5 – Primers utilizados para PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	34
Tabela 6 – Bibliotecas sequenciadas na plataforma ilumina MiSeq.....	42
Tabela 7 – Bibliotecas sequenciadas na plataforma ilumina NextSeq.....	42
Tabela 8 – As bibliotecas sequenciadas na plataforma.....	51
Tabela 9 – Genes selecionados após sequenciamento da plataforma MiSeq.....	53
Tabela 10 – Resumo das leituras obtidas pela plataforma NextSeq.....	64
Tabela 11 - Resumo do alinhamento das leituras.....	65
Tabela 12 – Relação das 5 sequencias identificadas como os alvos mais frequentes de ligação de TCF21 (IDR < 0.05).....	65
Tabela 13 – Genes relacionados à regulação do processo de morte celular por apoptose de fibroblastos.....	66
Anexo I – Tabela de informações sobre as culturas de células de pacientes.....	91
Anexo III - Sequencias identificadas como potenciais alvos de TCF21 em células H295R pCMVMycTCF21 – MiSeq.....	94
Anexo IV - Sequencias identificadas como potenciais alvos de TCF21 em células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 -MiSeq.....	110
Anexo V - Genes identificados como potenciais alvos de TCF21 em células H295R pcMVMycTCF21 e em células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 pela plataforma MiSeq.....	119
Anexo VII - Sequencias identificadas em células H295R pCMVMycTCF21 com IDR < 0,05.....	122

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1 Glândula Suprarrenal	15
1.2 Desenvolvimento embrionário do córtex suprarrenal.....	17
1.3 TCF21 e sua função no desenvolvimento embrionário	18
1.4 Tumores adrenocorticais	21
1.5 TCF21 em tumores adrenocorticais.....	23
2. Objetivos	26
3. Materiais e Métodos	28
3.1 Pacientes.....	29
3.2 Culturas de células	30
3.3 Obtenção do sistema CRISPR/dCas9/TCF21 para ativação endógena de TCF21	30
3.4 Transdução e seleção das células de interesse	32
3.5 Transfecção transiente das células H295R	33
3.6 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	34
3.7 Análise da expressão proteica por <i>immunoblotting</i>	35
3.8 Análise da expressão proteica de TCF21 por imunoprecipitação seguida de <i>immunoblotting</i>	35
3.9 Curva de crescimento celular.....	36
3.10 Ensaio de viabilidade celular e tratamento com ω -Conotoxina MVIIA.....	36
3.11 Ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP).....	37
3.12 Preparação da biblioteca Illumina para sequenciamento.....	38
3.13 Validação das bibliotecas Illumina TruSeq	41
3.14 Sequenciamento utilizando a plataforma Illumina MiSeq.....	41
3.15 Sequenciamento utilizando a plataforma Illumina NextSeq.....	42
3.16 Análise do sequenciamento MiSeq através da plataforma BaseSpace	43
3.17 Análise de dados obtidos do sequenciamento NextSeq	43
3.18 Análise Estatística.....	44
4. Resultados.....	45
4.1 Expressão de <i>TCF21</i> através do sistema de ativação CRISPR/dCas9.....	46
4.2 Obtenção e validação da biblioteca do DNA enriquecido obtido do ensaio de Chip.....	49
4.3 Identificação das sequencias pela plataforma MiSeq	52

4.3.1 Validação dos genes selecionados após sequenciamento da plataforma MiSeq.....	53
4.3.2 Expressão de <i>CXCL12</i> , <i>RUNX1T1</i> e <i>CXCR4</i> em amostras de tumores adrenocorticais	56
4.3.4 Validação da relação de TFC21 e <i>CXCL12</i>	59
4.3.5 Relação da expressão de <i>CXCL12</i> com o estadiamento do tumor.....	60
4.3.6 Análise funcional do gene <i>CXCL12</i> em carcinoma adrenocortical.....	61
4.4 Identificação das sequencias pela plataforma NexSeq	63
4.4.1 Validação, por qRT-PCR, de <i>PRDM7</i> , <i>CNTNAP2</i> , <i>CACNA1B</i> , <i>PTPRN2</i> e <i>KCNE1B</i>	66
4.4.2 Identificação de prováveis genes alvos em outros tipos de tumores.....	68
4.4.3 Expressão gênica de <i>CACNA1B</i> em amostras de tumores adrenocorticais adultos e pediátricos	69
4.4.4 Análise da viabilidade celular após bloqueio do canal de cálcio Ca v2.2...	70
5. Discussão	72
5.1 Identificação das sequencias pela plataforma MiSeq	74
5.2 Identificação das sequencias pela plataforma NexSeq	77
6. Conclusões.....	80
7. Referências	82
Anexos.....	90

1. Introdução

1.1 Glândula Suprarrenal

A glândula suprarrenal humana está localizada no polo superior de cada rim, posterior ao peritônio (Figura 1A). O suprimento sanguíneo é feito pelas artérias suprarrenais superior, média e inferior que podem ter dupla ou até múltiplas ramificações. A drenagem de cada glândula ocorre através da veia suprarrenal. A glândula direita tem forma piramidal e a esquerda possui formato semilunar. Em adultos, as suprarrenais têm entre 3 a 5 cm e entre 3.5 e 5 g (Standring, 2010).

A suprarrenal é constituída por uma cápsula que envolve o córtex e medula, que possuem origens embriológicas distintas (Figura 1B). A medula é o tecido mais interno, responsável pela secreção de catecolaminas. O córtex adrenal compõe a maior parte do órgão e está externo à medula e justaposto à cápsula adrenal. O córtex possui coloração amarelada devido a presença de lipídeos e é composto por zonas concêntricas com características morfológicas distintas. Essas zonas são a zona glomerulosa, mais externa, a zona fasciculada e a zona reticular, mais interna (Figura 1C).

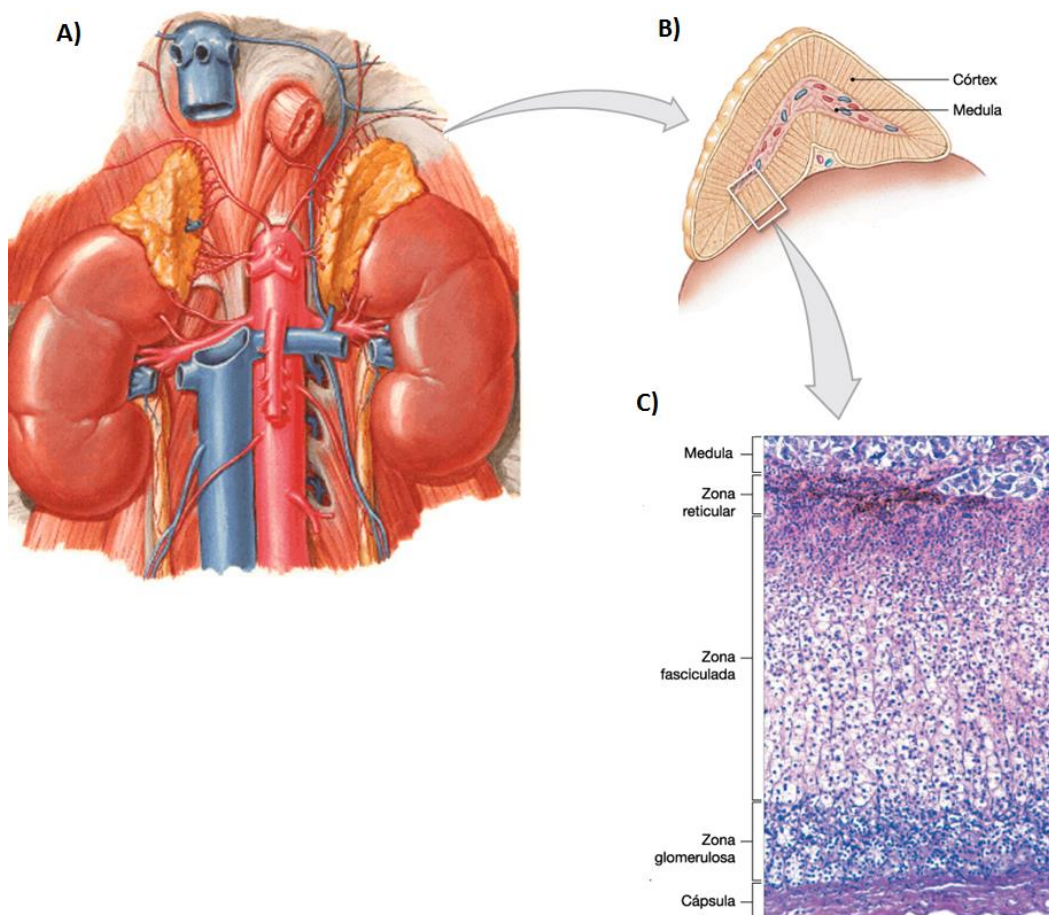
A zona glomerulosa corresponde a cerca de 15% do volume do córtex e produz mineralocorticoides, como a aldosterona, responsável pela regulação da composição dos eletrólitos dos líquidos corporais. A secreção de aldosterona é estimulada pela alteração dos níveis de sódio ou potássio na corrente sanguínea e também pela liberação da Angiotensina II (Guyton, 2011).

A zona fasciculada compõe cerca de 78% do volume do córtex da suprarrenal. Suas células são maiores, com mais lipídeos e formam cordões separados por vasos achatados e de paredes fenestradas. Essa zona produz glicocorticóides, como o cortisol, responsáveis pelo metabolismo da glicose e síntese de glicogênio, principalmente no fígado. A produção de glicocorticoides pela zona fasciculada é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA), em resposta a estímulos fisiológicos e externos. Após esses estímulos, há a produção e liberação pelo hipotálamo do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e de vasopressina no sistema porta hipofisário. O CRH estimula a adenohipófise a liberar na circulação sanguínea o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). O ACTH se liga ao receptor de melanocortina 2 (MC2R), localizado nas células adrenocorticais, que desencadeia a sinalização para a produção do cortisol. A regulação do eixo HPA ocorre por retroalimentação negativa, ou seja, o aumento da concentração de glicocorticóides no

plasma sinaliza para a inibição da produção de CRH e ACTH, respectivamente no hipotálamo e hipófise (Guyton, 2011).

A zona reticular, adjacente a medula adrenal, possui células menores e rico suprimento vascular, tornando-a facilmente distinguível em uma análise histológica. A zona reticular é responsável pela síntese de hormônios andrógenos, como a testosterona. No entanto, o conhecimento sobre a regulação e liberação dos hormônios andrógenos pela zona reticular é ainda limitado. Algumas evidências mostram a ação do ACTH, da gonadotrofina coriônica humana (hCG) e do hormônio luteinizante (LH) na produção de andrógenos por essa zona (Rao, 2010).

Figura 1- A glândula suprarrenal humana. A) glândulas suprarrenais localizadas no polo superior de cada rim. B) Desenho de secção longitudinal da glândula suprarrenal com a localização do córtex e da medula adrenal. C) Secção da glândula suprarrenal, que localiza a medula, mais interna, e as zonas que formam o córtex adrenal (zona reticular, zona fasciculada e zona glomerulosa) e a cápsula, mais externa.



Fonte: Adaptada de Netter, 2018 e Martini, 2009.

1.2 Desenvolvimento embrionário do córtex suprarrenal

O desenvolvimento embrionário e pós-natal do córtex da glândula suprarrenal é complexo e pouco compreendido até recentemente. Do ponto de vista histológico, aproximadamente até o 1º ano de vida persiste uma zona fetal no córtex e somente depois dessa idade o córtex adrenal é semelhante à do adulto (Serón-Ferre & Jaffe, 1981). Funcionalmente, a diferenciação terminal da zona reticular ocorre por volta do 12º ano de vida. Em camundongos machos, a zona fetal regride após a puberdade e nas fêmeas após a primeira gestação (Holmes & Dickson 1971).

Em 2013, Wood e colaboradores descreveram que durante o desenvolvimento do córtex adrenal de camundongos, um subgrupo de células da cápsula do córtex é originado de células adrenocorticais fetais que expressam *GLI Family Zinc Finger 1* (Gli1). Gli1 é um marcador de células progenitoras adrenocorticais responsáveis pela manutenção e renovação do córtex adrenal do adulto. Há também outro subgrupo de células na cápsula adrenal que são descendentes de células que expressam o Fator de Transcrição 21 (Tcf21) no primórdio adrenogonadal. As células que expressam Tcf21 migram em direção centrípeta e dão origem a células do estroma. As células do estroma são células não-esteroidogênicas e não expressam o Fator esteroideogênico 1 (Sf1/Nr5a1), pois tem origem em células Tcf21 positivas, fator que regula negativamente Sf1 (Kim et al., 2013). Portanto, como no esquema da Figura 2, a glândula adrenal adulta é formada por células de diferentes origens. Entretanto, Bandiera e colaboradores (2013) identificaram células progenitoras que persistem na cápsula adrenal caracterizadas pela expressão de Tcf21, *Wilms' tumor 1* (Wt1), Gli1 e *GATA Binding Protein 4* (GATA4), que são capazes de dar origem a células esteroideogênicas, e que, portanto, expressam Sf-1, o que contrasta com os achados de Wood et al. (2013). Nesse trabalho, foi demonstrado que Tcf21 e Gli1 são alvos diretos de Wt1 e que durante o processo de diferenciação das células esteroideogênicas adrenais, Wt1, aumenta a expressão de Tcf21.

Figura 2 – Tipos celulares do desenvolvimento da glândula adrenal. A) células da crista neural formam a medula adrenal (vermelho). As células de origem mesenquimal que expressam Tcf21 no primórdio adrenogonadal compõem um subgrupo de células que participarão da formação da cápsula adrenal (laranja). A cápsula também expressa Gli1 e que tem origem das células fetais (azul). As células que expressam Gli1 darão origem as células esteroideogênicas que expressam Sf1/Nr5a1 (verde). As células da cápsula que expressam Tcf21 darão origem a células do estroma que expressam Platelet-derived growth factor receptor (Pdgfr) e formarão o córtex definitivo. B) As diferentes etapas do desenvolvimento da

organogênese renal. A expressão de TCF21 analisada em órgãos de camundongos apresentaram um padrão similar ao de humanos (Quaggin et al., 1998).

Em embriões de camundongos foi observado, por hibridização *in situ*, que Tcf21 está expresso durante o desenvolvimento dos rins, pâncreas, coração, pulmão, intestino e glândula suprarrenal. O estudo de Tcf21/Pod-1 no desenvolvimento renal de camundongos mostrou que Tcf21 está expresso nos metanefros de camundongos desde 13.5 dias após o coito (dpc), aumenta gradativamente até 16.5 dpc. Após 16.5 dpc a expressão de Tcf21 diminui na maioria dos órgãos, com exceção dos rins e dos pulmões (Quaggin et al., 1998). Em um estudo desenvolvido por Lu e colaboradores (1998) foi analisado o padrão de expressão de Tcf21 em embriões de camundongos a partir de 8.5 dpc. Nesse estudo, Tcf21 apresentou um padrão de expressão em células mesenquimais que circundam o epitélio de diversos órgãos, e foi denominado capsulina. Outro estudo realizado por Rob e colaboradores (1998) observou que Tcf21 estava expresso na bexiga, ovário, útero e testículos de camundongos adultos.

Para confirmar a importância de Tcf21 no desenvolvimento embrionário, Quaggin e colaboradores (1999) geraram camundongos Tcf21 *knockout* através de um construto LacZ inserido na região do códon iniciador do domínio bHLH do gene Tcf21. Os camundongos nasceram vivos, sem defeitos aparentes ou alteração do peso corporal, no entanto tiveram pouco tempo de vida. A análise dos rins e pulmões mostrou que esses órgãos não atingiram o desenvolvimento completo, pois não houve a formação dos alvéolos pulmonares, o que justifica a morte após o nascimento. Portanto, Tcf21 é essencial para a diferenciação dos pulmões, dos podócitos e glomérulos, e fundamental para a morfogênese dos pulmões e rins. A análise do coração desses animais não mostrou alterações nesse órgão durante o desenvolvimento (Lu et al., 2000), no entanto observaram que os animais não possuíam baço, o que sugere que Tcf21 pode ser fundamental para organogênese desse órgão.

Durante o desenvolvimento das gônadas de camundongos (13.5 dpc), Tcf21 está mais expresso nos testículos do que nos ovários, mas em menos de um mês após o nascimento o padrão de expressão de Tcf21 se inverte: é reduzida nos testículos e aumentada nos ovários, e se mantém até 3 meses de idade (Tamura et al., 2001). Portanto, na gonadogênese Tcf21 tem padrão de expressão dependente do sexo e do estágio de desenvolvimento do órgão.

Experimentos em células de Leydig, linhagem I-10, aonde Tcf21 foi superexpresso, foi detectada a diminuição da expressão do gene que expressa o fator esteroideogênico 1, Sf-1/Nr5a1 (Tamura et al., 2001). SF1 está expresso em células esteroideogênicas e regula a expressão das enzimas esteroideogênicas responsáveis pela produção de esteróides (Morohashi et al., 1993). Também está expresso nas três zonas do córtex adrenal, nas células de Leydig e de Sertoli, nas células da granulosa e da teca no ovário (Honda et al., 1993; Ikeda et al., 1993; Morohashi et al., 1994). Em camundongos e em humanos, Sf1 é expresso desde o primórdio adrenogonadal, nas gônadas e adrenais em desenvolvimento e permanece expresso no córtex adrenal adulto (Hanley et al., 2001; Val et al., 2003). Além de seu papel na regulação das enzimas esteroideogênicas, SF1 pode ter um papel na proliferação de células adrenocorticais (Morohashi et al., 1994). Em 1995, Sadovsky e colaboradores observaram a ausência de gônadas e adrenais em camundongos silenciados para Sf1/Nr5a1. Apesar desses animais se desenvolverem normalmente durante a gestação, com níveis de corticosterona e ACTH normais em comparação com os animais controle, os camundongos deficientes para Sf1/Nr5a1 morreram logo após o nascimento e apresentaram níveis baixos de corticosterona e altos níveis de ACTH. A ausência de adrenais e gônadas evidencia a importância de Sf1/Nr5a1 para o desenvolvimento desses órgãos (Sadovsky et al., 1995).

Por sua vez, camundongos *knockout* para Tcf21 apresentaram as genitálias femininas e masculinas indistinguíveis no neonato. Apresentam os ovários com dimensões adequadas, mas com diferentes localizações anatômicas e com o ovário esquerdo unido à glândula adrenal. Nos machos, os testículos são menores, com formato irregular e também unidos à glândula adrenal, no entanto a diferenciação das células de Sertoli ocorre normalmente (Cui et al., 2004). Esse desenvolvimento anômalo das gônadas ocorre devido à expressão ectópica de Sf1, o que causa desregulação do processo de diferenciação de células esteroideogênicas (Cui et al., 2004). Em conjunto essas observações mostram que a expressão de Tcf21 é fundamental para o desenvolvimento normal das gônadas e da glândula adrenal de mamíferos. Além do seu papel no desenvolvimento de vários órgãos, atualmente, vários estudos mostram que Tcf21 pode ter um papel importante no processo tumorigênico de vários tecidos incluindo do córtex da glândula suprarrenal (revisado por Jiang & Yang, 2018).

1.4 Tumores adrenocorticais

Tumores benignos do córtex da suprarrenal, os adenomas adrenocorticais (ACA), são neoplasias comuns em adultos cuja incidência aumenta com a idade, atingindo aproximadamente 3% dos indivíduos acima de 50 anos. Por outro lado, o carcinoma adrenocortical (ACC) é uma neoplasia rara que acomete mais as mulheres do que os homens (Aufforth & Nilubol, 2014). Os adenomas adrenocorticais adultos podem ser funcionantes ou não, e são tumores homogêneos e bem delimitados. Carcinomas adrenocorticais adultos são heterogêneos, geralmente não-funcionais, agressivos, com alto índice de recidivas locais e podem ocasionar metástases preferencialmente nos pulmões, mas também no sistema nervoso central, fígado e mamas (Torti & Correa, 2020).

Tumores adrenocorticais (ACTs) pediátricos apresentam um melhor prognóstico em relação aos tumores de adultos, principalmente se diagnosticados precocemente. O diagnóstico precoce ocorre na maioria das vezes porque crianças que desenvolvem carcinomas adrenocorticais apresentam aumento da produção de hormônios andrógenos, e evidências clínicas que facilitam o diagnóstico (Michalkiewicz et al., 2004).

Devido a uma mutação germinativa (R337H) no gene supressor de tumor TP53 na maioria dos tumores adrenocorticais pediátricos de pacientes brasileiros, a incidência desses tumores é cerca de 10 vezes superior no Brasil do que no restante do mundo (Latronico et al., 2001; Ribeiro et al., 2001). O gene TP53 é reconhecidamente importante para o desenvolvimento de cânceres quando está mutado (Leroy et al., 2014). A mutação germinativa R337H, definida pela substituição do aminoácido arginina pelo aminoácido histidina, e que está relacionada ao aumento de incidência de ACC infantil na população brasileira, não aumenta a incidência de outros tipos de tumores nesses pacientes. Provavelmente a mutação R337H torna a proteína p53 parcialmente funcional e pH dependente, e é relevante apenas para a incidência de tumores na faixa pediátrica (DiGiammarino et al., 2002; Libe et al., 2007; Pinto et al., 2015).

Em pacientes adultos, o diagnóstico é feito através da análise de nove critérios histológicos e patológicos chamados escore de Weiss (Weiss, 1984). Em 2002, Aubert e colaboradores revisaram os critérios, entretanto o sistema com os nove parâmetros

ainda é mais usado para o diagnóstico de ACTs. Assim, o tumor é considerado um carcinoma quando possui três ou mais dos seguintes critérios: elevada taxa mitótica, presença de mitoses atípicas, necrose, grau nuclear III ou IV, arquitetura difusa, células claras constituindo 25% ou menos do tumor, invasão de estruturas venosas, invasão sinusoidal e invasão da cápsula tumoral. De acordo com a rede europeia de estudo dos tumores adrenais [*European Network for the Study of Adrenal Tumors*, (ENSAT)], os tumores adrenocorticais podem ser classificados em quatro estágios, conforme descrito na Tabela 1 (Gaujoux et al., 2017).

Tabela 1 – Estágios da evolução de carcinomas adrenocorticais*

Estadiamento	Tamanho	Restrito a cápsula	Invasão de linfonodos	Metástase
Estágio I	< 5 cm	sim	não	não
Estágio II	> 5 cm	sim	não	não
Estágio III	sem definição	sim ou não	sim ou não	não
Estágio IV	sem definição	restrito ou não	invasão ou não	sim

*de acordo com *European Network for the Study of Adrenal Tumors* (ENSAT)

A Sociedade Europeia de Endocrinologia (ESE) e o ENSAT recomendam que, para confirmação de casos de carcinomas adrenocorticais, são necessárias: 1) a determinação do escore de Weiss, com especificação da taxa mitótica; 2) a porcentagem de células Ki-67-positivas, que é um marcador de proliferação em tumores; 3) o estadiamento do tumor, conforme mostrado na Tabela 1; e 4) a condição, total ou parcial, da ressecção do tumor. Para a distinção de tumores adrenocorticais primários e tumores não adrenocorticais é recomendado que seja analisada a expressão de SF1 por imunoistoquímica (Fassnacht et al., 2018).

A abordagem inicial para tratamento dos carcinomas adrenocorticais é a completa ressecção cirúrgica do tumor, entretanto muitos pacientes apresentam recidivas e metástases. O tratamento é realizado com o agente adrenolítico e citotóxico mitotano, um derivado do inseticida diclorodifeniltricloroetano (DDT), que apresenta efeitos colaterais neurológicos e gastrointestinais. Assim, sua

administração é recomendada apenas para pacientes com risco de recorrência (Aufforth & Nilubol, 2014; Fassnacht et al., 2018).

Nos últimos anos, alguns estudos genômicos de larga escala foram realizados para compreender as alterações que ocorrem em ACCs e ACAs (Fonseca et al., 2012; Assié et al., 2014). Foram analisados os níveis de metilação e identificadas 212 ilhas CpG hipermetiladas em carcinomas. A expressão gênica desses fatores foi avaliada em 6 adrenais normais, 10 adenomas e 6 carcinomas e foi observado que os genes *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A)*, *GATA Binding Protein 4 (GATA4)*, *Cilia And Flagella Associated Protein (DLEC1)*, *Histone Deacetylase 10 (HDAC10)*, *PYD And CARD Domain Containing (PYCARD)*, *Secretoglobin Family 3A Member 1 (SCGB3A1/HIN1)* tinham expressão reduzida em comparação aos tecidos normais (Fonseca et al., 2012). Também foram analisados 122 ACCs que foram separados em dois grupos com diferentes prognósticos, de maneira que o subgrupo com pior prognóstico tinha mais regiões metiladas no DNA e mutações nos genes *Zinc And Ring Finger 3 (ZNR3)*, *Catenin Beta 1 (CTNNB1)* e *TP53* (Assié et al., 2014).

Estudo do nosso grupo identificou, através de análise por qPCR, que *TCF21* tem expressão diferencial em tumores adrenocorticais adultos e sua expressão é fator de prognóstico, capaz de separar pacientes com carcinomas em dois subgrupos: um com pior e outro com melhor sobrevida geral (Passaia et al., 2018). Além disso, sugerimos que *TCF21* pode ser considerado um supressor tumoral em tumores adrenocorticais, em acordo com o que ocorre com outros tumores (Jiang & Yang, 2018).

1.5 TCF21 em tumores adrenocorticais

TCF21 está pouco expresso em carcinomas de pulmão, cabeça e pescoço, em melanomas, em câncer renal e em hepatocarcinomas (Tessema & Belinsky, 2008; Arab et al., 2011; Gooskens et al., 2018; Lu et al., 2018). Em câncer de cabeça e pescoço, em câncer de pulmão de células não pequenas e em melanomas metastáticos, *TCF21* está epigeneticamente silenciado (Smith et al., 2006; Arab et al., 2011). Em tumores adrenocorticais, a análise da expressão de *TCF21* em amostras de carcinoma, adenoma e tecido adrenocortical normal humano detectou que *TCF21* foi duas vezes menos expresso em carcinomas do que em adenomas e quatro vezes menos expresso quando comparado às amostras de tecido adrenal normal (Giordano et al., 2009; França et al., 2013). Em França e colaboradores (2013) mostramos que

TCF21 se liga ao sítio E-box do promotor de *SF1* promovendo a inibição de *SF1* e do gene *StAR* em células de carcinomas adrenocorticais humanos, o mesmo ocorre em células normais de adrenal de rato (França et al., 2015). Em células adrenocorticais, H295R, *SF1* está relacionado com o aumento da capacidade proliferativa e com desenvolvimento de hiperplasia e neoplasia em camundongos com elevada expressão de *SF1* (Doghman et al., 2007). Além disso, utilizando a base de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathways* (KEGG) foram identificadas três vias correlacionadas negativamente com a expressão de *TCF21*: ciclo celular, biossíntese de glicosaminoglicanos/heparan sulfato e controle de qualidade do mRNA. Dentre os genes do ciclo celular estão os genes *cyclin B2* (*CCNB2*), *cyclin dependent kinase 1* (*CDK1*), *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein theta/14-3-3 protein theta* (*YWHAQ*), *checkpoint kinase 2* (*CHEK2*), *origin recognition complex subunit 2* (*ORC2*), *transcription fator E2F2* (*E2F2*), *S-phase kinase associated protein 2* (*SKP2*), *cyclin A2* (*CCNA2*) e *budding uninhibited by benzimidazoles homologo beta 1* (*BUB1B*).

A análise de *TCF21* em células de linhagem de hepatocarcinoma, células HepG2, mostrou que *TCF21* não se liga ao receptor nuclear Receptor Homólogo de Fígado (*LRH1/NR5A2*), que também é membro da família de receptores nucleares da subfamília *Ftz-F1*, e compartilha alta homologia com *SF1* (Becker-André et al., 1993). No fígado, *LRH1* está envolvido com o transporte reverso do colesterol, com a síntese dos ácidos biliares na circulação enterohepática e na lipogênese (Fayard et al., 2004; Xu et al., 2010). *LRH1* é regulador do metabolismo do colesterol nos ovários, do seu desenvolvimento e função (Mouzat et al., 2013). Nas células HepG2 que hiperexpressam *TCF21*, *TCF21* se liga a duas regiões distintas do promotor de *SHP* (*small heterodimer partner*), que é um regulador negativo de *LRH1*. Essa ligação inibe a expressão de *SHP* resultando na expressão de *LRH1*. Portanto, em células HepG2 *TCF21* tem funções que contrastam com as observadas nas células de tumores adrenocorticais (França et al., 2015).

TCF21 foi analisado por RT-PCR em 78 amostras de pacientes adultos (44 adenomas e 34 carcinomas) e em 35 amostras de tumores pediátricos de pacientes com menos de 5 anos de idade (27 adenomas e 8 carcinomas) e em 15 amostras de pacientes de 5 a 18 anos (5 adenomas e 10 carcinomas). Essa análise confirmou que em nosso coorte a expressão de *TCF21* é menor em carcinomas adultos do que em

adenomas (Passaia et al., 2018). Em pacientes pediátricos, maiores e menores de 5 anos, não houve expressão diferencial de *TCF21* nos tumores malignos e benignos de pacientes. Além disso, o gene *BUB1B* (*BUB1 Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase B*), gene de checkpoint mitótico, confirmou sua maior expressão em carcinomas do que em adenomas adultos. A expressão combinada do gene *TCF21* e do gene *BUB1B* mostrou 84% de acurácia, e foi considerada como marcador de sobrevida em pacientes adultos (de Reynies et al., 2009; Fragoso et al., 2012). Ao utilizar o valor de corte maior que 0.19 para a expressão combinada de *TCF21* e *BUB1B* foi possível separar os pacientes com carcinomas em dois subgrupos: um com melhor sobrevida, no qual nenhum paciente morreu durante o período de acompanhamento, e outro grupo com expressão menor que 0.19 que teve pior prognóstico de sobrevida, cerca de 2 vezes menor que o grupo anterior. Em pacientes pediátricos com idade menor que 5 anos a expressão gênica combinada de *TCF21* e *SF1* foi considerada preditor de malignidade com acurácia de 79% (Passaia et al., 2018). Em conjunto, os dados obtidos até o momento sobre a expressão de *TCF21* sugerem que *TCF21* pode ter um papel importante no processo tumorigênico das suprarrenais. No entanto, para um melhor entendimento do seu papel nesses tumores tivemos como hipótese que *TCF21* pode se ligar a outros alvos gênicos relacionados com o desenvolvimento dos tumores adrenocorticais, e para isso tivemos os seguintes objetivos abaixo descritos.

2. Objetivos

a) Identificar novos alvos que possam ser regulados pelo fator de transcrição TCF21, através do sequenciamento do DNA imunoprecipitado pelo método ChIP-Seq, de células de tumor adrenal e hepático, respectivamente H295R e HepG2, após superexpressão de TCF21;

b) Validar os genes alvos selecionados através da modulação da expressão gênica e proteica, após o aumento de expressão de TCF21;

c) Analisar a função dos alvos selecionados após expressão ou inibição desses genes nas células H295R.

3. Materiais e Métodos

3.1 Pacientes

Foram analisadas 55 de amostras de tumores adrenocorticais adultos (29 ACAs e 26 ACCs) e 16 amostras de pacientes pediátricos (10 ACAs e 6 ACCs). As amostras foram obtidas de fragmentos de tumores cedidos pelo Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM-42), Departamento de Clínica Médica da FMUSP. Os pacientes foram diagnosticados com tumores adrenocorticais entre os anos de 1981 a 2014, com tempo médio de acompanhamento de 62,7 meses nos pacientes adultos e 81,9 meses nos pacientes pediátricos (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados clínicos dos pacientes

Adultos		n=55	
Características		Total	%
Média de idade (Anos)		41,41	-
Variação		19-72	-
Sexo	Feminino	41	74,5%
	Masculino	14	25,5%
Diagnóstico	ACA	29	52,7%
	ACC	26	46,3%
Morte relacionada ao tumor		17	30,9%
Média de acompanhamento (meses)		62,7	-
Pediátricos		n=16	
Média de idade (Anos)		3,97	-
Variação		0,9-17,7	-
Sexo	Feminino	13	81,3%
	Masculino	3	18,7%
Diagnóstico	ACA	10	62,5%
	ACC	6	37,5%
Morte relacionada ao tumor		3	18,7%
Média de acompanhamento (meses)		81,9	-

3.2 Culturas de células

Foram utilizadas três linhagens de culturas de células: 1) células de carcinoma adrenocortical humano, a linhagem H295R (Gazdar et al., 1990); 2) células de hepatocarcinoma humano, a linhagem HepG2 (Knowles et al., 1980) e 3) células embrionárias de rim humano, HEK293 (Harrison et al., 1977). As células HEK293 foram utilizadas para padronizar o protocolo de transdução lentiviral.

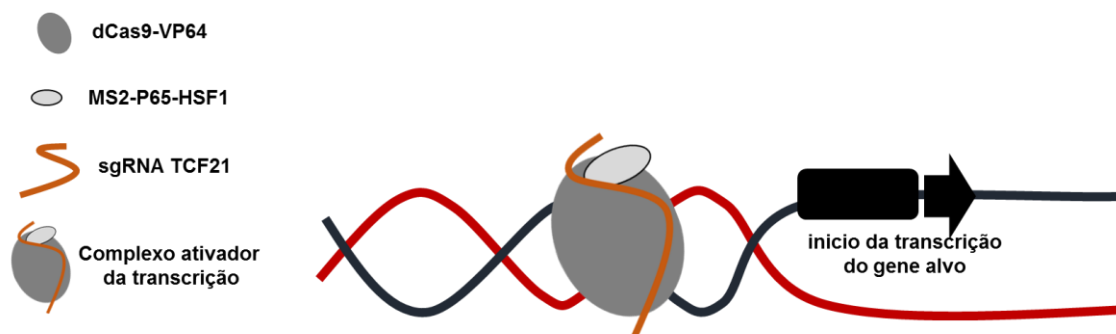
Foram utilizadas culturas de células secundárias obtidas a partir de fragmentos de tumores de pacientes, conforme descrito em França et al., 2013. Foram utilizadas culturas de células de carcinoma adrenocortical adulto (ACC-T36 e ACC-T227), adenoma adulto (ACA-T23 e ACA-T101), carcinoma pediátrico (ACCPed-T218) e adenoma pediátrico (ACAPed-T7). As informações sobre essas culturas de células estão no Anexo I.

As culturas HepG2, HEK293 e as culturas secundárias foram cultivadas em meio DMEM, com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco). A linhagem H295R foi cultivada em meio RPMI com 2% SFB e 1% ITS (insulina, transferina e selênio, Gibco). Todas as culturas foram mantidas a 37 °C em ambiente úmido 95% ar e 5% CO₂.

3.3 Obtenção do sistema CRISPR/dCas9/TCF21 para ativação endógena de TCF21

O sistema de ativação CRISPR/dCas9 é uma modificação do sistema de deleção CRISPR no qual a nuclease Cas9 está desativada, por isso denominada dCas9. Assim, a nuclease dCas9 combinada a um RNA guia (sgRNA) para um alvo específico do DNA se liga a determinada sequência promovendo a transcrição gênica endógena. O sistema de ativação utilizado compreende a construção de um complexo ativador da transcrição que se ligará a uma região de até 200bp antes do sítio de início da transcrição do gene alvo (Figura 3). Esse complexo é formado pela nuclease dCas9 fusionada ao domínio de transativação VP64, o constructo MS2-p65-HSF1, que codifica proteínas fusionadas para aumentar a eficiência da transcrição gênica, e a sequência sgRNA, que guiará o complexo até a região alvo (Koneremann et al., 2014). Os componentes foram inseridos nas células estudadas por transdução lentiviral, ou seja, as sequências foram inseridas no DNA das células. Dessa forma, o sistema é estável após seleção, e efetivo para indução da expressão gênica.

Figura 3 – Esquema sobre os componentes do sistema de ativação CRISPR/dCas9.



Fonte: Próprio autor.

Para a construção do sistema de ativação CRISPR/dCas9 foram utilizados três plasmídeos: a) lenti sgRNA (MS2), (#61427; Addgene, Cambridge, EUA) com resistência ao antibiótico zeocina; b) lenti dCas9-VP64 (#61425; Addgene, Cambridge, EUA), com resistência a blasticidina e c) lenti MS2-P65-HSF1 (#61426; Addgene, Cambridge, EUA), com resistência a higromicina. Os plasmídeos adquiridos vieram armazenados em LB Agar, sendo necessária apenas a sua amplificação. Assim o inóculo de bactérias foi semeado em placa com LB ágar e 100 ng/μl de ampicilina para seleção da colônia e depois foi amplificado *overnight* em meio LB e agitação constante. Os plasmídeos foram extraídos com o kit *ChargeSwitch Pro Filter - plasmid maxiprep kit* (Invitrogen, USA) e quantificados (ng/μl) por espectrometria no equipamento Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Três sequências sinais para a região promotora de *TCF21* foram desenhadas (Tabela 3) e selecionadas através de uma ferramenta online (<http://sam.genome-engineering.org/database/>). A clonagem do plasmídeo sgRNA, ou seja, a inserção da sequência de *TCF21* no plasmídeo lenti sgRNA (MS2) foi realizada de acordo com protocolo estabelecido por Konermann et al., 2014. A sequência utilizada como controle foi GCACTACCAGAGCTAACTCA nomeada *scramble* (SCR).

Tabela 3 - Sequências da região promotora de TCF21

sgRNA	RefSeq	Distância TSS	Sequência
sgRNA TCF21_1	NM_198392	69	GGGCCTGGCAGGCCCTCCC
sgRNA TCF21_2	NM_198392	144	ACATTACAAGTTGCAAATCA
sgRNA TCF21_3	NM_198392	112	AAGGGGTCTAAGCGCTTTGC

Os lentivírus foram produzidos após transfecção dos plasmídeos empacotadores PAX e VSV.G, juntamente com os plasmídeos do sistema CRISPR/dCas9 descritos anteriormente em células HEK293FT empacotadoras. O sobrenadante foi recolhido, filtrado em filtros de 0.45 µm, aliquotado e armazenado à temperatura - 80° C. Essa etapa foi realizada em ambiente NB2 com a colaboração do Dr. Matheus Henrique dos Santos Dias do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) sob responsabilidade do Dr. Hugo Aguirre Armelin.

3.4 Transdução e seleção das células de interesse

As células foram transduzidas e selecionadas primeiramente com o lentivírus dCas9, com resistência à blasticidina, depois com o lentivírus MS2-P65-HSF1, com resistência à higromicina e, por fim, com o lentivírus sgRNA, com resistência à zeocina, contendo as sequências SCR ou sgRNA TCF21_1 ou sgRNA TCF21_2 ou sgRNA TCF21_3 (Tabela 2). Inicialmente, para estabelecimento do protocolo de transdução, foram utilizadas as células HEK293. Com o protocolo estabelecido, e dependendo do tipo celular, 1.5×10^5 a 2.0×10^5 células foram plaqueadas 48 h antes do início da transdução até atingirem 50% de confluência. Para a transdução, as células foram mantidas por 24 h com 1 ml de sobrenadante viral mais 1 ml de meio de cultivo sem soro, com exceção da cultura de células H295R, nas quais foi utilizado meio RPMI 2%+SFB 1% ITS. Em seguida, o sobrenadante viral foi descartado e trocado por meio de cultivo celular com soro. A seleção com antibiótico foi iniciada 48h após a transdução com a concentração de antibióticos estabelecida após a preparação de uma curva de resistência. Primeiramente foram utilizadas diferentes concentrações de: 1) Blasticidina: 5, 10, 20, 30, 50 µg/ml; 2) Higromicina: 25, 50, 100,

250, 500 µg/ml e 3) Zeocina: 100, 250, 500, 750, 1000 µg/ml. Em seguida, foram utilizadas as concentrações dentro de uma faixa mais estreita, determinada após a primeira curva, para confirmar a concentração mínima necessária para cada cultura celular. O meio de cultura com antibióticos também foi adicionado em células não transduzidas. Essa preparação foi realizada em ambiente NB2 no Laboratório de Reparo de DNA do Prof. Carlos Menck do Departamento de Microbiologia do ICB da USP. As células HEK293 transduzidas com *TCF21* foram selecionadas com as concentrações de 10, 100 e 500 µg/ml de blasticidina, higromicina e zeocina, respectivamente, enquanto as células H295R e HepG2 foram selecionadas com as concentrações de 10, 100 e 1000 µg/ml e 4, 500 e 850 µg/ml, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Antibióticos e concentrações utilizadas para a seleção

Cultura de células	Blasticidina (µg/ml)	Higromicina (µg/ml)	Zeocina (µg/ml)
HEK293	10	100	500
H295R	10	100	1000
HepG2	4	500	850

3.5 Transfecção transiente das células H295R

O plasmídeo pCMVMycTCF21 foi usado para aumentar a expressão de TCF21 e foi gentilmente cedido pelo Dr. Masataka Nakamura (Tokyo Medical University, Japan). 1.0×10^7 células foram plaqueadas em placas de 100 mm e, 24 horas após o plaqueamento, transfectadas com o complexo formado por 10 µg de DNA plasmidial pCMVMycTCF21 em combinação com 20 µl do reagente Turbofect (Thermo Fisher Scientific) durante 5 horas, quando o meio de cultura foi trocado. O vetor pCMVMyc foi usado como controle.

Para o aumento de um dos genes estudado, o gene CXCL12, as células H295R foram transfectadas com o vetor pBABE puro SDF-1 alpha (#12270; Addgene, Cambridge, EUA) e o vetor pBABE puro (#1764; Addgene, Cambridge, EUA), esse último usado como controle. 7×10^5 células foram plaqueadas em placa de 35 mm e, 24 horas após o plaqueamento, transfectadas com o complexo formado por 0,5 µg de

DNA plasmidial em combinação com 1 µl do reagente Turbofect (Thermo Fisher Scientific) durante 5 horas, quando o meio de cultura foi trocado.

Extrações de RNA e de proteínas foram feitas 24 h e 48 h após a transfecção, respectivamente. Após 48 h de transfecção foi feito o *crosslink* entre as proteínas e o DNA, para realização do ensaio de imunoprecipitação de cromatina, cujo procedimento completo está descrito no item 3.12.

3.6 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

O RNA total foi extraído utilizando-se Trizol (Invitrogen, USA) e a concentração e pureza do RNA foram avaliadas por espectrometria no equipamento NanoDrop 2000c. Foram utilizados 4 µg de RNA para sintetizar cDNA utilizando a transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, USA), para um volume final de 160 µl com concentração de 25 ng/µl. A reação de qPCR foi realizada em um sequenciador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Os primers utilizados para reações Sybr Green estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Primers utilizados para PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
Beta-actina	CCTCGCCTTTGCCGATCC	CGCGGCGATATCATCATCC
GUSB	AGCCAGTTCCTCATCAATGG	GGTAGTGGCTGGTACGAAA
TCF21	GAAAGAAGTGGTGACCGCGA	GTAAGTGTCTCGCGGGGT
CXCL12	TGCCCTTCAGATTGTAGCCC	GCGTCTGACCCTCTCACATC
LRR4C	GGATCCATAAAGAAGGAGTACTGG	GGACCCGTTTCTCTGTTTGC
HEG1	AACGTTTCGATCGCTGGGATT	CAGTAACGCCCGTTCTCCTT
RUNX1T1	TTGCACACACATCCCTGTCAT	GCACTTGGAGCAGAAATGTGG
MN1	ACCTCGGCCAGTAAATTGGG	CGATCATGTTCTGGCAAGCG
PRDM7	AGCCACAAGAAGACAAACGTGA	GTGCGGGAAACAACCACAC
CNTNAP2	TTACACTTGGTGGGTTGGCA	CTGTGCAGTTGCGTTCGATG
CACNA1B	CAGTGGTCCGTGAATGGGA	GTTGGCCGTCTTGTAGGTGA
PTPRN2	AGGTTCCGGCAATGGACTTT	TTCGGGAGGTCTGCAAGTTC
KCNE1B	GCCCTTAGAAGGTGCCGC	GGGATTTTTCCCGGGTCTGA
ATP10A	TACCTGGGGGACCCCTATTG	GTCCAGTAAGGGTTGGACGG

3.7 Análise da expressão proteica por *immunoblotting*

A proteína total foi extraída das células plaqueadas, ou de 5 mg de tecido, com 190 µl de tampão RIPA mais 10 µl de coquetel de inibidores de protease e fosfato (Sigma Aldrich, EUA) com auxílio de *scraper* ou homogeneizador automático. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4 °C por 15 min para obtenção da proteína total e o sobrenadante obtido foi quantificado através do reagente de Bradford em espectrofotômetro Epoch (Biotech, Winooski, EUA). As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), e as proteínas separadas e retidas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um sistema de transferência úmida. O corante Ponceau foi usado para verificar a eficiência da transferência. As proteínas totais retidas nas membranas foram bloqueadas por 2 h com solução TBST mais 5% de leite sem gordura e incubadas *overnight*, a 4 °C, com o anticorpo primário. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase horseradish e quimioluminescência foram incubados por 1 h a temperatura ambiente e detectados com o reagente ECL (GE Healthcare Life Sciences, EUA) no Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, EUA).

Os anticorpos utilizados foram: anti-beta actina (1:2000, sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA), anti-CXCL12 (1:2500, ab9797, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-CXCR4 (1:2000, #555974, BD Biosciences, California, EUA), anti-β catenina (1:1000, # #9562, Cell Signaling Technology, Massachusetts, EUA), anti-PCNA (1:1000, sc-7907, Santa Cruz Biotechnology), anti-CACNA1B (1:200, ACC-002, Alomone Labs, Jerusalem, Israel), anti-mouse (1:4000, 074-1806, KPL, Massachusetts, EUA), anti-rabbit (1:2000, #7074, Cell Signaling Technology). As membranas foram quantificadas em triplicatas por densitometria usando o software ImageJ.

3.8 Análise da expressão proteica de TCF21 por imunoprecipitação seguida de *immunoblotting*

Em triplicata, 20 µg de proteína total foi incubada com o tampão RIPA (até completar 100 µl) e 2 µl de proteína G (sc-2002, Santa Cruz Biotechnology) por 1 h, em gelo. Após centrifugação de 14000 rpm, por 10 min a 4° C, o sobrenadante foi incubado com 0,4 µg de anticorpo anti-TCF21 (sc-377225, Santa Cruz Biotechnology), *overnight*, a 4° C sob agitação. Após o período de incubação, as amostras foram novamente incubadas com 2 µl proteína G por 4h, a 4° C, sob agitação. Após

centrifugação de 14000 rpm, por 10 min a 4° C, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado por duas vezes com tampão RIPA. O pellet foi ressuspendido em 15 µl de tampão de amostra e aquecido por 5 min a 100° C. Após essas etapas as amostras foram aplicadas em gel SDS a 15%. As membranas foram bloqueadas por 1 h 30 m em temperatura ambiente com TBST + 5% de leite sem gordura, e incubadas overnight, a 4° C, com o anticorpo anti-TCF21 (1:1000, sc-377225, Santa Cruz Biotechnology) com TBST + 2,5% leite sem gordura. O anticorpo secundário anti-mouse (1:4000, 074-1806, KPL, Massachusetts, EUA) foi incubado por 1 h a temperatura ambiente e detectado com o reagente ECL (GE Healthcare Life Sciences, EUA) no Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, EUA).

3.9 Curva de crescimento celular

Em placas de 24 poços, 2.5×10^4 células foram plaqueadas em triplicata e analisadas a cada 24 h após adição de 100 µl de tripsina, para a preparação das células em solução. As células foram contadas em contador automático Countess II FL (Invitrogen, USA).

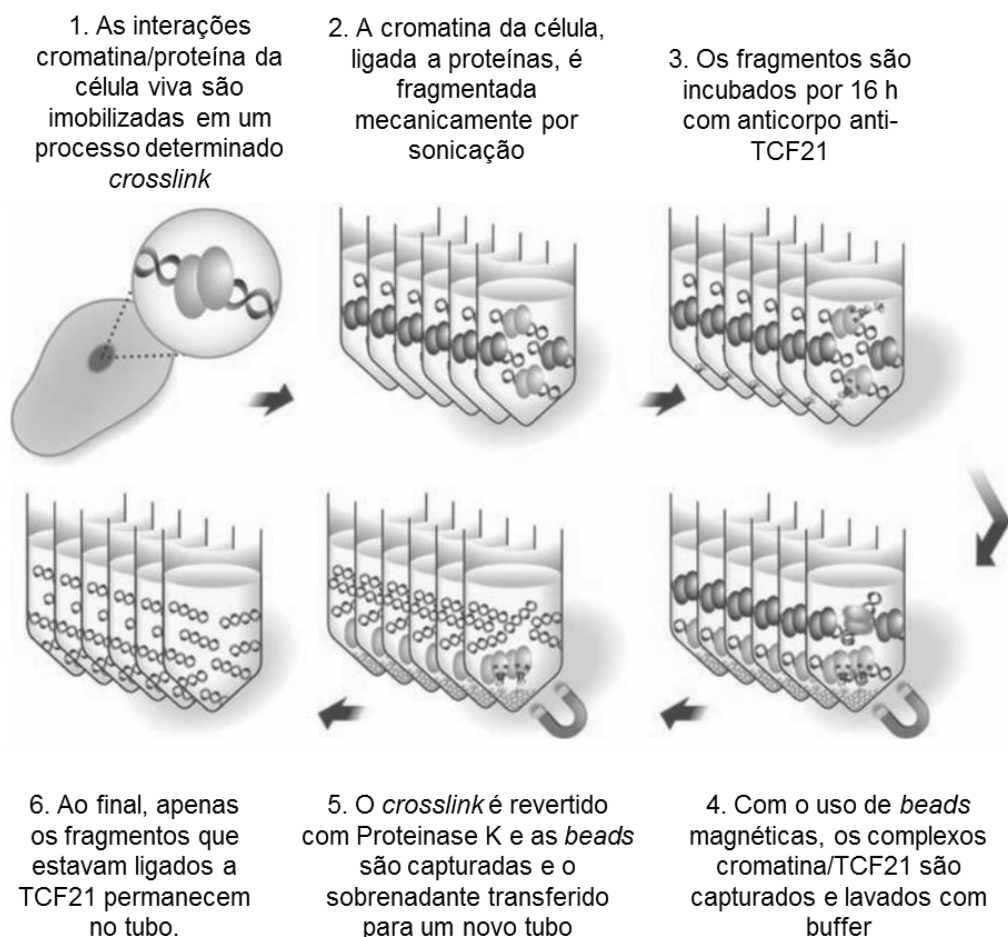
3.10 Ensaio de viabilidade celular e tratamento com ω -Conotoxina MVIIA

O ensaio MTS - CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, USA) é um método colorimétrico através do qual o reagente tetrazolium, cujo nome completo é [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt], de coloração amarela, é bioreduzido pelas células metabolicamente ativas em sais formazan, que é solúvel em meio de cultura, e apresenta cor azul. A quantidade de formazan é proporcional ao número de células metabolicamente ativas, portanto viáveis (Cory et al., 1991). Em placas de 96 poços, 4.0×10^4 de células H295R e 2.0×10^4 de ACC-T227 foram plaqueadas e após 24 h foi adicionado 100 nM de ω -Conotoxina MVIIA para bloqueio do canal Ca v2.2, como descrito em Bleackman et al., 1995 e Aritomi et al., 2011. Para a reação foram utilizados 20 µl do reagente MTS - CellTiter em 100 µl de meio de cultura e as células foram incubadas por 4 h a 37° C em atmosfera úmida e 5% de CO₂. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm (Biotech, Winooski, EUA).

3.11 Ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP)

O ensaio de imunoprecipitação de cromatina permite analisar interações DNA-proteína envolvidos nos mecanismos regulatórios da transcrição gênica, como a ligação de um fator de transcrição (proteína) em uma região regulatória (DNA), identificando desta forma quais genes são ativados e provavelmente transcritos (Gade & Kalvakolanu, 2012). Esse ensaio foi realizado com o kit ChIP-IT Express (Active Motif, USA) e é constituído de várias etapas como mostrado na Figura 4. Foram plaqueadas $1.0 - 9.0 \times 10^7$ células em placas de 100 mm por 24 h ou 48 h antes da transfecção com o plasmídeo pCMVMycTCF21, e mantidas em cultura por 48 h.

Figura 4 – Etapas do protocolo de ensaio de imunoprecipitação de cromatina.



Fonte: Adaptado do manual ChIP-IT Express (Active Motif, USA).

As células foram mantidas à temperatura ambiente com 2.7 % de formaldeído em meio de cultura por 10 min, para *crosslink* entre as proteínas e a cromatina (etapa 1). A reação de *crosslink* foi interrompida com a adição, por 5 min, do tampão do kit

contendo glicina. As células foram raspadas e retiradas para serem centrifugadas a 2.500 rpm por 10 min a 4° C. O pellet de células obtido foi ressuspensionado em tampão de lise do kit, incubado em gelo por 30 minutos e transferido para um homogeneizador manual para obtenção dos núcleos isolados. Após centrifugação, os núcleos foram ressuspensionados no tampão de sonicação do kit e sonicados no sonicador VCX 130 PB (Sonics & Materials, EUA) a 25 % de potência e a 4°C (etapa 2). Dependendo do tipo celular o tempo de sonicação foi de 6 ou 8 pulsos de 10 s cada com 10 s de intervalo para obtenção dos fragmentos dos complexos de cromatina/proteínas entre 200 bp a 1000 bp. Os fragmentos de cromatina/proteínas foram purificados com o kit ChIP DNA Purification (Active Motif, USA) e analisados em gel de agarose 1%, com ladder de DNA de 1 Kbp para constatação dos tamanhos dos fragmentos obtidos entre 200 bp a 1000 bp. A imunoprecipitação de cromatina foi realizada com *beads* magnéticas de proteína G, com o anticorpo anti-TCF21 ChIP Grade (ab32981, Abcam) e um *cocktail* de inibidores de proteases utilizando o kit ChIP-IT Express (Active Motif, USA). As amostras foram incubadas *overnight* em um rotor giratório, a 4° C, e para 100 µl de cromatina foram utilizados 5 µg de anticorpo anti-TCF21 (etapa 3). Como controle negativo foram incubados 20 µl de cromatina com 1 µg de anticorpo anti-IgG e como controle positivo foram incubados 20 µl de cromatina com 1 µg de anticorpo anti-Polimerase II. Após incubação, as *beads* magnéticas foram imunoprecipitadas e lavadas com os buffers (etapa 4) e em seguida o *crosslink* foi revertido com buffer específico e tratadas com proteinase K (etapa 5). Ao final desse processo, teoricamente, foram obtidos fragmentos ligados ao TCF21 (etapa 6).

3.12 Preparação da biblioteca Illumina para sequenciamento

O kit TruSeq® ChIP Sample Preparation (Illumina) foi usado para preparar as bibliotecas a partir do DNA enriquecido obtido do ensaio de imunoprecipitação. Foram necessários no mínimo 5 ng e no máximo 10 ng totais de DNA imunoprecipitado, que foram quantificados com precisão. Para tal, as amostras foram quantificadas utilizando o kit dsDNA HS (*High Sensitivity*) e o fluorímetro Qubit 2.0 da facility Genial do CEFAP do ICB. As bibliotecas foram construídas com 7 ng de DNA enriquecido, que foi a concentração máxima alcançada após os ensaios de imunoprecipitação de cromatina para os diferentes tipos celulares. As amostras foram reunidas em 200 µl de volume total e concentradas para um volume final de 50 µl, em temperatura ambiente, por centrifugação no Vacufuge (Eppendorf, Alemanha). Após confirmação da quantidade

de DNA enriquecido (7 ng) as amostras passaram pelas etapas ilustradas na Figura 5.

a) Reparo das extremidades dos fragmentos – Essa etapa converte os *overhangs*, que são “saliências” presentes nos fragmentos por causa do processo de sonicação, em extremidades “cegas”. Foi adicionado 10 µl do tampão de ressuspensão do kit mais 40 µl do mix de reparo aos 50 µl do DNA enriquecido. As amostras foram incubadas a 30° C por 30 min em um termociclador. Em seguida foram adicionados 160 µl do reagente AMPure XP Beads (Beckman Coulter Genomics), usado para a lavagem das amostras com etanol 80%, o que permite grande recuperação das amostras através de um ímã magnético.

b) Adição de um nucleotídeo ‘A’ na extremidade 3’ dos fragmentos – Essa etapa tem como objetivo prevenir que os fragmentos se liguem uns aos outros. Para a realização dessa etapa foram utilizados 12,5 µl do mix, que contém o nucleotídeo ‘A,’ adicionado à amostra obtida na etapa anterior seguido de incubação à 37° C por 30 min. e a 70° C por 5 min em um termociclador.

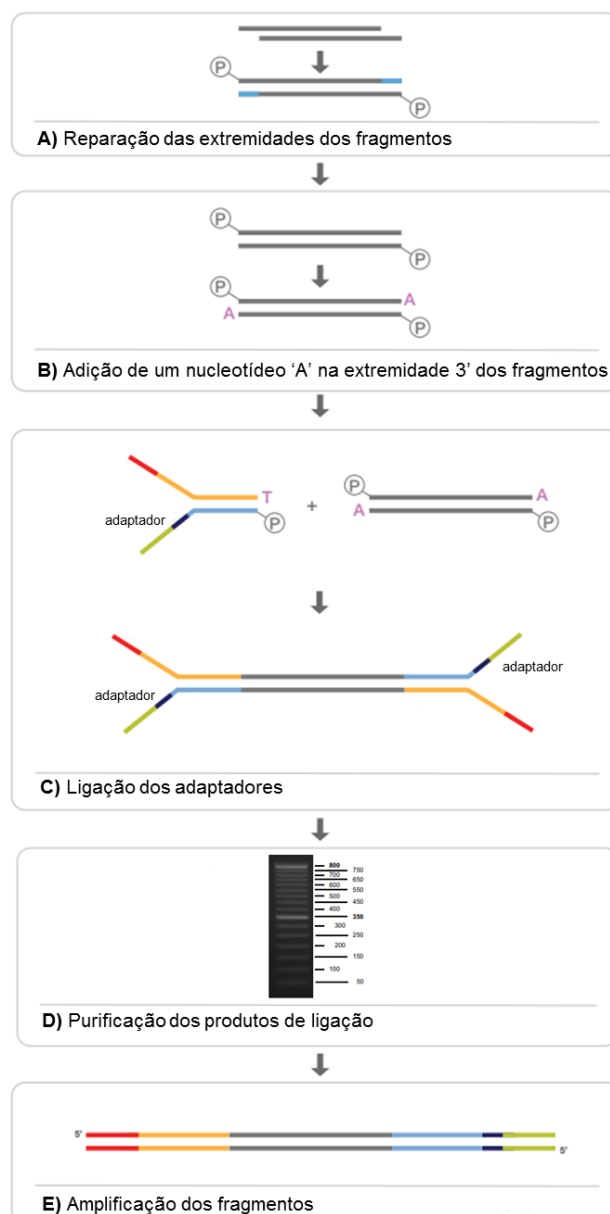
c) Ligação dos adaptadores – Essa etapa tem como objetivo a adição de adaptadores com marcadores (índices) que permitem que as amostras sejam identificadas durante o sequenciamento. Nessa reação foram adicionados 2,5 µl do mix de ligação do kit mais 2,5 µl do adaptador com o índice, que foi escolhido para ser identificado pelo sequenciador Illumina. As amostras foram incubadas a 30° C por 10 min em um termociclador e logo após 5 µl do tampão “Stop Ligation” foi adicionado. Em seguida as amostras passaram novamente pelas lavagens em álcool 80% com auxílio do reagente AMPure XP Beads.

d) Purificação dos produtos de ligação – Essa etapa é para a remoção dos adaptadores que não estejam ligados a fragmentos ou adaptadores que tenham formado dímeros. As amostras foram aplicadas em um gel de agarose ultrapura a 2% preparado em uma cuba para eletroforese que foi previamente higienizada com solução 70% de etanol. Foram utilizados dois pesos moleculares, um de 50 bp DNA ladder e outro de 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) para garantir precisão do tamanho da biblioteca. Os fragmentos ligados aos adaptadores se apresentaram entre 250 a 350 bp no gel. Amostras com esses parâmetros foram retiradas do gel com uma lâmina estéril para o DNA ser extraído com o kit MinElute Gel Extraction

(Qiagen). Dessa forma, os adaptadores não ligados aos fragmentos de DNA não foram amplificados no próximo passo.

e) Amplificação dos fragmentos – Nessa etapa os fragmentos que possuem adaptadores nas duas extremidades foram amplificados. A reação do PCR foi realizada com um *cocktail* de primers do kit para anelar apenas nas extremidades dos adaptadores. O protocolo de amplificação dos fragmentos foi 98° C por 30 s, 16 a 18 ciclos de 98° C por 10 s, 60° C por 30 s e 72° C por 30 s e 72° C por 5 m.

Figura 5 – Etapas do protocolo de preparação da biblioteca Illumina para sequenciamento.



Fonte: Adaptado do manual TruSeq ChIP Sample Preparation e 50bp DNA Ladder.

3.13 Validação das bibliotecas Illumina TruSeq

Essa etapa consiste na verificação do tamanho médio dos fragmentos e da concentração de material obtido após a amplificação. As bibliotecas foram validadas de duas maneiras. A primeira é por fluorimetria e análise do tamanho médio dos fragmentos utilizando o fluorímetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). O tamanho médio dos fragmentos foi verificado através do equipamento Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, California, EUA), usando *High Sensitivity DNA chip*, ambos da *facility* Genial do CEFAP-ICB. Assim, com o tamanho médio dos fragmentos e a concentração em ng/ μ l foi possível calcular a molaridade da biblioteca, que é a unidade utilizada para o cálculo de normalização e preparação do *pool* para o sequenciamento. A segunda forma de validar as bibliotecas é através de PCR em tempo real (qPCR) utilizando o kit *QIAseq Library Quant Array* (Qiagen, Hilden, Alemanha) e placas prontas para uso. Apenas as amostras com os adaptadores são amplificadas, o que torna esse método mais sensível que o anterior. A concentração da amostra foi comparada à uma curva padrão de bibliotecas, com cinco pontos em triplicata. As placas QIAseq necessitam apenas da adição do mix SYBR Green Mastermix com a polimerase HotStarTaq, contida no kit, e das bibliotecas a serem testadas. As bibliotecas foram quantificadas em duas diluições diferentes (1:2000 e 1:20000) e em triplicata. O resultado foi obtido através da planilha de cálculos fornecida pela Qiagen.

3.14 Sequenciamento utilizando a plataforma Illumina MiSeq

Para esse sequenciamento foi utilizado o sequenciador Illumina MiSeq da *facility* Genial do CEFAP-ICB, e o kit MiSeq Reagent Kit v3, 600 ciclos (Illumina). O desenho experimental definido para a primeira corrida na plataforma MiSeq foi de duas leituras de 300 bp por fragmento, com quatro amostras de bibliotecas, cada uma com concentração final para geração dos *clusters* de 12 pM. Como controle interno foi utilizado 10% de Illumina PhiX Control (Illumina), que é uma biblioteca diversificada e equilibrada que funciona como controle da execução do sequenciador. Foram sequenciadas as bibliotecas das células 1) HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 imunoprecipitada com anticorpo anti-TCF21, denominada ChIP HepG2 TCF21; 2) o controle, amostra HepG2CRISPR/dCas9/TCF21 imunoprecipitada com anticorpo anti-IgG, denominada ChIP HepG2 IgG; 3) as células H295R pCMVMycTCF21 imunoprecipitadas com anticorpo anti-TCF21, denominada ChIP H295R TCF21; e 4)

o controle, H295R pCMVMycTCF21 imunoprecipitada com anticorpo anti-IgG, denominada ChIPH295R IgG (Tabela 6).

Tabela 6 – Bibliotecas sequenciadas na plataforma illumina MiSeq

Biblioteca	Índice	Sequência
ChIP HepG2 TCF21	AR007	CAGATC(A)
ChIP HepG2 IgG	AR006	GCCAAT(A)
ChIP H295R TCF21	AR0013	AGTCAA(C)
ChIP H295R IgG	AR0012	CTTGTA(A)

3.15 Sequenciamento utilizando a plataforma Illumina NextSeq

Foram realizados dois sequenciamentos na plataforma NextSeq através de diferentes bibliotecas (Tabela 7) e com o kit NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 ciclos) da Illumina. O desenho experimental definido foi de uma leitura de 75 bp. O DNA fragmentado de cada tipo celular, sem imunoprecipitação de cromatina, foi usado como controle positivo e denominado *input*. O controle interno (PhiX) foi usado a 10% de concentração na corrida NextSeq 1 e, após a observação que seria necessário aumentar a concentração, a corrida NextSeq 2 foi sequenciada com 30% de PhiX.

Tabela 7 – Bibliotecas sequenciadas na plataforma illumina NextSeq

Corrida NextSeq 1		
Biblioteca	Índice	Sequência
H295R input	AR002	CGATGT(A)
ChIP H295R TCF21	AR013	AGTCAA(C)
ChIP H295R TCF21 B	AR004	TGACCA(A)
ChIP H295R IgG	AR012	CTTGTA(A)
HepG2 input	AR015	ATGTCA(G)
ChIP HepG2 TCF21	AR007	CAGATC(A)
ChIP HepG2 TCF21 B	AR016	CCGTCC(C)
ChIP HepG2 IgG	AR006	GCCAAT(A)

Corrida NextSeq 2		
ChIP H295R TCF21 B	AR004	TGACCA(A)
ChIP H295R TCF21 C	AR018	GTCCGC(A)
H295R input	AR002	CGATGT(A)
H295R input B	AR006	GCCAAT(A)

3.16 Análise do sequenciamento MiSeq através da plataforma BaseSpace

A identificação das sequencias foi realizada pelo servidor BaseSpace Sequence Hub da Illumina (<https://illumina.com/platform-services-manager>). O BaseSpace é um servidor online que permite analisar os dados da corrida obtidos diretamente do sequenciador Illumina. A análise de ChIP-Seq usou a ferramenta *Model-based Analysis of ChIP-Seq* (MACS2; <https://github.com/taoliu/MACS/>) para identificar as regiões enriquecidas obtidas através da imunoprecipitação de cromatina, e a ferramenta *Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment* (HOMER; <http://homer.salk.edu/homer/>) para detectar os motivos existentes nessas regiões identificadas (Zhang et al., 2008, Heinz et al., 2010). As regiões foram consideradas significativas para o Q-value <0.05. Esse valor considera que < 5 % dos testes significativos ($P < 0.05$) resultarão em falsos positivos.

3.17 Análise de dados obtidos do sequenciamento NextSeq

A análise dos dados do sequenciamento e as plataformas e ferramentas utilizadas descritas abaixo foram realizados pela empresa RDP Bioinformatics.

A verificação da qualidade da corrida foi realizada usando a ferramenta FastQC 11.7 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) (Andrews, 2010) e as leituras de baixa qualidade foram filtradas com FASTP 20.0 (<http://opengene.org/fastp/fastp>) (Chen et al., 2018). Os escores de qualidade Phred (escores Q) foram usados para medir a precisão das leituras de nucleotídeos. O padrão de qualidade aceitável é $Q > 30$, que significa que a probabilidade de uma chamada de base incorreta é de 1 em 1000.

As leituras das sequencias foram mapeadas com a ferramenta BWA 7.13 (<https://github.com/lh3/bwa/releases>) (Li & Durbin, 2009) usando como referência o genoma humano GRCh38 obtido do banco de dados Ensembl (Homo_sapiens.GRCh38.dna_sm.primary_assembly.fa.gz). Os parâmetros padrões da ferramenta BWA foram utilizados apenas para obter o melhor alinhamento de cada

leitura. A ferramenta Samtools 1.8 foi utilizada para filtrar e remover as sequências duplicadas (<https://sourceforge.net/projects/samtools/files/samtools/1.8/>) (Li et al., 2009), e Qualimap 2.2.1 (<http://qualimap.bioinfo.cipf.es/>) foi utilizada para verificar a qualidade e a cobertura do mapeamento (Okonechnikov et al., 2015).

Para identificar os sítios de ligação de TCF21, ou seja, as regiões enriquecidas do DNA após a imunoprecipitação de cromatina, foi utilizado o método *Peak Calling*. *Peak Calling* é um método computacional para identificar e alinhar as sequências enriquecidas do DNA obtidas após CHIP. Os picos são regiões do genoma em que há várias leituras alinhadas. O *Peak Calling* foi realizado com o MACS2 2.1.1 (<https://taoliu.github.io/MACS/>) (Zhang et al., 2008) usando o processo de desenvolvimento AQUAS (https://github.com/NHLBI-BCB/TF_chipseq_pipeline), e considerado $P < 0.01$. Porém, antes dessa etapa, todas as leituras mapeadas para as mitocôndrias e as regiões consideradas como ruído pela “lista negra” da *Encyclopedia of DNA Elements* (ENCODE) foram excluídas (Amemiya et al., 2019).

A *Irreproducible Discovery Rate* $IDR < 0.05$ foi calculada para identificar picos consistentes, o que garante a reprodutibilidade do experimento (Li et al., 2011). O teste IDR baseia-se em definir quais picos identificados tem frequência similar e consistente entre as réplicas. O protocolo padrão para análises de experimentos CHIP-Seq utiliza $IDR < 0.05$ (Landt et al., 2012). A ferramenta GREAT 4.0.4 (*Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool*, <http://great.stanford.edu/>) foi utilizada para agrupar os genes identificados por função (McLean et al., 2010). Essa ferramenta classifica os resultados pelo valor binomial (observado ou não observado) em todo o genoma. Os resultados foram considerados significativos quando *False Discovery Rate* (FDR) foi < 0.05 .

3.18 Análise Estatística

Os dados de expressão de *TCF21* com o modelo CRISPR/dCas9 foram analisados com o teste ANOVA, com o programa GraphPad Prism 6 e representados com média \pm desvio padrão (DP). A expressão relativa de *TCF21* das culturas de células transduzidas utilizando os sgRNAs para TCF21 foram calculadas em comparação à expressão das células transduzidas com o sgRNA *Scramble* (SCR), utilizadas como controle. As expressões gênicas e proteicas foram analisadas por teste T de *Student*. Foram considerados significativos os resultados com $p < 0.05$.

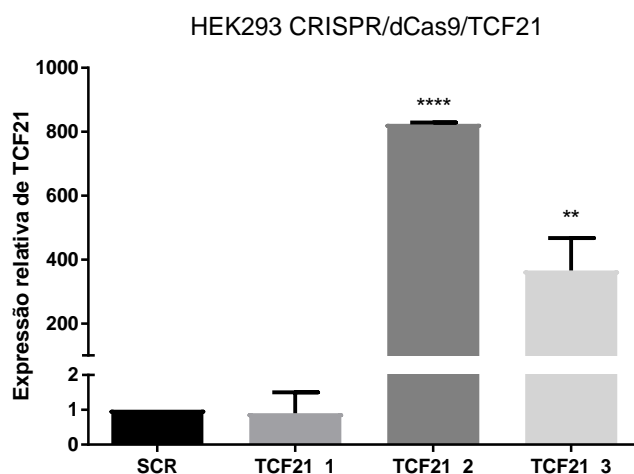
4. Resultados

Resumidamente, os resultados apresentados utilizaram dois sistemas para obtenção das células expressando *TCF21*, o sistema de ativação CRISPR/dCas9 para a ativação endógena de *TCF21* e a transfecção através do plasmídeo pCMVMycTCF21 para superexpressar *TCF21*. Essas células modificadas foram utilizadas em um ensaio de ChIP para enriquecimento de sequências de DNA reconhecidas pelo anticorpo anti-TCF21. Bibliotecas dessas sequências de DNA alvo foram obtidas, seguido do sequenciamento para reconhecimento dos prováveis genes alvos de TCF21. A significância e importância das sequências foram analisadas e selecionadas por ferramentas de bioinformática para determinar os alvos mais prováveis de TCF21. Por fim, os genes alvos selecionados foram validados através de ensaios de expressão gênica, proteica e ensaios funcionais.

4.1 Expressão de *TCF21* através do sistema de ativação CRISPR/dCas9

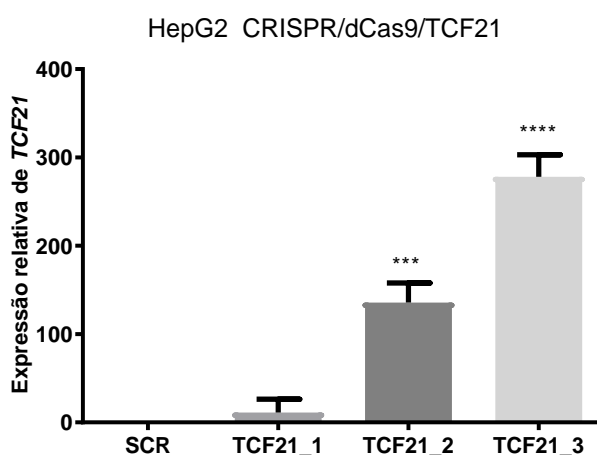
Para testar o sistema de ativação CRISPR/dCas9/TCF21, células HEK293 foram transduzidas com o lentivírus e selecionadas, e a eficiência da expressão do gene *TCF21* foi analisada por qPCR. As células HEK293, com as sequências guias sgRNA TCF21_2 e TCF21_3, tiveram aumento significativo ($p < 0.0001$) da expressão do gene *TCF21* quando comparadas às células controle, células HEK293 com o sgRNA SCR (Figura 6). As células HEK293 sgRNA TCF21_2 expressaram 824.7 ± 3.5 vezes mais *TCF21* do que as células HEK293 SCR, enquanto as células HEK293 TCF21_3 expressaram 366.1 ± 82.6 vezes mais *TCF21* do que as células HEK293 SCR. No entanto, não houve diferença significativa entre a expressão das células HEK293 TCF21_1 em comparação ao controle. Portanto, devido à maior eficiência na ativação de *TCF21* com a sequência sgRNA TCF21_2, essa foi a utilizada nesse tipo celular.

Figura 6 – Expressão relativa de TCF21 nas células HEK293 transduzidas com o sistema CRISPR/dCas9. sgRNA Scramble (SCR) e sgRNA TCF21_1, TCF21_2 e TCF21_3. Resultados representados como média ± DP Teste ANOVA; ** p< 0.01; ****p< 0.0001; n= 3



As células HepG2 foram transduzidas com as mesmas sequencias sgRNA, e o sgRNA TCF21_3 foi selecionado com base na maior eficiência de indução de *TCF21* (278.2 ± 20.3 vezes) em comparação às células HepG2 SCR. As células HepG2 TCF21_2 apresentaram a indução da expressão de 135.6 ± 18.0 vezes (Figura 7), enquanto que, como ocorreu com a HEK293, as células transduzidas com o sgRNA TCF21_1 não apresentaram aumento de expressão de *TCF21*.

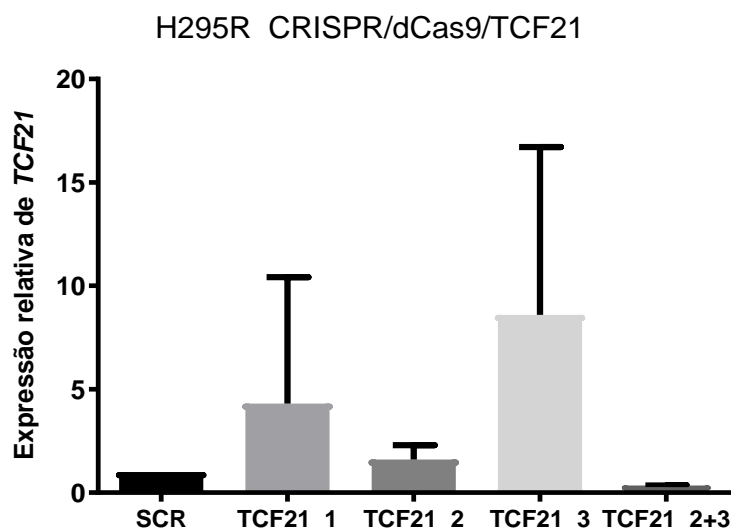
Figura 7 – Expressão relativa de TCF21 nas células HepG2 transduzidas utilizando o sistema CRISPR/dCas9. sgRNA Scramble (SCR) e sgRNA TCF21_1, TCF21_2 e TCF21_3. Resultados representados com média ± DP. Teste ANOVA; *** p< 0.001; ****p< 0.0001; n= 3.



Para caracterização dos modelos biológicos modificados obtidos, células HEK293 e HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 foi realizada a análise da capacidade de proliferação e a viabilidade celular, que está como material suplementar no Anexo II.

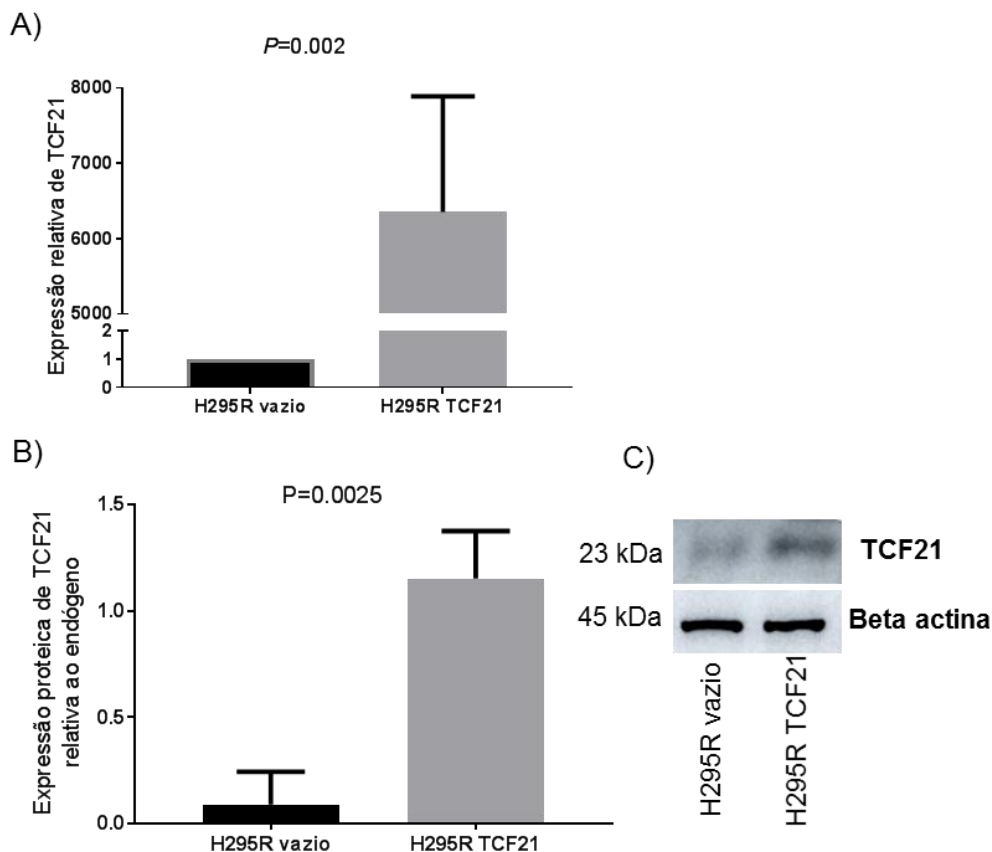
Quando o sistema de ativação CRISPR/dCas9 foi utilizado para a indução de *TCF21* nas células H295R após a transdução dos sgRNAs não observamos sua indução mesmo após a transdução simultânea de sgRNAs *TCF21_2* e sgRNAs *TCF21_3* (Figura 8). Portanto, para contornar essa situação utilizamos a transfecção com o plasmídeo pCMVMycTCF21, conforme descrito em Passaia et al., 2018.

Figura 8 – Expressão relativa de *TCF21* nas células H295R transduzidas com o sistema CRISPR/dCas9. sgRNA Scramble (SCR) e sgRNA *TCF21_1*, *TCF21_2* e *TCF21_3*. Resultados representados com média \pm DP. Teste ANOVA; $p=0.28$; $n= 3$.



A transfecção do vetor pCMVMycTCF21 nas células H295R aumentou a expressão de *TCF21* em $6354 \pm 886,4$ vezes em relação às células controle (H295RpCMVMyc ou H295R vazio), enquanto a expressão da proteína *TCF21* foi cerca de 12 vezes superior ao controle ($P=0.002$, Figura 9).

Figura 9 – Análise da expressão de TCF21. A) A expressão gênica das células H295R TCF21 com o vetor pCMVMycTCF21 e células controle, H295R vazio. B) Expressão proteica das células H295R TCF21 e nas células controle. Resultados representados com média \pm DP. Teste T de Student, $n=3$. C) Immunoblotting para anti-TCF21 e anti-beta actina nas células H295R TCF21 e controle.

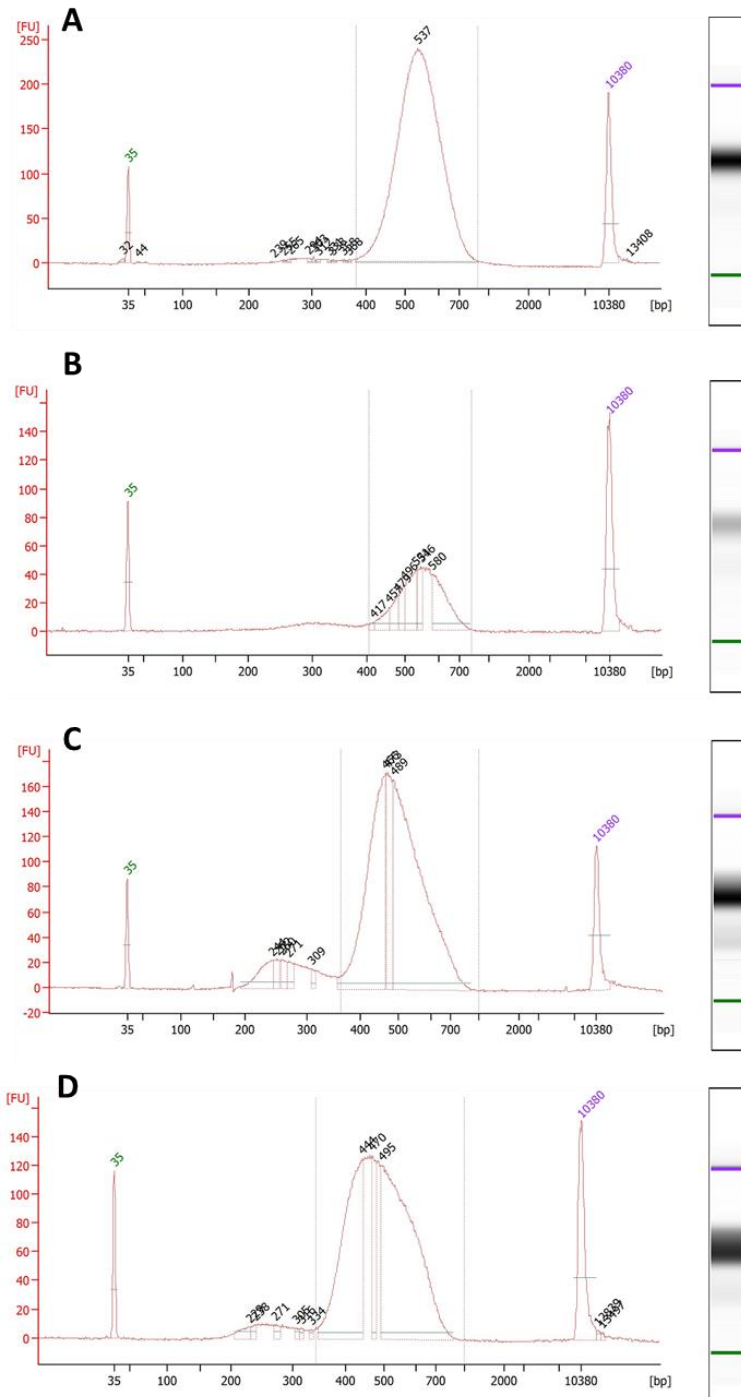


4.2 Obtenção e validação da biblioteca do DNA enriquecido obtido do ensaio de Chip

A biblioteca obtida das células HepG2 IgG após o ensaio de ChIP apresentou uma concentração de 17,7 ng/ μ l de DNA e tamanho médio de 545 bp (pares de base), enquanto a biblioteca de DNA obtida das células HepG2 TCF21 apresentou concentração de 60 ng/ μ l e 549 bp (Figura 10A e 10B). A biblioteca de DNA das células H295R IgG e das células ChIP H295R TCF21 apresentaram, respectivamente, concentração de 20.8 ng/ μ l e 505 bp e 17.8 ng/ μ l e 499 bp (Figuras 10C e 10D). Não foram identificados outros picos de leitura na análise de eletroforese microfluída, além dos controles de leitura de 35 bp e 10380 bp, o que significa ausência de adaptadores livres, isto é, sem ligação a fragmentos e nem fragmentos muito grandes. O tamanho aproximado dos adaptadores é de 100 bp, portanto o tamanho médio dos fragmentos foi de 400 bp. Desta forma, foi definido que as bibliotecas seriam sequenciadas em

duas leituras de 300 bp, a primeira com início na extremidade 3' e a segunda com início na extremidade 5', o que permitiu a leitura de todas as bases do fragmento.

Figura 10 - Eletroforese microfluídica das amostras das bibliotecas de DNA para sequenciamento A) biblioteca HepG2 IgG, tamanho médio 545bp; B) biblioteca HepG2 TCF21, tamanho médio 549bp; C) biblioteca H295R IgG, tamanho médio 505bp; D) biblioteca H295R TCF21, tamanho médio 499bp.



O sequenciamento realizado na plataforma MiSeq mostrou que as amostras não estavam na concentração ideal. Um dos prováveis motivos foi a não ligação dos adaptadores aos fragmentos, e quando isso ocorre o equipamento não é capaz de sequenciá-lo. Por isso, para as corridas seguintes, que foram realizadas na plataforma NextSeq, as bibliotecas foram validadas por qPCR e confirmados seus tamanhos em gel de agarose. Desta forma verificamos que as bibliotecas anteriores estavam com tamanho médio de 500bp por apresentarem produto de “bolha de PCR”. Como é pouco o DNA obtido por ensaios ChIP e a amplificação para construção da biblioteca requer 18 ciclos para amplificação, os fragmentos podem ligar uns aos outros, formando “bolhas de PCR”. Ao serem analisados por eletroforese microfluída os dois fragmentos ligados são lidos como apenas um fragmento, e muito maior do são. Através da quantificação por qPCR os fragmentos são desnaturados e amplificados apenas quando há presença do adaptador. Entretanto, devido às divergências de concentração entre os resultados dos dois métodos, as bibliotecas quantificadas por qPCR foram aplicadas em um gel de agarose 1% para verificar o tamanho médio dos fragmentos após a desnaturação das fitas, confirmando que as bibliotecas estavam com tamanho entre 250 bp e 300 bp. Portanto, o protocolo realizado para as novas bibliotecas para o sequenciamento NextSeq 2 foi realizado com 2 ciclos a menos para evitar que, após a amplificação do material disponível, os fragmentos pudessem se ligar uns aos outros, formando as bolhas de PCR. As concentrações utilizadas estão resumidas na tabela 8.

Tabela 8 – As bibliotecas sequenciadas na plataforma

Corrida NextSeq 1	
Biblioteca	Concentração (nM)
H295R input	47,42
ChIP H295R TCF21	18,38
ChIP H295R TCF21 B	68,02
ChIP H295R IgG	36,57
HepG2 input	26,1
ChIP HepG2 TCF21	155,82
ChIP HepG2 TCF21 B	5,51
ChIP HepG2 IgG	9,99

Corrida NextSeq 2	
ChIP H295R TCF21 B	68,02
ChIP H295R TCF21 C	3,6
H295R input	47,42
H295R input B	21,82

4.3 Identificação das sequencias pela plataforma MiSeq

Estão descritas nos Anexos III as 537 regiões de ligação de TCF21 encontradas nas células H295R pCMVMycTCF21 e no Anexo IV as 285 regiões de ligação de TCF21 nas células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21. Dessas regiões, 38 genes são comuns aos dois tipos celulares analisados e que estão apresentadas no Anexo V. Para definir quais dessas regiões/genes seriam validados foi utilizada a lista de genes identificados na análise por MiSeq em células H295R pCMVMycTCF21 e em células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 e a base de dados cBioPortal for Cancer Genomics (<http://www.cbioportal.org/>), que disponibiliza dados públicos de estudos do genoma de hepatocarcinomas e carcinomas adrenocorticais. A partir dessas análises a expressão de *TCF21* foi correlacionada com a expressão dos genes identificados na corrida MiSeq em cada tipo de tumor. A base de dados CBioPortal oferece a análise da expressão de mRNA de 79 carcinomas adrenocorticais, enquanto dos hepatocarcinomas estão incluídas 366 amostras de mRNA.

As correlações de Spearman podem variar de coeficiente + 1 (correlação positiva perfeita) a coeficiente -1 (correlação negativa perfeita). Foram selecionadas para validação as correlações que apresentaram coeficiente de moderado a forte, ou seja $> \pm 0.5$ referentes às células H295R pcMVMycTCF21. Em células HepG2 CRISPR/dCa9/TCF21 foram selecionadas as correlações $> \pm 0.5$ com genes que também foram identificados pelo sequenciamento nas células de carcinoma adrenocortical (Anexo V). Como esses genes provavelmente são regulados por TCF21 em ambos os tipos celulares, foram selecionados para validação em células H295R e HepG2 (Tabela 9). Não foram constatadas correlações negativas com coeficiente moderado ou forte (> -0.5).

Tabela 9 – Genes selecionados após sequenciamento da plataforma MiSeq

Identificado em H295R pCMVMycTCF21		
Gene	Spearman r	P value
CXCL12	0,526	< 0,0001
Identificados em HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 e H295R pCMVMycTCF21		
LRRC4C	0,671	< 0,0001
HEG1	0,552	< 0,0001
RUNX1T1	0,550	< 0,0001
MN1	0,541	< 0,0001

A análise dos dados por ferramentas de bioinformática realizada pelo Dr. Antonio M. Lerario (Department of Internal Medicine, University of Michigan, USA) detectou que as leituras não foram suficientes para confirmar a ligação de TCF21 nas sequencias identificadas. Portanto, as próximas corridas de sequenciamento foram realizadas com a plataforma NextSeq que apresenta maior capacidade de leituras de fragmentos. No entanto, apesar da falta de garantia de produtividade, foram realizadas validações dos genes selecionados.

4.3.1 Validação dos genes selecionados após sequenciamento da plataforma MiSeq

A análise da expressão dos genes *CXCL12*, *LRRC4C*, *HEG1* e *RUNX1T1* e *MN1* nas células H295R pcMVMycTC21 detectou um aumento de 9.39 ± 1.02 % na expressão de *CXCL12* ($P < 0.001$, Fig 11A), enquanto o gene *RUNX1T1* apresentou uma diminuição de 79.45 ± 8.99 % ($P < 0.001$, Fig 11D). Os genes *LRRC4C*, *HEG1* e *MN1* (Fig. 11B, C e E) não apresentaram alterações significativas quando comparados ao controle. A análise dos mesmos genes nas células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 apresentou uma diminuição da expressão de todos os genes analisados: *CXCL12* ($81.97 \pm 3.37\%$), *LRRC4C* ($75.30 \pm 6.26\%$), *HEG1* ($72.41 \pm 4.71\%$), *RUNX1T1* ($75.25 \pm 5.42\%$) e *MN1* (84.13 ± 5.35 %) ($P < 0.001$, Fig 12 A-E).

Figura 11 – Análise da expressão de mRNA por qPCR em células H295R pcMVMycTCF21. A) expressão de *CXCL12*, B) expressão de *LRRC4C*, C) expressão de *HEG1* D) expressão de *RUNX1T1* e E) expressão de *MN1*. Teste T de Student. Resultados apresentados em média +DP. N=3.

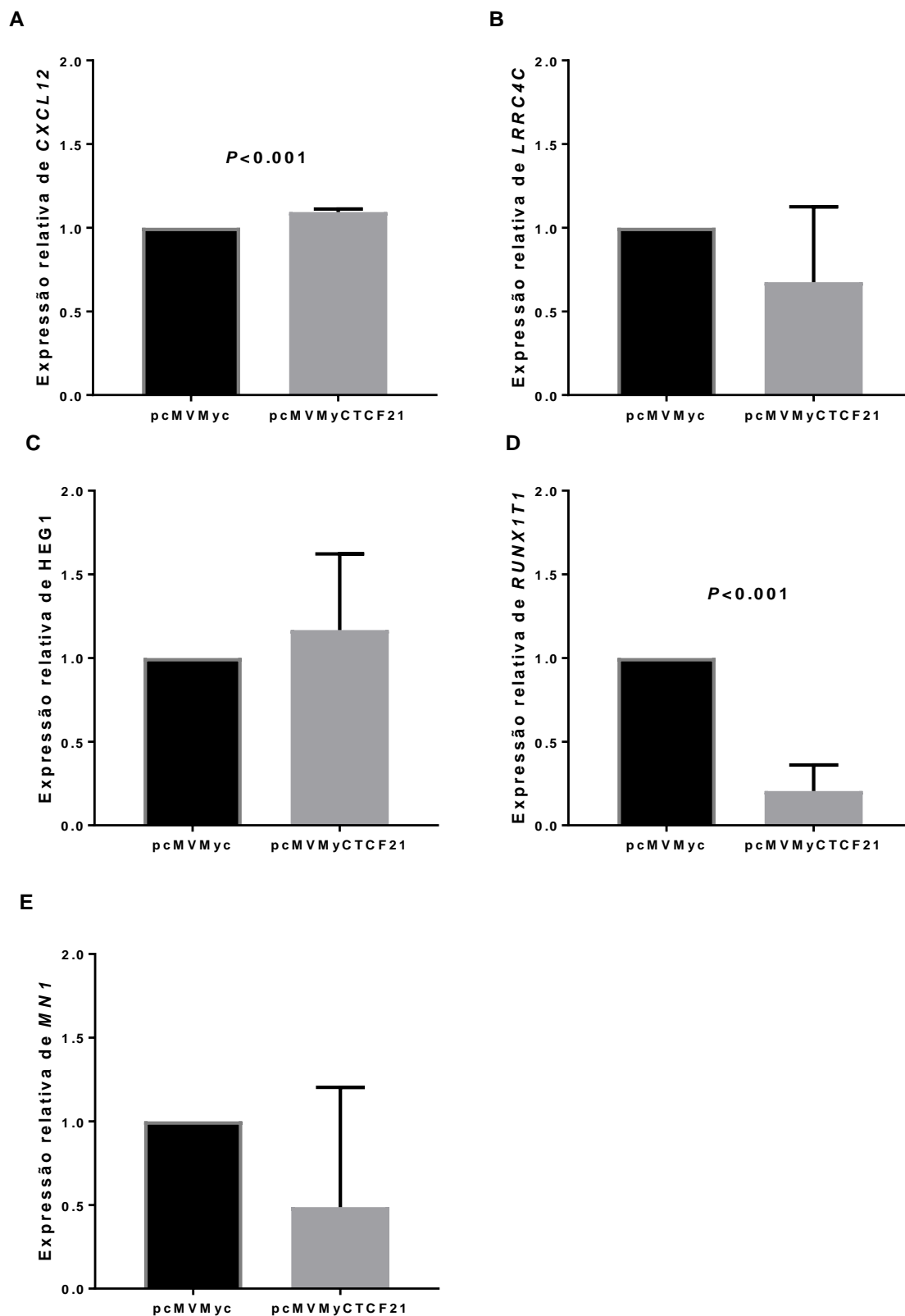
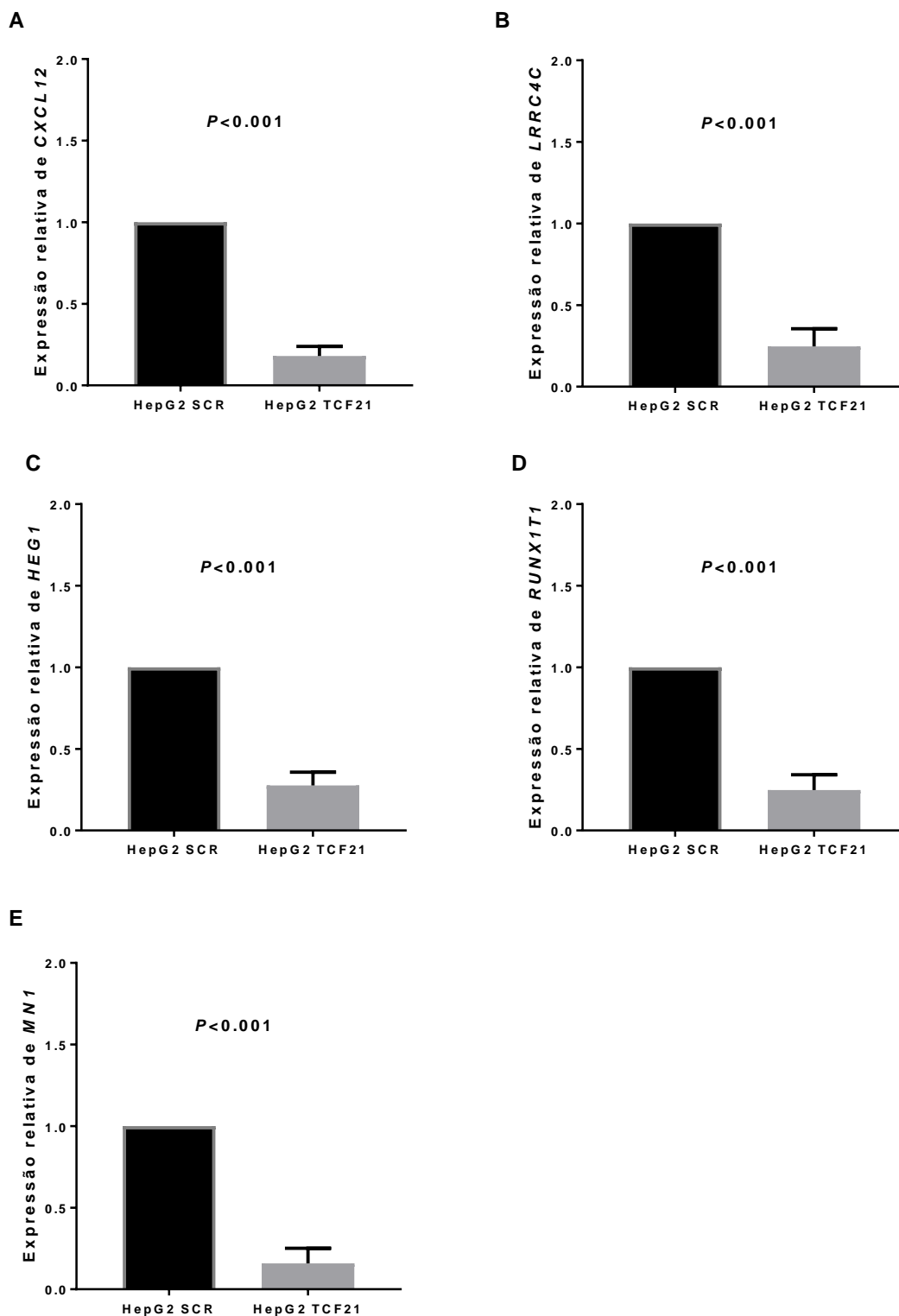


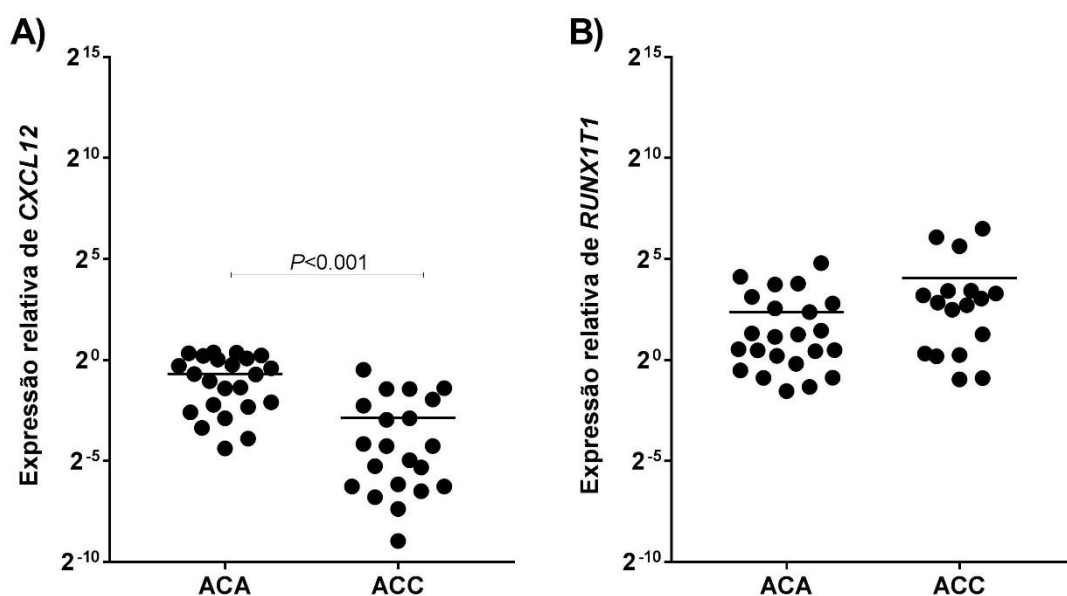
Figura 12– Análise da expressão de mRNA por qPCR em células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21. A) expressão de *CXCL12*, B) expressão de *LRRC4C*, C) expressão de *HEG1*, D) expressão de *RUNX1T1* e E) expressão de *MN1*. Teste T de Student. Resultados apresentados em média +DP. N=3.



4.3.2 Expressão de *CXCL12*, *RUNX1T1* e *CXCR4* em amostras de tumores adrenocorticais

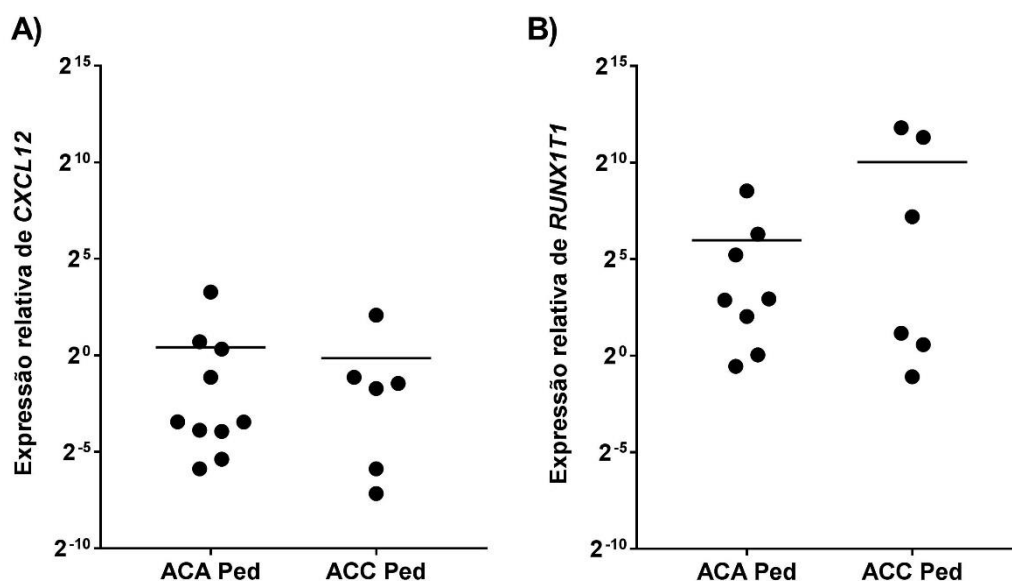
Uma vez que os genes *CXCL12* e *RUNX1T1* apresentaram uma expressão estatisticamente significativa nas células H295R pcMVMycTC21, verificamos como esses genes estão expressos nos tumores adrenocorticais de pacientes. Foram analisadas 44 amostras, 21 amostras de carcinomas e 23 de adenomas adrenocorticais de adultos. O gene *CXCL12* está menos expresso nas amostras de carcinomas do que nas de adenomas ($P < 0.001$, Figura 13A). Não houve diferença na expressão do gene *RUNX1T1* nas amostras analisadas (Figura 13B).

Figura 13 - Expressão relativa dos genes *CXCL12* e *RUNX1T1* em adenomas (ACA) e carcinomas (ACC) de adultos. A) expressão relativa de *CXCL12* ($P < 0.001$); B) expressão relativa de *RUNX1T1*. Teste T de Student em escala logarítmica. ACA n=23; ACC n= 21.



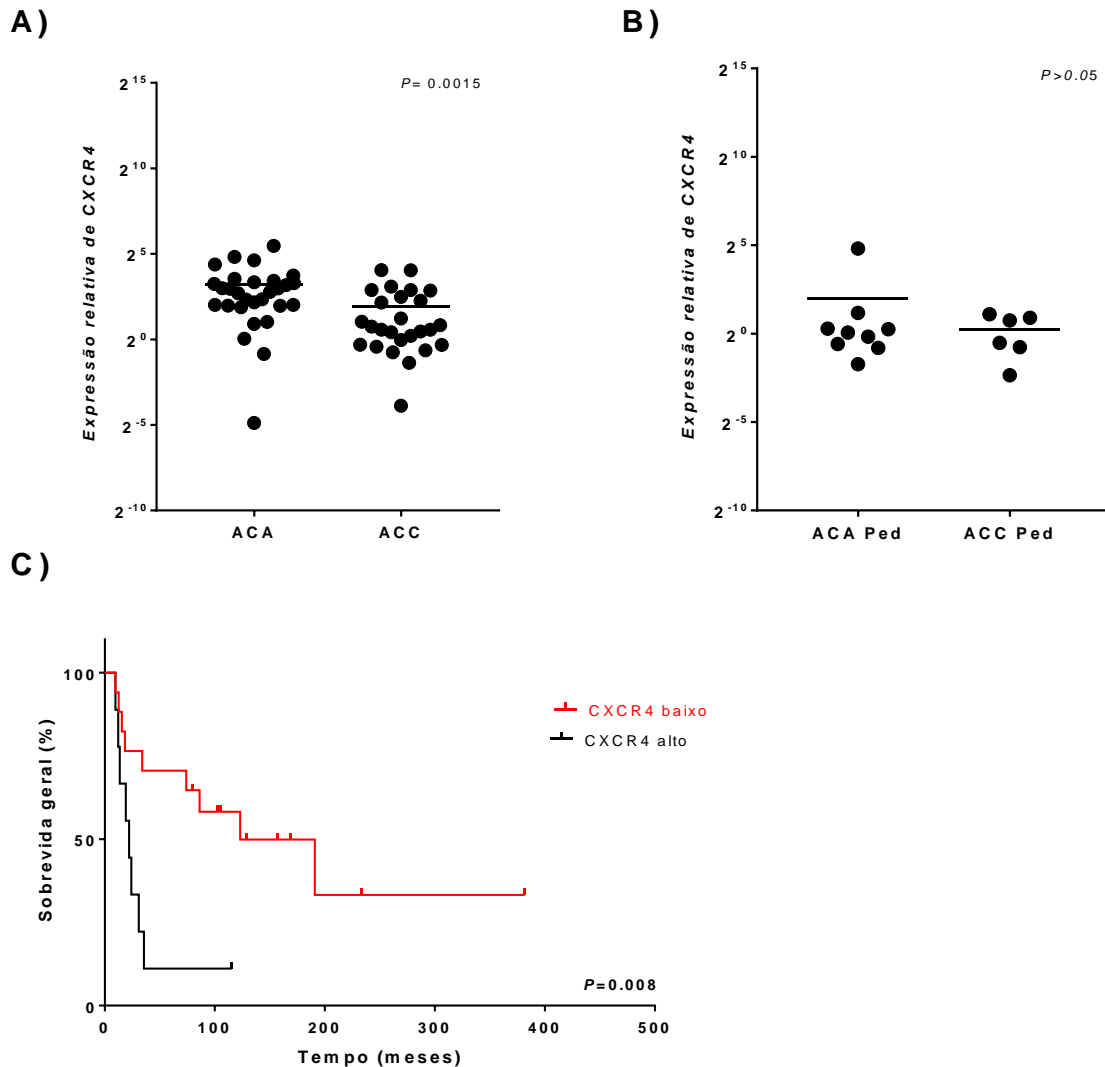
A análise foi também realizada utilizando 16 amostras de tumores adrenocorticais pediátricos, 10 adenomas e 6 carcinomas, que mostrou que não há diferença de expressão dos genes *CXCL12* e *RUNX1T1* nesses tumores (Figura 14 A e B).

Figura 14 - Expressão relativa dos genes *CXCL12* e *RUNX1T1* entre em adenomas (ACA) e carcinomas (ACC) pediátricos. A) expressão relativa de *CXCL12*; B) expressão relativa de *RUNX1T1*. Teste T de Student em escala logarítmica. ACA Ped n=10; ACC Ped n= 6.



Devido a importância de *CXCL12* e do seu receptor *CXCR4* (CXC chemokine receptor 4) no processo tumorigênico (Zhou et al., 2019), também analisamos a expressão gênica de *CXCR4* em amostras de pacientes. As amostras dos carcinomas adultos apresentaram uma menor expressão do gene *CXCR4* em relação aos adenomas ($P=0.0015$, Figura 15 A), enquanto que as amostras dos tumores pediátricos não mostram diferença significativa (Figura 15 B). Quando essas amostras de carcinomas adultos foram analisadas quanto à sobrevida, dois grupos se formaram, com expressão relativa de *CXCR4* maior ou menor que 3.0 (Teste Curva de ROC com 75% de acurácia, $P=0.0018$). As amostras de carcinomas com menor expressão do gene *CXCR4* apresentaram melhor sobrevida do que as com maior expressão de *CXCR4* (Figura 15 C). Esses resultados sugerem que a expressão de *CXCR4* pode ser um fator de prognóstico em pacientes com carcinoma adrenocortical, mas a alta expressão desse fator não pode ser relacionada à malignidade em tumores adrenocorticais, devido aos níveis de expressão dos adenomas.

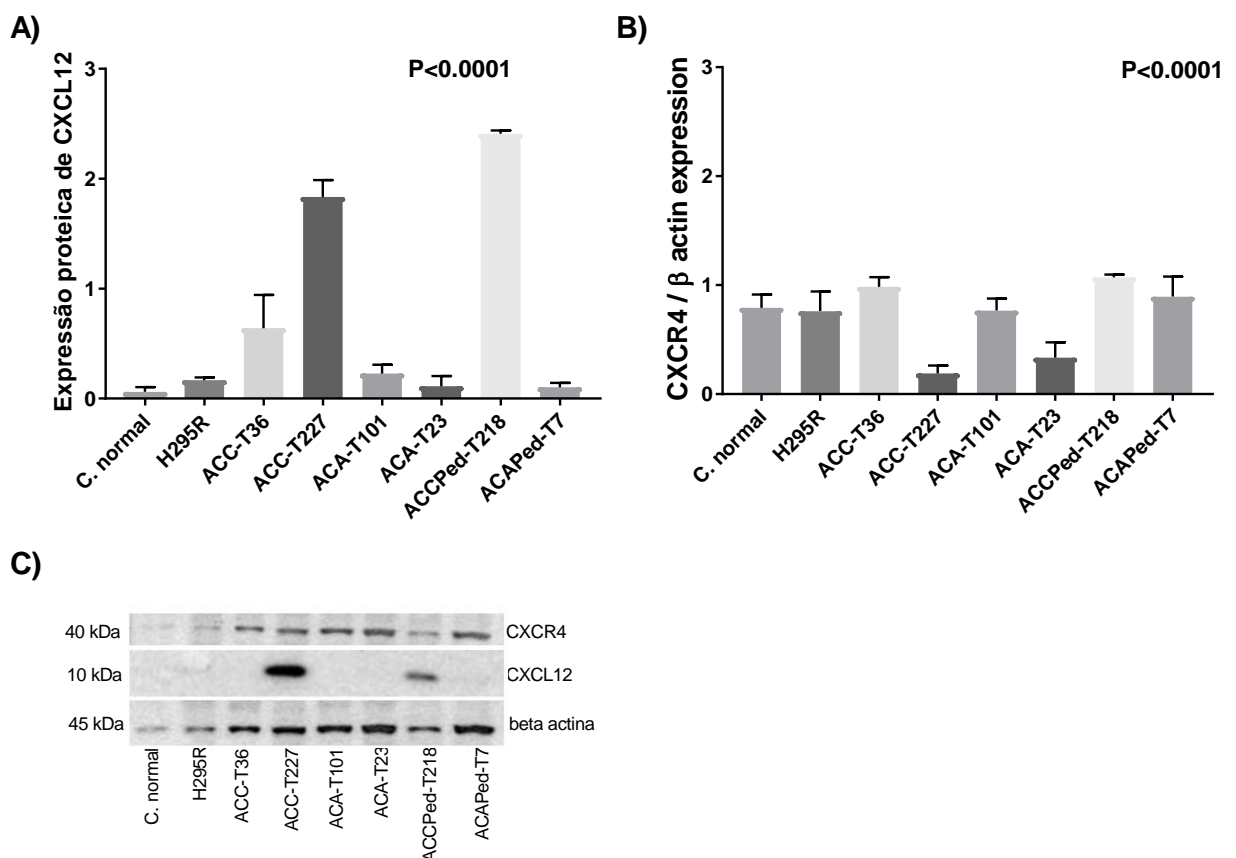
Figura 15 - Expressão relativa do gene *CXCR4* entre em adenomas (ACA) e carcinomas (ACC) A) em pacientes adultos; B) em pacientes pediátricos C) curva de sobrevida geral em pacientes adultos com carcinoma. Teste T de Student em escala logarítmica. ACA n= 29, ACC n= 27, ACA Ped n=9; ACC Ped n= 6, *CXCR4* baixo n= 17, *CXCR4* alto n=9.



A análise da expressão das proteínas CXCL12 e CXCR4 em culturas secundárias de células de carcinoma e adenomas de adultos e pediátricos mostrou que a proteína CXCL12 está mais expressa nas células de carcinomas adultos e pediátricos e menos expressa nos adenomas, em relação à adrenal normal e em relação à linhagem H295R (Figura 16 A e C). Em contraste com o que foi detectado na expressão genica de tumores de pacientes (Figura 13 A), a expressão da proteína CXCL12 nas culturas de células malignas é maior do que culturas de adenomas. Quanto a expressão do receptor CXCR4, de uma maneira geral, não foram observadas grandes diferenças de expressão entre as culturas de células analisadas

com exceção das culturas de células ACC-T227 e ACA-T23 que, em relação às demais culturas analisadas, apresentaram uma diminuição da expressão de CXCR4 (Fig 16 B e C, $P < 0.0001$).

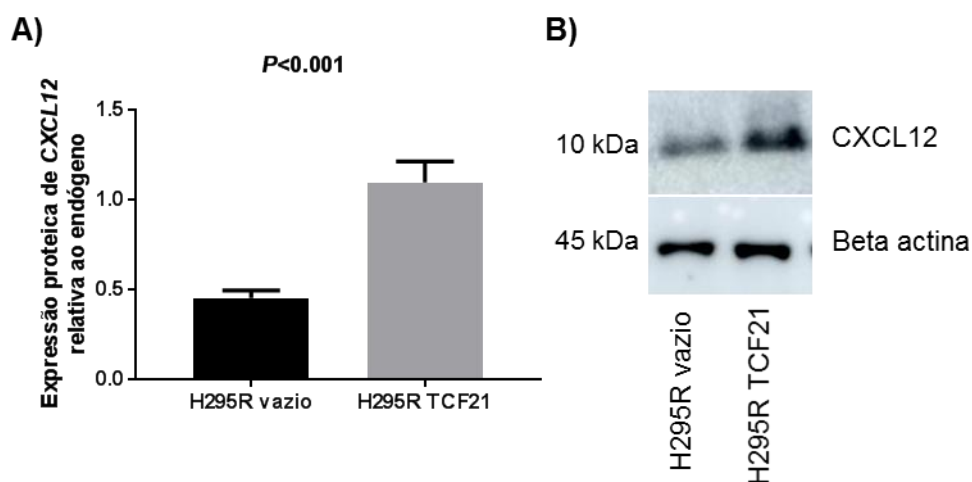
Figura 16 - Expressão proteica de CXCL12 A) expressão de CXCL12 relativa a beta actina em uma amostra de tecido de córtex adrenal adulto (C. normal), na linhagem H295R, em células de carcinoma adulto ACC-T36 e ACC-T227, em células de adenoma adulto ACA-T101 e ACA-T23 e em células de carcinoma pediátrico ACCPed-T218 e de adenoma pediátrico ACAPed-T7. B) imagens de *immunoblotting* para anti-CXCL12 e anti-Beta actina. Teste ANOVA. Resultados representados com média \pm DP. $n=3$.



4.3.4 Validação da relação de TFC21 e CXCL12

Para validar a relação positiva entre TCF21 e CXCL12 observada na análise da expressão do mRNA analisamos a expressão proteica de CXCL12 nas células H295R pCMVMycTCF21, portanto com TCF21 superexpresso. Observamos um aumento de $64.07 \pm 7,27 \%$ ($P < 0.001$) da expressão da proteína CXCL12 em relação às células controle, células H295R vazio, na Figura 17. Dessa forma confirmamos a relação positiva entre TCF21 e CXCL12 também a nível proteico.

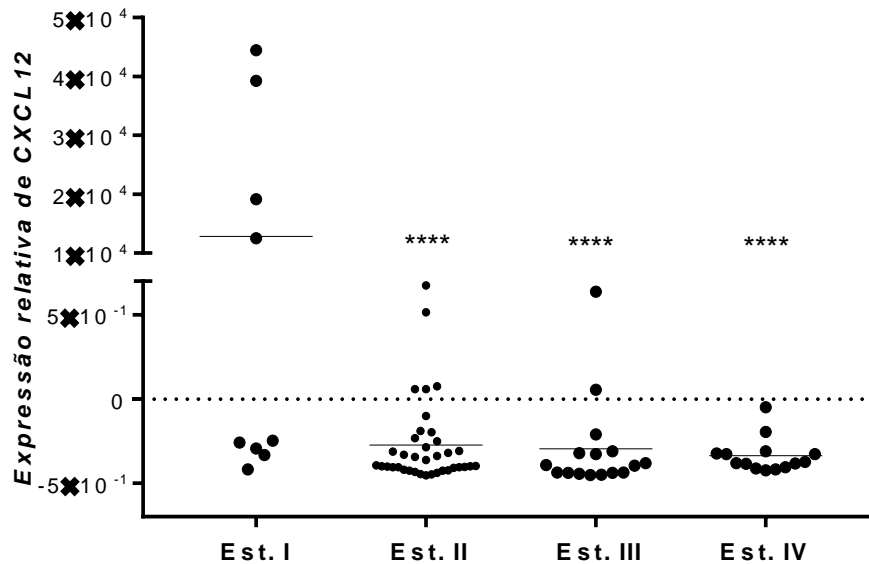
Figura 17 - Expressão CXCL12. A) expressão proteica B) imagens de imunobloting para anti-CXCL12 e anti-Beta actina. Teste T de Student, Resultados representados com média \pm DP. n=3.



4.3.5 Relação da expressão de *CXCL12* com o estadiamento do tumor

Como observamos uma expressão diferencial de *CXCL12* entre adenomas e carcinomas adultos, verificamos se haveria diferença da expressão de *CXCL12* em relação aos diferentes estágios da doença, ou seja, levando em consideração a malignidade do carcinoma. Para tal foi utilizada a base de dados cBioPortal for Cancer Genomics (<http://www.cbioportal.org/>) para relacionar a expressão de *CXCL12* com o grau de estadiamento dos tumores adrenocorticais de 79 pacientes com carcinoma adulto em diferentes estágios da doença (Figura 18). O gene *CXCL12* apresentou a expressão aumentada nos estadiamentos iniciais da doença (Estadiamento 1) enquanto nos demais estágios a expressão foi similar ($P < 0.0001$), sugerindo sua importância nos processos iniciais da doença.

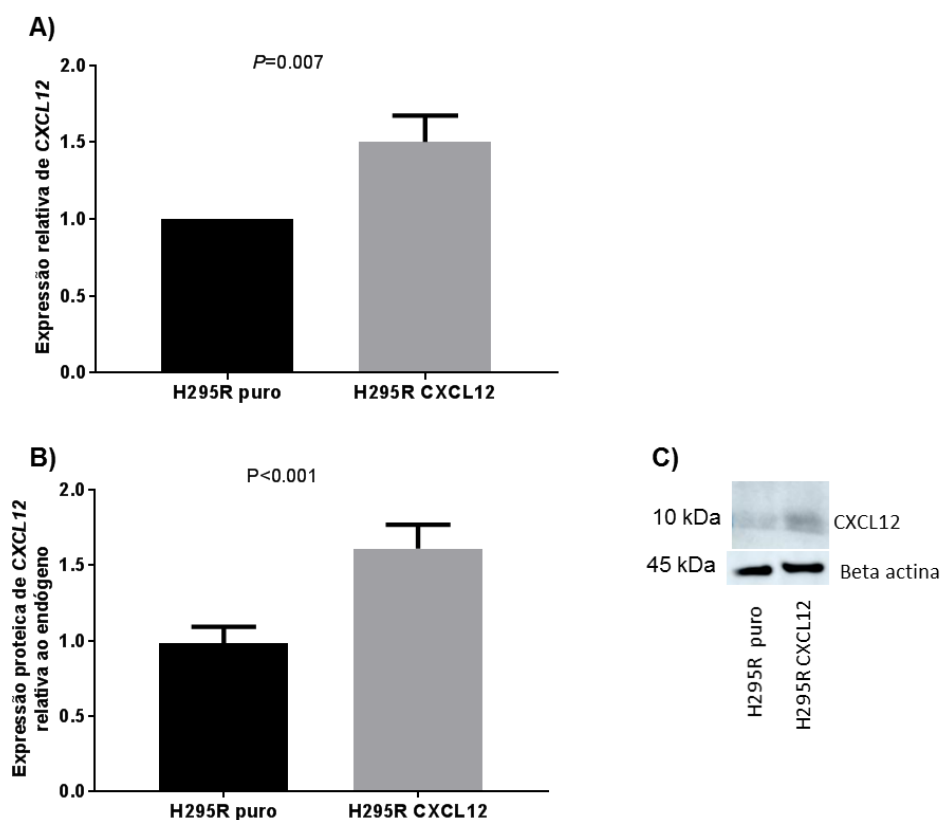
Figura 18 - Expressão relativa de *CXCL12* em 79 amostras de pacientes com ACC adulto. Estadiamento I, n=9, Estadiamento II, n=37, Estadiamento III, n=16 e Estadiamento IV, n=14. Teste ANOVA, dados representados com mediana. ****P<0.0001.



4.3.6 Análise funcional do gene *CXCL12* em carcinoma adrenocortical

Com o objetivo de investigarmos o papel do gene *CXCL12* em um modelo de carcinoma adrenocortical, as células H295R foram transfectadas com o plasmídeo pBABE-*CXCL12* para aumento da expressão do gene *CXCL12* e como controle o vetor pBABE puro. Observamos que as células H295RpBABE-*CXCL12* apresentaram um aumento de 50.29 ± 9.82 % da expressão de *CXCL12* em relação ao controle (Figura 19 A; $P=0.007$), enquanto a expressão proteica foi aumentada em $62.73 \pm 8,26$ % em relação ao controle (Figura 19 B e C, $P<0.001$).

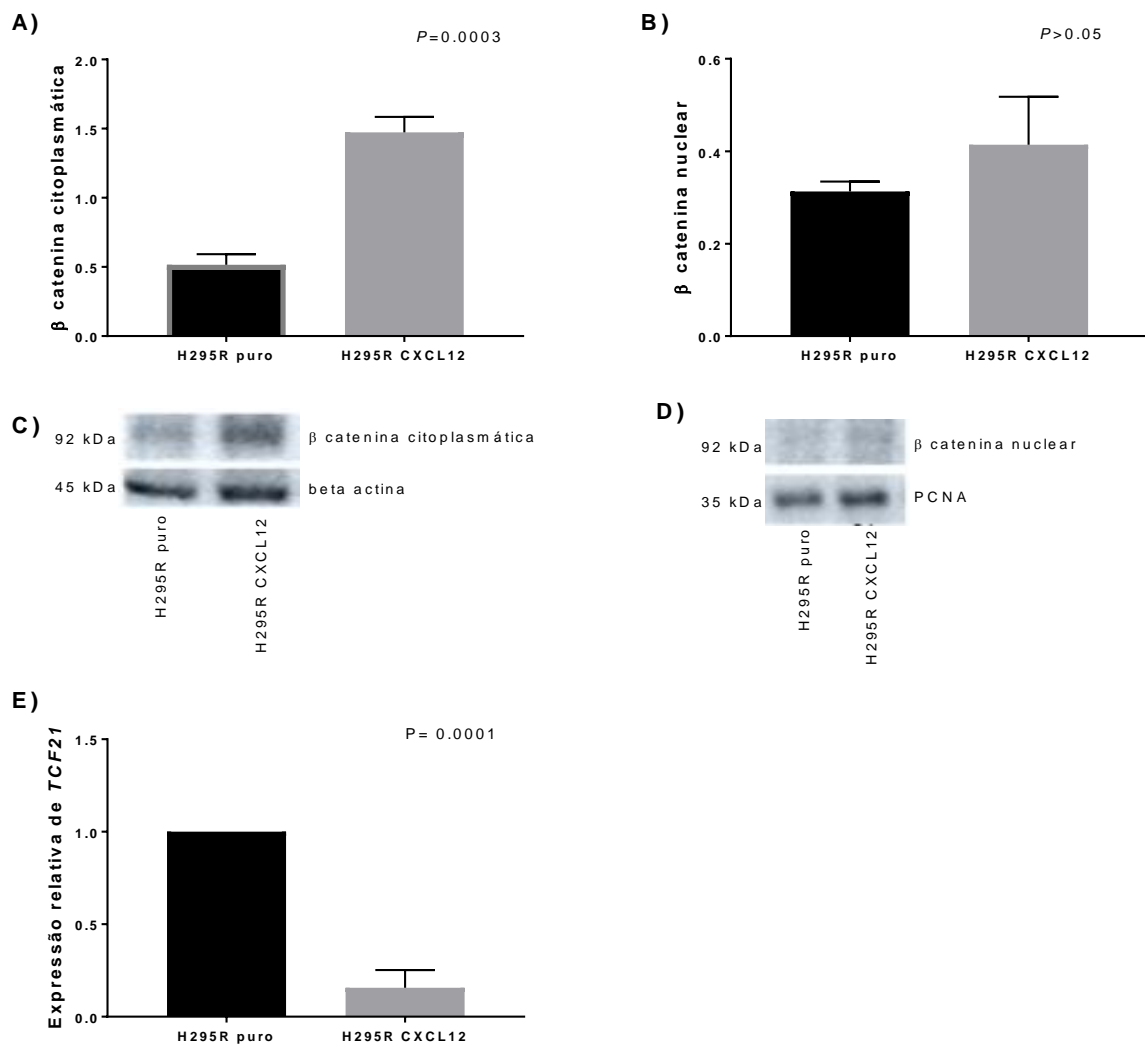
Figura 19 - Expressão relativa de CXCL12. A) expressão de mRNA, n=3. B) expressão proteica, n=5. Teste T de Student. Resultados representados com média \pm DP C) imagens de imunoblotting para anti-CXCL12 e anti-Beta actina.



Segundo Gao e colaboradores (2019) CXCL12 pode atuar ativando a via Wnt pois atua aumentando os níveis de fosforilação de GSK3 β , o que aumenta a β catenina citoplasmática. Além disso, quando CXCL12 se liga ao receptor CXCR4 ele reprime a ligação de TCF21 ao gene *ABCA1* (*ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1*) durante a regulação do metabolismo lipídico, o que promove a aterosclerose. A via Wnt/ β catenina tem papel importante no desenvolvimento embrionário da suprarrenal e na tumorigênese adrenocortical (El Wakil & Lalli, 2011), portanto analisamos o efeito do aumento da expressão de CXCL12 na localização citoplasmática da β catenina e na expressão de *TCF21*. O aumento da expressão de CXCL12 nas células H295R, células H295R CXCL12, induziu um aumento significativo ($P=0.0003$) de 96% \pm 8% na expressão da β catenina citoplasmática (Fig 20 A), mas não significativa na β catenina nuclear (Fig 20 B). A análise da expressão gênica de *TCF21* nas células que superexpressam CXCL12 mostrou uma diminuição em 84% \pm 5% da expressão de TCF21 em relação às células controle (Fig 20 E, $P=0.0001$). No

entanto, não foi possível detectar a expressão proteica de TCF21 nas células H295R puro e H295R CXCL12 por *immunoblotting*.

Figura 20 - Expressão de β catenina em células H295R pBABE-CXCL12. A) Expressão de β catenina citoplasmática B) Expressão de β catenina nuclear C) imagens de immunoblotting para anti- β catenina em lisado citoplasmático e anti-beta actina (controle citoplasmático). D) imagens de immunoblotting para anti- β catenina em lisado nuclear e anti-PCNA (controle nuclear). E) expressão relativa de *TCF21* em células H295R pBABE-CXCL12. Teste T de Student, Resultados representados com média \pm DP. n=3.



4.4 Identificação das sequencias pela plataforma NexSeq

O primeiro sequenciamento NextSeq realizado foi interrompido devido à baixa diversidade de bases nitrogenadas das bibliotecas de DNA obtidas com a abordagem de CHIP (efeito denominado "G overcall", ou seja, excesso de leituras de bases guanina). Portanto as leituras obtidas no primeiro sequenciamento não foram

analisadas com as ferramentas de bioinformática. O segundo sequenciamento na plataforma NextSeq foi realizado com maior concentração do controle interno, biblioteca PhIX, para garantir que o sequenciamento não fosse interrompido. Além disso, as bibliotecas H295R pCMVMycTCF21 foram definidas como prioridade, portanto as amostras das células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 não foram novamente sequenciadas. A maioria das leituras passou no teste de qualidade do sequenciamento ($Q > 30$), e em média 12% das leituras totais eram duplicadas e foram filtradas, ou seja, excluídas da análise (Tabela 10).

Tabela 10 – Resumo das leituras obtidas pela plataforma NextSeq

Biblioteca sequenciada	Número total de leituras	Total de bases	Bases (Q > 30)	Leituras remanescentes após filtragem	%
NextSeq 1					
H295R input	11711561	882180897	840210691	10581264	90.35
ChIP H295R TCF21	926884	68535663	62797177	649937	70.12
ChIP H295R TCF21 B	8524895	640518166	605190310	7628965	89.49
NextSeq 2					
H295R input	23055856	1737519000	166233000 0	22393833	97.13
H295R input B	3521963	250503110	224539502	2805762	79.66
ChIP H295R TCF21 B	20926454	1574673000	149796300 0	20213999	96.60
ChIP H295R TCF21 C	13785231	1015690000	943034267	12665945	91.88

A análise obtida através da ferramenta Qualimap (<http://qualimap.bioinfo.cipf.es/>) mostrou que o mapeamento médio das bibliotecas teve a cobertura de 25 ± 16 % de todo o genoma humano. Esse resultado era esperado, pois houve uma baixa taxa de mapeamento após a remoção das duplicatas e, conseqüentemente, baixa taxa de leituras remanescentes para identificação das sequências (Tabela 11).

Tabela 11 - Resumo do alinhamento das leituras

Biblioteca sequenciada	Leituras mapeadas	Leituras remanescentes após remoção de duplicatas
NextSeq 1		
H295R input	8213911	5000692
ChIP H295R TCF21	457964	484027
ChIP H295R TCF21 B	5453775	4003510
NextSeq 2		
H295R input	17675708	8834944
H295R input B	2177335	1146220
ChIP H295R TCF21 B	14899249	8224815
ChIP H295R TCF21 C	8565125	4653866

Embora as amostras tenham apresentado alta taxa de duplicação e, portanto, baixa quantidade de leituras mapeadas, houve enriquecimento em pequenas partes do genoma, permitindo que as sequencias alvo de TCF21 fossem identificadas. Portanto, foram utilizadas as amostras obtidas das células H295R pCMVMycTCF21 dos dois sequenciamentos NextSeq. Foram identificadas 3.211 sequencias como prováveis sítios de ligação de TCF21, e que estão relacionadas no Anexo VI. Essas sequencias foram submetidas ao teste IDR < 0.05 e foram obtidos 70 picos consistentes, com menos de 5% de chance de serem irreprodutíveis. Os 70 picos IDR < 0.05 representam sequencias reguladas por TCF21 em células H295R pCMVMycTCF21 (Anexo VII) e foram utilizados para as análises de seleção de genes para validação. Dentre as 70 regiões, as que surgiram com maior frequência foram aquelas listadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Relação das 5 sequencias identificadas como os alvos mais frequentes de ligação de TCF21 (IDR < 0.05)

	Gene	Nome
1	PRDM7	<i>PR/SET Domain 7</i>
2	CNTNAP2	<i>Contactin Associated Protein 2</i>
3	CACNA1B	<i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 B</i>
4	PTPRN2	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type N2</i>
5	KCNE1B	<i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E</i>

Assim, os genes *PRDM7*, *CNTNAP2*, *CACNA1B*, *PTPRN2*, *KCNE1B*, foram identificados como alvos de TCF21 com maior frequência de ligação. Foi também

utilizada a plataforma GREAT (<http://great.stanford.edu/public/>) para agrupar os genes identificados com as funções as quais estão relacionados. Essa análise possui caráter descritivo e não teve como finalidade identificar genes para validação. Dentre as 3.211 sequências obtidas a função significativamente relacionada (FDR < 0,001) foi o processo de morte celular por apoptose de fibroblastos. Os genes que possuem essa função estão listados na Tabela 13.

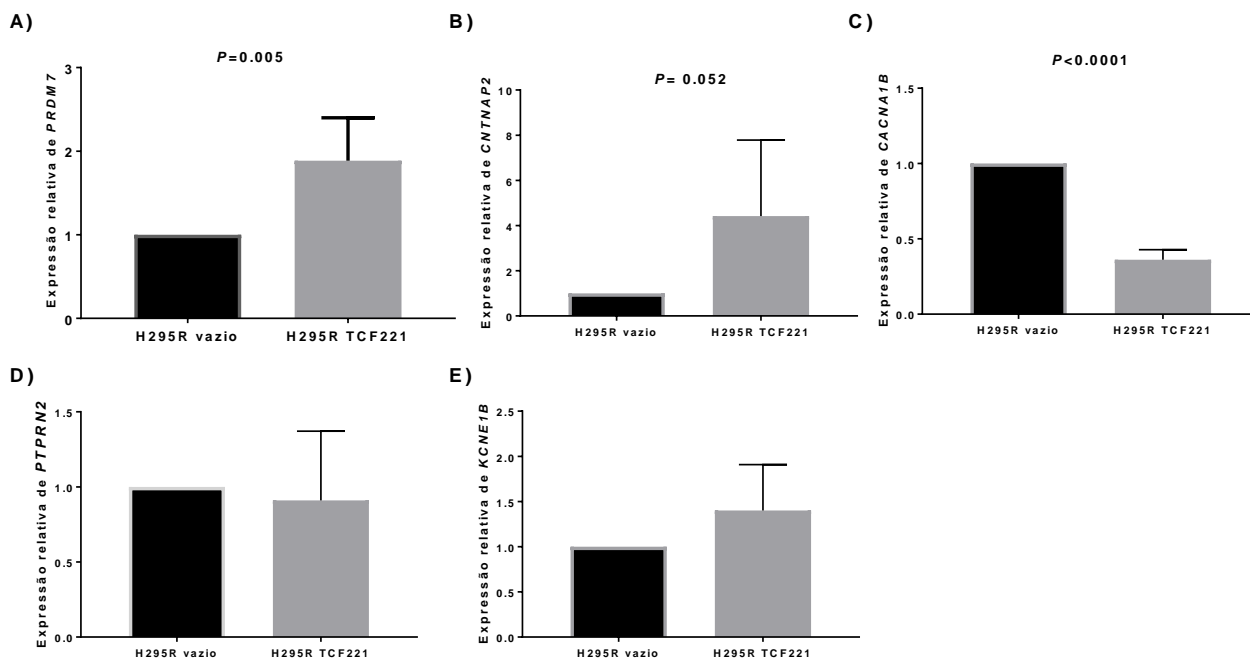
Tabela 13 – Genes relacionados à regulação do processo de morte celular por apoptose de fibroblastos

Gene	Nome
BCL2L11	<i>BCL2 Like 11</i>
BTG1	<i>BTG Anti-Proliferation Factor 1</i>
CFDP1	<i>Craniofacial Development Protein 1</i>
CHD8	<i>Chromodomain Helicase DNA Binding Protein</i>
GAS6	<i>Growth Arrest Specific</i>
PIK3CG	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase</i>
SFRP1	<i>Secreted Frizzled Related Protein 1</i>
STK17A	<i>Serine/Threonine Kinase 17a</i>
XRCC2	<i>X-Ray Repair Cross Complementing 2</i>

4.4.1 Validação, por qRT-PCR, de *PRDM7*, *CNTNAP2*, *CACNA1B*, *PTPRN2* e *KCNE1B*

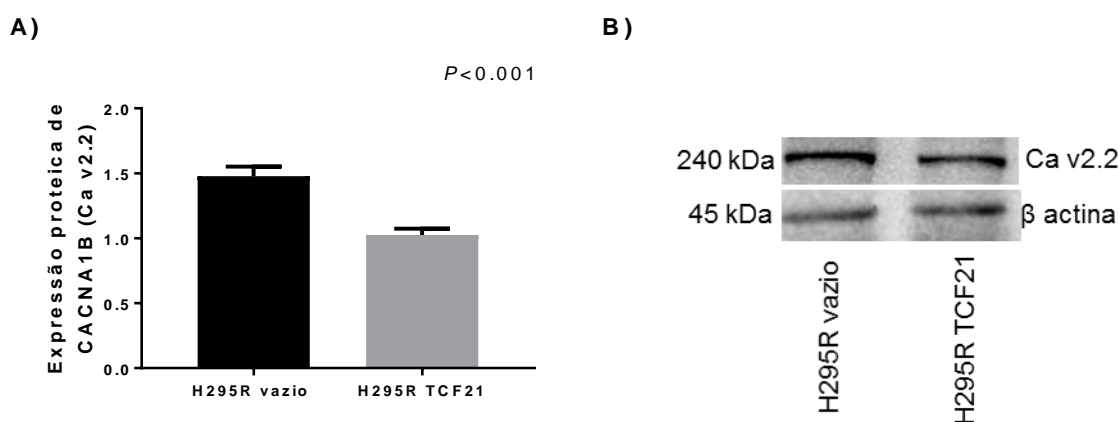
Para validar os genes alvos de TCF21 identificados, a expressão gênica de *PRDM7*, *CNTNAP2*, *CACNA1B*, *PTPRN2* e *KCNE1B* foi analisada em células H295R pCMVMycTCF21. Na presença de TCF21, houve aumento de 1.89 ± 0.23 (P=0.005) da expressão relativa do gene *PRDM7* e de 4.42 ± 1.5 (P= 0.052) do gene *CNTNAP2* (Fig 21 A e B), enquanto a expressão do gene *CACNA1B* foi menor ($0.36 \pm 0,04$, P<0.0001, Fig 21 C), em comparação com as células controle. Não houve diferença da expressão dos genes *PTPRN2* e *KCNE1B* (Fig 21 D e E).

Figura 21 - Análise da expressão de mRNA por qRT-PCR em células H295R pCMVMycTCF21. A) expressão de *PRDM7*, B) expressão de *CNTNAP2*, C) expressão de *CACNA1B*, D) expressão de *PTPRN2*, E) expressão de *KCNE1B*. Teste T de Student, n= 3-5.



Uma vez que o gene *CACNA1B* é um dos alvos potenciais e parece estar inibido na presença de TCF21 e analisamos sua expressão proteica nas células H295R pCMVMycTCF21. O gene *CACNA1B* codifica para o canal de cálcio dependente de voltagem do tipo N, chamado Ca v2.2. Esse canal é expresso em neurônios e nas células de carcinoma adrenocortical, células H295R, onde parece ter um papel significativo na transdução do sinal durante a biossíntese de aldosterona e cortisol (Aritomi et al., 2011). O aumento de *TCF21* levou à diminuição da expressão da proteína *CACNA1B* em $45 \pm 5\%$ ($P<0.001$, Figura 22 A) em relação ao controle, corroborando o observado na expressão gênica. Portanto, mostramos que na presença de TCF21, esse fator de transcrição pode modular a expressão do canal de cálcio do tipo N, CA v2.2 em tumores adrenocorticais.

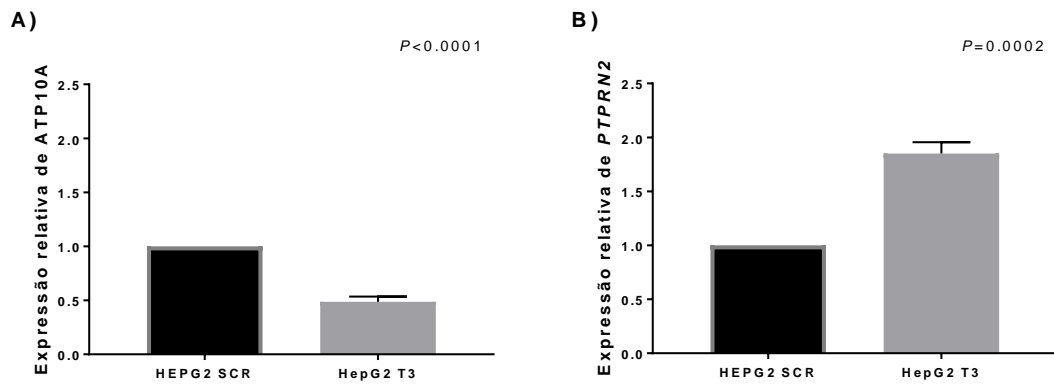
Figura 22 - Expressão proteica de CACNA1B, canal de cálcio Ca v2.2 A) em células H295R TCF21 e H295R vazio B) imagens de imunobloting para anti-CACNA1B e anti-beta actina. Teste T de Student, Resultados representados com média \pm DP. n=3.



4.4.2 Identificação de prováveis genes alvos em outros tipos de tumores

Para avaliar se os genes identificados poderiam ser regulados por TCF21 em outros tipos de câncer, a expressão gênica de *TCF21* foi correlacionada com a expressão gênica dos alvos $IDR < 0.05$ em dados obtidos através do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Foram analisados cinco tipos de câncer: Câncer de mama invasivo (n= 1082), Carcinoma de células escamosas da cabeça e do pescoço (n= 515), Carcinoma Renal de Células Claras (n= 510), Hepatocarcinoma (n= 366) e câncer de pulmão (n= 510). Genes com correlação de Spearman de 0.5 a 1 (positiva ou negativa) foram selecionados. Assim, apenas em hepatocarcinomas, *ATP10A* e *PTPRN2* estavam correlacionados positivamente com *TCF21* ($r = 0.52$, $P < 0.0001$ e $r = 0.65$, $P < 0.0001$, respectivamente). A expressão desses genes foi analisada nas células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21, e o aumento de *TCF21*, reduziu em $51 \pm 3\%$ a expressão de *ATP10A* (Figura 23 A, $P < 0.0001$) e aumentou em $85 \pm 3\%$ a expressão do gene *PTPRN2* (Figura 23 B, $P = 0.0002$). As consequências dessas alterações merecem ser analisadas no futuro.

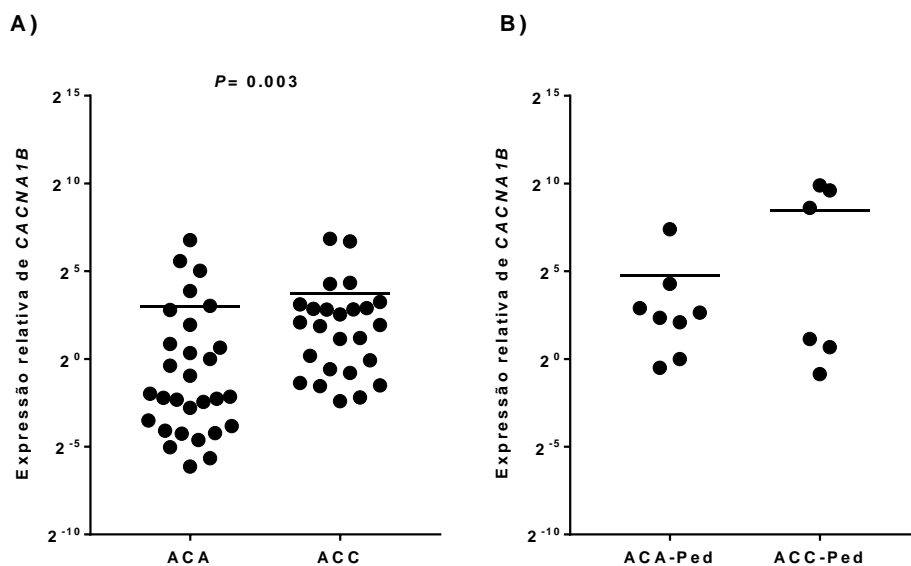
Figura 23 - Expressão gênica em células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 e SCR A) Expressão de *ATP10A* B) Expressão de *PTPRN2*. Teste T de Student, Resultados representados com média \pm DP. n=3.



4.4.3 Expressão gênica de *CACNA1B* em amostras de tumores adrenocorticais adultos e pediátricos

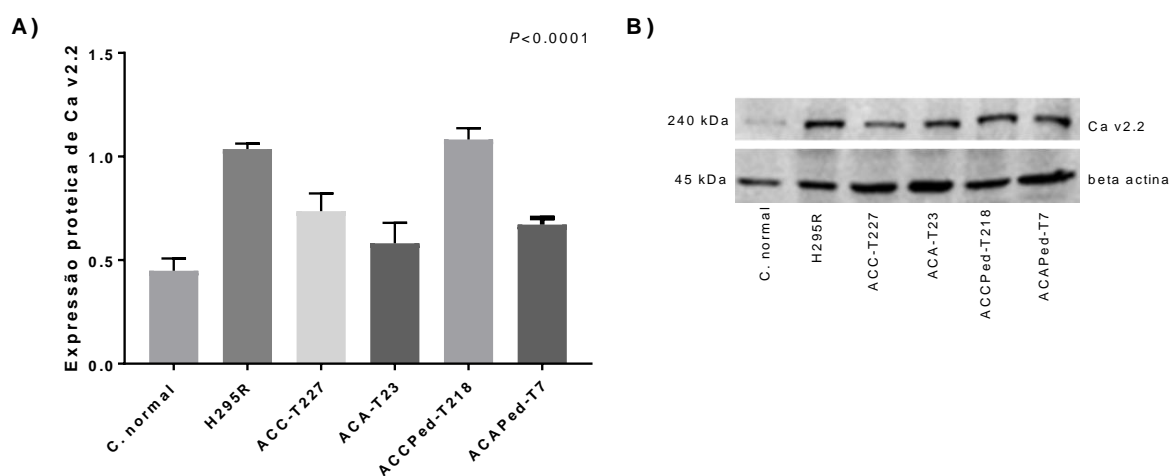
A expressão gênica de *CACNA1B* foi analisada em amostras de tumores adrenocorticais adultos e apresentou elevada expressão em carcinomas quando comparado com adenomas (Figura 24 A, $P=0.003$). Em pacientes pediátricos não houve diferenças entre adenomas e carcinomas (Figura 24 B, $P>0.05$). A expressão gênica de *CACNA1B* não teve relação com o tempo livre de doença ou com sobrevida geral tanto nas amostras de pacientes adultos e como nas dos pediátricos estudados.

Figura 24 - Expressão relativa de *CACNA1B* em adenomas (ACA) e carcinomas (ACC). A) em amostras de pacientes adultos ACA, n=29, ACC, n=26 B) em amostras de pacientes pediátricos, ACA-Ped, n=8, ACC-Ped, n=6. Teste T de Student em escala logarítmica.



Para a análise da expressão proteica de Ca v2.2 utilizamos culturas de células de pacientes adultos e pediátricos (Anexo I). A cultura de células de carcinoma adulto, ACC-T227, e pediátrico, ACCPed-T218, tiveram uma maior expressão de Ca v2.2 em relação à amostra de córtex de adrenal normal ($P= 0.0031$ e $P<0.0001$, respectivamente, Fig 25 A e B). Quando comparado às células de adenoma, a expressão de Ca v2.2 foi similar nas células de tumores adultos, células ACC-T227 e ACA-T23. Porém, em amostras pediátricas, a expressão de Ca v2.2 foi maior nas células de carcinoma ACCPed-T218 do que nas células de adenoma ACAPed-T7 ($P= 0.0001$, Fig 25 A). Esses dados confirmam que a expressão de Ca v2.2 é elevada em carcinomas e pode ser importante em tumores pediátricos, mas não distingue entre adenomas e carcinomas adultos.

Figura 25 - Expressão de Ca v2.2 A) expressão de Ca v2.2 relativa a beta actina em uma amostra de tecido de córtex adrenal adulto (C. normal), na linhagem H295R, em células de carcinoma adulto ACC-T227, em células de adenoma adulto ACA-T23 e em células de carcinoma pediátrico ACCPed-T218 e de adenoma pediátrico ACAPed-T7. B) imagens de *immunoblotting* para anti-CACNA1B (Ca v2.2) e anti-Beta actina. Teste ANOVA. Resultados representados com média \pm DP. $n=3$

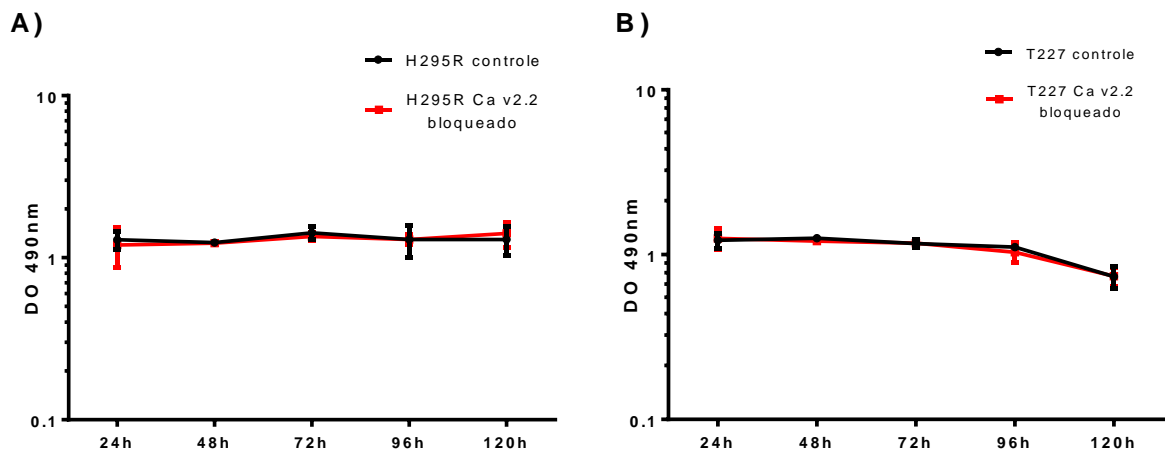


4.4.4 Análise da viabilidade celular após bloqueio do canal de cálcio Ca v2.2

Como a expressão gênica de *CACNA1B* é maior em carcinomas adultos do que em adenomas e como a expressão proteica de Ca v2.2 é elevada em carcinomas, assim como na cultura secundária de células de carcinoma pediátrico, células ACCPed-T218, o canal Ca v2.2 foi bloqueado para avaliar seu efeito na viabilidade celular. As células H295R foram tratadas com ômega (ω)-Conotoxina MVIIA, um bloqueador específico para o canal de cálcio v2.2 (Olivera et al., 1987). O bloqueio do

canal Ca v2.2 ocorre após 2 min do tratamento com 100nM (ω)-Conotoxina, e não é revertido, mesmo após retirada do bloqueador do meio (Williams et al., 1992; Bleakman et al., 1995; Aritomi et al., 2011). Tanto em células H295R quanto em células ACC-T227, não houve diferença na viabilidade celular das células tratadas, e com o canal bloqueado, em comparação com as células controle (Fig 26 A e B). Outros parâmetros funcionais merecem ser analisados após bloqueio do canal Ca v2.2, como a síntese de cortisol.

Figura 26 - Análise de viabilidade através do ensaio de MTS A) em células H295R tratadas com 100 nM de ω -Conotoxina MVIIA (Ca v2.2 bloqueado) e em células H295R controle B) em células T227 tratadas com 100nm de ω -Conotoxin MVIIA (Ca v2.2 bloqueado) e em células H295R controle. Teste ANOVA. Resultados representados com média \pm DP. n=2.



5. Discussão

TCF21 está pouco expresso na maioria dos tumores estudados como os de pulmão, de cabeça e pescoço, renais e em melanomas (Tessema & Belinsky, 2008; Arab et al., 2011; Gooskens et al., 2018). Na maioria das vezes, *TCF21* está epigeneticamente silenciado (Smith et al., 2006) e envolvido na progressão tumoral, e tem sido utilizado como biomarcador em tumores com comportamento agressivo, como no caso de melanomas (Arab et al., 2011). Em tumores de células renais, por exemplo, o aumento de expressão de *TCF21* diminuiu a capacidade de formar colônias, a migração celular e reduziu as características mesênquimais (Gooskens et al., 2018). *TCF21* também reduz a capacidade de migração e invasão, proliferação, angiogênese e promove apoptose em células de câncer de mama *in vitro* (Li et al., 2019). Características semelhantes são observadas em linhagens celulares de câncer colo retal, onde o aumento de expressão de *TCF21* está relacionado à redução da proliferação, migração e invasão celular (Dai et al., 2017). Em células de câncer gástrico, o aumento de *TCF21* diminuiu a capacidade proliferativa e invasão, e o aumento da adesão celular (Yang et al., 2018). Em hepatocarcinomas, a baixa expressão de *TCF21* está relacionada com agressividade tumoral e pior sobrevida (Lu et al., 2019). Em câncer de bexiga, *TCF21* está mais expresso em amostras de câncer primário do que em amostras metastáticas e *in vitro* a superexpressão de *TCF21* levou a diminuição da capacidade de invasão das células (Mokkapatil et al., 2020). Entretanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação de *TCF21* e seus alvos.

Nosso grupo mostrou que *TCF21* regula negativamente a expressão do gene *SF1/NR5A1* em células de carcinoma adrenocortical H295R por se ligar diretamente na sequência E-box de sua região promotora. Nas células de hepatocarcinoma, linhagem HepG2, *TCF21* se liga na região promotora do fator *SHP*, o que causa inibição da sua expressão, o que tem como consequência o aumento da expressão de *LRH1/NR5A2* (França et al., 2013; 2015). *SF1/NR5A1* e *LRH1/NR5A2* pertencem à mesma subfamília de receptores nucleares e esses achados sugerem que *TCF21* pode ter ações e funções distintas dependendo do contexto celular. Portanto, as linhagens H295R e HepG2 foram inicialmente escolhidas para a identificação de novos alvos de *TCF21*. Como *TCF21* está pouco expresso em carcinomas adrenocorticais e em hepatocarcinomas (França et al., 2013; Passaia et al., 2018; Lu et al., 2019), utilizamos o sistema de ativação CRISPR/dCas9*TCF21* em células HepG2 e o de transfecção com plasmídeo pcMVMyc*TCF21* em células H295R, uma vez que o

sistema CRISPR/dCas9TCF21 não funcionou nas células H295R. Devido ao custo de sequenciar as amostras dos dois tipos celulares com a plataforma NextSeq, as células de carcinoma adrenocortical tiveram prioridade e os alvos identificados foram também analisados em outros tipos de tumores utilizando a base de dados TCGA.

5.1 Identificação das sequências pela plataforma MiSeq

O sequenciamento das amostras obtidas pelos ensaios de ChIP-Seq das células H295R pCMVMycTCF21 e células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21, utilizando a plataforma MiSeq, selecionou os genes *CXCL12*, *LRRC4C*, *HEG1* e *RUNX1T1* e *MN1*, mas após análise por bioinformática o sequenciamento não foi considerado adequado. No entanto, resolvemos analisar a expressão desses genes nas células H295R pcMVMycTCF21 e HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21. Dentre esses genes apenas os genes *RUNX1T1* e *CXCL12* foram diferencialmente expressos na presença de *TCF21* nas células H295R pcMVMycTCF21. Nas células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21, os cinco genes selecionados tiveram diminuição da expressão com o aumento de *TCF21*. Dentre eles, apenas HEG1 foi estudado em hepatocarcinomas.

O fator HEG1 foi descrito, pela primeira vez, por regular o desenvolvimento concêntrico do coração de zebrafish (Mably et al., 2003) e na formação do coração e vasos em camundongos (Kleaveland et al., 2009). Em pacientes com hepatocarcinomas (HCC), a elevada expressão de HEG1 foi correlacionada com pior sobrevida e tempo livre de doença. Além disso, *in vitro* a superexpressão de HEG1 aumentou a migração e invasão celular e promoveu a transição epitelial-mesênquima. *In vivo* o aumento de HEG1 levou a metástases pulmonares e hepáticas (Zhao et al., 2019). HEG1 aumenta a expressão de β catenina e atua na translocação nuclear e, por sua vez, envolve a via Wnt/ β catenina em HCC (Zhao et al., 2019). Como na presença de *TCF21*, observamos uma inibição da expressão de HEG1 em células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21, poderíamos sugerir que TCF21 poderia atuar como supressor tumoral nesse tipo de câncer, regulando negativamente HEG1.

RUNX1T1/MTG8 faz parte da família de proteínas MTG (*Myeloid Translocation Gene*) que são capazes de mediar interações de proteínas em complexos múltiplos através de associação com fatores de transcrição, repressores e enzimas modificadoras de histonas (Davis et al., 2002). No entanto, como também foi localizado fora do núcleo celular, pode ter outras funções além da regulação gênica

(Rossetti et al., 2014). RUNX1T1 interage com TCF12 e TCF4, proteínas do tipo helix-loop-helix à semelhança de TCF21 (GeneCard® Human Gene Data Base, <https://www.genecards.org>). Em leucemia mielóide aguda está frequentemente associado a translocação cromossômica t(8;21) (q22;q22) (Martinez et al., 2004). RUNX1T1 é importante para o desenvolvimento de diversos tecidos e está alterado em carcinoma de mama, aonde inibe a transição mesênquima-epitélio (Hong et al., 2019). O aumento da expressão de *TCF21* nas células H295R pcMVMycTCF21 e células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 mostraram que o gene *RUNX1T1* está reprimido, no entanto, a análise de sua expressão em carcinomas e adenomas de pacientes, não apresentou diferenças. Até aonde sabemos não existem estudos que relacionem *RUNX1T1* e *TCF21*.

A análise dos dados de 79 carcinomas adrenocorticais adultos no banco de dados TCGA mostrou uma correlação positiva moderada ($r = 0.526$) entre a expressão de mRNA dos genes *CXCL12* e *TCF21*. *CXCL12* faz parte de uma família de citocinas quimiotáticas envolvidas na motilidade de células-tronco durante o desenvolvimento, na neovascularização e na tumorigênese (Vandercappellen et al., 2008). Camundongos silenciados para *Cxcl12/Sdf-1* não sobrevivem e possuem menos progenitores de linfócitos B no fígado fetal e na medula óssea e menos progenitores mielóides na medula óssea, além disso, tem má formação do septo ventricular cardíaco (Nagasawa et al., 1996). *CXCL12* está expresso no fígado adulto, mas sua expressão aumenta quando há danos hepáticos. Há diversos trabalhos sobre a interação de *CXCL12* e seus receptores *CXCR4* e *CXCR7* como alvos terapêuticos em doenças hepáticas (Liepelt e Tacke, 2016). Em células hepáticas mesenquimais e tumorais, *CXCL12* responde via *CXCR4*. Expressão aumentada de *CXCR4* está relacionada a um pior prognóstico em hepatocarcinomas (Liepelt e Tacke, 2016) e a Inibição de *CXCL12* pode diminuir a angiogênese e o crescimento do tumor, além de sensibilizá-lo à quimioterapia (Liepelt e Tacke, 2016). *CXCL12* está relacionado com angiogênese e migração em câncer de pulmão, de mama, ovário, câncer de próstata e renal (Muller et al., 2001; Phillips et al., 2003; Pan et al., 2006; Scotton et al., 2002; Taichman et al., 2002; Vandercappellen et al., 2008). Em câncer de mama, a neutralização do receptor C-X-C motif chemokine receptor *CXCR4* diminui a metástase para os linfonodos e pulmões (Muller et al., 2001). Em células H295R pcMVMycTCF21 a superexpressão de *TCF21* levou ao aumento da expressão do

gene e da proteína CXCL12. No entanto, não sabemos qual o mecanismo da relação detectada pelo aumento de TCF21 e CXCL12, se há uma interação direta entre esses fatores. Como CXCL12 não foi identificado na análise de ChIP-Seq pela plataforma NextSeq, provavelmente o mecanismo de atuação sugerido não é por ligação direta de TCF21 no gene *CXCL12*.

Em 2017, Weiss e colaboradores avaliaram, por *microarray*, a expressão de *CXCL12* e do seu receptor *CXCR4* em amostras de carcinomas adrenocorticais. Detectaram uma expressão muito baixa de *CXCL12* nos carcinomas e elevada expressão de *CXCR4* em tumores metastáticos. No nosso coorte *CXCR4* está mais expresso em adenomas do que em carcinomas, no entanto, dentre os carcinomas, aqueles que apresentam maior expressão de *CXCR4* apresentam uma sobrevida menor, o que vai ao encontro do que foi observado por Weiss, que relaciona esse receptor à metástase. Um outro estudo mostrou que em adenomas adultos, *CXCL12* foi localizado em vasos sanguíneos, e mais expresso em adenomas produtores de cortisol do que em adenomas produtores de aldosterona (Kitawaki et al., 2018). Nossos resultados, detectaram expressão diferencial de *CXCL12* entre adenomas e carcinomas, mas sua expressão não teve relação com a ocorrência de metástase ou morte em decorrência do câncer. Entretanto, a elevada expressão de *CXCL12* em amostras de carcinoma adulto e pediátrico sugere que esse fator pode ser relevante no eixo *CXCL12/CXCR4* de tumores adrenocorticais.

O eixo *CXCL12*/receptores afeta a proliferação celular, a quimioresistência e a angiogênese no processo tumoral (Meng et al., 2018). Em células de câncer colorretal, *CXCL12* estimula células *CXCR4* positivas à invasão celular pela ativação da via Wnt / β -catenina e promove a transição epitélio-mesênquima (Hu et al., 2014).

Em células THP-1, células monocíticas humanas, o tratamento com *CXCL12* levou a diminuição da β catenina nuclear e aumento de β catenina citoplasmática, mesmo com o aumento de fosforilação de GSK3 β , sugerindo que *CXCL12* regula a via Wnt / β -catenina, inibindo a translocação de β catenina para o núcleo (Gao et al., 2019). Gao e colaboradores, 2019 também avaliaram que as células tratadas com a citocina *CXCL12* tiveram redução de TCF21, tanto da expressão gênica quanto da expressão da proteína, reprimindo a ativação do gene *ABCA1* através da ligação de TCF21 e levando a promoção da aterosclerose. Apesar de a linhagem H295R possuir uma mutação na Ser45 da β catenina que mantém a via ativa constitutivamente

(Tissier et al., 2005), observamos aumento de concentração de β catenina citoplasmática e diminuição da expressão de *TCF21* na presença de CXCL12, o que sugere que CXCL12 poderia regular a via Wnt/ β catenina nas células adrenocorticais.

5.2 Identificação das sequencias pela plataforma NexSeq

O sequenciamento através da plataforma NextSeq identificou sequencias alvos de *TCF21* com 95% ou mais de chances de serem reprodutíveis. Até onde sabemos, foi realizada a identificação de alvos de *TCF21* em células de músculo liso da artéria coronária humana (Sazonova et al., 2015), que identificou alvos relacionados à contração de músculo liso, interação com a matriz e ligação com fatores de crescimento, mas não tumores. Nossas análises identificaram as sequencias mais frequentes correspondentes aos genes *PRDM7*, *CNTNAP2*, *CACNA1B*, *PTPRN2* e *KCNE1B*. A validação por qRT-PCR mostra que os genes *PRDM7*, *CNTNAP2* e *CACNA1B* são modulados na presença de *TCF21*.

PRDM7 (*PR Domain Containing 7*) é uma histona metiltransferase (Blazer et al., 2016). Está relacionada com maiores chances de desenvolver câncer, pois tem ganho de função em pacientes com síndrome de Li-Fraumeni (Basso et al., 2005).

O *CNTNAP2* (*Contactin Associated Protein 2*) atua na modulação da adesão celular e na arborização dendrítica (Li & Pozzo-Miller, 2019), mas dados do *GeneCards®: The Human Gene Database* indicam que há expressão gênica de *CNTNAP2* na glândula adrenal.

O gene *CACNA1B* (*Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 B*) codifica um canal de cálcio dependente de voltagem (CCDV) do tipo N, chamado Ca v2.2. Os canais do tipo N são amplamente expressos no sistema nervoso, mas também expresso no pâncreas e na glândula adrenal (Miller, 1992). Em análises feitas a partir de bases de dados, Phan e colaboradores (2017) observaram que os CCDV estão menos expressos em câncer de cérebro, pulmão, rim, bexiga, ovário, mama e câncer colorretal. Em câncer de pulmão de células não pequenas, a expressão gênica e proteica de *CACNA1B*/ Ca v2.2 é maior em amostras de câncer do que em amostras normais obtidas do tecido adjacente, e sua expressão é maior nos estágios mais avançados desse tipo de câncer (Zhou et al., 2017).

Devido ao grau de significância da alteração do gene *CACNA1B* detectada por qRT-PCR e a confirmação da inibição da proteína *CACNA1B*/Ca v2.2, esse gene foi primeiramente selecionado para análise de sua importância em tumores

adrenocorticais. Os demais genes terão estudos futuros para avaliação das suas funções na tumorigênese adrenocortical.

Os resultados da análise do gene *CACNA1B* em amostras de pacientes adultos mostrou que esse gene está mais expresso em carcinomas adrenocorticais do que em adenomas. O mesmo não foi observado em tumores pediátricos, provavelmente devido ao pequeno número de amostras, mas observamos que um subgrupo de pacientes com carcinoma apresentou uma tendência de alta expressão de *CACNA1B*. A importância dessa tendência é reforçada pelos dados obtidos em cultura de células pediátricas, pois células ACCPed-T218 de carcinoma pediátrico apresentaram uma maior expressão do gene *CACNA1B* do que as células de adenoma, células ACAPed-T7. Esses dados apontam para a necessidade de análises adicionais nesses tumores. A utilização do inibidor seletivo ω -Conotoxina MVIIA, que é uma toxina sintética obtida do veneno do caracol *Conus magus* e que bloqueia especificamente o canal Ca v2.2 (Olivera et al., 1987), foi eficiente em bloquear células HEK293 e H295R (Bleakman et al., 1995; Aritomi et al., 2011). Nos Estados Unidos, a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou esse inibidor para tratamento de dor crônica severa em pacientes que não respondem a outros tratamentos, como à morfina. Os canais do tipo N são ativados com altos limiares de cálcio (Miller, 1992) e seu bloqueio ocorre em 2 min após a aplicação da ω -Conotoxina sendo irreversível (Williams et al., 1992; Bleakman et al., 1995). Em células de glioma a administração de ω -Conotoxina MVIIA inibiu a proliferação e viabilidade celular, mas não em células da glia (Nicoletti et al., 2017). No entanto, nas células H295R e ACC-T227 não observamos alteração na viabilidade celular utilizando o inibidor ω -Conotoxina do canal Ca v2. Esses resultados sugerem que outros parâmetros funcionais devem ser analisados que possam estar relacionados com a presença de TCF21 e canais de cálcio em tumores adrenocorticais.

Para verificar se os alvos identificados em células de carcinoma adrenocortical poderiam ser reguladas por TCF21 em outros tipos de tumores avaliamos a expressão de mRNA dos genes selecionados em cinco tipos de tumores, e somente em hepatocarcinomas a expressão dos genes *ATP10A* e *PTPRN2* tiveram correlação positiva com TCF21 acima de moderada. Em carcinoma hepatocelular, *PTPRN2* está hipermetilado e pode estar envolvido no desenvolvimento desse tumor (Gentilini et al., 2017), por outro lado o gene *ATP10A* (ATPase Phospholipid Transporting 10 A) é uma

ATPase e sua deleção está relacionada a síndrome de Angelman (GeneCards, The Human Gene DataBase). Até onde sabemos, não há descrição desse gene em tumores ou no tecido adrenocortical.

6. Conclusões

a) A identificação dos alvos do fator de transcrição TCF21 em células H295R e HepG2

Foram identificadas 70 sequências alvos de TCF21 em células H295R pCMVMycTCF21 através da plataforma NexSeq com 95% ou mais de chances de serem reproduzíveis. Dentre as cinco mais frequentes, genes *PRDM7*, *CNTNAP2*, *CACNA1B*, *PTPRN2* e *KCNE1B*, TCF21 regula positivamente *PRDM7* e *CNTNAP2* e negativamente *CACNA1B*/canal de cálcio Ca v2.2.

Através da análise de dados da TCGA, dentre os alvos identificados em células H295R, os genes *ATP10A* e *PTPRN2*, tiveram correlação significativa com TCF21 em amostras de hepatocarcinoma de pacientes.

b) A validação dos genes alvos selecionados através da modulação da expressão gênica e proteica, após o aumento de expressão de TCF21.

Nas células H295R pCMVMycTCF21 a expressão gênica e proteica de *CACNA1B* está reduzida em relação ao controle, o que confirma a relação negativa entre *CACNA1B* e TCF21.

A análise de amostras de tumores adrenocorticais de pacientes adultos, a expressão gênica de *CACNA1B* foi maior em carcinomas do que em adenomas, mas não apresentou relação com a sobrevida geral. A análise de amostras de tumores pediátricos, a expressão gênica de *CACNA1B* não apresentou diferença significativa entre carcinomas e adenomas, embora a expressão do canal de cálcio Ca v2.2 tenha sido maior em células de carcinoma pediátrico, o que sugere que esse gene possa ser importante em tumores adrenocorticais pediátricos.

Nas células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21, o aumento de *TCF21* levou a diminuição da expressão genética de *ATP10A* e aumento da expressão de *PTPRN2*.

c) A função dos alvos selecionados após expressão ou inibição desses genes nas células H295R

Em células H295R e na cultura de células de carcinoma ACC-T227, o bloqueio seletivo do canal de cálcio Ca v2.2 com a droga ômega-conotoxina MVIIA não alterou a viabilidade celular. Portanto, outros experimentos e abordagens são necessários para avaliar a função do canal Ca v2.2 na suprarrenal e tumores adrenocorticais.

7. Referências

ALBERTS, B.; WILSON, J. H.; HUNT, T. **Biologia Molecular da célula**. 6ª ed. Porto Alegre : Artmed, 2017. xxxiii, 1601, 1690 p. p. 9780815341116

ANDREWS, S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> Acesso em: 30 ago. 2020

ARAB, K.; SMITH, L. T.; GAST, A.; WEICHENHAN, D. *et al.* Epigenetic deregulation of TCF21 inhibits metastasis suppressor KISS1 in metastatic melanoma. **Carcinogenesis**, 32, n. 10, p. 1467-1473, Oct 2011.

AMEMIYA, H. M.; KUNDAJE, A.; BOYLE, A. P. The ENCODE Blacklist: Identification of Problematic Regions of the Genome. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 9354, Jun 27 2019.

ARITOMI, S.; WAGATSUMA, H.; NUMATA, T.; URIU, Y. *et al.* Expression of N-type calcium channels in human adrenocortical cells and their contribution to corticosteroid synthesis. **Hypertens Res**, 34, n. 2, p. 193-201, Feb 2011.

ASSIE, G.; LETOUZE, E.; FASSNACHT, M.; JOUINOT, A. *et al.* Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. **Nat Genet**, 46, n. 6, p. 607-612, Jun 2014.

AUFFORTH, R. D.; NILUBOL, N. Emerging therapy for adrenocortical carcinoma. **Int J Endocr Oncol**, 1, n. 2, p. 173-182, 2014.

BANDIERA, R.; VIDAL, V. P.; MOTAMEDI, F. J.; CLARKSON, M. *et al.* WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland. **Dev Cell**, 27, n. 1, p. 5-18, Oct 14 2013.

BASSO, T. R.; VILLACIS, R. A.; CANTO, L. M.; ALVES, V. M. *et al.* Genomic profile of a Li-Fraumeni-like syndrome patient with a 45,X/46,XX karyotype, presenting neither mutations in TP53 nor clinical stigmata of Turner syndrome. **Cancer Genet**, 208, n. 6, p. 341-344, Jun 2015.

BECKER-ANDRE, M.; ANDRE, E.; DELAMARTER, J. F. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. **Biochem Biophys Res Commun**, 194, n. 3, p. 1371-1379, Aug 16 1993.

BLAZER, L. L.; LIMA-FERNANDES, E.; GIBSON, E.; ERAM, M. S. *et al.* PR Domain-containing Protein 7 (PRDM7) Is a Histone 3 Lysine 4 Trimethyltransferase. **J Biol Chem**, 291, n. 26, p. 13509-13519, Jun 24 2016.

BLEAKMAN, D.; BOWMAN, D.; BATH, C. P.; BRUST, P. F. *et al.* Characteristics of a human N-type calcium channel expressed in HEK293 cells. **Neuropharmacology**, 34, n. 7, p. 753-765, Jul 1995.

CHEN, S.; ZHOU, Y.; CHEN, Y.; GU, J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**, 34, n. 17, p. i884-i890, Sep 1 2018.

CUI, S.; ROSS, A.; STALLINGS, N.; PARKER, K. L. *et al.* Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in Pod1 knockout mice. **Development**, 131, n. 16, p. 4095-4105, Aug 2004.

CORY, A. H.; OWEN, T. C.; BARLTROP, J. A.; CORY, J. G. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Commun**, 3, n. 7, p. 207-212, Jul 1991.

DAI, Y.; DUAN, H.; DUAN, C.; ZHU, H. *et al.* TCF21 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer through inactivation of PI3K/AKT signaling. **Onco Targets Ther**, 10, p. 1603-1611, 2017.

DAVIS, J. N.; MCGHEE, L.; MEYERS, S. The ETO (MTG8) gene family. **Gene**, 303, p. 1-10, Jan 16 2003.

DE REYNIES, A.; ASSIE, G.; RICKMAN, D. S.; TISSIER, F. *et al.* Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. **J Clin Oncol**, 27, n. 7, p. 1108-1115, Mar 1 2009.

- DIGIAMMARINO, E. L.; LEE, A. S.; CADWELL, C.; ZHANG, W. *et al.* A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat Struct Biol**, 9, n. 1, p. 12-16, Jan 2002.
- DOGHMAN, M.; KARPOVA, T.; RODRIGUES, G. A.; ARHATTE, M. *et al.* Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. **Mol Endocrinol**, 21, n. 12, p. 2968-2987, Dec 2007.
- EL WAKIL, A.; LALLI, E. The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. **Mol Cell Endocrinol**, 332, n. 1-2, p. 32-37, Jan 30 2011.
- FASSNACHT, M.; DEKKERS, O. M.; ELSE, T.; BAUDIN, E. *et al.* European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. **Eur J Endocrinol**, 179, n. 4, p. G1-G46, Oct 1 2018.
- FAYARD, E.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K. LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. **Trends Cell Biol**, 14, n. 5, p. 250-260, May 2004.
- FRAGOSO, M. C.; ALMEIDA, M. Q.; MAZZUCO, T. L.; MARIANI, B. M. *et al.* Combined expression of BUB1B, DLGAP5, and PINK1 as predictors of poor outcome in adrenocortical tumors: validation in a Brazilian cohort of adult and pediatric patients. **Eur J Endocrinol**, 166, n. 1, p. 61-67, Jan 2012.
- FRANCA, M. M.; FERRAZ-DE-SOUZA, B.; SANTOS, M. G.; LERARIO, A. M. *et al.* POD-1 binding to the E-box sequence inhibits SF-1 and StAR expression in human adrenocortical tumor cells. **Mol Cell Endocrinol**, 371, n. 1-2, p. 140-147, May 22 2013.
- FRANCA, M. M.; FERRAZ-DE-SOUZA, B.; LERARIO, A. M.; FRAGOSO, M. C. *et al.* POD-1/TCF21 Reduces SHP Expression, Affecting LRH-1 Regulation and Cell Cycle Balance in Adrenocortical and Hepatocarcinoma Tumor Cells. **Biomed Res Int**, 2015, p. 841784, 2015.
- FONSECA, A. L.; KUGELBERG, J.; STARKER, L. F.; SCHOLL, U. *et al.* Comprehensive DNA methylation analysis of benign and malignant adrenocortical tumors. **Genes Chromosomes Cancer**, 51, n. 10, p. 949-960, Oct 2012.
- GADE, P.; KALVAKOLANU, D. V. Chromatin immunoprecipitation assay as a tool for analyzing transcription factor activity. **Methods Mol Biol**, 809, p. 85-104, 2012.
- GAO, J. H.; HE, L. H.; YU, X. H.; ZHAO, Z. W. *et al.* CXCL12 promotes atherosclerosis by downregulating ABCA1 expression via the CXCR4/GSK3beta/beta-catenin(T120)/TCF21 pathway. **J Lipid Res**, 60, n. 12, p. 2020-2033, Dec 2019.
- GAZDAR, A. F.; OIE, H. K.; SHACKLETON, C. H.; CHEN, T. R. *et al.* Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. **Cancer Res**, 50, n. 17, p. 5488-5496, Sep 1 1990.
- GAUJOUX, S.; MIHAI, R.; JOINT WORKING GROUP OF, E.; ENSAT. European Society of Endocrine Surgeons (ESES) and European Network for the Study of Adrenal Tumours (ENSAT) recommendations for the surgical management of adrenocortical carcinoma. **Br J Surg**, 104, n. 4, p. 358-376, Mar 2017.
- GENTILINI, D.; SCALA, S.; GAUDENZI, G.; GARAGNANI, P. *et al.* Epigenome-wide association study in hepatocellular carcinoma: Identification of stochastic epigenetic mutations through an innovative statistical approach. **Oncotarget**, 8, n. 26, p. 41890-41902, Jun 27 2017.
- GIORDANO, T. J.; KUICK, R.; ELSE, T.; GAUGER, P. G. *et al.* Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. **Clin Cancer Res**, 15, n. 2, p. 668-676, Jan 15 2009.

GOOSKENS, S. L.; KLASSON, T. D.; GREMMELS, H.; LOGISTER, I. *et al.* TCF21 hypermethylation regulates renal tumor cell clonogenic proliferation and migration. **Mol Oncol**, 12, n. 2, p. 166-179, Feb 2018.

GUYTON, AC & HALL, JE. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2011. 1151p

HARRISON, T.; GRAHAM, F.; WILLIAMS, J. Host-range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells. **Virology**, 77, n. 1, p. 319-329, Mar 1977.

HANLEY, N. A.; RAINEY, W. E.; WILSON, D. I.; BALL, S. G. *et al.* Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation. **Mol Endocrinol**, 15, n. 1, p. 57-68, Jan 2001.

HEINZ, S.; BENNER, C.; SPANN, N.; BERTOLINO, E. *et al.* Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. **Mol Cell**, 38, n. 4, p. 576-589, May 28 2010.

HOLMES, P. V.; DICKSON, A. D. X-zone degeneration in the adrenal glands of adult and immature female mice. **J Anat**, 108, n. Pt 1, p. 159-168, Jan 1971.

HONG, D.; FRITZ, A. J.; GORDON, J. A.; TYE, C. E. *et al.* RUNX1-dependent mechanisms in biological control and dysregulation in cancer. **J Cell Physiol**, 234, n. 6, p. 8597-8609, Jun 2019.

IKEDA, Y.; SHEN, W. H.; INGRAHAM, H. A.; PARKER, K. L. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. **Mol Endocrinol**, 8, n. 5, p. 654-662, May 1994.

HONDA, S.; MOROHASHI, K.; NOMURA, M.; TAKEYA, H. *et al.* Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. **J Biol Chem**, 268, n. 10, p. 7494-7502, Apr 5 1993.

HU, T. H.; YAO, Y.; YU, S.; HAN, L. L. *et al.* SDF-1/CXCR4 promotes epithelial-mesenchymal transition and progression of colorectal cancer by activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. **Cancer Lett**, 354, n. 2, p. 417-426, Nov 28 2014.

JIANG, X.; YANG, Z. Multiple biological functions of transcription factor 21 in the development of various cancers. **Onco Targets Ther**, 11, p. 3533-3539, 2018.

KLEAVELAND, B.; ZHENG, X.; LIU, J. J.; BLUM, Y. *et al.* Regulation of cardiovascular development and integrity by the heart of glass-cerebral cavernous malformation protein pathway. **Nat Med**, 15, n. 2, p. 169-176, Feb 2009.

KIM, A. C.; BARLASKAR, F. M.; HEATON, J. H.; ELSE, T. *et al.* In search of adrenocortical stem and progenitor cells. **Endocr Rev**, 30, n. 3, p. 241-263, May 2009.

KITAWAKI, Y.; NAKAMURA, Y.; KUBOTA-NAKAYAMA, F.; YAMAZAKI, Y. *et al.* Tumor microenvironment in functional adrenocortical adenomas: immune cell infiltration in cortisol-producing adrenocortical adenoma. **Hum Pathol**, 77, p. 88-97, Jul 2018.

KNOWLES, B. B.; HOWE, C. C.; ADEN, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. **Science**, 209, n. 4455, p. 497-499, Jul 25 1980.

KONERMANN, S.; BRIGHAM, M. D.; TREVINO, A. E.; JOUNG, J. *et al.* Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. **Nature**, 517, n. 7536, p. 583-588, Jan 29 2015.

LANDT, S. G.; MARINOV, G. K.; KUNDAJE, A.; KHERADPOUR, P. *et al.* ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. **Genome Res**, 22, n. 9, p. 1813-1831, Sep 2012.

LATRONICO, A. C.; PINTO, E. M.; DOMENICE, S.; FRAGOSO, M. C. *et al.* An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and

adults with sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 86, n. 10, p. 4970-4973, Oct 2001.

LEROY, B.; ANDERSON, M.; SOUSSI, T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. **Hum Mutat**, 35, n. 6, p. 672-688, Jun 2014.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, 25, n. 14, p. 1754-1760, Jul 15 2009.

LI Q.; BROWN J.B.; HUANG H.; BICKEL, P.J. Measuring reproducibility of high-throughput experiments. **Ann Appl Stat**, 5, 1752–79, Jan 2011

LI, P. W.; WANG, H. Y.; XU, L. L. [Effect of TCF21 on proliferation, migration and vascular production of breast cancer cells]. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, 48, n. 4, p. 307-311, Apr 8 2019.

LIEPELT, A.; TACKE, F. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) as a target in liver diseases. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 311, n. 2, p. G203-209, Aug 1 2016.

LI, W.; POZZO-MILLER, L. Dysfunction of the corticostriatal pathway in autism spectrum disorders. **J Neurosci Res**, Nov 22 2019.

LIBE, R.; FRATTICCI, A.; BERTHERAT, J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. **Endocr Relat Cancer**, 14, n. 1, p. 13-28, Mar 2007.

LU, J.; RICHARDSON, J. A.; OLSON, E. N. Capsulin: a novel bHLH transcription factor expressed in epicardial progenitors and mesenchyme of visceral organs. **Mech Dev**, 73, n. 1, p. 23-32, Apr 1998.

LU, J.; CHANG, P.; RICHARDSON, J. A.; GAN, L. *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor capsulin controls spleen organogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97, n. 17, p. 9525-9530, Aug 15 2000.

LU, W.; YANG, C.; DU, P.; ZHANG, J. L. *et al.* Expression tendency and prognostic value of TCF21 in hepatocellular carcinoma. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, 47, n. 1, p. 1466-1470, Dec 2019.

MABLY, J. D.; MOHIDEEN, M. A.; BURNS, C. G.; CHEN, J. N. *et al.* heart of glass regulates the concentric growth of the heart in zebrafish. **Curr Biol**, 13, n. 24, p. 2138-2147, Dec 16 2003.

MARTINEZ, N.; DRESCHER, B.; RIEHLE, H.; CULLMANN, C. *et al.* The oncogenic fusion protein RUNX1-CBFA2T1 supports proliferation and inhibits senescence in t(8;21)-positive leukaemic cells. **BMC Cancer**, 4, p. 44, Aug 6 2004.

MASSARI, M. E.; MURRE, C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. **Mol Cell Biol**, 20, n. 2, p. 429-440, Jan 2000.

MCLEAN, C. Y.; BRISTOR, D.; HILLER, M.; CLARKE, S. L. *et al.* GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. **Nat Biotechnol**, 28, n. 5, p. 495-501, May 2010.

MEN, X.; MA, J.; WU, T.; PU, J. *et al.* Transcriptome profiling identified differentially expressed genes and pathways associated with tamoxifen resistance in human breast cancer. **Oncotarget**, 9, n. 3, p. 4074-4089, Jan 9 2018.

MENG, W.; XUE, S.; CHEN, Y. The role of CXCL12 in tumor microenvironment. **Gene**, 641, p. 105-110, Jan 30 2018.

MICHALKIEWICZ, E.; SANDRINI, R.; FIGUEIREDO, B.; MIRANDA, E. C. *et al.* Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. **J Clin Oncol**, 22, n. 5, p. 838-845, Mar 1 2004.

MILLER, R. J. Voltage-sensitive Ca²⁺ channels. **J Biol Chem**, 267, n. 3, p. 1403-1406, Jan 25 1992.

MOKKAPATI, S.; PORTEN, S. P.; NARAYAN, V. M.; LIM, A. H. *et al.* TCF21 Promotes Luminal-Like Differentiation and Suppresses Metastasis in Bladder Cancer. **Mol Cancer Res**, 18, n. 6, p. 811-821, Jun 2020.

MOROHASHI, K.; ZANGER, U. M.; HONDA, S.; HARA, M. *et al.* Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. **Mol Endocrinol**, 7, n. 9, p. 1196-1204, Sep 1993.

MOUZAT, K.; BARON, S.; MARCEAU, G.; CAIRA, F. *et al.* Emerging roles for LXRs and LRH-1 in female reproduction. **Mol Cell Endocrinol**, 368, n. 1-2, p. 47-58, Apr 10 2013.

MOROHASHI, K.; IIDA, H.; NOMURA, M.; HATANO, O. *et al.* Functional difference between Ad4BP and ELP, and their distributions in steroidogenic tissues. **Mol Endocrinol**, 8, n. 5, p. 643-653, May 1994.

MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N. *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, 410, n. 6824, p. 50-56, Mar 1 2001.

NAGASAWA, T.; HIROTA, S.; TACHIBANA, K.; TAKAKURA, N. *et al.* Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. **Nature**, 382, n. 6592, p. 635-638, Aug 15 1996.

NICOLETTI, N. F.; ERIG, T. C.; ZANIN, R. F.; ROXO, M. R. *et al.* Pre-clinical evaluation of voltage-gated calcium channel blockers derived from the spider *P. nigriventer* in glioma progression. **Toxicol**, 129, p. 58-67, Apr 2017.

OKONECHNIKOV, K.; CONESA, A.; GARCIA-ALCALDE, F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, 32, n. 2, p. 292-294, Jan 15 2016.

OLIVERA, B. M.; CRUZ, L. J.; DE SANTOS, V.; LECHEMINANT, G. W. *et al.* Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using omega-conotoxin from *Conus magus* venom. **Biochemistry**, 26, n. 8, p. 2086-2090, Apr 21 1987.

PAN, J.; MESTAS, J.; BURDICK, M. D.; PHILLIPS, R. J. *et al.* Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. **Mol Cancer**, 5, p. 56, Nov 3 2006.

PANTOU, M. P.; GOURZI, P.; DEGIANNIS, D. The potential presence of the highly similar paralogue gene KCNE1B blurs the genetic basis of KCNE1-LQTS patients. **Eur J Hum Genet**, 27, n. 8, p. 1175-1177, Aug 2019.

PASSAIA, B. D. S.; DIAS, M. H.; KREMER, J. L.; ANTONINI, S. R. R. *et al.* TCF21/POD-1, a Transcriptional Regulator of SF-1/NR5A1, as a Potential Prognosis Marker in Adult and Pediatric Adrenocortical Tumors. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 9, p. 38, 2018.

PHAN, N. N.; WANG, C. Y.; CHEN, C. F.; SUN, Z. *et al.* Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. **Oncol Lett**, 14, n. 2, p. 2059-2074, Aug 2017.

PINTO, E. M.; CHEN, X.; EASTON, J.; FINKELSTEIN, D. *et al.* Genomic landscape of paediatric adrenocortical tumours. **Nat Commun**, 6, p. 6302, Mar 6 2015.

PHILLIPS, R. J.; BURDICK, M. D.; LUTZ, M.; BELPERIO, J. A. *et al.* The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. **Am J Respir Crit Care Med**, 167, n. 12, p. 1676-1686, Jun 15 2003.

QUAGGIN, S. E.; VANDEN HEUVEL, G. B.; IGARASHI, P. Pod-1, a mesoderm-specific basic-helix-loop-helix protein expressed in mesenchymal and glomerular epithelial cells in the developing kidney. **Mech Dev**, 71, n. 1-2, p. 37-48, Feb 1998.

QUAGGIN, S. E.; SCHWARTZ, L.; CUI, S.; IGARASHI, P. *et al.* The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. **Development**, 126, n. 24, p. 5771-5783, Dec 1999.

RAO, C. V. Human adrenal LH/hCG receptors and what they could mean for adrenal physiology and pathology. **Mol Cell Endocrinol**, 329, n. 1-2, p. 33-36, Nov 25 2010.

RIBEIRO, R. C.; SANDRINI, F.; FIGUEIREDO, B.; ZAMBETTI, G. P. *et al.* An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, n. 16, p. 9330-9335, Jul 31 2001.

ROBB, L.; MIFSUD, L.; HARTLEY, L.; BIBEN, C. *et al.* epicardin: A novel basic helix-loop-helix transcription factor gene expressed in epicardium, branchial arch myoblasts, and mesenchyme of developing lung, gut, kidney, and gonads. **Dev Dyn**, 213, n. 1, p. 105-113, Sep 1998.

ROSSETTI, S.; HOOGEVEEN, A. T.; SACCHI, N. The MTG proteins: chromatin repression players with a passion for networking. **Genomics**, 84, n. 1, p. 1-9, Jul 2004.

SCOTTON, C. J.; WILSON, J. L.; SCOTT, K.; STAMP, G. *et al.* Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. **Cancer Res**, 62, n. 20, p. 5930-5938, Oct 15 2002.

SENGELAUB, C. A.; NAVRAZHINA, K.; ROSS, J. B.; HALBERG, N. *et al.* PTPRN2 and PLCbeta1 promote metastatic breast cancer cell migration through PI(4,5)P2-dependent actin remodeling. **EMBO J**, 35, n. 1, p. 62-76, Jan 4 2016.

SERON-FERRE, M. and JAFFE, R. B. The fetal adrenal gland. **Annu Rev Physiol**, 43, 141-162, Mar, 1981.

SADOVSKY, Y.; CRAWFORD, P. A.; WOODSON, K. G.; POLISH, J. A. *et al.* Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92, n. 24, p. 10939-10943, Nov 21 1995.

SMITH, L. T.; LIN, M.; BRENA, R. M.; LANG, J. C. *et al.* Epigenetic regulation of the tumor suppressor gene TCF21 on 6q23-q24 in lung and head and neck cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103, n. 4, p. 982-987, Jan 24 2006.

STANDRING, S.; BORLEY, N. R.; GRAY, H. **Gray's anatomia**. 40th ed. . Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2010. xxiv, 1551 p.

SOROKIN, A. V.; NAIR, B. C.; WEI, Y.; AZIZ, K. E. *et al.* Aberrant Expression of proPTPRN2 in Cancer Cells Confers Resistance to Apoptosis. **Cancer Res**, 75, n. 9, p. 1846-1858, May 1 2015.

TAICHMAN, R. S.; COOPER, C.; KELLER, E. T.; PIENTA, K. J. *et al.* Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. **Cancer Res**, 62, n. 6, p. 1832-1837, Mar 15 2002.

TAMURA, M.; KANNO, Y.; CHUMA, S.; SAITO, T. *et al.* Pod-1/Capsulin shows a sex- and stage-dependent expression pattern in the mouse gonad development and represses expression of Ad4BP/SF-1. **Mech Dev**, 102, n. 1-2, p. 135-144, Apr 2001.

TESSEMA, M.; BELINSKY, S. A. Mining the epigenome for methylated genes in lung cancer. **Proc Am Thorac Soc**, 5, n. 8, p. 806-810, Dec 1 2008.

TISSIER, F.; CAVARD, C.; GROUSSIN, L.; PERLEMOINE, K. *et al.* Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. **Cancer Res**, 65, n. 17, p. 7622-7627, Sep 1 2005.

TORTI J. F. & CORREA R. **Cancer, Adrenal**. StatPearls, 2020. *E-book*.

VAL, P.; LEFRANCOIS-MARTINEZ, A. M.; VEYSSIERE, G.; MARTINEZ, A. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. **Nucl Recept**, 1, n. 1, p. 8, Sep 18 2003.

VANDERCAPPELLEN, J.; VAN DAMME, J.; STRUYF, S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. **Cancer Lett**, 267, n. 2, p. 226-244, Aug 28 2008.

WEISS, L. M. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. **Am J Surg Pathol**, 8, n. 3, p. 163-169, Mar 1984.

WEISS, I. D.; HUFF, L. M.; EVBUOMWAN, M. O.; XU, X. *et al.* Screening of cancer tissue arrays identifies CXCR4 on adrenocortical carcinoma: correlates with expression and quantification on metastases using (64)Cu-plerixafor PET. **Oncotarget**, 8, n. 43, p. 73387-73406, Sep 26 2017.

WILLIAMS, M. E.; FELDMAN, D. H.; MCCUE, A. F.; BRENNER, R. *et al.* Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. **Neuron**, 8, n. 1, p. 71-84, Jan 1992.

WOOD, M. A., ARCHARYA A., FINCO I., SWONGER J. M. *et al.* Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in M. Musculus. **Development** 140, 22, 4522-4532, Nov, 2013

WU, Y.; WANG, W.; JIANG, W.; YAO, J. *et al.* An investigation of obesity susceptibility genes in Northern Han Chinese by targeted resequencing. **Medicine (Baltimore)**, 96, n. 7, p. e6117, Feb 2017.

XU, Z.; OUYANG, L.; CASTILLO-OLIVARES, A. D.; PANDAK, W. M. *et al.* alpha(1)-Fetoprotein Transcription Factor (FTF)/Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1) Is an Essential Lipogenic Regulator. **Biochim Biophys Acta**, 1801, n. 4, p. 473-479, Apr 2010.

YANG, Z.; JIANG, X.; LI, D.; DONG, Q. *et al.* TCF21 inhibits proliferation and chemoresistance through the AKT pathway in human gastric cancer. **Gene**, 682, p. 42-49, Jan 15 2019.

ZHANG, Y.; LIU, T.; MEYER, C. A.; EECKHOUTE, J. *et al.* Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). **Genome Biol**, 9, n. 9, p. R137, 2008.

ZHAO, Y. R.; WANG, J. L.; XU, C.; LI, Y. M. *et al.* HEG1 indicates poor prognosis and promotes hepatocellular carcinoma invasion, metastasis, and EMT by activating Wnt/beta-catenin signaling. **Clin Sci (Lond)**, 133, n. 14, p. 1645-1662, Jul 31 2019.

ZHOU, X.; WANG, W.; ZHANG, S.; WANG, X. *et al.* CACNA1B (Cav2.2) Overexpression and Its Association with Clinicopathologic Characteristics and Unfavorable Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer. **Dis Markers**, 2017, p. 6136401, 2017.

Anexos

Anexo I – Tabela de informações sobre as culturas de células de pacientes

Tipo Celular	Data de obtenção	Gênero	Idade	Diagnóstico	Weiss	Classificação	Mutação TP53
ACAPed-T7	03/05/2006	Feminino	1a7m	Adenoma	5	Síndrome de Cushing e Virilizante	não
ACA-T23	29/09/2008	Feminino	43a	Adenoma	1	Hiperaldosteronismo	N/I
ACC-T36	26/01/2009	Feminino	39a	Carcinoma	5	N/I	não
ACA-T101	23/07/2012	Feminino	41a	Adenoma	0	produtor de aldosterona	N/I
ACCPed-T218	30/08/2018	Feminino	2a9m	Carcinoma	8	Virilizante	N/I
ACC-T227	01/04/19	Feminino	62a	Carcinoma	8	N/I	N/I

N/I – Dado não informado

Anexo II - Análise da proliferação e viabilidade celular das células CRISPR/dCas9/TCF21

As células HEK293 CRISPR/dCas9/TCF21 apresentaram capacidade de proliferação semelhante ao controle, células CRISPR/dCas9/SCR (Figura A). Através do ensaio de MTS, as células HEK293 CRISPR/dCas9/TCF21 apresentaram aumento significativo da viabilidade celular em relação ao controle após 96 h em cultura (Figura B). No entanto, após 120 h essa diferença não se manteve.

Figura A – Curva de crescimento das células HEK293 CRISPR/dCas9/TCF21 e CRISPR/dCas9/SCR. Resultados representados com média \pm DP. Teste ANOVA; n= 3

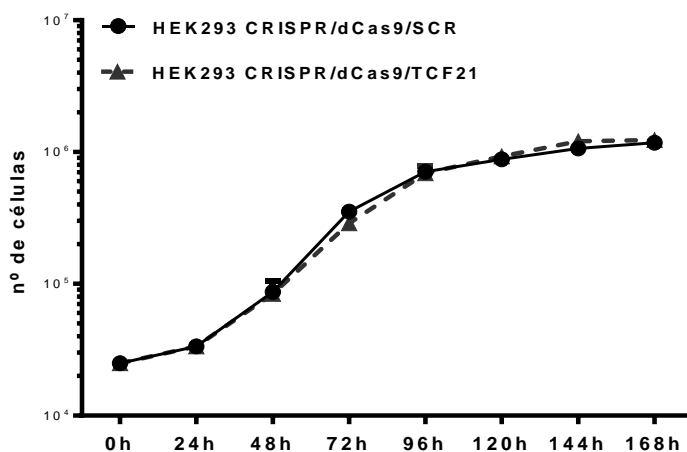
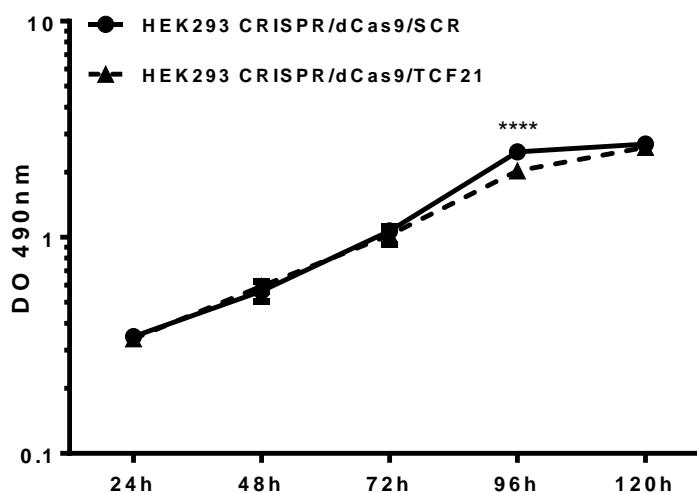


Figura B – Ensaio de viabilidade (MTS) das células HEK293 CRISPR/dCas9/TCF21 e CRISPR/dCas9/SCR. Resultados representados com média \pm DP, DO= Densidade Óptica. Teste ANOVA; ****p< 0.0001 n= 3



A análise da capacidade de proliferação das células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 não mostrou diferença em comparação com as células HepG2 CRISPR/dCas9/SCR (Figura C). A viabilidade celular foi maior das células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 em 72h em cultura em relação ao controle, mas não se manteve até 120 h (Figura D).

Figura C – Curva de crescimento das células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 e CRISPR/dCas9/SCR. Resultados representados com média \pm DP. Teste ANOVA; n= 3

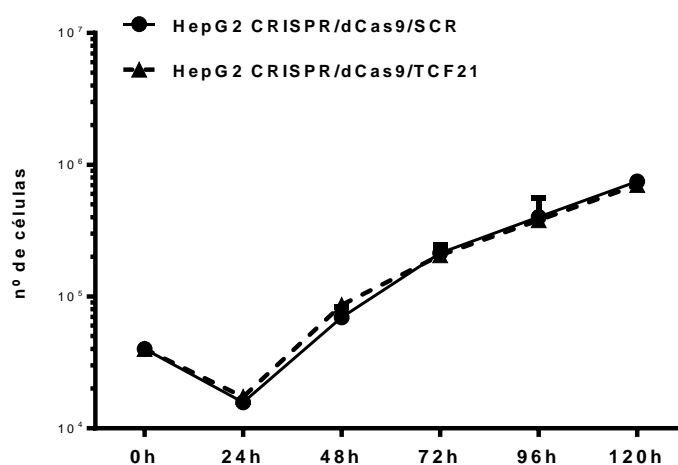
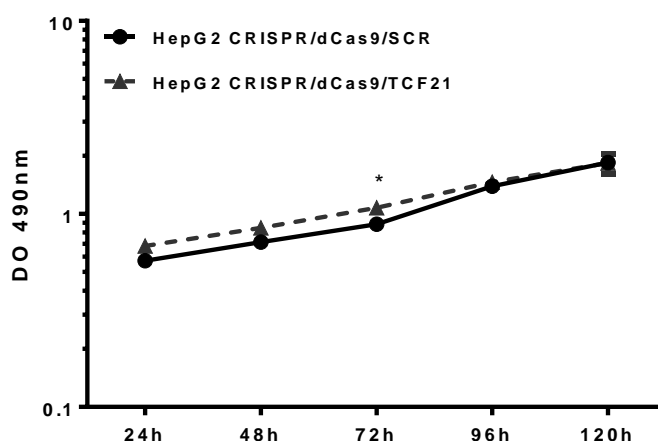


Figura D – Ensaio de viabilidade (MTS) das células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 e CRISPR/dCas9/SCR. Resultados representados com média \pm DP, DO= Densidade Óptica. Teste ANOVA; *p< 0.01 n= 3.



Anexo III - Sequencias identificadas como potenciais alvos de TCF21 em células H295R pCMVMycTCF21 – MiSeq

Peak Score	Distância TSS	Refseq	Gene
937.625	-122127	NR_121570	LOC101928381
711.769	-127863	NM_003413	ZIC3
711.769	-88302	NM_024581	FAM184A
561.622	-60263	NM_001040069	LINC00273
493.538	-491381	NM_206908	GUSBP4
445.493	23367	NM_004944	DNASE1L3
445.493	15829	NM_080476	PIGU
445.493	-29789	NM_016368	ISYNA1
413.022	-585	NM_014207	CD5
405.638	120089	NM_007368	RASA3
377.137	-338690	NM_005328	HAS2
377.137	-47441	NR_026860	LINC00473
377.137	11668	NM_152551	SNRNP48
377.137	75352	NM_152756	RICTOR
377.137	-110954	NR_049865	MIR548AX
377.137	1464669	NR_033658	YY1P2
377.137	99036	NM_006885	ZFHX3
377.137	143559	NM_022166	XYLT1
377.137	-124471	NM_139241	FGD4
377.137	-14528	NM_017435	SLCO1C1
377.137	540298	NM_020929	LRRC4C
377.137	-17285	NM_016243	CYB5R1
339.476	-22533	NM_001099294	KIAA1644
335.111	8701	NM_001061	TBXAS1
335.111	7792	NR_026994	LINC01020
335.111	51877	NM_012433	SF3B1
335.111	72024	NM_024993	LRRTM4
335.111	-88695	NM_001205273	THEG5
335.111	102351	NM_001001677	LINC01164
335.111	-474430	NM_052997	ANKRD30A
335.111	-99053	NM_003873	NRP1
333.506	670995	NM_025087	CWH43

317.144	3663	NR_049893	MIR5707
301.415	15425	NM_182614	TMEM255B
300.454	-61295	NM_024410	ODF1
300.454	73328	NR_037439	MIR3666
300.454	68442	NR_106733	MIR6085
272.234	-26670	NM_032693	NAA11
272.234	213335	NR_047508	LINC00417
247.757	103493	NR_110057	LOC101927616
244.108	-8821	NM_007368	RASA3
238.856	-26112	NM_001136273	ZFP92
238.856	111540	NM_005647	TBL1X
238.856	96435	NR_039814	MIR4668
238.856	-445	NM_033086	FGD3
238.856	-17143	NR_037489	MIR3910-2
238.856	-72728	NR_002817	AQP7P1
238.856	20483	NM_178812	MTDH
238.856	61123	NR_120513	LOC101928861
238.856	-38091	NM_001913	CUX1
238.856	12732	NM_004912	KRIT1
238.856	564233	NM_015570	AUTS2
238.856	53901	NM_003718	CDK13
238.856	1082	NM_024919	FRMD1
238.856	182599	NM_138419	MTFR2
238.856	43882	NM_000165	GJA1
238.856	-431925	NM_153612	HS3ST5
238.856	51981	NR_038401	LOC100131047
238.856	-973	NM_030883	OR2H1
238.856	95683	NM_000332	ATXN1
238.856	-231767	NR_104671	LOC102467213
238.856	172393	NR_104633	LINC00603
238.856	21004	NM_000128	F11
238.856	-76071	NR_122079	LOC439933
238.856	31996	NM_005017	PCYT1A
238.856	6303	NM_025112	ZXDC
238.856	46678	NM_020733	HEG1
238.856	-217573	NM_002941	ROBO1

238.856	-41862	NM_001257177	LOC339862
238.856	399021	NM_002430	MN1
238.856	22590	NM_007031	HSF2BP
238.856	135381	NR_024100	LINC00323
238.856	-29675	NR_110629	LINC01440
238.856	63267	NM_080607	VSTM2L
238.856	50712	NM_024893	SYNDIG1
238.856	3249	NM_001631	ALPI
238.856	-11383	NR_110225	LOC101927482
238.856	33808	NM_052946	NOSTRIN
238.856	-7067	NM_006507	REG1B
238.856	-16071	NR_110759	LOC100420587
238.856	-45329	NM_001039884	ZNF826P
238.856	-6659	NM_182577	ODF3L2
238.856	-23420	NM_024086	METT16
238.856	141709	NM_018723	RBFOX1
238.856	18465	NR_039860	MIR4710
238.856	86546	NM_024824	ZC3H14
238.856	-72050	NM_005015	OXA1L
238.856	-133602	NR_047700	MYO16-AS1
238.856	52606	NM_018647	TNFRSF19
238.856	46109	NR_104172	LOC283352
238.856	-60815	NM_007007	CPSF6
238.856	31085	NR_026656	LOC400043
238.856	-128068	NM_001013620	ALG10B
238.856	58477	NM_005075	SLCO1A2
238.856	-19932	NM_006176	NRGN
238.856	675836	NR_120553	LINC01493
238.856	-33235	NM_000728	CALCB
238.856	58320	NM_018222	PARVA
238.856	-99236	NM_002315	LMO1
238.856	6307	NM_003737	DCHS1
238.856	108364	NM_030756	TCF7L2
238.856	-9597	NM_152635	OIT3
238.856	2795	NM_152230	IPMK
238.856	-12244	NM_000609	CXCL12

238.856	22858	NR_033846	LINC00841
238.856	51764	NR_024524	LOC100129055
238.856	-301631	NM_052997	ANKRD30A
238.856	59970	NR_036069	MIR3123
238.856	-6730	NM_173508	SLC35F3
238.856	-6868	NM_000674	ADORA1
238.856	-100120	NM_014857	RABGAP1L
238.856	-4735	NM_199173	BGLAP
238.856	110212	NM_152367	MAB21L3
238.856	74937	NM_020190	OLFML3
238.856	-54462	NR_033940	LOC100129620
238.856	-186741	NR_046591	DPYD-AS2
238.856	-803226	NM_012302	LPHN2
238.856	-39557	NR_104362	DAB1-AS1
238.856	390141	NM_003713	PPAP2B
238.856	-3207	NM_024009	GJB3
238.856	112738	NM_052896	CSMD2
238.856	3130	NM_014280	DNAJC8
238.856	134841	NM_017766	CASZ1
209.404	6304	NM_005491	MAMLD1
209.404	393700	NM_203408	FAM47A
209.404	48072	NM_152581	MOSPD2
209.404	-41785	NM_001039765	EHMT1-IT1
209.404	526893	NM_003266	TLR4
209.404	97461	NM_021218	INIP
209.404	134566	NM_022127	SLC28A3
209.404	-1302	NR_039686	MIR4475
209.404	-16103	NM_005596	NFIB
209.404	-56673	NM_033439	IL33
209.404	369393	NM_031466	TRAPPC9
209.404	172852	NR_125424	LOC101927822
209.404	3345	NM_002546	TNFRSF11B
209.404	-578900	NM_052900	CSMD3
209.404	18076	NM_004349	RUNX1T1
209.404	-52071	NR_034003	LOC100130298
209.404	-27626	NM_018371	CSGALNACT1

209.404	-127186	NR_110829	LOC101928700
209.404	8816	NM_001008748	LOC93432
209.404	117352	NM_012395	CDK14
209.404	55659	NM_152744	SDK1
209.404	-57329	NM_005922	MAP3K4
209.404	28230	NM_139126	PPIL4
209.404	29269	NR_027030	LINC01312
209.404	-939078	NR_027338	TPI1P3
209.404	763595	NM_000056	BCKDHB
209.404	-121789	NM_052923	ZBED9
209.404	47912	NM_021058	HIST1H2BJ
209.404	35896	NM_015482	SLC22A23
209.404	-15468	NM_015238	WWC1
209.404	-40651	NM_181776	SLC36A2
209.404	-272756	NM_031438	NUDT12
209.404	2047	NM_022145	CENPK
209.404	-8454	NM_007036	ESM1
209.404	199248	NM_001102562	MARCH11
209.404	49616	NM_001001702	FLJ33360
209.404	115255	NR_039962	MIR4799
209.404	217512	NM_025212	CXXC4
209.404	44870	NR_121610	BMPR1B-AS1
209.404	-329701	NM_001201	BMP3
209.404	-1250528	NM_015236	LPHN3
209.404	462	NM_014988	LIMCH1
209.404	624481	NR_036237	MIR4275
209.404	17086	NR_034136	LOC100133461
209.404	-1980	NM_000283	PDE6B
209.404	56197	NM_017733	PIGG
209.404	29785	NM_001025266	C3orf70
209.404	84806	NM_001080440	OTOL1
209.404	-11333	NM_013308	GPR171
209.404	857725	NM_000935	PLOD2
209.404	873903	NM_000935	PLOD2
209.404	187494	NR_108084	CLSTN2-AS1
209.404	-54249	NM_001099	ACPP

209.404	19168	NM_000796	DRD3
209.404	268526	NR_033860	LINC00971
209.404	-76651	NM_012234	RYBP
209.404	-67216	NM_014744	TBC1D5
209.404	-18020	NM_022141	PARVG
209.404	18824	NM_152508	LINC00896
209.404	-84405	NR_046774	DSCAM-IT1
209.404	237815	NR_109963	LOC101927869
209.404	-280920	NM_001005521	C21orf37
209.404	12128	NR_029480	MIRLET7C
209.404	15262	NR_039757	MIR4532
209.404	25115	NM_173485	TSHZ2
209.404	1357	NM_080627	SOGA1
209.404	40998	NM_152614	C2orf57
209.404	-3730	NM_021141	XRCC5
209.404	-499894	NM_001080500	VWC2L
209.404	-771	NR_034096	FTCDNL1
209.404	904760	NM_018557	LRP1B
209.404	8404	NM_002299	LCT
209.404	117613	NM_032143	ZRANB3
209.404	-469802	NR_033996	LOC388942
209.404	-13390	NM_153447	NLRP5
209.404	33039	NM_002785	PSG11
209.404	26161	NM_001015890	TDRD12
209.404	17817	NM_032037	TSSK6
209.404	-4273	NM_016368	ISYNA1
209.404	7767	NM_015260	SIN3B
209.404	424883	NM_019022	TMX3
209.404	9570	NM_007163	SLC14A2
209.404	65083	NM_002930	RIT2
209.404	-109882	NM_020805	KLHL14
209.404	7245	NM_006137	CD7
209.404	-5248	NM_016286	DCXR
209.404	171871	NM_000346	SOX9
209.404	111478	NR_109971	LINC01483
209.404	11498	NM_001256	CDC27

209.404	7489	NM_003487	TAF15
209.404	40759	NM_001194958	KCNJ18
209.404	14124	NR_033984	LOC400548
209.404	116751	NM_024562	TANGO6
209.404	-10541	NM_020786	PDP2
209.404	20285	NR_110918	LOC101927650
209.404	-79	NM_033226	ABCC12
209.404	-75091	NM_018723	RBFOX1
209.404	6513	NR_033833	LINC00927
209.404	-3708	NM_024817	THSD4
209.404	-156185	NM_002943	RORA
209.404	-13321	NM_022898	BCL11B
209.404	47963	NM_182560	C14orf177
209.404	92181	NR_033943	LOC100129345
209.404	61090	NM_024734	CLMN
209.404	-1110	NR_110553	LOC102724190
209.404	213388	NM_032135	FSCB
209.404	940265	NM_032135	FSCB
209.404	434088	NM_022123	NPAS3
209.404	-385110	NM_172370	DAOA
209.404	-793308	NR_049840	MIR548AS
209.404	-8405	NM_000620	NOS1
209.404	9353	NM_000277	PAH
209.404	-232875	NM_013244	MGAT4C
209.404	75703	NM_006982	ALX1
209.404	-70026	NR_120471	LOC101928441
209.404	-132	NR_029603	MIR139
209.404	-66430	NM_005247	FGF3
209.404	-2606	NM_001001921	OR5AS1
209.404	67276	NM_001004703	OR4C46
209.404	116422	NM_024113	C11orf49
209.404	749702	NR_120553	LINC01493
209.404	36535	NM_005170	ASCL2
209.404	-21070	NM_152643	KNDC1
209.404	80338	NM_001001677	LINC01164
209.404	103657	NM_145012	CCNY

209.404	124477	NR_049884	MIR5699
209.404	28224	NM_001821	CHML
209.404	-23598	NM_001103	ACTN2
209.404	-1606	NM_177398	LMX1A
209.404	-30703	NM_052939	FCRL3
209.404	8135	NM_178229	IQGAP3
209.404	17680	NM_019099	FAM212B
209.404	45774	NM_000779	CYP4B1
209.404	23058	NM_144569	SPOCD1
209.404	-328654	NR_034182	MATN1-AS1
191.015	-6856	NM_004992	MECP2
191.015	88024	NM_004224	GPR50
191.015	-1998	NR_121647	LINC01410
191.015	-14796	NM_152574	TTC39B
191.015	-123849	NM_174911	FAM84B
191.015	168754	NM_173851	SLC30A8
191.015	-90379	NM_014379	KCNV1
191.015	40560	NM_006421	ARFGEF1
191.015	7634	NM_014729	TOX
191.015	-2870	NM_002095	GTF2E2
191.015	33131	NM_015310	PSD3
191.015	-35198	NM_139167	SGCZ
191.015	173691	NM_006094	DLC1
191.015	107286	NM_030936	RNF32
191.015	-26718	NR_046103	LOC349160
191.015	-725713	NM_152754	SEMA3D
191.015	-636939	NM_022479	WBSCR17
191.015	-16797	NM_000598	IGFBP3
191.015	4326	NM_007353	GNA12
191.015	35703	NM_144980	C6orf118
191.015	-486216	NM_020133	AGPAT4
191.015	-361958	NM_012419	RGS17
191.015	-477604	NM_207499	PTCHD4
191.015	18156	NM_015345	DAAM2
191.015	33095	NM_153487	MDGA1
191.015	14041	NM_152734	C6orf89

191.015	137047	NM_152554	C6orf195
191.015	446565	NM_013283	MAT2B
191.015	32972	NM_181504	PIK3R1
191.015	-68420	NM_004520	KIF2A
191.015	157373	NR_104632	LOC101926940
191.015	-458	NM_153013	NADK2
191.015	31499	NR_104616	LOC100506858
191.015	10229	NM_023924	BRD9
191.015	-7315	NM_032623	MGARP
191.015	45255	NR_110660	LINC01365
191.015	-180069	NM_005172	ATOH1
191.015	-10359	NM_020236	MRPL1
191.015	-67858	NR_037876	SLIT2-IT1
191.015	34207	NM_001184	ATR
191.015	56903	NM_032242	PLXNA1
191.015	247367	NM_014980	STXBP5L
191.015	17925	NM_020357	PCNP
191.015	53585	NM_173655	EPHA6
191.015	133980	NM_022785	EFCAB6
191.015	-18791	NM_015140	TLL12
191.015	8896	NR_125362	LOC100506679
191.015	25202	NM_007068	DMC1
191.015	-49254	NM_003056	SLC19A1
191.015	6899	NM_006936	SUMO3
191.015	-4900	NM_001389	DSCAM
191.015	-17052	NM_178468	FAM83C
191.015	321518	NR_109872	LOC102606466
191.015	28384	NR_038239	LINC00658
191.015	-39649	NM_014914	AGAP1
191.015	75617	NM_003648	DGKD
191.015	-10020	NM_004044	ATIC
191.015	392674	NM_015265	SATB2
191.015	-463025	NM_020342	SLC39A10
191.015	6118	NM_001289947	ERICH2
191.015	-26943	NM_004418	DUSP2
191.015	-71471	NM_001032412	ACTR3BP2

191.015	-110567	NR_110219	LOC101927285
191.015	-97997	NR_110251	LINC01247
191.015	194705	NM_001205273	THEG5
191.015	59553	NM_014717	ZNF536
191.015	-12291	NM_001098626	ZNF98
191.015	-515	NM_005498	AP1M2
191.015	-13418	NR_036206	MIR4322
191.015	2908	NM_006949	STXBP2
191.015	-292714	NR_104127	LINC01029
191.015	-388724	NM_004361	CDH7
191.015	-172982	NM_001037802	SKOR2
191.015	-405199	NR_049847	MIR5583-1
191.015	-39390	NM_018307	RHOT1
191.015	53230	NM_015134	MPRIP
191.015	-76447	NR_049816	MIR5093
191.015	-19139	NR_045112	LOC100129617
191.015	3543	NR_106759	MIR6504
191.015	80405	NR_104660	LOC101928248
191.015	2522	NM_015272	RPGRIP1L
191.015	6382	NM_006738	AKAP13
191.015	84310	NM_004039	ANXA2
191.015	39720	NM_017661	ZNF280D
191.015	-573951	NM_020858	SEMA6D
191.015	-64998	NM_002399	MEIS2
191.015	-93059	NM_130901	OTUD7A
191.015	75306	NR_040082	LOC100128714
191.015	-906447	NR_102737	LINC00911
191.015	152613	NM_025152	NUBPL
191.015	-1353	NM_000705	ATP4B
191.015	-105855	NR_103846	LINC00676
191.015	-227409	NR_049840	MIR548AS
191.015	3382	NM_080818	OXGR1
191.015	-119912	NR_046991	LINC00353
191.015	98193	NM_003306	TRPC4
191.015	42688	NM_006531	IFT88
191.015	-79517	NM_152905	NEDD1

191.015	14045	NM_001256373	C12orf79
191.015	207244	NR_028408	LINC00938
191.015	169118	NM_032834	ALG10
191.015	65396	NM_019844	SLCO1B3
191.015	-23053	NM_030766	BCL2L14
191.015	67603	NM_173593	B4GALNT3
191.015	-6145	NM_002424	MMP8
191.015	1594	NM_173583	KLHL35
191.015	171974	NR_036180	MIR378C
191.015	-15695	NM_001077685	AGAP7P
191.015	-37767	NR_110138	LINC01452
191.015	76030	NR_106800	MIR6742
191.015	-2651	NM_033102	SLC45A3
191.015	18421	NM_177402	SYT2
191.015	35816	NM_022093	TNN
191.015	124850	NM_005092	TNFSF18
191.015	24360	NM_000655	SELL
191.015	788	NM_199344	SFT2D2
191.015	416	NR_104217	NBPF25P
191.015	-128259	NR_110693	LOC101928241
191.015	-437682	NM_006256	PKN2
191.015	-138367	NM_012302	LPHN2
191.015	-220955	NM_173808	NEGR1
172.919	594	NM_001145028	PALM3
143.582	85154	NM_138960	TGIF2LX
143.582	77781	NR_103711	PAPPA-AS1
143.582	20180	NM_017790	RGS3
143.582	25639	NM_033051	SLC46A2
143.582	-31912	NM_004473	FOXO1
143.582	3931	NM_145006	SUSD3
143.582	119748	NM_015941	ATP6V1H
143.582	-82736	NR_029689	MIR153-2
143.582	-40293	NR_024476	PAXIP1OS
143.582	2851	NM_145030	PPP1R35
143.582	20560	NM_003508	FZD9
143.582	-48139	NR_037477	MIR3914-1

143.582	-101706	NM_022479	WBSCR17
143.582	-777	NM_000790	DDC
143.582	248372	NM_022748	TNS3
143.582	29873	NM_014766	SCRN1
143.582	18739	NR_110054	LOC101926963
143.582	23014	NM_007045	FGFR1OP
143.582	92523	NR_038408	LOC100128176
143.582	-249870	NR_046100	LOC285762
143.582	-400434	NR_039786	MIR4643
143.582	8656	NM_207499	PTCHD4
143.582	4234	NM_182594	ZNF454
143.582	-29536	NR_109894	CTB-178M22.2
143.582	-4237	NR_039665	MIR4460
143.582	419156	NM_016644	PRR16
143.582	-240342	NM_173670	RGMB
143.582	-132062	NM_005909	MAP1B
143.582	-24750	NR_104664	LOC102467147
143.582	-312545	NR_073113	NNT-AS1
143.582	-42585	NM_001102562	MARCH11
143.582	-31735	NR_003713	LOC728613
143.582	-184103	NM_012118	CCRN4L
143.582	90309	NR_102713	STPG2-AS1
143.582	35274	NM_005390	PDHA2
143.582	74427	NM_005172	ATOH1
143.582	-2063	NM_003471	KCNAB1
143.582	27108	NR_002992	SNORA7B
143.582	80375	NM_032343	CHCHD6
143.582	-56066	NR_049831	MIR4444-2
143.582	-28426	NM_006030	CACNA2D2
143.582	108516	NM_005442	EOMES
143.582	25950	NR_030614	MIR885
143.582	42208	NR_110118	LINC01266
143.582	-89262	NM_001008494	ISX
143.582	26656	NM_138983	OLIG1
143.582	2238	NM_058184	LINC00158
143.582	-232654	NM_003489	NRIP1

143.582	-4236	NM_080820	DTD1
143.582	204322	NM_017545	HAO1
143.582	-28116	NM_017933	PID1
143.582	9704	NM_005070	SLC4A3
143.582	4662	NR_110604	LANCL1-AS1
143.582	85205	NR_034096	FTCDNL1
143.582	-392671	NM_173651	FSIP2
143.582	-954502	NM_130773	CNTNAP5
143.582	-1130110	NM_006773	DDX18
143.582	872	NR_110568	LOC101927661
143.582	126506	NR_024059	MIMT1
143.582	-9793	NM_000400	ERCC2
143.582	410258	NR_110759	LOC100420587
143.582	-462822	NR_027301	LINC00662
143.582	174670	NM_004907	IER2
143.582	-15661	NM_014772	CTIF
143.582	71	NM_020474	GALNT1
143.582	-65634	NR_109971	LINC01483
143.582	163228	NM_015623	TANC2
143.582	8641	NM_032133	MYCBPAP
143.582	-10281	NM_173847	SPACA3
143.582	238946	NM_001190452	MTRNR2L1
143.582	-24578	NM_000691	ALDH3A1
143.582	21595	NM_001372	DNAH9
143.582	-324657	NM_001796	CDH8
143.582	27176	NM_153837	GPR114
143.582	67944	NM_020424	LYRM1
143.582	-105133	NR_110106	LOC101926928
143.582	-148622	NM_022480	KLHL25
143.582	86941	NR_029709	MIR190A
143.582	-49991	NM_032499	C15orf41
143.582	-54476	NM_014106	ZNF770
143.582	-12713	NR_029624	MIR211
143.582	-22947	NR_026771	DKFZP434L187
143.582	122115	NR_002770	DIO3OS
143.582	-245428	NM_182560	C14orf177

143.582	-71447	NM_003485	GPR68
143.582	-1193217	NR_110074	LINC01467
143.582	91057	NM_015057	MYCBP2
143.582	15202	NM_021808	GALNT9
143.582	1546	NM_004416	DTX1
143.582	43152	NM_005639	SYT1
143.582	-29697	NR_024072	MRS2P2
143.582	-45579	NM_031435	THAP2
143.582	380289	NM_018318	CCDC91
143.582	-8784	NM_000834	GRIN2B
143.582	271851	NM_003105	SORL1
143.582	17310	NM_002335	LRP5
143.582	95519	NM_003591	CUL2
143.582	-362364	NR_039822	MIR4675
143.582	-65909	NR_120635	LOC101928272
143.582	117304	NM_006624	ZMYND11
143.582	1064	NM_016102	TRIM17
143.582	381774	NM_003713	PPAP2B
143.582	3441	NR_039942	MIR4781
143.582	42800	NM_024503	HIVEP3
140.907	185077	NR_121584	LOC101929116
140.907	-52733	NM_001141917	FAM205A
140.907	-1336	NM_015061	KDM4C
140.907	109664	NM_014943	ZHX2
140.907	-264883	NR_002835	HAS2-AS1
140.907	-13766	NM_001039769	UG0898H09
140.907	-4989	NM_006765	TUSC3
140.907	-60766	NR_031690	MIR548I4
140.907	87508	NM_001195278	TMEM178B
140.907	-1857	NM_199349	KCP
140.907	-44291	NM_182595	POM121L12
140.907	30882	NR_036501	LINC00997
140.907	27588	NR_110870	LOC101929420
140.907	-252928	NR_027030	LINC01312
140.907	26315	NM_018988	GFOD1
140.907	-75723	NM_182761	FAM170A

140.907	335625	NR_000039	RAB9BP1
140.907	70819	NM_152295	TARS
140.907	-335459	NM_004394	DAP
140.907	-948839	NR_110753	LOC101927282
140.907	-420641	NM_152545	RASGEF1B
140.907	-137581	NM_032654	AFAP1-AS1
140.907	46523	NM_002093	GSK3B
140.907	-9763	NM_138807	TAMM41
140.907	-7249	NM_021096	CACNA1I
140.907	-4385	NR_110545	LINC01423
140.907	-88388	NR_109942	LINC01523
140.907	-36491	NM_001164811	PET117
140.907	40593	NR_039933	MIR4774
140.907	605368	NM_020868	DPP10
140.907	27887	NM_005428	VAV1
140.907	256145	NM_001036	RYR3
140.907	416358	NM_000153	GALC
140.907	110966	NM_020421	ADCK1
140.907	-383804	NR_039996	LINC00648
140.907	111806	NM_138288	SPTSSA
140.907	159935	NR_036193	MIR4307
140.907	259572	NR_046848	FAM155A-IT1
140.907	90019	NR_033988	FLJ41278
140.907	-1971	NM_005555	KRT6B
140.907	389938	NR_024504	LOC646813
140.907	-18567	NM_020229	PRDM11
140.907	-59898	NR_120625	LOC101927549
140.907	-15314	NM_005470	ABI1
140.907	-107027	NM_019590	KIAA1217
140.907	-346747	NR_038884	LINC00701
140.907	67632	NM_031935	HMCN1
140.907	-139329	NM_020950	KIAA1614
140.907	-33397	NR_110722	LOC101928778
140.907	8360	NM_001030	RPS27
112.949	755599	NR_039635	MIR4436A
48.245	485825	NR_120619	LINC01163

22.114	107758	NM_022748	TNS3
--------	--------	-----------	------

Peak Score – frequência de identificação do pico; **Distância TSS** – Distância (bp) do sítio de início de transcrição; **RefSeq** - Sequência de Referência

Anexo IV - Sequencias identificadas como potenciais alvos de TCF21 em células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 - MiSeq

Peak Score	Distância TSS	Refseq	Gene
6.615.614	224221	NR_003955	EMBP1
6.194.577	-30519	NM_032440	LCOR
4.496.836	75288	NM_001004703	OR4C46
4.132.624	463050	NR_024380	LOC441666
1.675.868	-88306	NM_024581	FAM184A
1.627.931	-122125	NR_121570	LOC101928381
1.251.955	3900	NM_001040069	LINC00273
1.073.987	34825	NR_033907	LOC642236
1.025.463	65347	NM_001004703	OR4C46
926.591	-81090	NR_110761	LOC102723769
901.969	178628	NR_120619	LINC01163
703.426	26399	NM_001040069	LINC00273
681.731	132280	NM_003222	TFAP2C
666.451	-4987	NM_001956	EDN2
666.297	27327	NM_030626	LRRC27
601.227	-30636	NM_001195127	WI2-237311.2
579.411	-111228	NM_001024942	FAM27C
571.416	24638	NM_016196	RBM19
551.161	1680972	NR_003952	ZNF733P
544.422	385070	NR_120554	LOC103312105
526.526	61368	NR_003267	GGT3P
520.546	-68103	NR_049816	MIR5093
520.546	-254	NM_033282	OPN4
515.245	-26577	NM_032693	NAA11
512.601	-73233	NR_027124	LOC339568
498.437	-93172	NM_000693	ALDH1A3
483.851	29457	NM_014696	GPRIN2
477.476	-53820	NM_178456	C20orf85
457.439	16845	NM_024827	HDAC11
457.439	59693	NM_052931	SLAMF6
452.675	-50847	NM_005822	RCAN2
452.675	514754	NM_000585	IL15

452.675	12503	NM_182565	UBALD2
440.377	-129619	NM_001008745	ATP6V0E2-AS1
440.377	-11317	NR_125359	LOC79160
440.377	324700	NM_018194	HHAT
438.357	192543	NM_001032412	ACTR3BP2
424.765	349246	NM_002430	MN1
424.765	-13395	NM_014568	GALNT5
408.383	13784	NM_198483	RUFY4
408.383	-115486	NR_015398	LOC100128554
400.887	344534	NM_002515	NOVA1
400.074	29101	NM_182974	GLT6D1
400.074	116929	NM_004349	RUNX1T1
400.074	-6057	NM_198284	LINC00265
400.074	247054	NR_105009	LINC01335
400.074	33739	NM_006515	SETMAR
400.074	63571	NM_006739	MCM5
400.074	-311975	NM_021643	TRIB2
400.074	-202626	NM_017799	TMEM260
400.074	5011	NM_003282	TNNI2
393.822	-94080	NR_049816	MIR5093
380.043	150563	NM_004304	ALK
380.043	-23609	NR_024468	MYT1L-AS1
380.043	-6259	NM_002424	MMP8
378.249	-28207	NM_014510	PCLO
378.249	-81445	NR_110018	LOC100505921
378.249	-1324335	NM_001704	BAI3
378.249	2415	NM_000960	PTGIR
378.249	-7840	NM_152604	ZNF383
378.249	88798	NM_032873	UBASH3B
378.249	61447	NM_014431	PALD1
378.249	112430	NM_018836	AJAP1
367.052	55925	NM_017733	PIGG
367.052	-13491	NM_004975	KCNB1
367.052	-65583	NM_053056	CCND1
357.985	-59254	NR_037489	MIR3910-2
357.985	1743	NR_031734	MIR1913

357.985	56179	NR_104616	LOC100506858
357.985	8645	NM_002193	INHBB
357.985	44462	NM_003743	NCOA1
357.985	21375	NM_080475	SERPINB11
357.985	-8653	NR_003034	LOC441601
357.985	23848	NM_006204	PDE6C
355.322	72753	NR_002787	LOC154449
355.322	-172046	NM_006316	MYCNOS
343.008	18015	NM_002457	MUC2
339.721	120096	NR_105006	LINC01111
339.721	-22525	NM_014602	PIK3R4
339.721	24166	NM_020733	HEG1
339.721	-67830	NM_173485	TSHZ2
339.721	2986	NM_001875	CPS1
339.721	177742	NR_110599	LOC102724224
339.721	-426071	NM_003203	GCFC2
339.721	-2676	NR_040018	C1QTNF1-AS1
339.721	84629	NR_039721	MIR4499
339.721	-1597	NM_001525	HCRTR1
331.933	8896	NM_174906	ADIG
331.933	-1160	NM_080830	CST11
331.933	-89051	NM_004457	ACSL3
331.933	179087	NM_001039762	FAM196A
323.003	82524	NR_015430	C14orf64
321.856	-18255	NR_109885	RALY-AS1
311.055	-2472	NM_005577	LPA
310.529	-12883	NR_027019	ANKRD30BL
307.891	44376	NM_153246	C6orf223
292.549	-110522	NM_001127464	ZNF469
288.089	-385446	NM_004932	CDH6
288.089	-81229	NR_037902	LOC100507537
288.089	4203	NM_007282	RNF13
288.089	-16378	NR_038311	ITGB2-AS1
288.089	-14262	NR_049822	MIR5190
284.359	-17768	NM_002066	GML
284.359	-7122	NM_148961	OTOS

284.359	-35978	NM_019064	SDK2
284.359	-22719	NM_030634	ZNF436
271.138	-46663	NM_001100829	TMEM170B
271.138	25852	NM_000316	PTH1R
271.138	-163375	NR_110285	LOC101927924
271.138	932	NM_175078	KRT77
267.142	22103	NR_121577	MIR4674HG
267.142	449369	NM_018112	TMEM38B
267.142	140816	NM_001205273	THEG5
267.142	40987	NM_024514	CYP2R1
267.142	-112321	NM_000721	CACNA1E
267.142	25533	NM_001127577	LOC100129534
262.389	-12156	NR_110228	LINC01250
250.692	100148	NM_002793	PSMB1
250.692	-10880	NR_120348	LOC101929196
250.116	88263	NM_021208	LINC00474
250.116	303077	NR_031679	MIR548H3
250.116	152862	NM_004349	RUNX1T1
250.116	-63475	NM_000503	EYA1
250.116	-15532	NM_017460	CYP3A4
250.116	69199	NM_152680	TMEM154
250.116	-164698	NM_021038	MBNL1
250.116	-21748	NM_153752	LINC00313
250.116	-15129	NM_152507	C21orf128
250.116	18821	NM_001011718	XKR7
250.116	119701	NM_024894	NOL10
250.116	238518	NR_040074	LOC100287225
250.116	11407	NM_003727	DNAH17
250.116	-47599	NM_015011	MYO16
250.116	642899	NM_178539	FAM19A2
250.116	612899	NM_020929	LRRRC4C
250.116	81673	NR_120623	TCERG1L-AS1
246.095	837026	NM_001012968	SPIN4
243.426	101740	NM_014258	SYCP2
238.238	64312	NM_020536	CSRP2BP
235.122	89900	NM_145003	TSNARE1

235.122	177798	NM_198449	EMB
235.122	20327	NM_138968	LINC00189
235.122	30597	NM_016552	ANKMY1
235.122	346120	NM_138285	NUP35
235.122	3054	NM_006949	STXBP2
235.122	255635	NR_104152	CASC17
235.122	-29940	NM_005964	MYH10
235.122	374756	NR_039722	MIR4500
235.122	99456	NR_046579	CACNA1C-AS2
235.122	-104661	NM_001206626	TRIM49B
235.122	7481	NM_003272	GPR137B
225.469	-9274	NM_032501	ACSS1
225.469	131580	NM_001004299	ANKRD26P1
221.422	-23437	NM_014806	RUSC2
221.422	-204558	NR_047475	NRG1-IT3
221.422	39188	NM_006207	PDGFRL
221.422	389222	NM_012252	TFEC
221.422	396465	NM_002511	NMBR
221.422	45082	NM_173674	DCBLD1
221.422	337054	NM_138574	HDGFL1
221.422	179150	NM_003862	FGF18
221.422	-2658	NM_021038	MBNL1
221.422	-93144	NR_039761	MIR4535
221.422	406258	NM_002430	MN1
221.422	21777	NM_005461	MAFB
221.422	63612	NM_000285	PEPD
221.422	-5506	NM_138570	SLC38A10
221.422	45764	NM_022739	SMURF2
221.422	587	NM_015085	RAP1GAP2
221.422	-189558	NM_000620	NOS1
221.422	-141319	NR_046986	KIRREL3-AS2
221.422	1170	NM_002256	KISS1
221.422	-4910	NM_001384	DPH2
221.422	57129	NM_015209	KAZN
221.422	-51065	NM_033467	MMEL1
209.538	-127048	NM_000999	RPL38

209.179	-6834	NM_020717	SHROOM4
209.179	-397	NR_036252	MIR4289
209.179	183652	NM_022138	SMOC2
209.179	26406	NM_001044	SLC6A3
209.179	345592	NM_004249	RAB28
209.179	-5221	NM_006026	H1FX
209.179	-5000	NM_001282537	C21orf140
209.179	-99406	NR_110631	BMP7-AS1
209.179	11238	NM_080607	VSTM2L
209.179	-820	NM_015893	PRLH
209.179	-4351	NM_000438	PAX3
209.179	-171633	NM_025067	KLHL29
209.179	140070	NM_012293	PXDN
209.179	-756	NM_030657	LIM2
209.179	11770	NR_027754	CEACAM22P
209.179	159420	NR_002837	UBE2MP1
209.179	1163147	NM_178539	FAM19A2
209.179	-71832	NM_000281	PCBD1
209.179	-15974	NM_001077685	AGAP7P
203.735	124570	NR_038972	LOC339593
197.583	-8048	NM_001085481	MAP1LC3B2
197.507	-23733	NM_019613	WDR45B
188.877	-6291	NM_002501	NFIX
188.877	68241	NM_000346	SOX9
188.877	29338	NM_018723	RBFOX1
186.531	32613	NR_038989	LINC01016
182.665	-55321	NM_001794	CDH4
175.574	-16959	NM_174919	ARHGAP27
175.574	17680	NM_001012714	PRR26
174.353	35560	NR_033907	LOC642236
165.992	-18079	NM_022141	PARVG
165.992	26808	NM_002193	INHBB
156.413	573807	NM_002012	FHIT
156.413	15904	NM_001146339	VSTM2B
156.413	172147	NR_036180	MIR378C
156.413	151927	NM_015215	CAMTA1

154.518	227073	NM_015239	AGTPBP1
154.518	62383	NM_015198	COBL
154.518	16289	NR_001288	TFAMP1
154.518	233501	NM_138694	PKHD1
154.518	2549	NM_015238	WWC1
154.518	-12239	NM_001080516	GRXCR2
154.518	298815	NM_198449	EMB
154.518	-17579	NR_039662	MIR4457
154.518	-87642	NM_012234	RYBP
154.518	61703	NM_198851	C22orf34
154.518	-32848	NM_001099294	KIAA1644
154.518	49837	NM_133454	SGSM1
154.518	95429	NR_031658	MIR1257
154.518	79627	NR_039757	MIR4532
154.518	-11962	NM_198582	KLHL30
154.518	308660	NM_014914	AGAP1
154.518	211565	NM_014553	TFCP2L1
154.518	-31009	NM_003853	IL18RAP
154.518	151771	NM_003494	DYSF
154.518	23596	NM_003108	SOX11
154.518	19876	NM_033206	KIR3DX1
154.518	-201557	NM_014717	ZNF536
154.518	-503806	NR_104127	LINC01029
154.518	25337	NR_110777	LOC101927410
154.518	11443	NM_019020	TBC1D16
154.518	63969	NM_022759	ENGASE
154.518	23769	NM_173615	VWA3A
154.518	61822	NM_014117	C16orf72
154.518	4725	NM_000820	GAS6
154.518	-52661	NM_032829	FAM222A
154.518	8913	NM_199352	SLC22A25
154.518	19886	NM_018664	BATF3
151.421	48454	NM_152888	COL22A1
151.421	-16918	NM_000598	IGFBP3
151.421	57809	NM_006714	SMPDL3A
151.421	75544	NM_024717	MCTP1

151.421	105801	NM_002606	PDE9A
151.421	4458	NR_120451	LOC101927637
151.421	196242	NM_173598	KSR2
151.421	-59168	NM_018448	CAND1
151.421	-85732	NM_145308	SHANK2-AS3
151.421	-7945	NM_033100	CDHR1
151.421	-2706	NM_153254	TTL10
151.044	-48912	NM_004104	FASN
151.044	-309409	NM_182831	C16orf82
143.827	34149	NM_024839	RPP21
143.827	-344294	NR_104628	LOC101929681
143.827	131771	NM_024337	IRX1
143.827	-157738	NR_049831	MIR4444-2
143.827	-55582	NR_046774	DSCAM-IT1
143.827	282	NR_004846	LOC100134868
143.827	-22180	NR_110592	LOC102723927
143.827	34057	NM_001007525	NWD1
143.827	-292590	NR_104127	LINC01029
141.376	85285	NM_003581	NCK2
141.376	-125868	NM_182564	LINC00469
136.492	-289913	NR_110860	LOC101928519
136.492	49302	NM_001001702	FLJ33360
136.492	4840	NR_038838	LOC100506122
136.492	-5472	NM_000878	IL2RB
136.492	46670	NM_004737	LARGE
136.492	13610	NM_021196	SLC4A5
136.492	-50558	NM_005792	MPHOSPH6
136.492	-46937	NR_026774	LINC00239
136.492	1278	NM_025106	SPSB1
131.449	-126352	NM_002081	GPC1
121.446	183878	NM_001032412	ACTR3BP2
107.039	334807	NM_025087	CWH43
52.798	-49055	NR_026597	DIRC3
28.653	47101	NR_110879	LOC101929064
28.653	-37569	NM_004764	PIWIL1
28.653	92985	NM_004675	DIRAS3

28.653	-360402	NM_004781	VAMP3
--------	---------	-----------	-------

Peak Score – frequência de identificação do pico; **Distância TSS** – Distância (bp) do sítio de início de transcrição; **RefSeq** - Sequência de Referência

Anexo V - Genes identificados como potenciais alvos de TCF21 em células H295R pcMVMycTCF21 e em células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21 pela plataforma MiSeq

REFSEQ	Gene
NM_000316	ACTR3BP2
NM_000503	AGAP1
NM_000585	AGAP7P
NM_001282537	CWH43
NM_002066	DSCAM-IT1
NM_002501	FAM184A
NM_003272	FLJ33360
NM_004781	HEG1
NM_004975	IGFBP3
NM_006515	KIAA1644
NM_014602	LINC00273
NM_015011	LINC01029
NM_015209	LINC01163
NM_018112	LOC100506858
NM_018836	LOC101928381
NM_022759	LRRC4C
NM_025067	MIR378C
NM_025087	MIR3910-2
NM_030626	MIR4444-2
NM_032501	MIR4532
NM_032829	MIR5093
NM_033282	MMP8
NM_033467	MN1
NM_138285	NAA11
NM_148961	NOS1
NM_153254	OR4C46
NM_173598	PARVG
NM_182564	PIGG
NR_003034	RBFOX1
NR_024380	RUNX1T1
NR_026597	RYBP
NR_038989	SOX9

NR_039722	STXBP2
NR_047475	THEG5
NR_105009	TSHZ2
NR_110777	VSTM2L
NR_120451	WWC1
NR_121577	ZNF536

RefSeq - Sequência de Referência

Anexo VI - Sequencias identificadas em células H295R pCMVMycTCF21 – NextSeq

Disponível em:

<https://drive.google.com/drive/folders/1tklBWXMEygzfgolK4xxk24v0QTVhrcXt>

Anexo VII - Sequencias identificadas em células H295R pCMVMycTCF21 com IDR < 0,05

Peak Score	Distância TSS	Ensembl	Gene
670.365	-39401	ENSG00000126856	PRDM7
657.154	2;214;725;197;842	ENSG00000174469	CNTNAP2
641.278	106;735;106;735	ENSG00000148408	CACNA1B
558.899	145;881;145;896;145;000	ENSG00000155093	PTPRN2
531.314	-417543	ENSG00000276289	KCNE1B
522.523	40;777;238;019;460	ENSG00000197177	ADGRA1
522.523	35358	ENSG00000198033	TUBA3C
520.833	4294	ENSG00000235387	SPAAR
498.772	17;054;293;007	ENSG00000155816	FMN2
498.772	-183668	ENSG00000196511	TPK1
487.577	8068	ENSG00000121892	PDS5A
472.915	500;175;001;750;017	ENSG00000161267	BDH1
471.342	-19415	ENSG00000268320	SCGB1C2
469.395	108476	ENSG00000154529	CNTNAP3B
451.316	275851	ENSG00000260458	KCNJ18
445.001	-573712	ENSG00000276289	KCNE1B
427.519	-271571	ENSG00000170549	IRX1
426.353	230092	ENSG00000109182	CWH43
409.911	-4462467	ENSG00000130538	OR11H1
408.426	260700	ENSG00000109182	CWH43
408.426	52717	ENSG00000233999	IGKV3OR2
403.913	60542	ENSG00000185304	RGPD2
403.768	304284	ENSG00000155313	USP25
403.768	-19726	ENSG00000007237	AC005747.1
403.768	-109303	ENSG00000271336	IGHD1OR15
403.768	-165260	ENSG00000175497	DPP10
403.768	-4501498	ENSG00000130538	OR11H1
402.778	-589551	ENSG00000276289	KCNE1B
392.973	112620	ENSG00000286175	AC023490.7
381.474	224216	ENSG00000109182	CWH43
377.074	-258955	ENSG00000113430	IRX4
375.973	590;025;929;656;970;000	ENSG00000270629	NBPF14

366.586	-634111	ENSG00000276289	KCNE1B
365.691	-407233	ENSG00000276289	KCNE1B
365.434	-27094	ENSG00000183629	GOLGA8G
363.497	-585069	ENSG00000276289	KCNE1B
356.266	140;107;140;107	ENSG00000127989	MTERF1
356.266	10;430;610;469;925;300;000	ENSG00000206190	ATP10A
356.266	50041	ENSG00000234278	PRR20E
356.266	-62735	ENSG00000100453	GZMB
348.789	-578252	ENSG00000276289	KCNE1B
343.938	-53966	ENSG00000153684	GOLGA8F
339.332	-395223	ENSG00000276289	KCNE1B
332.515	5;187;025;041;171;900	ENSG00000135540	NHSL1
332.515	4;397;243;972	ENSG00000165061	ZMAT4
332.515	16;424;299;064	ENSG00000176571	CNBD1
332.515	1;071;471;075;946;430;000	ENSG00000136205	TNS3
329.682	-625311	ENSG00000276289	KCNE1B
308.764	4;265;742;610	ENSG00000150760	DOCK1
308.764	814551	ENSG00000182447	OTOL1
308.764	-19976	ENSG00000186207	LCE5A
298.214	-398181	ENSG00000276289	KCNE1B
285.013	53;518;526;505;263;600;000	ENSG00000184640	SEPTIN9
285.013	14;754;459;574;580;300;000	ENSG00000153774	CFDP1
285.013	103;228;103;243;103;000	ENSG00000155093	PTPRN2
285.013	33252	ENSG00000260811	OR4C45
285.013	2591	ENSG00000178605	GTPBP6
285.013	-64278	ENSG00000237524	TEX51
285.013	-283996	ENSG00000143995	MEIS1
229.412	-582656	ENSG00000276289	KCNE1B
44.375	-373347	ENSG00000276289	KCNE1B
38.125	-601625	ENSG00000276289	KCNE1B
26.875	-629707	ENSG00000276289	KCNE1B
5.875	56290	ENSG00000284662	OR4F16
3.375	-398844	ENSG00000276289	KCNE1B
3.125	-405114	ENSG00000276289	KCNE1B
525	132	ENSG00000118526	TCF21
365	-418590	ENSG00000276289	KCNE1B

275	663216	ENSG00000196693	ZNF33B
35	-600548	ENSG00000276289	KCNE1B

Peak Score – frequência de identificação do pico; **Distância TSS** – Distância (bp) do sítio de início de transcrição; **Ensembl** - código para acesso a sequencia na base de dados Ensembl