

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MAYARA CAROLINNE SILVA BOTELHO

**Identificação em larga escala de genes que medeiam a
quiescência celular e a diferenciação para lactogênese
induzidas pela laminina**

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

30/09/2022

MAYARA CAROLINNE SILVA BOTELHO

Identificação em larga escala de genes que medeiam a quiescência celular e a diferenciação para lactogênese induzidas pela laminina

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Bruni Cardoso

São Paulo

2022

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

B748i	Botelho, Mayara Identificação em larga escala de genes que medeiam a quiescência celular e a diferenciação para lactogênese induzidas pela laminina / Mayara Botelho. - São Paulo, 2022. 139 p.
	Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. Orientador: Cardoso, Alexandre Bruni
	1. quiescencia. 2. lactogênese. 3. matriz extracelular. 4. CRISPR/Cas9. I. T. II. Cardoso, Alexandre Bruni, orientador.

Dedicatória

À minha querida mãe Mary Botelho (*in memoriam*), cujo empenho em me educar sempre veio em primeiro lugar. Aqui estão os resultados dos seus esforços. Com muito amor, gratidão e saudades.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pela oportunidade de estar aqui e viver todas essas experiências, aprendizado e amadurecimento.

Aos meus pais, Fernando e Mary, e minha irmã, Taynara por todo o suporte, carinho, paciência e compreensão mesmo eu estando tão longe de casa. Sem vocês eu jamais teria conseguido.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Bruni Cardoso pela incrível oportunidade, pela confiança depositada e por tantos ensinamentos que vão além da vida acadêmica e que vou levar comigo para sempre. Mas sobretudo agradeço a sua paciência e dedicação que me permitiram evoluir como pessoa e profissional, sendo mais completa, competente e confiante.

À Pos-Doutora Rebeka Tomasin, pela companhia, os conselhos, a paciência e, principalmente, a amizade. Sem sua ajuda, seus conhecimentos e apoio eu não conseguiria.

Aos amigos que fiz no laboratório de Sinalização da Matriz Extracelular: Ana Maria Rodrigues, Pedro Ribeiro, Giovanni Genesi e Ana Zen. Vocês tornaram meus dias mais leves, alegres, felizes e recheados de bolos.

Ao Professor Nicolas Hoch e seu grupo pela valorosa ajuda nas análises, pela companhia de todos os dias e pelas amizades que cultivei.

Aos Profs. Drs. Walter Colli e Maria Julia Manso Alves que estavam sempre dispostos a me ouvir e me dar um conselho valoroso.

À técnica Celia Ludio cujo trabalho e conselhos eram indispensáveis para o funcionamento do laboratório.

À Beatriz Moraes cuja amizade somente fortaleceu com os anos de convívio e risadas que dividimos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira e a Pós-Doutora Mariana Dominguez, fundamentais para a manipulação do citometro de fluxo. À Danielle

Cristiane Baldo e Alessandra Dellavance do grupo Fleury que nos deram acesso à infraestrutura para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Helder Nakamura e os Mestre Alysson Henrique Urbanski fundamentais para as análises de bioinformática.

Ao Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo cujo conhecimento e expertise divididos comigo permitiram tanto o enriquecimento desse trabalho.

À Profa. Dra. Clarisse Rocha pelos valiosos conselhos logo no início do trabalho e por ceder os primeiros Primers antes que os meus chegassem.

Ao Instituto de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica) e seus funcionários.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPESP e Instituto Serrapilheira pelo apoio financeiro ao laboratório. À FAPESP (Processo 2017/25437-3) pela bolsa de doutorado e ao Instituto Serrapilheira (Processo 3832) pela bolsa de desenvolvimento.

RESUMO

Botelho, M.C.S. **Identificação em larga escala de genes que medeiam a quiescência celular e a diferenciação para lactogênese induzidas pela laminina.** 2022. 139p. Tese (Doutorado em ciências biológicas; área de concentração: Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

A proliferação é um dos atributos mais fundamentais dos sistemas vivos. Mas, ao contrário dos organismos unicelulares, as células dos organismos complexos param de proliferar, entrando em um estado denominado quiescência, mesmo na presença de nutrientes. Fatores presentes no microambiente celular, como a membrana basal (compartimento especializado da matriz extracelular (MEC) estruturado numa malha de laminina), desencadeiam e sustentam a quiescência, contribuindo para a diferenciação tecidual observada em organismos multicelulares. Para elucidar os mecanismos que fundamentam à aquisição e manutenção da quiescência e da diferenciação celular, nós realizamos um *forward genetic screen* em células expostas à uma MEC rica em laminina-111 (lrECM) que induz quiescência e diferenciação. Para isso, geramos células epiteliais mamárias não tumorais expressando o sensor fluorescente do ciclo celular FUCCI, assim como um repórter de diferenciação para lactogênese (β Cas-CFP). As células foram transfectadas com uma biblioteca lentiviral CRISPR/Cas9 *pooled* de abrangência genômica e tratadas com lrECM e prolactina por 72h, tempo em que a maioria das células entra em quiescência e se diferenciam. Após isolamento por *cell sorting* em três populações distintas: mCitrine+ (proliferativa), mCherry+ (quiescente) mCherry+ /CFP+ (quiescente e diferenciada), as células foram sequenciadas para identificação do enriquecimento de guideRNAs que alvejaram genes que medeiam a aquisição de quiescência e diferenciação. Entre os principais candidatos, encontramos genes envolvidos no ciclo celular, organização de células epiteliais e vias metabólicas. Usando o silenciamento pós-transcricional em ensaios baseados em microscopia de fluorescência, validamos novos mediadores de quiescência e diferenciação. Este trabalho expande nossa compreensão básica sobre proteínas sinalizadoras que atuam durante a aquisição da quiescência e diferenciação em contextos fisiológicos, estabelecendo as bases para estudos translacionais em lactação e para o câncer, uma doença em que a regulação da quiescência é perdida.

Palavras-chave: Quiescência, Diferenciação para Lactogênese, Matriz Extracelular, CRISPR/Cas9,

ABSTRACT

Botelho, M.C.S. **Large-scale identification of genes that mediate cellular quiescence and differentiation for lactogenesis induced by laminin.** 2022. 139p. Thesis (PhD's Degree in Biological Sciences; area of concentration: Biochemistry) - Institute de Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Proliferation is one of the most fundamental attributes of living systems. But unlike unicellular organisms, complex organisms' cells stop proliferating, entering a state termed quiescence, even in the presence of nutrients. Factors present in the cell microenvironment, such as the basement membrane (a specialized extracellular matrix (ECM) compartment assembled over a laminin network), trigger and sustain quiescence, contributing to tissue differentiation observed in multicellular organisms. To elucidate the mechanisms underlying acquisition and maintenance of quiescence and cell differentiation, we performed a forward genetic screen in cells exposed to a laminin-111 rich ECM (IrECM) that induce quiescence and differentiation. For this, we generated non-tumoral mammary epithelial cells expressing the fluorescent cell cycle sensor FUCCI, as well as a differentiation fluorescence reporter for lactogenesis (β Cas-CFP). Cells were transfected with a CRISPR/Cas9 genome-wide lentiviral pooled library and treated with IrECM and prolactin for 72h, time that most cells enter quiescence and differentiate. The cells were sorted in three distinct populations: mCitrine⁺ (proliferative), mCherry⁺ (quiescent) mCherry⁺/CFP⁺ (quiescent and differentiated) and sequenced for determining enrichment of CRISPR guideRNAs targeting genes mediating acquisition of quiescence and differentiation. Among the hits we found genes involved in cell cycle, epithelial cell organization and metabolic pathways. Using gene silencing in fluorescence microscopy-based assays, we validated novel mediators of quiescence and differentiation. This work expands our basic understanding of signaling proteins that act during quiescence and differentiation acquisition in physiological contexts, laying the groundwork for translational studies in lactation and for cancer, a disease in which quiescence regulation is lost.

Keywords: Quiescence, Lactogenic Differentiation, Extracellular Matrix, CRISPR/Cas9

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Uma visão esquemática do ciclo celular.	18
Figura 2 - Balança de efetores em favor da interrupção ou proliferação do ciclo celular.....	28
Figura 3 - Resumo do procedimento do screening para identificação de genes mediadores de quiescência e lactogênese.....	42
Figura 4 - Células EpH4 ES-FUCCI em monocamada e em 3D	52
Figura 5 - Células EpH4-FUCCI respondem aos estímulos de quiescência da membrana.	53
Figura 6 - PCR em tempo da expressão de β -caseína em EPH4- ES-FUCCI.	54
Figura 7 - EpH4- β Cas-CFP-FUCCI tratada com IrECM por 72 horas.	55
Figura 8 - Resposta das células EpH4 β -cas-CFP ES-Fucci ao tratamento com IrECM (matrigel) e prolactina.....	56
Figura 9 - Exemplos de análise usando o Flowing.	58
Figura 10 - EpH4-FUCCI em IrECM de 24 a 192 horas	59
Figura 11 - Distribuição de qualidade ao longo dos reads.....	61
Figura 12 - Comparação entre as corridas de sequenciamento das bibliotecas amplificadas no nosso laboratório e dos desenvolvedores da biblioteca.	63
Figura 13 - Similaridade no número de sgRNAs pela razão de representação no sequenciamento do nosso laboratório e dos desenvolvedores da biblioteca.	64
Figura 14 - Correlação entre a representatividade dos sgRNAs detectados na nossa corrida e na corrida de Sanjana et al.....	65
Figura 15 - Sequência dos gates e canais usados para o perfil do cell sorting	66
Figura 16 - Distribuição de qualidade ao longo dos reads na Lane 1 do cartucho de NextSeq.....	69
Figura 17 - Representação normalizada [(reads+1)/total de reads da condição] dos sgRNA das bibliotecas A e B na corrida NGS HiSeq versus os sgRNA da biblioteca plasmidial.	71
Figura 18 - Estratégia para inclusão de alvos potenciais na lista de genes relacionados a quiescência.	72
Figura 19 - O gráfico apresenta o -log do score positivo obtido pelo programa MAGEck de genes individuais em função da posição que ocupam no KO Gene rank (posição baseada no valor do score positivo) da seleção positiva.....	74
Figura 20 - Análise de enriquecimento de vias na lista de genes potencialmente reguladores da quiescência.....	75
Figura 21 - Estratégia para inclusão de alvos relacionados a diferenciação para lactogênese para análise de enriquecimento de vias.	78
Figura 22 - O gráfico apresenta o -log do score negativo obtido pelo programa MAGEck de genes individuais em função da posição que ocupam no KO Gene rank (posição baseada no valor do score negativo) da seleção negativa das células mCherry+/CFP+..	79
Figura 23 - Análise de enriquecimento de vias na lista de genes potencialmente reguladores da lactogênese.	80

Figura 24 - Expressão dos genes alvos após estímulo com IrECM ou IrECM+Prolactina.	88
Figura 25 - Expressão relativa dos genes potenciais mediadores de quiescência após silenciamento por siRNA.	90
Figura 26 - Expressão relativa dos genes potenciais mediadores de diferenciação de células epiteliais mamárias após silenciamento por siRNA.....	91
Figura 27 - Células EpH4-βCas-CFP-FUCCI tratada com IrECM por 48 horas.	92
Figura 28 - Células EpH4-βCas-CFP-FUCCI tratadas com os siRNA para Trp53, CHUK, NUMB e Tjp1 e IrECM e/ou prolactina por 48 horas..	93
Figura 29 - O silenciamento de Tjp1 resulta em aumento da proliferação em células tratadas com IrECM.....	94
Figura 30 – O silenciamento dos genes alvo envolvidos em quiescência e lactogênese afeta a resposta à IrECM.	95
Figura 31 - EpH4-βCas-CFP-FUCCI tratada com os siRNA de Jak2, Fto, Igfbp5 e Itga2 e IrECM e/ou prolactina por 48 horas.....	96
Figura 32 – A expressão de β-Caseína é reduzida em resposta ao silenciamento por siRNA de todos os alvos.	97
Figura 33 – O silenciamento dos genes alvo envolvidos em quiescência e lactogênese afeta a resposta a indução de expressão de β-caseína.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições do PCR 1 da biblioteca	39
Tabela 2 - Condições do PCR 2 da biblioteca	40
Tabela 3 - Condições da PCR 1 (método touch down).....	45
Tabela 4 - Condições para PCR2	46
Tabela 5 - Análise do sequenciamento da biblioteca pelo e-signal lab e pelos dados disponibilizados por Sanjana e colaboradores [88].	62
Tabela 6 - Porcentagem das diferentes populações isoladas após trasdução com a biblioteca GeCKO seguida de tratamento com IrECM+Prolactina.	67
Tabela 7 - Concentrações obtidas a partir da extração do DNA genômico.	67
Tabela 8 – Reads e Cobertura das corridas de NGS.....	70
Tabela 9 - Lista dos genes alvo mediadores da quiescência, classificação na seleção do MAGEcK, número de miR que atuam no gene, função do gene.	76
Tabela 10 – Lista de genes alvo relacionados a diferenciação para lactogênese	81
Tabela 11 – Coocorrência de genes relacionados a quiescência. O número de artigos em que a coocorrência de um determinado par de genes aparece é mostrado entre parênteses.	84
Tabela 12 – Coocorrência de genes relacionados a lactogênese. O número de artigos em que a coocorrência de um determinado par de genes aparece é mostrado entre parênteses.	85

Sumário

1. Introdução	17
1.1. O ciclo celular e a sua regulação.....	17
1.2. A quiescência proliferativa.....	21
1.3. A glândula mamária e a lactogênese.....	29
2. Objetivos	33
2.1. Objetivo geral.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
3. Metodologia	34
3.1. Cultivo celular.....	34
3.2. Amplificação do plasmídeo ES-FUCCI.....	35
3.3. Obtenção e caracterização da linhagem estável EpH4-ES-FUCCI.....	36
3.4. Obtenção e caracterização da linhagem estável EpH4- β Cas-CFP-ES-FUCCI.....	36
3.5. Amplificação da biblioteca CRISPR/Cas9.....	37
3.6. Preparo das amostras para sequenciamento <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS) Illumina.....	38
3.7. Sequenciamento da biblioteca plasmidial.....	40
3.8. Empacotamento das partículas lentivirais.....	41
3.9. Viabilidade celular e resposta proliferativa aos tratamentos com IrECM e IrECM + Prolactina.....	41
3.10. Screen genético com o uso da biblioteca GeckoV2 de CRISPR/Cas9 com cobertura de 100X.....	42
3.11. Preparação de amostras do <i>screen</i> com cobertura de 100X para o NGS.....	44
3.12. NGS do <i>CRISPR screen</i>	47
3.13. Análise dos dados de sequenciamento.....	48
3.14. Real-time PCR.....	48
3.15. Validação dos genes alvo escolhidos por siRNA.....	49
3.16. Microscopia de fluorescência e análise de imagens.....	49
4. Resultados	51
4.1. Geração do modelo celular para a identificação de genes mediadores da quiescência e da lactogênese.....	51
4.1.1. Resposta ao tratamento com IrECM e prolactina ao longo de 192 horas.....	57

4.1.2. O NGS demonstrou que a biblioteca plasmidial amplificada no nosso laboratório era apropriada para o screen	60
4.2. <i>CRISPR screen</i> para a identificação de genes mediadores da quiescência e da lactogênese	65
4.2.1. Análise dos genes possivelmente relacionados com quiescência	71
4.2.2. Análise dos genes possivelmente relacionados com a regulação da diferenciação para lactogênese	77
4.3. Validação da expressão gênica dos 21 genes relacionados à quiescência e dos 23 relacionados à lactogênese.	82
4.3.1. Escolha de genes para a validação funcional.....	82
4.3.2. Expressão dos genes alvo após estímulo com IrECM e prolactina ao longo de 48 horas	87
4.3.3. Validação do efeito do silenciamento dos genes alvo na quiescência e na diferenciação lactogênica.....	89
5. Discussão	99
6. Conclusões.....	108
Anexos	123
Anexo 1 – Plasmídeo ES-FUCCI.....	123
Anexo 2 – Plasmídeo da Biblioteca Gecko V2.....	124
Anexo 3 – <i>Primers Forward e Reverse</i> usados nos PCR1 e PCR2.....	125
Anexo 4 – Lista de <i>primers</i> usados no <i>Real-Time</i> PCR.....	128
Anexo 5 – Detalhamento do experimento usando RNAiMAX e Silencer Select ..	130
Anexo 6 – qRT-PCR para validação da expressão genica em células EpH4.....	131

1. Introdução

1.1. O ciclo celular e a sua regulação

A propagação de material genético através da divisão celular é uma das características que distingue seres vivos de sistemas naturais inanimados. A proliferação é, portanto, um dos atributos mais conservados e elementares de um sistema vivo [1], [2]. O ciclo celular é a série de eventos que ocorrem em uma célula e que a leva a se dividir e produzir duas novas células-filhas, propagando o seu material genético. O ciclo celular típico em eucariotos é composto de quatro fases: G1, S, G2 e M. G1, S e G2 juntos são chamados de interfase. A fase M é composta pela mitose, na qual o núcleo da célula se divide, e citocinese, na qual o citoplasma da célula se divide para formar duas células-filhas, estas duas fases estão fortemente acopladas [3]. Cada fase da progressão do ciclo celular é molecularmente regulada de modo bastante orquestrado (Fig. 1) e depende da conclusão adequada da fase anterior do ciclo celular. Uma célula também pode sair permanentemente do ciclo celular ou parar de ciclar temporariamente, entrando num estado denominado quiescência, que será abordada de forma mais aprofundada mais à frente.

As células entram em G1 após a conclusão da fase M anterior ou após sair da quiescência, comumente chamada de G0 ou G1 expandido. A transição das células entre as fases G0 e G1 é determinada por sinais mitogênicos extracelulares [4], [5]. Como exemplo de sinalização mitogênica que ativa a proliferação em células epiteliais mamárias e outros tipos de células, o mitógeno Epidermal Growth Factor (EGF) se liga ao seu receptor tirosina quinase, o EGFR, num mecanismo que leva a ativação da via MAPK-ERK e conseqüente indução da transcrição de ciclinas, especificamente

ciclinas D, e ativação das quinases dependentes de ciclina-4 e -6 (CDK4/6) responsáveis pela ativação de G1.

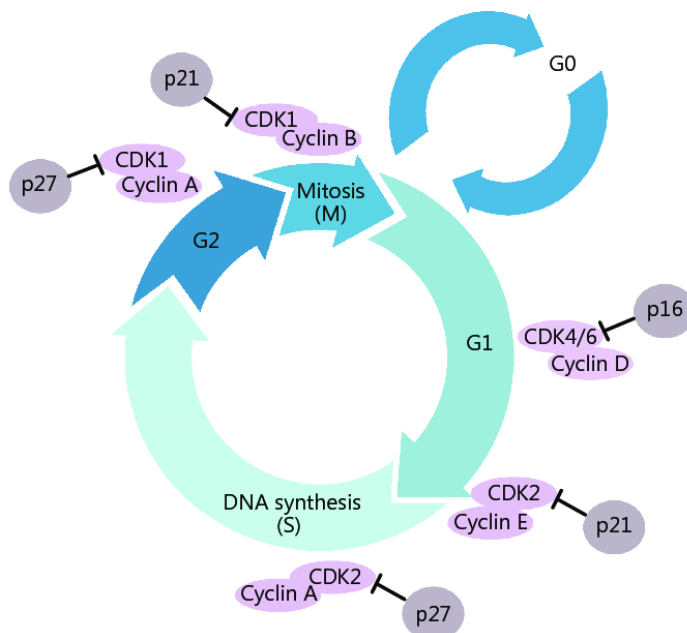


Figura 1 - Uma visão esquemática do ciclo celular. As transições entre fases e a progressão de cada fase do ciclo celular é regulada por quinasas dependentes de ciclina (CDKs). As proteínas inibidoras de CDK (CKI), P16, P21 e P27, atuam em diferentes pontos de verificação do ciclo. Fonte: [6]

A fase G1 é a fase de crescimento onde a biossíntese de biomoléculas e organelas é aumentada. A duração das fases do ciclo celular varia consideravelmente em diferentes tipos de células. Entretanto, a fase G1 é a mais variável e a sua duração é determinante para a duração do ciclo. [5], [7]. Durante a fase G1, as células são sensíveis a diversos sinais, microambientais, metabólicos e estresse. Esses sinais são molecularmente integrados e interpretados pelas células e com essa base, a célula “decide” se divide-se, diferencia-se ou morre; entretanto, para entrar na fase S, onde ocorre a replicação do DNA [5], [7].

As CDKs apresentam oscilação de atividade ao longo do ciclo celular, dependendo de sua interação com as ciclinas (proteínas ativadoras), proteínas inibitórias (proteínas inibidoras de CDK ou CKIs) e o estado de fosforilação de certos resíduos treonina e tirosina. CDKs, como CDK4/6, CDK2 e CDK1 (também conhecido

como Cdc2) são quinases serina/treonina com uma ampla variedade de substratos [38]. As CDKs são ativadas principalmente pela formação de complexos com as ciclinas, proteínas cujas quantidades aumentam e diminuem ao longo do ciclo celular devido principalmente a ativação transcricional de seus genes ou ao aumento de degradação via proteassoma. De modo que a ativação temporal de cada CDK é dependente da quantidade de sua ciclina parceira [49]. As associações combinatórias de CDKs e ciclinas geram as especificidades distintas necessárias para produzir as diferentes transições de ciclo [50], [51]. De forma geral, a atividade das CDKs é modulada pela presença de mitógenos, nutrientes, tamanho da célula e ativação de mecanismos de checkpoint (pontos de verificação) que resultam em mudanças de atividades de CKIs, na fosforilação da subunidade catalítica e na concentração das ciclinas [49].

Cada complexo ciclina/CDK atua em momentos específicos que podem abranger mais de uma fase do ciclo celular. [50]. Por exemplo, o complexo CDK2/ciclina E apresenta atividade que se inicia na metade de G1 e se estende até a metade da fase S, sendo crucial para a transição G1-S, enquanto o complexo CDK2/ciclina A começa a aumentar a sua atividade ao final de G1, apresentando um pico em G2, seguida de queda abrupta na transição G2-M. Na fase M, predominam os efeitos resultantes da atividade do complexo CDK1-ciclina B cuja atividade apresenta aumento crescente a partir da fase S, com um pico seguido de queda abrupta da sua atividade, demarcando o início da anáfase [8], [9].

As ciclinas conferem especificidade e determinam a consequência regulatória dos substratos efetores de eventos do ciclo celular. Por exemplo, CDK4 e/ou CDK6 formam complexos com ciclinas do tipo D, que ativam CDK4/6 que iniciam a fosforilação da família de proteínas do retinoblastoma (Rb) no início da fase G1 [52],

[53]. A fosforilação de Rb estimula a liberação do fator de transcrição E2F, que então estimula a transcrição dos primeiros genes responsivos ao E2F, que incluem ciclinas do tipo A e E necessários para a progressão do ciclo celular [54], [55]. No final da fase G1, a ciclina E se liga e ativa o CDK2, o que leva à fosforilação total do Rb e à posterior ativação da transcrição mediada pelo E2F [52], [53].

Juntos, os eventos acima conduzem a passagem da célula através do ponto de restrição (também denominado ponto de não retorno e discutido mais profundamente abaixo) no limite da fase G1/S e iniciam a fase S. No início da fase S, as ciclinas do tipo A são sintetizadas e formam um complexo com CDK2, que fosforila proteínas envolvidas na replicação do DNA e conduzem a progressão celular para a fase G2 [57]. Na fase G2 tardia, o complexo CDK1/ciclina A é formado e ativado, o que é necessário para a transição G2 /M e o início da prófase [58]. Finalmente, os complexos CDK1/ciclina B são formados na fase M e regulam a conclusão da mitose [59] (Fig. 1).

Existem vários pontos de verificação do ciclo celular que garantem que os processos críticos sejam acionados antes da progressão para a próxima fase [10], [11]. Alguns desses controles formam loops de *feedback* que geram mudanças bruscas na atividade de proteínas regulatórias contribuindo para a unidirecionalidade do ciclo celular [12]–[16]. Os principais pontos de controle na regulação do ciclo celular ocorrem na transição G1/S (um ponto de controle chave no qual as células se comprometem com uma nova divisão celular, iniciando a replicação do DNA), a transição G2/M (ou entrada na mitose) e a transição metáfase-anáfase, juntamente com a saída da mitose [17]. Erros nos processos do ciclo celular ou a progressão do ciclo celular em condições inadequadas podem ter consequências catastróficas para as células [18]. Uma vez que uma condição deletéria é detectada, os pontos de verificação interrompem temporariamente a progressão do ciclo celular até que a

situação seja corrigida [18]. A integração de todos esses sinais bioquímicos garante a progressão ordenada através do ciclo mitótico e respostas apropriadas às perturbações [19]–[22].

Apesar do *core* regulatório do ciclo celular ser bastante conservado em eucariotos e do conhecimento sobre as moléculas-chave deste processo ser vasto, pouco se sabe dos mediadores moleculares que induzem a aquisição do estado de quiescência em organismos multicelulares. O presente trabalho se propôs a contribuir a fechar esta lacuna do conhecimento com o uso de um *screen* genético e ferramentas celulares baseadas em sondas fluorescentes que permitem a discriminação de células individuais nos seus diferentes estados.

1.2. A quiescência proliferativa

Sabemos que propagar o material genético é essencial para a manutenção da vida [1], [2], mas porque parar o ciclo celular em transitoriamente em alguns se tornou uma vantagem evolutiva para os organismos? Em espécies unicelulares primitivas, o surgimento da quiescência provavelmente aumentou a taxa de sobrevivência em condições ambientais menos favoráveis, pois permitiu a suspensão do ciclo celular de forma reversível [2], [23]. A habilidade de entrar num estado quiescente e permanecer viável em situações adversas foi vital para a perpetuação do material genético, sucesso e ubiquidade de organismos unicelulares e para o aparecimento de seus descendentes multicelulares [2], [24]. Durante a evolução, vários aspectos da quiescência unicelular foram conservados em organismos multicelulares, enquanto novas propriedades celulares surgiram em decorrência da capacidade das células de parar a proliferação [2], [24]. É possível que a formação de microambientes compartimentalizados em organismos multicelulares tenha permitido o desacoplamento da indução da quiescência à fatores do ambiente externo [25]. Nesse

novo contexto, células não proliferativas podem permanecer metabolicamente ativas, potencialmente permitindo o surgimento de novas características celulares, favorecendo a especialização/diferenciação celular [26].

As evidências de uma parada não permanente no ciclo celular surgiram logo no início dos estudos da divisão celular a partir de experimentos que marcavam o DNA recém-sintetizado radioativamente. Nestes estudos, notou-se uma população de células que era negativa para a marcação radioativa, sugerindo a existência de um estado de latência proliferativa [27]. Na verdade, a maioria das células no corpo adulto está fora do ciclo celular ativo: são células diferenciadas terminalmente ou que vivem em estado de quiescência ou senescência [25]. Em indivíduos adultos, as células quiescentes são capazes de reentrar no ciclo celular em resposta a vários estímulos extrínsecos [28]. Por exemplo, uma lesão reativa fibroblastos quiescentes que proliferam para a reparação e regeneração do tecido [29], [30]. No entanto, as células quiescentes em grande parte não se dividem em circunstâncias normais [25].

Foi originalmente proposto que a quiescência fosse apenas uma fase G1 prolongada do ciclo celular [28] visto que as células quiescentes e em G1 possuem DNA não replicado [31]. Todavia, existem diferenças marcantes entre os dois estados. Por exemplo: as células quiescentes seguem para a fase S com um atraso significativo em relação às células G1, sugerindo que elas estão fundamentalmente em estados diferentes [31]. As células na fase G0 do ciclo celular podem estar quiescentes [32], porém existem dois outros estados, senescência e diferenciação terminal, que também são considerados G0. Entre os diferentes tipos de estados G0, a reversibilidade da parada do ciclo celular é uma marca registrada da quiescência celular, distinguindo-a dos outros tipos onde as células estão em G0 irreversivelmente e raramente reentram no ciclo celular ativo em condições fisiológicas normais [33].

É importante ressaltar que certas células diferenciadas, como os hepatócitos maduros, também são consideradas quiescentes em tecidos normais e são capazes de entrar no ciclo celular em caso de lesão e estresse [28]. As células em estados de quiescência, senescência ou diferenciação apresentam semelhanças e diferenças. Essas células contêm conteúdos de DNA semelhantes [34], apesar disso as células quiescentes são menores, metabolicamente menos ativas com supressão de RNA global e síntese proteica, e apresentam autofagia aumentada [35], [36].

As células cultivadas podem ser induzidas à quiescência por meio de mecanismos distintos [35], [37]–[41]. A maioria dos primeiros estudos sobre a quiescência de células de mamíferos empregou modelos de cultura de células *in vitro* [28], através da manipulação das condições de cultura: privação de soro, inibição por contato e perda de adesão. Esses estudos sugerem que o ambiente extracelular tem papéis regulatórios essenciais na quiescência celular. Os hepatócitos maduros são na sua maioria quiescentes no fígado intacto e passam por ciclos de replicação após hepatectomia parcial, até o órgão se regenerar [29]. No entanto, os hepatócitos exibem um potencial proliferativo mais robusto *in vitro*. Eles são capazes de proliferar continuamente e se desenvolver em linhagens não transformadas [42], implicando que o microambiente do tecido tende a manter as células em um estado quiescente. Uma revisão sobre a importância da matriz extracelular na aquisição e manutenção da quiescência foi publicado recentemente pelo nosso grupo [43] e este assunto é discutido no item seguinte.

Uma das questões mais frequentes em relação a transição quiescência/proliferação tem sido: em que ponto do ciclo celular as células tomam a decisão entre entrar em quiescência ou proliferar? Zetterberg e Larson demonstraram que apenas as células no início da fase G1 saem do ciclo celular e entram em

quiescência em resposta à privação de soro, enquanto o crescimento das células no final da fase G1 não é interrompido [31], [37]. O modelo clássico de “ponto de restrição” ou “ponto R” baseado no trabalho de Pardee [44] se sustenta na existência de um ponto de decisão no final da fase G1: antes do ponto R, as células saem do ciclo celular e tornam-se quiescentes em condições de crescimento desfavoráveis, como a privação de soro. Quando há estimulação por mitógenos, as células na fase G1 continuam o ciclo celular em direção ao ponto R. Uma vez ultrapassado o ponto R, a célula prosseguirá para a fase S e continuar até a conclusão do ciclo, independentemente da disponibilidade de soro [44], ou de mitógenos e fatores de crescimento em meio de cultura definido.

Entretanto, nos organismos, as células param de ciclar mesmo na presença de nutrientes e fatores de crescimento em concentrações suficientes para sustentar a proliferação [43]. Trabalhos recentes têm demonstrado que fatores presentes no microambiente celular, como a matriz extracelular, têm influência decisiva na regulação da transição proliferação-quiescência [45], [46]. Ao contrário de estudos de quiescência baseados na privação de soro/mitógenos ou no uso de agentes tóxicos que induzem a parada do ciclo celular, o nosso laboratório tem tirado proveito de modelos de cultura que incluem a matriz extracelular, que permite que as células adquiram estrutura e apresentem comportamentos mais similares ao que se observa *in vivo*[45]. Estas abordagens têm possibilitado a descoberta de mecanismos moleculares que provavelmente são ofuscados pelo contexto não fisiológico da privação de soro/mitógenos e uso de agentes tóxicos.

1.3. A regulação da quiescência pela matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é uma rede complexa de proteínas e carboidratos que não somente formam o arcabouço que provêm sustentação e propriedades mecânicas aos tecidos, mas que também constituem fonte de sinais que são detectados pelas células através de receptores de superfície [47] E são as integrinas, os principais receptores de superfície que transmitem sinais mecânicos e químicos da MEC para a célula [48]. Esses sinais influenciam na dinâmica do citoesqueleto e modulam vias de quinases intracelulares, regulando diversos processos celulares como a sobrevivência celular, a proliferação (ou parada do ciclo celular) e a diferenciação [49].

Vários tipos de células, como fibroblastos, células musculares e células epiteliais, devem ser adequadamente ancoradas à MEC para sobreviver e proliferar, sendo que esta necessidade de ancoragem é muitas vezes perdida, ou tem regulação aberrante, em células transformadas e cancerosas [50]. Por exemplo, diversos tipos de tumores apresentam genes relacionados a ancoragem à MEC mutados ou com atividade desregulada, como por exemplo a hiperativação de integrinas e quinases à jusante como a Integrin-Linked kinase e Focal Adhesion Kinase (FAK) que que ativam vias proliferativas.

Uma das vias moduladas pela MEC é a via Hippo, cuja atividade inibe por fosforilação os co-ativadores de transcrição YAP (Yes Associated Protein-1) e TAZ (transcriptional activator with PDZ binding motif) [51]. Quando Hippo é inibida, YAP/TAZ não são fosforiladas e se localizam preferencialmente no núcleo, onde exercem suas funções transcricionais ativando genes de fatores pró-proliferativos e de sobrevivência [51], [52]. A razão núcleo-citoplasma de YAP/TAZ em células epiteliais mamárias é aumentada em contextos de alto estresse mecânico, como alta rigidez da MEC ou baixa densidade celular. Nestas condições, Hippo é bloqueada

através processos mediados por hiperativação de integrinas, de quinases associadas à adesão focal e pela alta tensão do citoesqueleto de actomiosina.

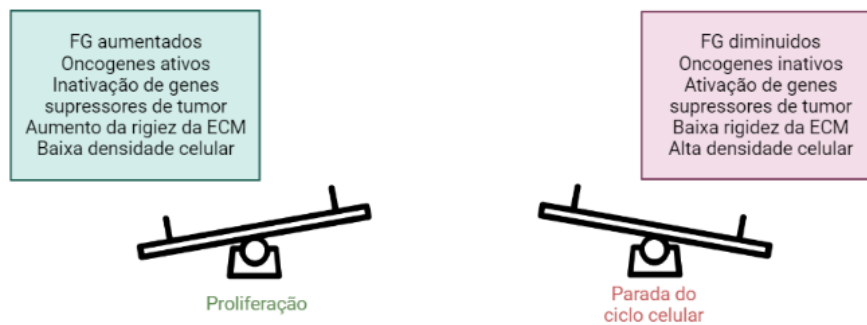
Ademais, várias vias de sinalização que conectam a adesão e a proliferação ativada por fatores de crescimento e mitógenos podem ser integrados numa rede molecular complexa [53]. Por exemplo, o EGF inibe a sinalização Hippo [54] e há evidências que a atividade de YAP pode controlar de maneira dependente da densidade celular a síntese do fator de transcrição MYC, que estimula a proliferação celular [55].

O nosso laboratório demonstrou que células epiteliais não-tumorais da glândula mamária humana diminuem as concentrações de actina nuclear (N-actina) num ambiente 3D rico em laminina-111 (3D-lrECM) através de um eixo de sinalização integrado por PI3K-AKT e exportina-6 (XPO6), o exportador nuclear da N-actina[45]. A inibição de PI3K resulta em maior atividade da XPO6, e como consequência, baixa concentração de N-actina. Níveis baixos de N-actina levam a quiescência de células epiteliais mamárias [45], [46]. Entretanto, este mecanismo de sinalização, laminina111-PI3K- AKT-XPO6-N-actina, é perturbado em células malignas da glândula mamária humana, que não respondem aos sinais da 3D-lrECM, não reduzindo os níveis de N-actina, portanto não sendo capazes de entrar em quiescência neste microambiente que induz a parada do ciclo celular em células não tumorais[45]. Apesar destes estudos terem revelado alguns importantes mecanismos que medeiam os sinais oriundos da MEC na regulação do estado proliferativo, ainda conhecemos pouco da rede regulatória envolvida no processo.

A membrana basal (MB) intacta parece ser crucial para desencadear a sinalização de quiescência em células epiteliais mamárias [56], [57]. A MB é um

compartimento especializado da MEC que reveste epitélios e outros tipos celulares e, além de sítio de ancoragem, provém sinais de sobrevivência e de controle do estado proliferativo e diferenciado [58]. Além de lamininas, tem na sua composição fundamental colágeno tipo IV, entactina e perlecan [58]. Entretanto, quais lamininas, além da laminina-111, são capazes de induzir quiescência celular? Nós obtivemos resultados preliminares que demonstram que as lamininas-111, 211, 332, 411, 421 e 511, assim como IrECM, inibem a proliferação em células epiteliais mamárias murinas não tumorais em diferentes graus de intensidade. A laminina-111 e a IrECM apresentaram os efeitos mais robustos na indução da quiescência. Colágenos tipo IV e tipo I e fibronectina não alteram a proliferação destas células (dados preliminares não apresentados).

Uma compreensão unificada e integrada de como o equilíbrio entre a interrupção do ciclo celular e a proliferação pode ser alterada por meio de alterações nos níveis de GF, oncogene e supressor de tumor, bem como por meio de ajustes na densidade celular ou na rigidez da MEC, é fornecida na Fig. 2. A transição da parada do ciclo celular para a proliferação pode ocorrer devido a um equilíbrio desviado no sentido dos fatores pró-proliferativos que resultam na ativação das CDKs.



Created in BioRender.com 

Figura 2 - Balança de efetores em favor da interrupção ou proliferação do ciclo celular. Um ponto de bifurcação separa um regime de oscilações CDK espontâneas e sustentadas associadas à proliferação celular (esquerda) de um estado estacionário estável, associado à parada do ciclo celular (direita), alterando abruptamente a dinâmica da rede Cdk que regula a progressão no ciclo celular de mamíferos. A célula combina os vários sinais que estimulam (GFs, oncogenes, alta rigidez ECM, baixa densidade celular) ou inibem (supressores tumorais, baixa rigidez ECM, alta densidade celular) o crescimento celular para determinar de que maneira o equilíbrio será distorcido. Adaptado de [59].

Alterações na comunicação bidirecional célula-MEC são cruciais em todos os estágios de desenvolvimento e progressão do câncer. Nos processos em que há intensa remodelação da MEC, como inflamação crônica [60], [61], infecções ou regulação molecular da inibição por contato [52], [54], [62], podem induzir alterações genômicas e transformação maligna em células saudáveis. Da mesma forma, alterações genéticas que modificam função de genes supressores de tumor ou oncogenes [63]–[66] podem causar alterações na MEC, perturbando a intrincada rede de comunicação célula-MEC.

Comparado ao que se conhece sobre os detalhes moleculares da regulação da quiescência por fatores solúveis e pela disponibilidade de fontes de carbono, sabemos pouco sobre o envolvimento da MEC nesse processo. Este assunto requer pesquisas que contemplem modelos de cultivo onde células estão inseridas num microambiente mais próximo do que se observa *in vivo* e o emprego de metodologias complementares com perturbação genética em larga-escala, análises de expressão gênica e microscopia. Neste contexto, o presente trabalho lança mão destas ferramentas e contribui para o avanço no conhecimento nesta área.

1.3. A glândula mamária e a lactogênese

A glândula mamária é um excelente modelo para o estudo da regulação da quiescência pela MEC, pois durante o seu desenvolvimento, passa por estágios de quiescência seguidos intensa proliferação, que são acompanhados por mudanças do microambiente do órgão, incluindo remodelação intensa da MEC.

Formada por células epiteliais, células mesenquimais, células imunes, nervos e matriz extracelular (MEC) que estão intimamente interligadas e se remodelam dinamicamente ao longo do desenvolvimento [67], a glândula mamária tem como principal função a produção e entrega do leite. A parte central deste órgão é uma árvore ductal epitelial formada por uma bicamada de células luminiais cuboidais internas e uma camada externa de células mioepiteliais alongadas. Ao redor dessa árvore, há uma gama diversificada de células, proteínas e glicosaminoglicanos que são cruciais para a função da mamária [67].

O desenvolvimento da glândula mamária ocorre principalmente em três estágios: durante a vida embrionária, puberdade e gravidez [68]. No nascimento, a

glândula mamária consiste em um sistema ductal simples que se estende do mamilo ao tecido conjuntivo e termina em botões terminais. Posteriormente, a glândula mamária rudimentar entra em uma fase quiescente [69] e o crescimento deste sistema ductal rudimentar acompanha o crescimento geral do corpo durante a infância até a puberdade [68]. O segundo estágio de desenvolvimento, iniciado na puberdade, é regulado e sustentado por hormônios, fatores de crescimento e citocinas. O desenvolvimento glandular é acompanhado por um aumento do tecido adiposo no estroma, onde os ductos se alongam e se ramificam [70]. Já as pontas dos ductos rudimentares se transformam em *terminal-end buds* (TEBs), penetram na gordura mamária [71] e se desenvolvem em unidades ductal-lobulares terminais [68]. Essas unidades consistem em botões ductais curtos agrupados ao redor das extremidades de cada ducto e o número desses botões aumenta à medida que a puberdade progride [68].

O ducto mamário maduro é composto principalmente de células mioepiteliais (camada externa) e células epiteliais luminais (camada interna). Durante a terceira fase do desenvolvimento, gestação, a mama sofre um aumento significativo na ramificação ductal e no desenvolvimento alveolar para se preparar para a lactação. As células epiteliais em proliferação se desenvolvem em botões alveolares que se diferenciam cada vez mais em alvéolos distintos, que sintetizam a maior parte da gordura, proteína e lactose do leite [72].

Os hormônios são essenciais para a morfogênese na glândula mamária. O estrogênio liberado na puberdade, o hormônio do crescimento e o fator de crescimento da insulina 1 (IGF1) estimulam a formação dos TEBs [73], [74]. O crescimento e ramificação do TEB é impulsionado pela migração epitelial coletiva [75] e requer cooperação com células imunes [76]–[78], fibroblastos e a MEC [79].

A concentração e o arranjo das moléculas da MEC são cruciais para a morfogênese e função da glândula mamária [79]. O TEB e o ducto do epitélio mamário em desenvolvimento são exemplos claros da associação entre estado proliferativo e organização da MEC. Enquanto o ducto, que contém células na sua maioria quiescentes, é revestido por uma espessa camada membrana basal nucleada por laminina-111 e laminina-332, o TEB apresenta pouca deposição de laminina e proximidade com fibras de colágeno [79]. Consistente com o que se observa *in vivo*, a IrECM ou lamininas-111 e -332 purificadas induzem a parada do ciclo celular em células epiteliais mamárias humanas e murinas [45]. Ademais, o tratamento em cultura com laminina em conjunto com hormônios lactogênicos induz a diferenciação funcional, caracterizada pela síntese de proteínas do leite como a β -caseína, em células epiteliais mamárias murinas, primárias ou linhagens como as células EpH4 utilizadas no presente trabalho [80]. Os hormônios lactogênicos sozinhos não são capazes de induzir a parada do ciclo celular ou a síntese de proteínas do leite, o que evidencia a necessidade das lamininas para a aquisição de função da glândula e a dependência da parada do ciclo celular para a diferenciação [80].

Diferentes hormônios atuam em vias específicas desencadeando efeitos distintos no desenvolvimento e função da glândula mamária. O estrogênio é detectado pelos receptores de estrogênio (ERs), que são receptores nucleares, e ativa principalmente o crescimento da glândula. Os ERs regulam a transcrição de vários genes através de sua interação com uma variedade de co-reguladores (como o coativador de receptor de esteroide 1 (SRC-1) e o transativador de interação Cbp / p300 1 (CITED1)) [81]. Já a prolactina regula a função da glândula mamária por meio da fosforilação da Janus quinase 2 (JAK2) e ativação de STAT5 (signal transducers and activators of transcription-5) [82].

JAK2-STAT5 é tida como uma via de sinalização central para a produção de leite [83]. Resumidamente, a prolactina se liga ao seu receptor (PRLR), que recruta JAK2. JAK2 ativa STAT5, que age como um fator de transcrição ativando genes que codificam proteínas do leite e que são importantes para aquisição e manutenção do estado lactogênico [83]. Estudos mais recentes forneceram evidências de que outras vias de sinalização clássicas como aquelas ativadas por GPCR, PI3K/Akt, além da adesão celular à laminina e ao distoglicano também estão envolvidas na ativação JAK2-STAT5 [84].

Assim como todo processo biológico de organismos superiores, o controle da expressão gênica para a produção de material tão complexo como o leite deve integrar sinais através de uma intrincada rede molecular, que contém vários outros fatores, além de JAK2-STAT5. O protagonismo da MEC neste processo evidencia que não somente vias ativadas por fatores solúveis são importantes para a lactogênese. Além disso, células em proliferação não apresentam um programa de expressão gênica compatível com a diferenciação. O presente trabalho se propõe a identificar genes mediadores da aquisição da quiescência e da diferenciação funcional de células epiteliais mamárias com o uso de um modelo celular que combina a IrECM e fatores solúveis essenciais para estes processos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Identificar genes mediadores da quiescência e da diferenciação para lactogênese induzida pela membrana basal em células epiteliais da glândula mamária.

2.2. Objetivos específicos

1. Criar um modelo celular que permita o monitoramento e o isolamento de células de acordo com seu estado proliferativo e diferenciado por citometria e microscopia de fluorescência.
2. Identificar genes envolvidos na aquisição da quiescência com o uso de uma biblioteca de CRISPR/CAS9.
3. Identificar genes envolvidos na diferenciação para lactogênese com o uso de uma biblioteca de CRISPR/CAS9.
4. Validar os potenciais genes-candidatos com ensaios de quiescência e lactogênese

3. Metodologia

3.1. Cultivo celular

Foram usadas nesse estudo as células EpH4: células epiteliais não tumorais imortalizadas derivadas da glândula mamária de camundongos fêmeas. A origem dessas células são as IM-1, células derivadas de tecido de glândula mamária primária de camundongos BALB/c que estavam na metade da gestação e que foram imortalizadas espontaneamente [85]. As células do subclone Ep-1, provenientes das células IM-1, polarizam e secretam apicalmente a proteína β -caseína quando estimuladas por hormônios lactogênicos e matriz extracelular rica em lamina (IrECM) em cultura, e permaneceram não tumorigênicas quando inoculadas em camundongos nude [86]. Por fim, as células EpH4 foram geradas infectando células Ep1 com o vetor retroviral pHMW vazio [87]. As células EpH4 mantêm as características não-tumorais e capacidade de polarização e diferenciação funcional exibidas pelas células parentais [80].

As células EpH4 foram cultivadas em placas P100 descartáveis adequadas para o cultivo celular. O pH e a temperatura foram mantidos próximos à faixa fisiológica através da incubação com 5% de CO₂ a 37°C. As células foram mantidas em meio DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB), insulina (5 µg/ml) e Gentamicina (50 µg/ml). Para sua expansão, as células em aproximadamente 70% de confluência foram lavadas e soltas da garrafa incubando-as com uma solução de 0,05% de tripsina (Invitrogen Co.), por 5 - 7 minutos a 37° C e replaquetadas na concentração de 4.000 células/cm².

As células foram congeladas em solução contendo 10% de *dimethyl sulfoxide* (DMSO) e 90% SFB na concentração de 500.000 células/mL. As células no meio de congelamento foram armazenadas a -80°C e, após 24 horas, transferidas para o reservatório de nitrogênio líquido a -190°C. Para o descongelamento, a ampola foi retirada do conservatório, descongelada e o conteúdo transferido para um tubo Falcon de 15mL. Foi adicionado 2mL de meio completo e as células foram centrifugadas a 200 rcf por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas no meio apropriado, transferidos para uma garrafa/placa plástica e mantidas em estufa de cultivo.

3.2. Amplificação do plasmídeo ES-FUCCI

O vetor contendo a construção ES-FUCCI (Fluorescent Ubiquitin Cell Cycle Indicator) foi adquirido diretamente da Addgene (catálogo #62451). O vetor é entregue pela Addgene já em bactéria no cultivo em ágar. Foi coletada uma pequena quantidade proveniente do vial da Addgene e essa foi cultivada em uma placa de ágar com ampicilina (100µg/mL) por 14 horas a 37°C. Após esse período, uma colônia isolada foi coletada e colocada em meio ágar líquido com ampicilina (100µg/mL) também por 14 horas, a 37°C, sob agitação para amplificação. Em seguida, realizou-se a extração do DNA plasmidial utilizando-se o QIAGEN Plasmid Mini Kit (#12123) conforme as orientações do fabricante. Posteriormente o produto foi linearizado usando a enzima MluI-HF e colocado em um gel de TAE para averiguar a qualidade dele.

3.3. Obtenção e caracterização da linhagem estável EpH4-ES-FUCCI

Como mencionado anteriormente, as células EpH4 conseguem entrar em quiescência e diferenciar-se em resposta a estímulos hormonais e IrECM da matriz extracelular, sendo um modelo ideal para nosso estudo. Juntamente com o plasmídeo FUCCI, que permite observar e separar as células em diferentes fases do ciclo celular, tem-se um robusto modelo de estudo de quiescência.

A transfecção das células EpH4 foi feita usando lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific, #L3000015), segundo instruções do fabricante. Foram utilizados 1 µg de DNA plasmidial e 2 µL de lipofectamina em um poço de uma placa de 24 wells que estava 70% confluenta. As células foram então selecionadas com higromicina B (500 µg/mL) por 10 dias. Ainda, a fim de garantir uma população onde todas as células expressassem a sonda FUCCI, foi realizado o *sorting* asséptico apenas das células fluorescentes no ARIA II do Nucel/USP. As células obtidas foram expandidas, estocadas e avaliadas funcionalmente em cultura 2D e 3D, conforme descrito nos resultados (Fig. 4).

3.4. Obtenção e caracterização da linhagem estável EpH4-βCas-CFP-ES-FUCCI

O experimento originalmente proposto neste projeto faz uso das células EpH4-ES-FUCCI, geradas com sucesso como demonstrado acima. Contudo, também temos disponível em nosso laboratório uma linhagem derivada de EpH4, as células EpH4-βCas-CFP que expressam a construção repórter constituída do promotor da β-caseína fusionado à sequência codificadora da proteína fluorescente CFP [80].

Aproveitando a disponibilidade de mais essa ferramenta, foi gerada a linhagem EpH4-βCas-FUCCI de maneira similar à relatada para as células EpH4-ES-FUCCI:

inserção do plasmídeo ES-FUCCI com auxílio do reagente FuGENE® 6 (E2691), seleção com higromicina B por 7 dias, o *sorting* asséptico das células expressando a sonda FUCCI, expansão e estoque da linhagem.

3.5. Amplificação da biblioteca CRISPR/Cas9

A biblioteca GeCKO V2 CRISPR/Cas9 foi obtida da Addgene (catálogo #1000000052) (Anexo 2). Essa biblioteca é fornecida em dois *subpools* (A e B), com aproximadamente 20µL cada, na concentração de 50ng/µL. Quando usadas em conjunto, as bibliotecas A e B contêm 6 *sgRNAs* por gene (3 *sgRNAs* em cada subpool), além de aproximadamente 1000 *sgRNAs* de controle projetados para não atingir o genoma. E a biblioteca A também tem como alvo *miRNAs* (4 *sgRNAs* por *miRNA*). No total, a biblioteca possui 130.209 de *sgRNAs*, que tem como alvo 20.611 genes codificadores de proteínas e 1.175 genes codificadores de *miRNA*. Para a expansão da biblioteca plasmidial foram empregadas células eletrocompetentes ENDURA (Lucigen, cat #60242) e o protocolo de eletroporação da forma que é descrito pelos desenvolvedores da biblioteca GeCKO, disponível no site da Addgene [88], [89].

Resumidamente, foram realizadas 10 eletroporações usando o Gene Pulser Xcell Electroporation Systems da BioRad, sendo 5 com cada subpool (A e B). Fizemos a recuperação por 60 minutos em 2mL de meio de recuperação da ENDURA (#80026-1) a 37°C e combinamos as 5 eletroporações de cada *subpool*, um total de 10mL. Deste, 10 µL foram adicionados a 2 mL de meio de recuperação, dos quais 20µL foram aplicados em uma placa de ágar pré-aquecida de 10 cm de diâmetro contendo ampicilina (1µL/mL). Esta diluição de 40.000 vezes permite estimar se a eficiência da transformação foi suficiente para garantir a representatividade e complexidade de todos *sgRNA* presentes na biblioteca. O volume remanescente (aproximadamente

10mL) foi plaqueado da seguinte maneira: 4mL em placas de 245x245mm (2 placas) e 2mL em placa de 130x130mm, 1 placa). As 4 placas de 245mm e duas placas de 130mm resultantes, bem como as duas placas de 10cm foram incubadas por 16 horas a 32 graus. Os desenvolvedores são muito específicos com relação ao número mínimo de colônias formadas, visto que disso depende a representatividade da biblioteca. Desta forma, este seria o primeiro fator crucial e limitante para experimentos de *screening* [88], [90]. Posteriormente os plasmídeos foram purificados usando o Kit MaxiPrep da Qiagen (#12163), conforme instruções do fabricante.

3.6. Preparo das amostras para sequenciamento *Next Generation*

Sequencing (NGS) Illumina

Para sequenciar a biblioteca e avaliar a sua representatividade foi necessário realizar dois PCRs:

- PCR 1 amplifica a região do inserto (plasmídeo) que contém o *sgRNA* (~20bp que definem a região que será cortada pela Cas9), gerando um amplicon de ~300bp.
- PCR 2 insere os *adaptors* e *barcodes* indispensáveis para o sequenciamento Illumina.

Usamos a DNA polimerase High Fidelity Herculase II Fusion (Agilent #600675) e seguimos o protocolo indicado pelo fabricante, mas o número de ciclos foi otimizado para minimizar a formação do artefato conhecido como "*PCR bubbles*".

Para minimizar esses problemas e chegar as condições utilizadas foram testadas 32 condições de PCR diferentes, que variaram em relação ao número de ciclos, reação padrão ou *touchdown*, bem como quantidade de *primer* e de *template*.

Para o PCR 1, utilizamos 30ng de DNA plasmidial como molde. O número de ciclos e temperaturas usadas estão na Tabela 1:

Tabela 1 - Condições do PCR 1 da biblioteca

PCR 1-TOUCH DOWN

SEGMENTO	Ciclos	Etapa	Temperatura	Duração
1	1	Desnaturação Inicial	95°C	2 minutos
2	10	Desnaturação	95°C	20 segundos
		Anelamento	70°C (-1°C/ciclo)	20 segundos
		Extensão	72°C	30 segundos
	5	Desnaturação	95°C	20 segundos
		Anelamento	60°C	20 segundos
		Extensão	72°C	30 segundos
3	1	Extensão final	72°C	3 minutos

Para o PCR 2 usamos como *template* 5uL do produto da reação de PCR1, e as condições de ciclagem utilizadas estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições do PCR 2 da biblioteca

PCR 2				
SEGMENTO	Ciclos	Etapa	Temperatura	Duração
1	1	Desnaturação Inicial	95°C	2 minutos
2	10	Desnaturação	95°C	20 segundos
		Anelamento	63°C	20 segundos
		Extensão	72°C	30 segundos
3	1	Extensão final	72°C	3 minutos

Os produtos foram submetidos à eletroforese em agarose 2% e a banda de ~370bp purificada através do kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MN #740609.50). O produto da extração foi ainda repurificado usando *beads* magnéticas Agencourt® AMPure (Beckmen Coulter #A63880) conforme instruções do fabricante. As amostras purificadas foram quantificadas quanto ao teor de DNA por fluorescência (Qubit dsDNA HS Assay Kit #Q32851) e usamos um bioanalisador para confirmar o tamanho do amplicon (Agilent High Sensitivity DNA Kit. catálogo #5067-4626).

3.7. Sequenciamento da biblioteca plasmidial

O sequenciamento foi conduzido no equipamento MiSeq Illumina da *core-facility* Genome Investigation And Analysis Laboratory (GENIAL) da USP. Usamos o MiSeq

Reagent Kit v3 (150-cycle) (MS-102-3001) e no cartucho uma concentração final de 4 μL da biblioteca e 10% de PhiX. A corrida foi realizada em cartucho de 150 ciclos (Illumina #MS-102-3001), *single end* e com 10% de DNA PhiX.

3.8. Empacotamento das partículas lentivirais

A biblioteca GeCKO V2 é lentiviral, o que permite a integração ao genoma de células que estão ou não em divisão, tornando a transfecção estável mais eficiente [91]. Usando as células empacotadoras 293FT, o agente de transfecção FuGENE® 6, os plasmídeos pMD2.G e pSPAX2, bem como os plasmídeos “A” e “B” da biblioteca GeCKO V2, as partículas virais foram montadas. Foram usadas 6 garrafas T225 na densidade de $1,5 \times 10^7$ células/garrafa. Para a montagem dos vírus, para cada garrafa, empregamos 15,3 μg de pMD2.G, 23,4 μg de pSPax2, 15,3 μg do *subpool A* e 15,3 μg do *subpool B* conforme previamente descrito [90].

3.9. Viabilidade celular e resposta proliferativa aos tratamentos com IrECM e IrECM + Prolactina

Para compreendermos melhor como as células se comportam ao longo do tempo após o estímulo de IrECM na indução de quiescência, realizamos o estímulo e avaliamos pelo período de 24 a 192 horas. Usamos o equipamento BD LSRFortessa™ Cell Analyzer e avaliamos quantas células estavam em G1/G0 e quantas estavam em S/G2/M nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas. Os dados foram analisados através do software gratuito Flowing v. 2.5.1 [92]. Contabilizamos 10.000 eventos de uma população determinada segundo as características de tamanho e granulosidade, excluindo-se as células mortas.

No dia seguinte ao plaqueamento, o meio foi trocado por meio definido GIH que possui apenas gentamicina, insulina e hidrocortisona [93]. Decorridas 24h as células

foram tratadas com 2% IrECM (Growth-Factor Reduced Matrigel CLS356253) e o controle foi mantido em meio GIH.

3.10. Screen genético com o uso da biblioteca GeckoV2 de CRISPR/Cas9 com cobertura de 100X

Para escolhermos genes alvos importantes para a quiescência e para a diferenciação funcional, realizamos os experimentos com cobertura de 100X que seguiram o desenho experimental ilustrado na Fig. 3.

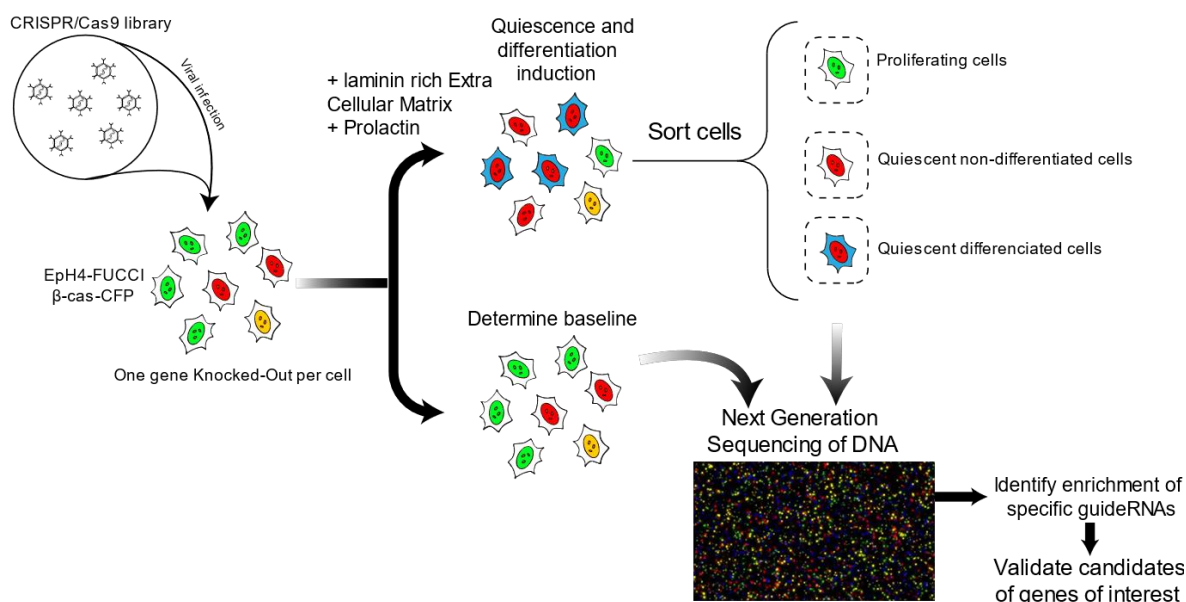


Figura 3 - Resumo do procedimento do *screening* para identificação de genes mediadores de quiescência e lactogênese. As células EpH4 β-Cas-CFP_FUCCI foram transduzidas com a biblioteca GeCKO V2 CRISPR/Cas9 e selecionadas com antibiótico puomicina por sete dias. Parte das células foi mantida em cultura por 48h ou 96h sem que houvesse o tratamento com IrECM. As outras foram tratadas com IrECM e após 96 horas, três populações foram selecionadas (mCitrine+, mCherry+/CFP- e mCherry+/CFP+). Todas as amostras seguiram para processamento e o sequenciamento NGS. Fonte: Pedro Ribeiro, Acervo e-signal lab.

É importante salientar que antes da realização deste *screen*, realizamos experimentos pilotos com baixa cobertura de transfeção e sequenciamento e estabelecemos o tempo de coleta e as condições para o *cell sorting* (os dados dos experimentos pilotos não são apresentados).

Como há aproximadamente 130.000 *sgRNA* originais da biblioteca GeCKO V2, para se obter uma cobertura de 100X são necessárias 13 milhões de células iniciais portando *sgRNA* para cada condição. Para garantir knockout de não mais que um gene por célula, utilizamos um MOI de 0,3, conforme recomendado pelos desenvolvedores [90]. Pela distribuição de Poisson, com MOI de 0,3, ocorreria a infecção por no máximo um único *sgRNA* em 22% das células. Como precisamos de 13 milhões de células, inicialmente plaqueamos 75 milhões de células, em 25 garrafas T175. No dia seguinte ao plaqueamento, colocamos os vírus com *sgRNA*. Em cada garrafa foram adicionados ~660.000, para atingir a cobertura necessária. No dia seguinte à infecção, o meio de cultura foi trocado pelo meio de crescimento (DMEMF12, 2% de soro fetal bovino, insulina (5µg/mL), gentamicina (50µg/mL) e G418 (250µg/mL)) acrescido de puromicina (4µg/mL), as células foram selecionadas por 7 dias e após esse período plaqueadas para o início do experimento.

Para dar início ao experimento, foram plaqueadas 26 garrafas T225 com meio de rotina, cada uma com 1 milhão de células e as células restantes foram coletadas e congeladas. Após 24 horas, o meio foi trocado por meio DMEM/F12 com gentamicina, hidrocortisona e insulina (GIH) e G418. Depois de 24 horas em GIH, metade das garrafas foi tratada com IrECM (2%) e prolactina (3µg/mL) e a outra metade apenas com prolactina. Após 48 horas, as células das garrafas sem IrECM foram coletadas e congeladas. Depois de 72 horas do início do desafio, as garrafas de células com IrECM e prolactina foram levadas ao laboratório do Grupo Fleury para serem separadas em 3 populações distintas: células proliferando (mCitrine+), células em G1/G0 (mCherry+) e células em G1/G0 que se diferenciaram como lactogênicas (mCherry+/CFP+).

3.11. Preparação de amostras do *screen* com cobertura de 100X para o NGS

Para extração do DNA genômico de todas as amostras usamos o Kit NucleoSpin Tissue da MN.

Para prosseguir o experimento, fizemos dois PCRs, o primeiro para selecionar a região do inserto do *sgRNA* e o segundo para inserir os adaptadores necessários para o sequenciamento. Optamos por realizar todos o PCR1 com a quantidade mínima de amostra de DNA disponível, que é de 4µg. Para as amostras que possuíam mais que o mínimo, optamos por fazer PCR1 com o máximo disponível de DNA até 86µg, que corresponde a 100X de cobertura. Para as PCRs 1 e 2, utilizamos a DNA polimerase High Fidelity Herculase II Fusion (Agilent #600675).

Nós precisamos otimizar o número de ciclos, assim como para o preparo de sequenciamento da biblioteca, para permitir a amplificação sem a formação dos PCR bubbles.

Para o PCR 1 usamos 1µg de DNA genômico por reação de 100uL (até 14 reações por amostra, de acordo com a disponibilidade de material, como mencionado acima). As condições da reação estão na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições da PCR 1 (método *touch down*).

PCR 1 TOUCH DOWN				
SEGMENTO	Ciclos	Etapa	Temperatura	Duração
1	1	Desnaturação Inicial	95°C	2 minutos
2	10	Desnaturação	95°C	20 segundos
		Anelamento	70°C (-1°C/ciclo)	20 segundos
		Extensão	72°C	30 segundos
	8	Desnaturação	95°C	20 segundos
		Anelamento	60°C	20 segundos
		Extensão	72°C	30 segundos
3	1	Extensão final	72°C	3 minutos

Para o PCR 2 usamos 10µL de template e a reação foi de 100µL. Para os controles que tínhamos a quantidade de DNAg inicial ideal (13,6µg), fizemos um pool de todos os PCR1 e esse foi o template usado no PCR 2. Já para as amostras raras, cada reação de PCR1, foi usada como template no PCR2. As condições de reação estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições para PCR2

PCR 2				
SEGMENTO	Ciclos	Etapa	Temperatura	Duração
1	1	Desnaturação Inicial	95°C	2 minutos
2	12	Desnaturação	95°C	20 segundos
		Anelamento	63°C	20 segundos
		Extensão	72°C	30 segundos
3	1	Extensão final	72°C	3 minutos

Para todas as amostras, foi empregado um mix de todos os primers *forward*, e, para cada amostra foi usado um primer reverse diferente, contendo o *barcode* para o sequenciamento (as sequências completas desses primers e dos amplicons encontram-se no Anexo 3, assim como o *barcode* que foi atribuído a cada amostra). Devido à forma como os primers foram desenhados pelos desenvolvedores da biblioteca, escolhemos usar os *barcodes* do primer reverse para que as nossas amostras pudessem ser demultiplexadas no próprio aparelho de sequenciamento (o *barcode* do primer *forward* faz parte do *amplicon* sequenciado, de forma que as amostras possam ser distinguidas apenas via bioinformática).

Os produtos foram submetidos à eletroforese em agarose 2% e a banda de ~370bp foi purificada através do kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MN #740609.50), modificando apenas o passo de solubilização do gel, no qual o kit pede que a amostra seja aquecida a 70°C juntamente do tampão NTI e optamos por não aquecer o gel com NTI. O produto da extração foi ainda repurificado usando beads

magnéticas Agencourt® AMPure (Beckmen Coulter #A63880) conforme instruções do fabricante.

O DNA das amostras purificadas foi quantificado por fluorescência (Qubit dsDNA HS Assay Kit #Q32851) e usamos um bioanalisador para confirmar o tamanho do amplicon (Agilent High Sensitivity DNA Kit. catálogo #5067-4626).

3.12. NGS do CRISPR screen

Para finalmente identificarmos os *sgRNA* diferencialmente enriquecidos nas amostras, realizamos o NGS. Como controle da corrida, optamos por correr as amostras da biblioteca novamente juntamente com essas amostras. Para todas as amostras, foi empregado um mix de todos os primers *forward*, e, para cada amostra foi usado um primer reverse diferente, contendo o *barcode* para o sequenciamento conforme descrito no item 3.11.

Foram realizadas duas corridas de sequenciamento. A primeira corrida foi conduzida no equipamento NextSeq Illumina da core-facility Genome Investigation And Analysis Laboratory (GENIAL) da USP, em cartucho de 75 ciclos (Illumina #20024906), single end e com 20% de DNA PhiX, como recomendam os desenvolvedores da biblioteca [90]. Um segundo sequenciamento foi realizado na facility Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), da Unicamp, em uma lane do cartucho com 100 ciclos, single end. Como resultado obtivemos pouco mais de 90 milhões de *reads* lidas, com boa qualidade. Para aumentar a cobertura e confiabilidade do sequenciamento, o resultado de ambas as corridas (do NextSeq e do HiSeq) foi integrado e analisado conjuntamente.

3.13. Análise dos dados de sequenciamento

Para identificar para identificar os possíveis genes relacionados a quiescência e diferenciação para lactogênese, os dados demultiplexados foram analisados através do mesmo script Python fornecido pelos desenvolvedores da biblioteca original [90] e, então, foi usado o Model-based Analysis of Genome-wide CRISPR-Cas9 Knockout (MAGEck) em colaboração com o grupo do prof. Dr. Helder Takashi Imoto Nakaya do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, onde trabalhamos diretamente com o aluno de doutorado Alysson Henrique Urbanski.

O MAGEck classifica o sgRNA de acordo com sua presença e quantidade entre o controle e as amostras e, em seguida, identifica o gene associado aos sgRNAs, formando uma lista que classifica positivamente e negativamente os genes cujos sgRNAs estavam enriquecidos e depletados respectivamente, conforme sugerem os desenvolvedores [90].

3.14. Real-time PCR

A amplificação da reação de PCR em Tempo Real para os genes alvo foi realizada no equipamento 7500 Tempo Real PCR System, Applied Biosystems, CA, utilizando 6µL POWER SYBR GREEN PCR Master Mix (SYBR™ Green 1 Dye, AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase LD, dNTPs com dUTP/dTTP e buffer com componentes otimizados) (ThermoFisher, California, EUA) e 2µL (10µM) de cada primer; 0,8µL de água ultrapura e 0,2µL de DNA. As condições de termociclagem foram dois minutos a 50°C, seguidos de 10 minutos a 95°C e 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e um minuto a 60°C. A dissociação dos produtos para a curva de desnaturação (*melting curve*) foi a 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 40 segundos a 95°C 1 minuto a 60°C, e uma etapa para realização da curva de desnaturação que variou de 68°C até 95°C, com aumento gradual na temperatura de 0,5°C/s. Dessa

forma, foi determinada a temperatura de desnaturação (T_m) dos produtos de PCR dos diferentes genes alvo. As sequências dos *primers* usados nos PCR são provenientes do primer Bank e estão listados no Anexo 4.

3.15. Validação dos genes alvo escolhidos por siRNA

Para validar os genes-alvo que julgamos serem essenciais para quiescência e para diferenciação lactogênica escolhemos o ensaio de RNA de interferência (RNAi). Para esse experimento usamos a mesma metodologia descrita na sessão 3.9 juntamente com os Lipofectamine RNAiMAX (13778-150) e siRNAs Silencer Select (4392420) para cada gene, como mostrados no Anexo 5. Seguimos as recomendações do fabricante e para cada um dos alvos começamos o cultivo de rotina em placas de 6 poços, sendo um siRNA diferente por poço. No primeiro dia plaquemos 30K de células em cada poço, e no segundo dia usamos o RNAiMax e um siRNA diferente em cada poço, exceto no controle. Após 24 horas repicamos para uma placa de fundo de vidro de 96 poços usando 3K de células por poço, no quarto dia do experimento ao trocamos o meio para GIH, colocamos o siRNA novamente, depois de 24 horas trocamos o meio para uma das seguintes opções: GIH, GIH+lrECM, GIH+Prolactina e GIH+lrECM+Prolactina. Depois de 48 Horas de tratamento as células foram analisadas por microscopia de fluorescência.

3.16. Microscopia de fluorescência e análise de imagens

Foi utilizado o microscópio de fluorescência motorizado DMI8 (Leica) acoplado a uma câmera digital para a aquisição análise das imagens das células das células fluorescentes. Para amenizar problemas decorrentes de alteração do meio que pudessem culminar em morte celular, as imagens foram capturadas com as células em um ambiente com temperatura a 37°C e 5% de CO₂. As imagens foram capturadas em objetivas de 10X. Para a captura da imagem foi usado o Programa LasX com Bin

de 1x1, usando os filtro CFP para identificar CFP (exposição de 500ms), YFP para identificar mCitrine (exposição de 400ms) e Texas-Red para identificar mCherry(exposição de 200ms). As imagens foram analisadas no programa Strataquest para quantificação do número de células mCitrine+ e mCherry+ e da intensidade de fluorescência de CFP. Para tal foram criadas 2 mascaras nucleares (uma para mCherry, e outra para mCitrine) e foram contabilizados os núcleos em cada uma dessas mascaras. Para a análise de CFP usamos a máscara de mCherry, expandimos 1mm além do núcleo e quantificamos a intensidade de CFP dentro da máscara.

4. Resultados

4.1. Geração do modelo celular para a identificação de genes mediadores da quiescência e da lactogênese

Nós produzimos um modelo celular que permite o monitoramento por microscopia de fluorescência e o isolamento por citometria de fluxo de células de acordo com seu estado (proliferativo, quiescente ou diferenciado). Inicialmente, geramos células expressando somente a sonda do ciclo celular. Para tanto, as células EpH4 foram transfectadas com uma sonda fluorescente do ciclo celular, a sonda FUCCI (Fluorescent Ubiquitin Cell Cycle Indicator) [94] e um repórter fluorescente para a atividade do promotor do gene *Csn2*, que codifica a β -caseína, uma das proteínas mais abundantes no leite. A sonda FUCCI utilizada no presente trabalho é composta de duas proteínas fluorescentes, mCitrine e mCherry, que são fusionados respectivamente à Geminina e à Cdt1. Geminina e Cdt1 são substratos diretos dos complexos de degradação via proteassoma APC-Cdh1 e APC-Skp2, respectivamente. A concentração de Cdt1 é alta durante G1, mas decai logo no início da fase S, enquanto os níveis de Geminina aumentam ao longo das fases S, G2 e M [95], [96]. Desta forma, variações nos níveis das duas proteínas fluorescentes da sonda FUCCI indicam se as células estão na fase G1 (mCherry+), nas fases S / G2 / M (mCitrine+) [94] ou início da fase S (mCitrine+/ mCherry+).

A fim de garantir uma população homogênea onde a maioria das células expressassem a sonda FUCCI, foi realizado o sorting asséptico apenas das células fluorescentes. Uma avaliação das células em cultura 2D (Fig. 4A) de baixa confluência e sem qualquer estímulo, mostrou que a maioria das células estava nas fases S/G2/M (mCitrine+), como esperado para essa condição. Já em cultura 3D (Fig. 4B) em gel de

matriz extracelular rica em laminina (IrECM) a maioria das células formou estruturas similares a ácinos e se encontram em G0/G1 (mCherry+). Ao serem desafiadas em cultura 2D com IrECM ou IrECM+Prolactina, apesar de não formarem estruturas acinares, mantiveram o estado quiescência (Fig. 5).

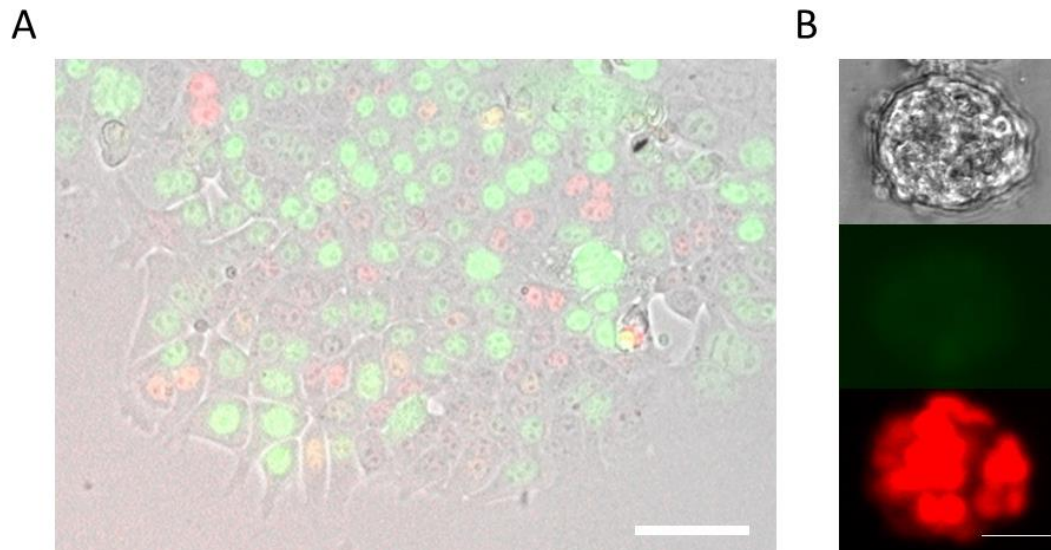


Figura 4 - Células Eph4 ES-FUCCI em monocamada e em 3D. A. Células Eph4-ES-FUCCI em 2D cultivadas com meio completo. A imagem de microscopia é composta pelos canais de fluorescência de mCitrine e mCherry e pelo canal de contraste de fase. Barra de aumento= 50 μ m. As células mCitrine+ (verdes) estão nas fases S (intermediária e tardia), G2 ou M do ciclo celular, as células mCherry+ (núcleo vermelho) estão em G1. Células cujo núcleo está duplamente marcado (mCitrine+ e Cherry+, núcleo amarelo) encontram-se no início de S. Células sem cor estão em mitose tardia, ou acabaram de terminar a mitose. B. Ácino formado a partir de células Eph4-ES-FUCCI em cultura 3D "on top" sobre IrECM (membrana basal reconstituída, rica em laminina-111: IrECM), na presença de prolactina. Imagem superior = canal do contraste de fase; imagem inferior = canais de fluorescência de mCitrine e mCherry. Barra de aumento= 25 μ m.

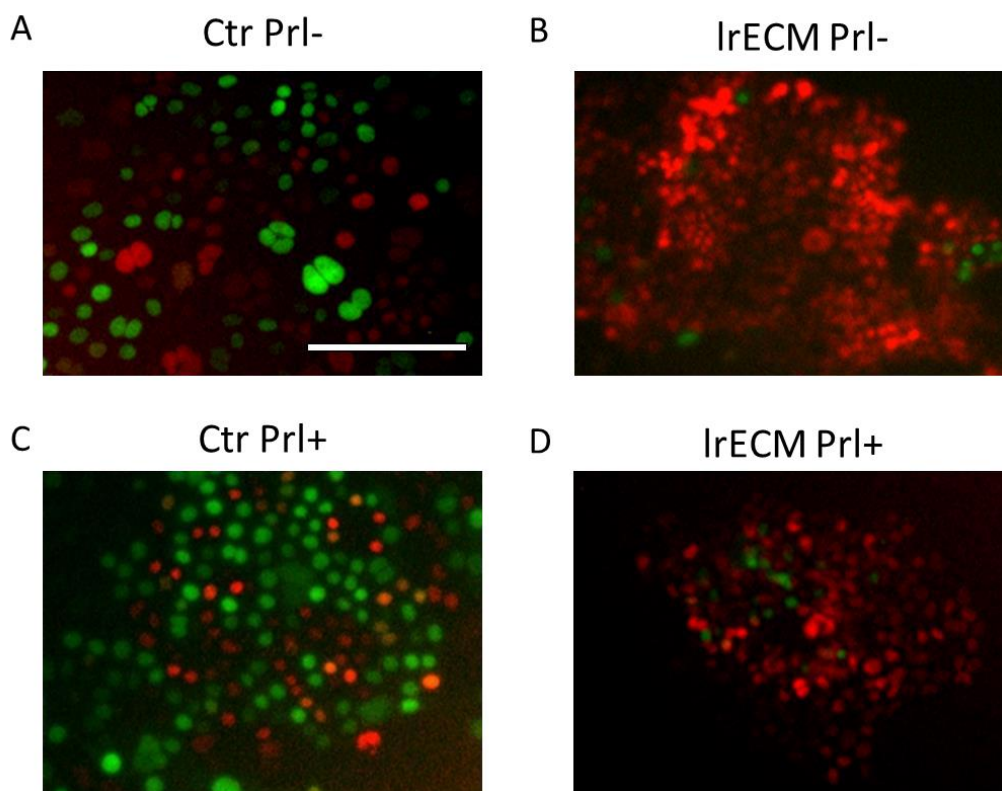


Figura 5 - Células EpH4-FUCCI respondem aos estímulos de quiescência da membrana basal. A e B. EpH4 sem prolactina. C e D. EpH4 com prolactina. A e C. Controle. B e D. Tratamento com lrECM por 48h. As células mCitrine+ estão em S/G2/M, enquanto as mCherry+ estão em G1. O contraste do canal vermelho foi ajustado no controle para permitir que a intensidade fosse comprável com lrECM. Barra de aumento = 100 μ m.

Para averiguar se as células ainda são capazes de produzir β -caseína, realizamos uma RT-qPCR com as células tratadas com prolactina e lrECM. As células tratadas apresentaram uma expressão aproximadamente 11.000 vezes mais alta que as células não tratadas (Fig. 6), demonstrando que a linhagem celular modificada manteve a sua capacidade de diferenciação mesmo após a incorporação do vetor de expressão.

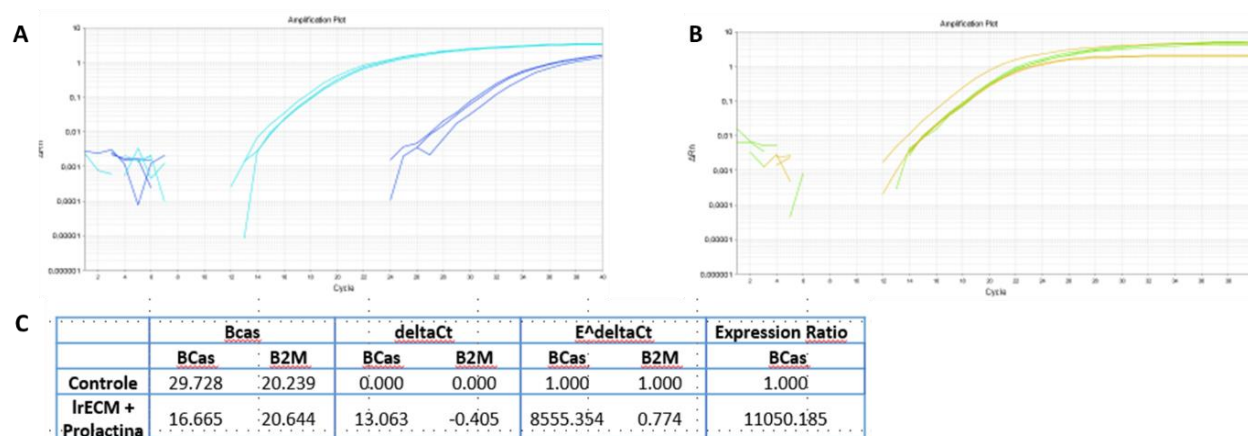


Figura 6 - PCR em tempo da expressão de β -caseína em EPH4- ES-FUCCI. A. Curva de amplificação da β -Caseína nas células EPH4-FUCCI não tratadas (azul escuro) e tratadas (azul claro) com IrECM e prolactina. B. Curva de amplificação de B2M, controle endógeno, em células EPH4-FUCCI não tratadas (verde escuro) e tratadas (verde claro) com IrECM e prolactina. C. Tabela com o cálculo da expressão relativa da β -Caseína nas células EPH4-FUCCI tratadas e não tratadas.

Originalmente, havíamos proposto identificar somente os genes mediadores de quiescência, utilizando como modelo celular a sub-linhagem EPH4-ES-FUCCI (geradas com sucesso como demonstrado acima). Entretanto, a diferenciação funcional das células epiteliais mamárias (direcionada a produção de leite) é estritamente acoplada a quiescência e é regulada por um mecanismo ainda não completamente elucidado [97]–[99]. E, assim como a quiescência, o que regula ao nível molecular a aquisição de características funcionais por células quiescentes, é uma grande pergunta na área de biologia celular. Para produzirem leite, as células mamárias necessitam do estímulo com hormônios lactogênicos e de sinalização fornecida pela membrana basal [97], [99]. Nós já tínhamos disponíveis no laboratório uma sub-linhagem EPH4 transduzida com o promotor da β -caseína fusionado a sequência codificadora da proteína fluorescente CFP [100] que quando tratada com prolactina e IrECM expressam CFP, o que indiretamente indica a diferenciação funcional (Fig. 7). A partir destas células produzimos a sub-linhagem EPH4 β -Cas-FUCCI de maneira similar à relatada para as células EPH4-ES-FUCCI.

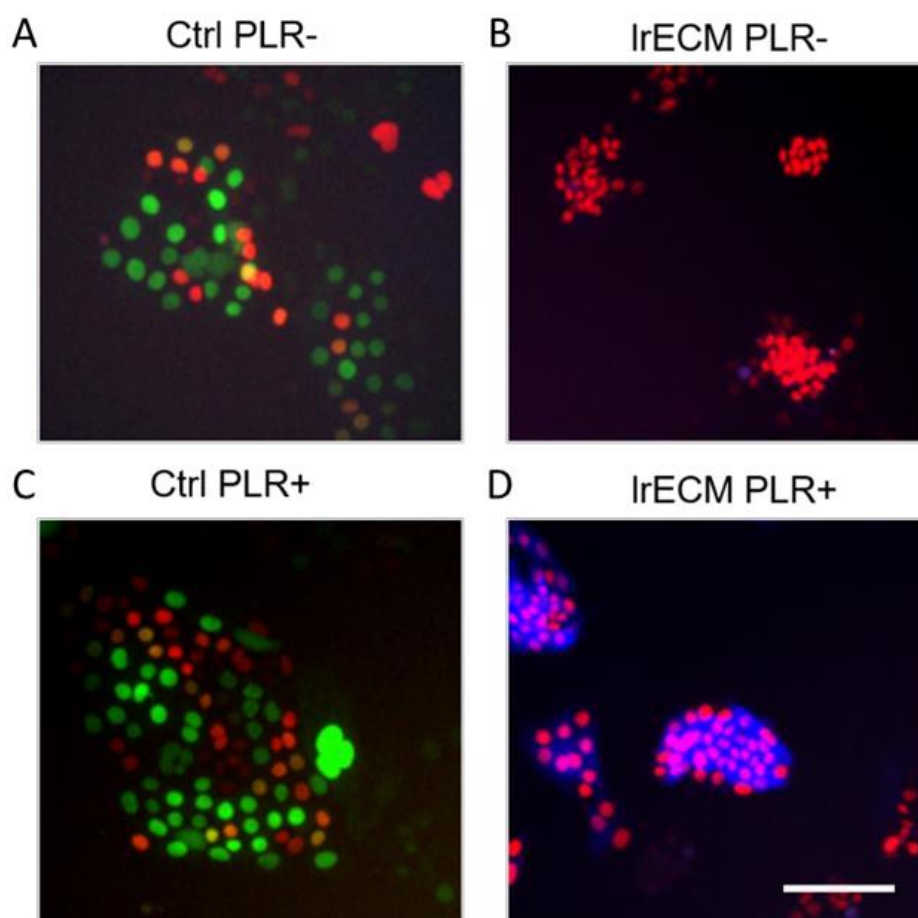


Figura 7 - Eph4- β Cas-CFP-FUCCI tratada com IrECM por 72 horas. A – Controle sem IrECM e sem prolactina. Muitas células estão nas fases S/G2/M. B – Controle sem IrECM e com prolactina. Muitas células estão nas fases S/G2/M. C – Tratamento com IrECM sem prolactina. A maioria das células encontra-se nas fases G1, mas não estão diferenciadas para produção de β -caseína. D – Tratamento com IrECM e prolactina. A maioria das células encontra-se nas fases G1 e está diferenciada expressando β -caseína. Os parâmetros de captura e processamento foram os mesmos para todas as imagens. Barra de aumento = 100 μ m

Nós obtivemos sucesso na geração das células que co-expressam a sonda do ciclo celular ES-FUCCI e o repórter para a expressão de β -caseína (Eph4 β -Cas-CFP ES-FUCCI). Entretanto, na primeira versão das células somente 40% das células expressavam a sonda FUCCI (Fig. 8). Portanto, enriquecemos a população de células expressando as duas sondas a partir de células cultivadas na condição controle (sem prolactina e sem IrECM). Após o enriquecimento, para a nossa surpresa, as células pararam de expressar a sonda β -cas-CFP. Provavelmente, isso ocorreu porque as

células isoladas foram mantidas com uma dosagem baixa do antibiótico de seleção e ao realizarmos o *sorting* as células viáveis não possuíam o esse plasmídeo integro. Usando a primeira população de EpH4 β -cas-CFP ES-FUCCI, realizamos o cultivo com prolactina e IrECM e submetemos as células para uma nova rodada de *sorting*, selecionando as células que eram duplamente positivas, para CFP e mCherry, presente no ES-FUCCI. Após o 2º *sorting*, as células apresentaram o fenótipo esperado; a maioria das células em G1 quando tratadas com IrECM. E quando co-tratadas com IrECM e prolactina, das células em G1, a maioria estava funcionalmente diferenciada, apresentando expressão de β -caseína (Fig. 8H).

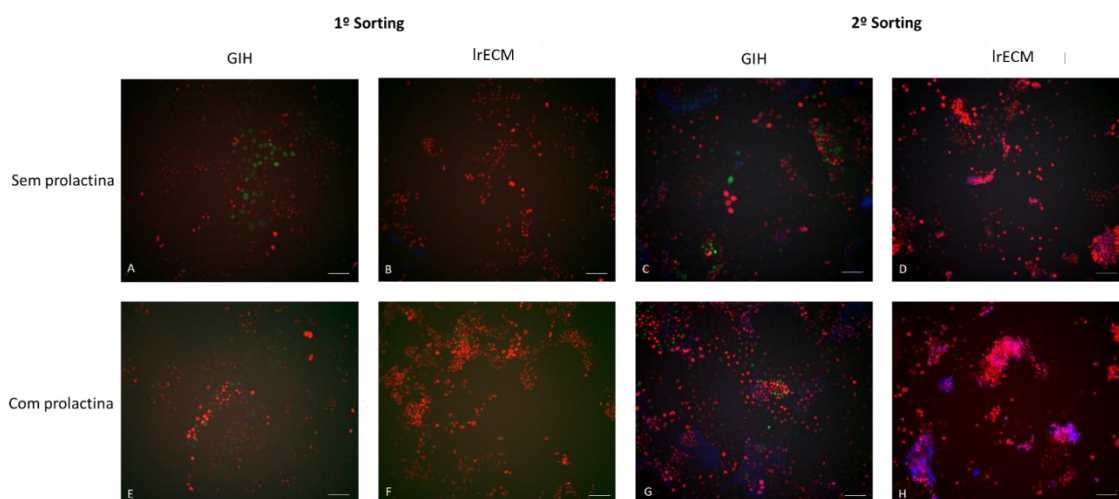


Figura 8 - Resposta das células EpH4 β -cas-CFP ES-Fucci ao tratamento com IrECM (matrigel) e prolactina. A e C – Controle sem IrECM e sem prolactina. Muitas células estão nas fases S/G2/M. B e D – Controle sem IrECM e com prolactina. Muitas células estão nas fases S/G2/M. E e G – Tratamento com IrECM sem prolactina. A maioria das células encontram-se na fase G1, mas não estão diferenciadas para produção de β -caseína. F e H -Tratamento com IrECM e prolactina. A maioria das células encontram-se na fase G1 e expressam β -caseína. Todos os parâmetros usados foram os mesmos para todas as imagens. Barra de aumento = 100 μ m.

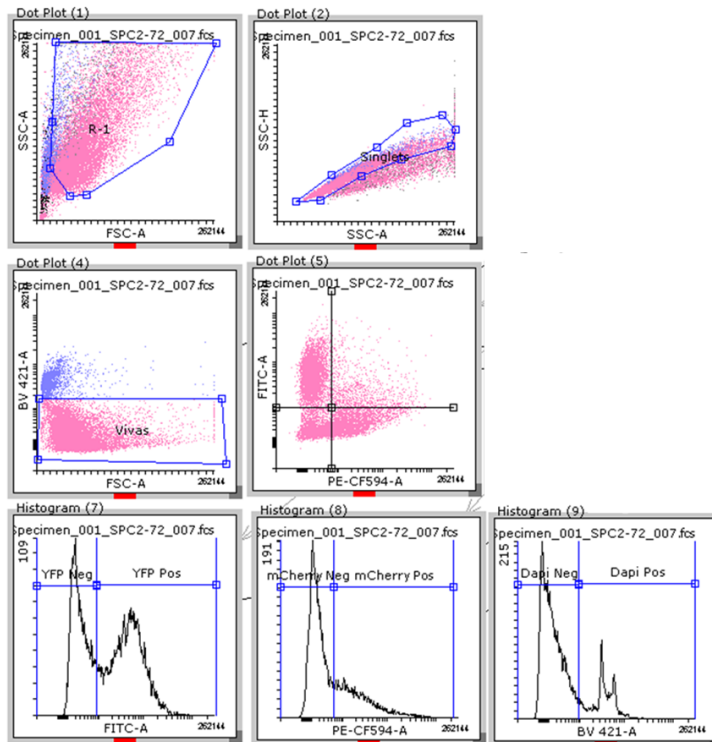
Como mostrado na Fig. 8, as células possuem o comportamento fenotípico esperado; continuam respondendo ao estímulo com IrECM para entrada em G0/G1

(mCherry+) e quando estimuladas conjuntamente com prolactina também se diferenciam. A posterior utilização dessas células no screen genético com a biblioteca de CRISPR-Cas9 permitiu a identificação de genes mediadores da regulação da quiescência induzida por IrECM e genes envolvidos na lactogênese.

4.1.1. Resposta ao tratamento com IrECM e prolactina ao longo de 192 horas

Para definir qual o tempo mais adequado de tratamento com IrECM para ser utilizado no *screen*, realizamos um ensaio onde as células foram tratadas com 2% IrECM por diferentes períodos entre 24 e 192 horas. As células foram analisadas por citometria. Obtivemos a porcentagem de células mortas com o uso de DAPI, corante fluorescente de DNA que não é capaz de entrar em células vivas, ao longo do tempo. Dentre as células vivas, obtivemos as células em G1/G0 (mCherry+) e as células em S/G2/M (mCitrine+) e as células no início de S (mCherry+/ mCitrine+). A Fig. 9 apresenta a estratégia de separação das populações de Eph4-FUCCI nas condições controle e tratadas com IrECM e prolactina.

A Controle sem prolactina



B Matrigel com prolactina

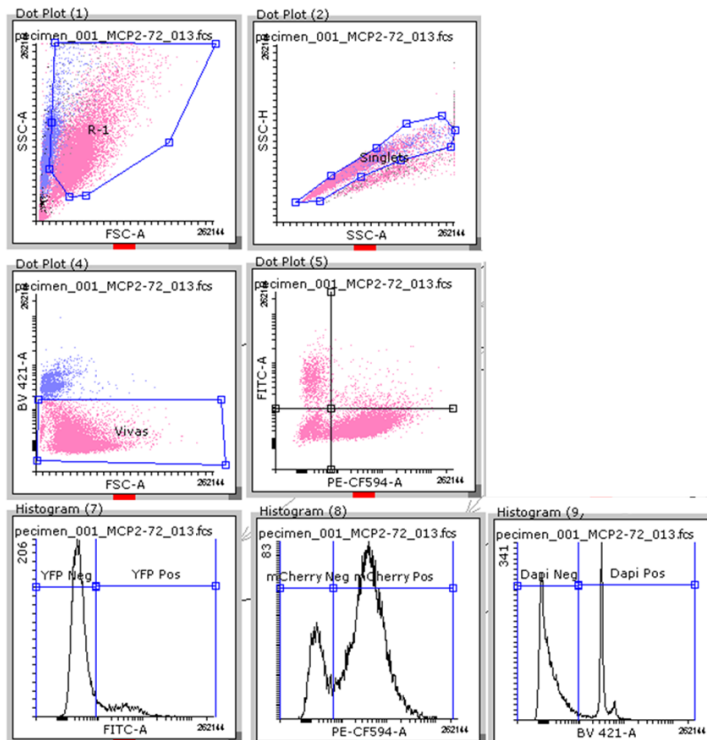


Figura 9 - Exemplos de análise usando o Flowing. As apresenta exemplos dos gráficos gerados nas análises.

Primeiramente, excluímos os debris usando SSC-A x FCS-A. Depois as células individuais foram separadas por

SSC-A x SSC-H. Dessa seleção, apenas as células que não foram coradas para DAPI foram consideradas vivas e foram analisadas. A: Amostra 72 horas controle sem prolactina. B: Amostra 72 horas com IrECM e prolactina.

Avaliamos quatro condições experimentais, combinando a presença e ausência de prolactina e IrECM, em oito períodos de tratamento (24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h e 192h) (Fig. 10).

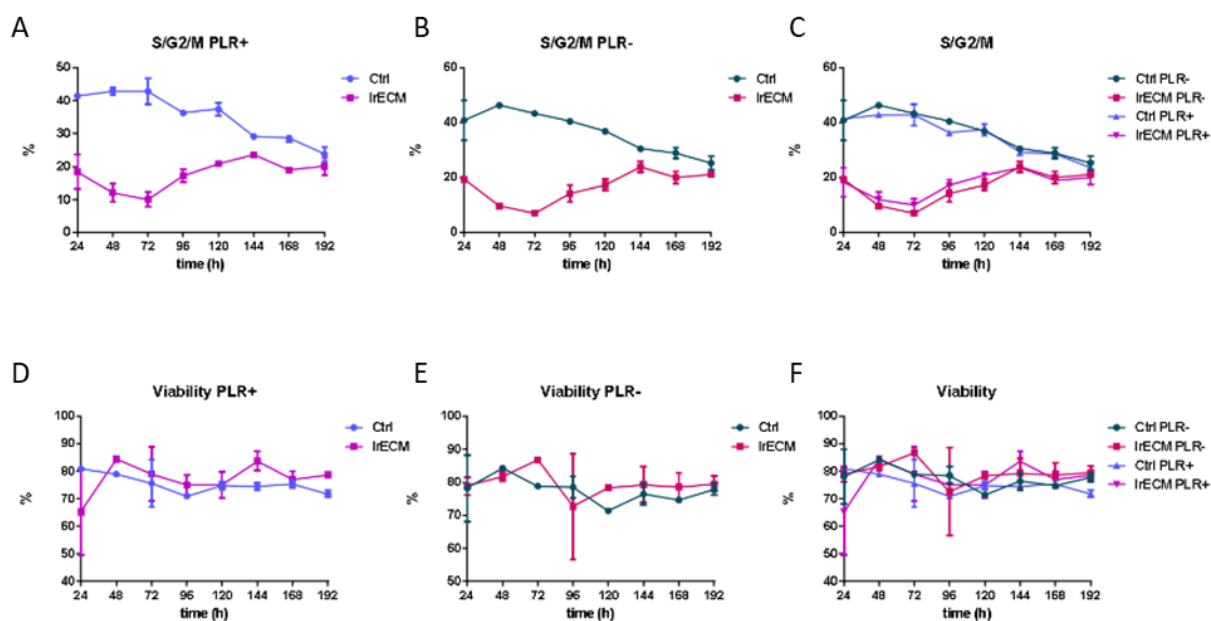


Figura 10 - Eph4-FUCCI em IrECM de 24 a 192 horas. A, B e C: Porcentagem de células Eph4-FUCCI mCitrine+ (S/G2/M). D, E e F: Viabilidade das células Eph4-FUCCI que se manteve muito parecida ao longo de todo o experimento. A e D são experimentos com prolactina. B e E são experimentos sem prolactina. C: compilado dos dados de A e B. F: compilado dos dados de D e E. Os números mostrados são médias +/- desvio padrão de duas repetições (N = 2).

Como este experimento foi conduzido apenas em duplicata, a fim de obter um panorama geral da resposta das células à IrECM ao longo do tempo, não foi possível realizar comparações estatísticas. Ainda assim, nota-se diminuição de células mCitrine+ (S/G2/M) até 72h, seguida do aumento de células ao longo do tempo, mesmo na presença de IrECM (Fig. 10). Com esse experimento escolhemos o ponto de 72h para coleta das células após o início do tratamento com IrECM, visto ser o

ponto em que existe um menor número de células em S/G2/M, diminuindo as chances de encontrarmos células falsas positivas no nosso CRISPR *screen*. Provavelmente, essa recuperação no número de células em proliferação após 72h em IrECM ocorre devido: 1. Às células que não respondem ao estímulo de IrECM (as mCitrine+) aumentam em números absolutos, enquanto a quantidade de células G1 (mCherry+) se mantém a mesma ao longo de todo o experimento e quando calculamos a porcentagem observamos aumento de mCitrine+. Ou seja, pode haver uma subpopulação com maior capacidade proliferativa; 2. As células que inicialmente responderam ao estímulo da IrECM param de responder e voltam a ciclar (aparecendo, portanto, no compartimento mCitrine+) devido a remodelação da MEC, possivelmente pelo aumento da secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs).

Ademais, com este experimento, nós também conseguimos observar que a taxa de morte celular não é afetada pelo tratamento com IrECM. Entretanto, é importante ressaltar que a taxa de morte é superestimada neste ensaio. O DAPI foi adicionado após a tripsinização e ressuspensão, desta forma, o número de células mortas abrange tanto as células que realmente morreram durante o ensaio, quanto aquelas que morreram durante o procedimento.

4.1.2. O NGS demonstrou que a biblioteca plasmidial amplificada no nosso laboratório era apropriada para o screen

Com objetivo de verificar se a representatividade dos mais de 130 mil sgRNAs contidos na biblioteca fora mantida após a amplificação realizada no nosso laboratório, permitindo a sua utilização no *screen*, nós realizamos o sequenciamento da biblioteca com o uso da plataforma MiSeq Illumina. Como resultado foram lidas mais de 2 bilhões de bases e obtivemos aproximadamente 21 milhões de *reads*, com boa qualidade (Fig.

11). Em seguida nós comparamos os dados de sequenciamento da nossa biblioteca (e-signal) com os do sequenciamento da biblioteca original[88].

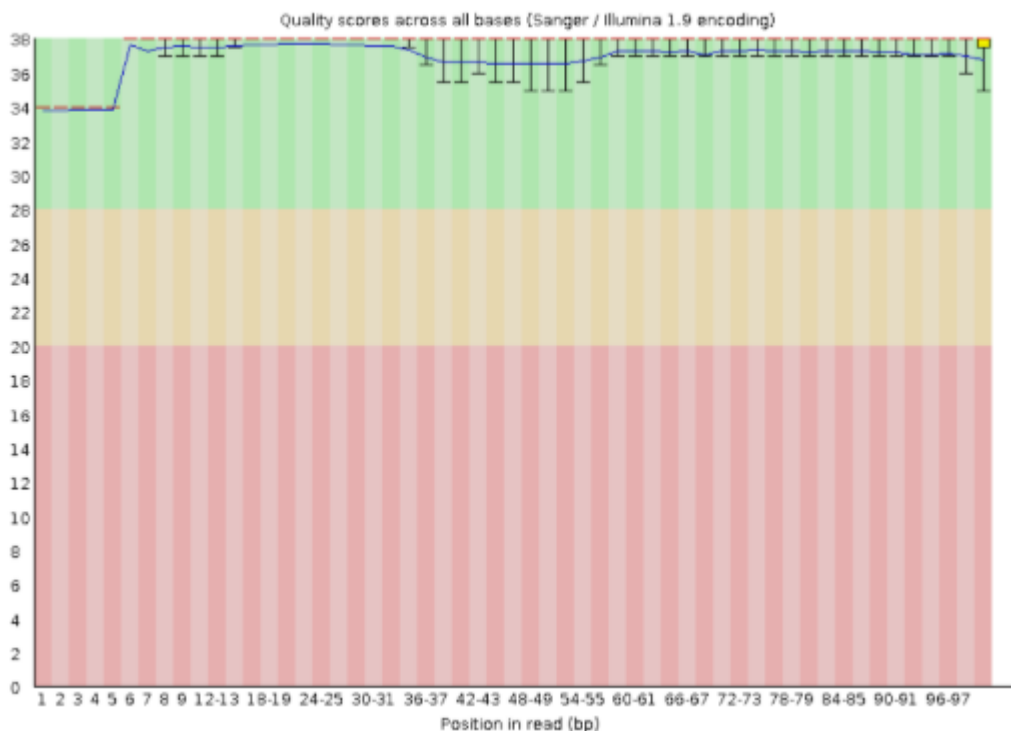


Figura 11 - Distribuição de qualidade ao longo dos *reads*. No eixo X temos as bases da sequência lida. No eixo Y temos a qualidade do sequenciamento. Coloração de fundo: Vermelho (Ruim) = 0 a 20; Amarelo (Média) = 20 a 28; Verde (Boa) = 28 ou maior. Gráfico: Linha vermelha = mediana; Caixa amarela = intervalo interquartil; Traços = pontos 10% e 90%; Linha azul = média.

Nossos dados de sequenciamento são bastante parecidos com os obtidos por Sanjana e colaboradores [88] (Tabela 5), com exceção do fato de que a cobertura do nosso sequenciamento tenha sido aproximadamente o dobro da cobertura de sequenciamento da biblioteca original (e-signal lab= 141x; Sanjana et al., 2014= 74x). As porcentagens de sgRNA perfeitos e de sgRNA não encontrados foram muito similares. Como regra geral, é desejável que a biblioteca tenha >70% de sgRNA perfeitos e a nossa biblioteca, assim como a original, obtiveram porcentagens acima deste valor. Embora Joung e colaboradores [90], recomende que a porcentagem de

sgRNA não encontrados seja <0,5%, a cobertura e equipamento utilizado no nosso sequenciamento foi mais próxima de Sanjana e colaboradores [88], onde 2,1% dos sgRNAs não foram detectados, possivelmente por uma questão de cobertura. A razão *reads* dos 10% mais altos para os 10% mais baixos demonstra uniformidade da biblioteca e é recomendado uma razão de <15[88], [101], portanto a nossa biblioteca também obteve um valor satisfatório para este parâmetro.

Tabela 5 - Análise do sequenciamento da biblioteca pelo e-signal lab e pelos dados disponibilizados por Sanjana e colaboradores [88].

	<i>e-signal</i>	<i>Sanjana et al., 2014</i>
<i>sgRNA perfeitos</i>	13.296.714	7.231.732
<i>sgRNA não perfeitos</i>	3.671.198	2.271.082
<i>Reads que não se encontrou barcode</i>	1.413.188	147.555
<i>Reads processadas</i>	18.381.100	9.650.369
<i>Porcentagem de sgRNA perfeitos</i>	78,4	76,1
<i>Porcentagem de sgRNA não encontrados</i>	2,1	2,1
<i>Razão reads dos 10% mais altos para os 10% mais baixos</i>	15,785	14,875

Além disso, a distribuição de sgRNAs por número de *reads* dos dois *subpools* (A e B) da biblioteca amplificada no nosso laboratório foi similar a distribuição da biblioteca dos desenvolvedores (Fig.12).

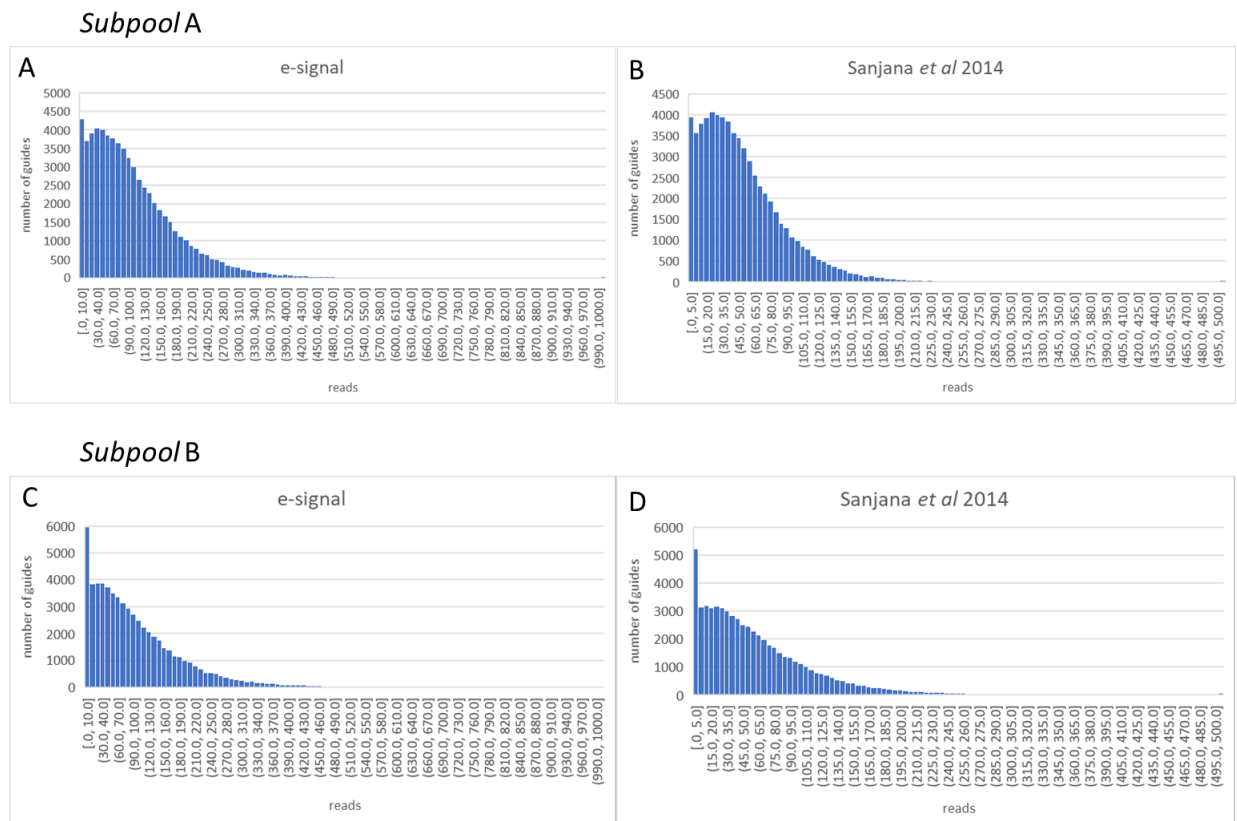


Figura 12 - Comparação entre as corridas de sequenciamento das bibliotecas amplificadas no nosso laboratório e dos desenvolvedores da biblioteca. A-D. Histogramas da distribuição de sgRNA por número de *reads* obtidos no sequenciamento de GeCKO V2. A e B = Subpool A; C e D=Subpool B. A e C = sequenciamento do nosso laboratório. B e D: Sequenciamento dos desenvolvedores. O número de sgRNAs de acordo com o número de *reads* obtidas para cada sgRNA, demonstrou alta similaridade no perfil de distribuição do sgRNA entre os dados obtidos em nosso laboratório ou pelos desenvolvedores. As vírgulas no eixo X separam os intervalos de cada classe do histograma.

Nós também calculamos a representatividade de cada sgRNA (número de *reads* do sgRNA dividido pela média do número de todos os *reads* – valores próximos a 1 significam distribuição uniforme dos guias dentro do pool (Fig. 13).

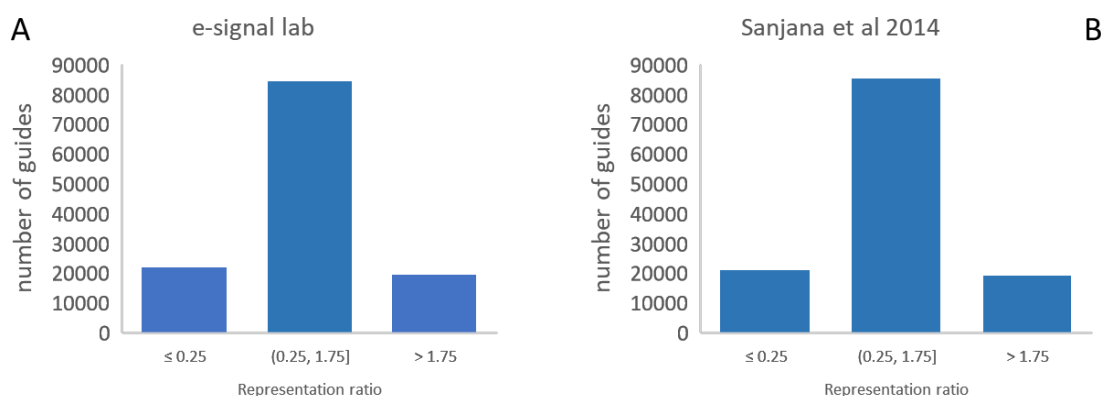


Figura 13 - Similaridade no número de sgRNAs pela razão de representação no sequenciamento do nosso laboratório e dos desenvolvedores da biblioteca. Histogramas da distribuição de sgRNA por número de reads obtidos no sequenciamento de GeCKO V2. A: Histograma gerado com a análise dos dados obtidos com o sequenciamento com o script count_spacerspy[90]. B: Histograma gerado com base na reanálise dos dados de Sanjana et al., 2014 com o script count_spacerspy.

Finalmente, a análise de correlação de Pearson entre a representatividade dos diferentes sgRNAs detectados na biblioteca amplificada no nosso laboratório e na biblioteca original [88] demonstrou grande similaridade, conforme indicado pelo valor de $R^2=0.9152$ (Fig. 14). Essa alta correlação entre as duas amostras indica que a amplificação e isolamento de plasmídeos conduzido no nosso laboratório não alterou a distribuição original dos sgRNA da biblioteca original.

Em suma, os dados indicam que a variabilidade e representatividade dos sgRNA na nossa biblioteca expandida é similar a encontrada na versão originalmente descrita, e, portanto, apropriada para prosseguirmos com os experimentos.

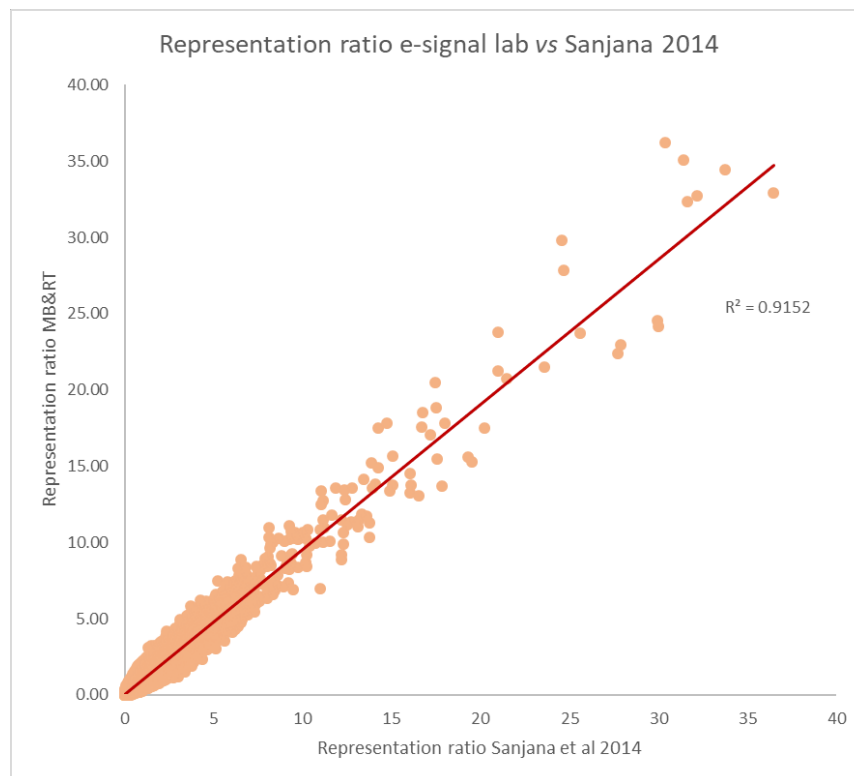


Figura 14 - Correlação entre a representatividade dos sgRNAs detectados na nossa corrida e na corrida de Sanjana et al.[88]. Cada ponto representa um sgRNA. A linha de tendência está indicada em vermelho.

4.2. CRISPR screen para a identificação de genes mediadores da quiescência e da lactogênese

Para o *screen*, as células Eph4- β -caseína-FUCCI transduzidas com a biblioteca GeCKO foram tratadas com IrECM e prolactina por 72 h e submetidas ao *cell sorting*. A estratégia de gating e os canais utilizados estão descritos na Fig. 15 e as porcentagens das diferentes populações pré e pós-sorting estão na Tabela 6.

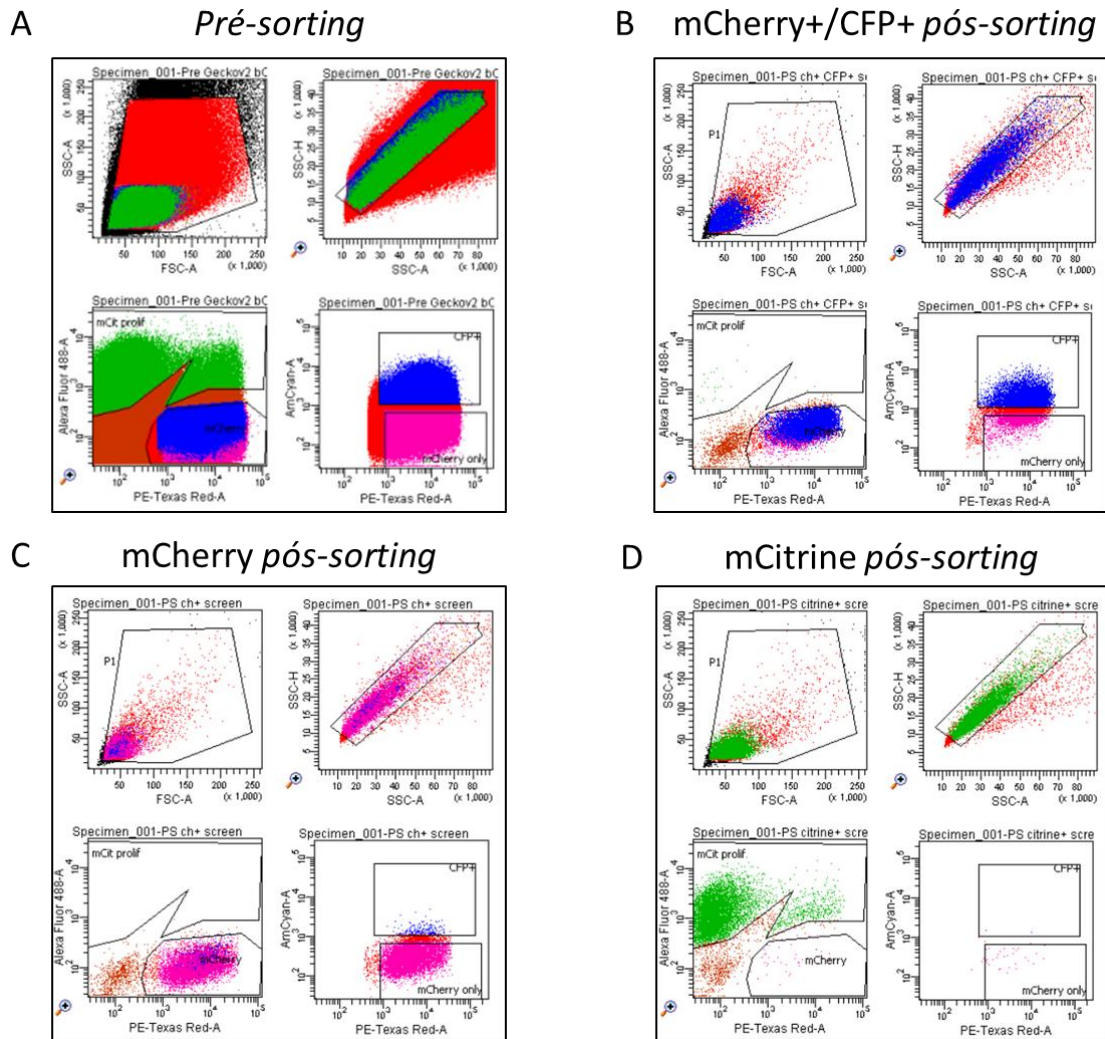


Figura 15 - Sequência dos *gates* e canais usados para o perfil do *cell sorting*. A – Perfil das células que foram submetidos ao *sorting* no 1. B – Perfil das células mCherry+/CFP+ pós o *sorting*. C – Perfil das células mCherry pós o *sorting*. D – Perfil das células mCitrine pós o *sorting*. No gráfico de SSC-A por FSC-A escolhemos a população de células, eliminando os *debris*. No gráfico de SSC-A por SSC-H eliminamos os *doublets*. No gráfico de PE-Texas RED-A por Alexa Fluor 448-A selecionamos as populações mCitrine positivas e mCherry positivas. No gráfico de PE-Texas Red-A por AmCyan-A separamos a população mCherry em apenas mCherry e mCherry e CFP positivas.

Tabela 6 - Porcentagem das diferentes populações isoladas após trasdução com a biblioteca GeCKO seguida de tratamento com IrECM+Prolactina.

Populações	<i>mCitrine+</i>	<i>mCherry</i>	<i>mCherry+/CFP+</i>
	+		
<i>Pré-sorting</i>	4,3%	74,1%	10,3%
<i>Pós-sorting (mCitrine+)</i>	90,6	0,3%	0,1%
<i>Pós-sorting (mCherry)</i>	0,0%	89,5%	2,1%
<i>Pós-sorting (mCherry+/CFP+)</i>	0,2%	21,6%	55,6%

Para o NGS, nós extraímos o DNA genômico das amostras seguintes amostras:

- 1) Células Pré-experimento (Pré-Exto)
- 2) Controle 48 horas- replicata 1 (Cont 48 1)
- 3) Células *mCitrine+* (*mCit+*) expostas ao tratamento
- 4) Células *mCherry+* (*mCh+*) expostas ao tratamento
- 5) Células *mCherry+/CFP* (*mCh+/CFP+*) expostas ao tratamento
- 6) Controle 48 replicata 2 (Cont 48 2)

O número de células, quantidade de DNA e razões 260/280 e 260/230 estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentrações obtidas a partir da extração do DNA genômico.

Amostra	Células	ng/mL	260/230	260/280	Volume	Rendimento
<i>Pre-Exto</i>	25M	386,3	1,93	1,99	~300µL	~115µg
<i>Cont 48 1</i>	78M	338,8	1,96	2,28	~800µL	~271µg
<i>mCit+</i>	650K	61,2	1,92	2,03	~60µL	~4µg
<i>mCh+</i>	6M	306,2	1,93	2,22	~80µL	~25µg
<i>mCh+/CFP+</i>	500K	60,9	1,92	2,03	~60µL	~4µg

Em seguida, realizamos as duas PCRs para amplificação das sequências dos sgRNA inseridas no DNA genômico das células, conforme descrito no material e métodos.

Para se atingir a cobertura de 100x do sequenciamento, foram necessárias duas rodadas de sequenciamento. O primeiro sequenciamento foi conduzido no equipamento NextSeq Illumina da core-facility Genome Investigation And Analysis Laboratory (GENIAL) da USP, em cartucho de 75 ciclos (Illumina #20024906), single end e com 20% de DNA PhiX, como recomendam os desenvolvedores da biblioteca [89]. Como resultado obtivemos aproximadamente 18 bilhões de bases lidas, 220 milhões de reads, com boa qualidade, como mostrado na Fig. 16.

Porém notamos em todos os gráficos de distribuição que a quantidade de bases Guanina lidas superava bastante as outras. O equipamento NextSeq reconhece apenas duas cores, sendo adenina reconhecida pelos canais vermelho e verde, citosina pelo canal vermelho, timina pelo canal verde e a leitura de guanina é feita por ausência de detecção pelos canais. Logo, entende-se que a quantidade superior de Guanina no sequenciamento ocorreu devido a um problema, no qual, provavelmente as bases perderam a fluorescência e foram lidas como guanina.

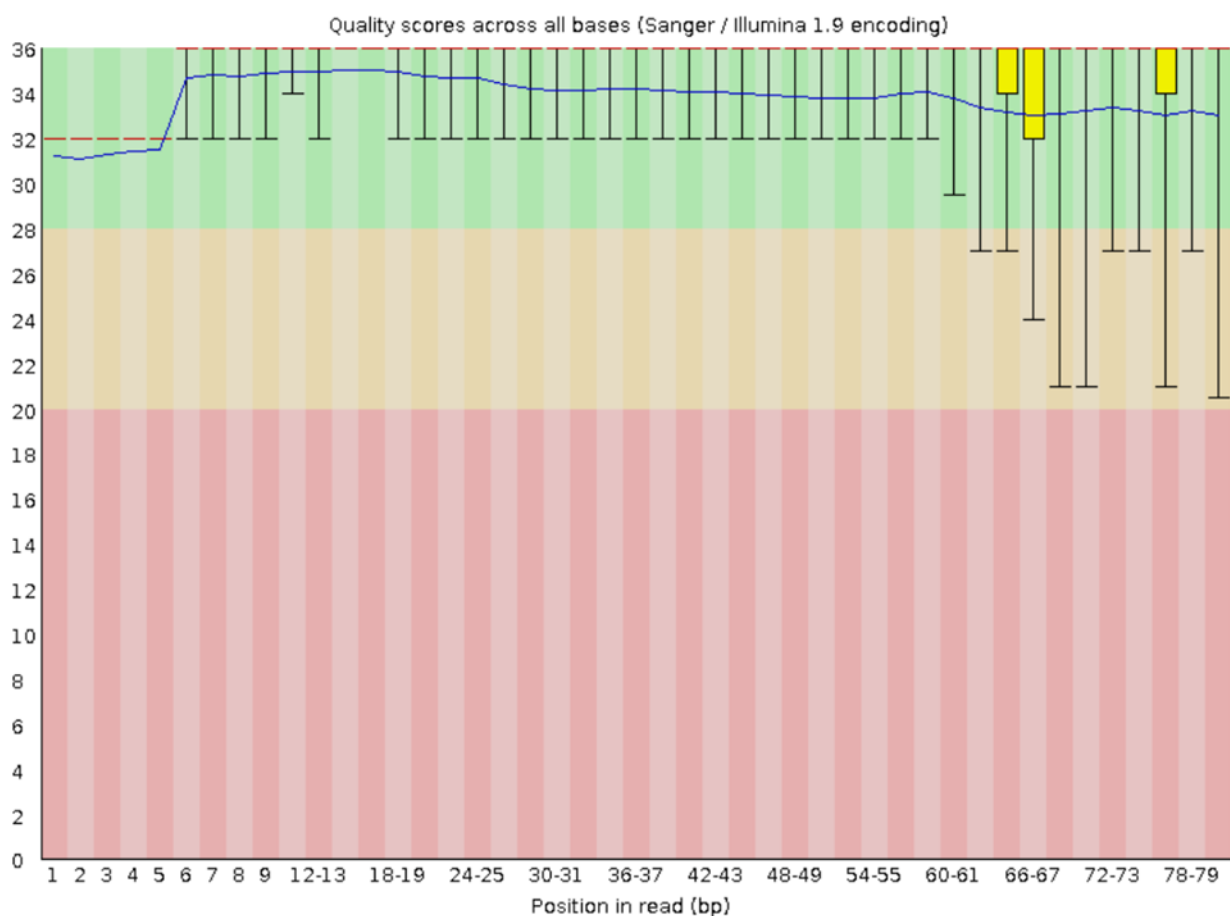


Figura 16 – Distribuição de qualidade ao longo dos *reads* na Lane 1 do cartucho de NextSeq. Coloração de fundo: Vermelho (Ruim) = 0 a 20; Amarelo (Média) = 20 a 28; Verde (Boa) = 28 ou maior. Gráfico: Linha vermelha = mediana; Caixa amarela = intervalo interquartil; Traços = pontos 10% e 90%; Linha azul = média.

Devido às limitações do aparelho NEXTSeq e da primeira corrida, realizamos outro sequenciamento, dessa vez com o equipamento HiSeq que identifica cada uma das bases por uma cor diferente, evitando o problema ocorrido em que as bases sem fluorescência foram lidas como Guanina pelo NextSeq. Nós obtivemos pouco mais de 90 milhões de *reads* lidas, com boa qualidade.

Como nossas amostras eram as mesmas, para aumentar a cobertura e confiabilidade do sequenciamento, o resultado de ambas as corridas (do NextSeq e do HiSeq) foi analisado conjuntamente. Na Tabela 8, conseguimos avaliar a cobertura de cada amostra em cada corrida e a soma de ambas. Observa-se que o número de

reads da Biblioteca. Ao ter ambas as corridas analisadas conjuntamente, a maioria das amostras, com exceção da mCherry+, superou 100X de cobertura de sequenciamento.

Tabela 8 – Reads e Cobertura das corridas de NGS

Amostra	NextSeq		HiSeq		NextSeq+HiSeq	
	#Reads	Cobertura	#Reads	Cobertura	#Reads	Cobertura
Biblioteca A	10.224.472	78,6	7.361.510	56,6	17.585.982	135,3
Biblioteca B	8.730.115	67,2	5.289.604	40,7	14.019.719	107,8
Controle 48h	15.336.312	118,0	11.568.070	89,0	26.904.382	207,0
Pré- Experimento	11.093.472	85,3	11.098.118	85,5	22.191.590	170,7
Indeterminado	114.711.380	882,4			114.711.380	882,4
mCherry+	2.729.157	21,0	3.496.938	26,9	6.226.095	47,9
mCitrine+	15.140.775	105,5	12.609.444	97,0	27.750.219	213,5
mCherry+/ CFP+	13.714.848	116,5	15.764.230	121,2	29.479.078	226,8

Nestas rodadas de sequenciamento, nós incluímos também a biblioteca dos vetores lentivirais que já havia sido sequenciada, como um controle extra de qualidade. Assim, a primeira análise feita foi a comparação dos resultados dos sequenciamentos da biblioteca. Para tal, os números de *reads* de cada *sgRNA* presentes no sequenciamento HiSeq da biblioteca foram contados e usados no gráfico segundo a seguinte equação: $[(reads+1)/total\ de\ reads\ da\ condição]$. Com esses dados, realizamos o teste de correlação de Pearson e ambos os sequenciamentos das bibliotecas se mostraram semelhantes (Fig. 17) ($R^2 = 0,97$). Como o resultado do sequenciamento foi similar, demos seguimento às análises.

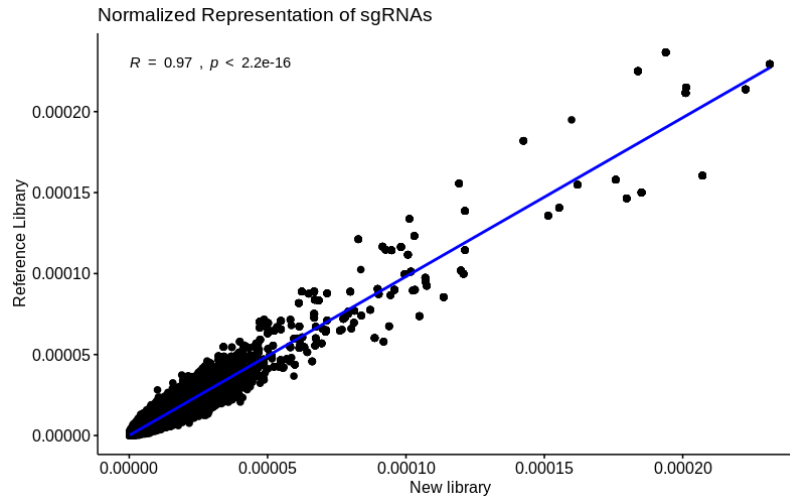


Figura 17 - Representação normalizada [(reads+1)/total de reads da condição] dos sgRNA das bibliotecas A e B na corrida NGS HiSeq versus os sgRNA da biblioteca plasmidial. A comparação entre os resultados da equação foi usada no gráfico. Eixo X: sgRNAs da biblioteca sequenciada pelo HiSeq. Eixo Y: sgRNAs da biblioteca de referência plasmidial sequenciada pelo MiSeq. O valor de $R=0,97$ e o valor de $p < 2,2 \times 10^{-16}$.

4.2.1. Análise dos genes possivelmente relacionados com quiescência

Para identificação dos genes possivelmente relacionados com a regulação quiescência, nós analisamos o enriquecimento de sgRNAs nas células que ainda proliferavam, ou seja, as células mCitrine+ a despeito de serem expostas ao tratamento com IrECM e prolactina, que induz a quiescência.

A lista de genes com sgRNAs enriquecidos em células mCitrine+ é obtida a partir dos sgRNAs que são super-representados em comparação ($p < 0,05$). O programa MAGeek fornece as seleções positiva (genes super-representados) e negativa (genes sub-representados). Como um filtro inicial, nós excluimos os genes que apareceram em ambas as seleções tanto para a população mCitrine+ como para mCherry+/CFP+ (Fig. 18A e 18B) Em seguida, nós comparamos os genes super-representados em células mCitrine+ a lista de genes super-representados em

mCherry+/CFP+, e excluimos os genes compartilhados pelas duas populações (Fig. 18C). Obtivemos, assim, 1041 alvos potenciais na população de mCitrine+, com 87 alvos sendo excluídos por não fazerem parte exclusivamente da seleção positiva de mCitrine+.



Figura 18 - Estratégia para inclusão de alvos potenciais na lista de genes relacionados a quiescência. A. Genes com sgRNAs super-representados (seleção positiva) ou sub-representados (seleção negativa) ($p < 0,05$) nas células mCitrine+. Na intersecção estão genes que apareceram em ambas seleções positivas negativas. Apenas os genes da seleção positiva foram selecionados nessa primeira filtragem. B. Genes com sgRNAs super-representados ou sub-representados ($p < 0,05$) nas células mCherry+/CFP+. Na intersecção estão genes que se apareceram em ambas as seleções negativas e positivas. Apenas os genes da seleção positiva foram selecionados passaram por essa filtragem inicial. C. Após a primeira filtragem, foi realizada a exclusão de genes contidos na lista mCitrine+ também enriquecidos em mCherry+/CFP+.

Na lista de 1041 alvos havia 939 genes codificadores de proteínas, 80 genes de microRNAs (miR) e 22 non-targets. A partir da lista do MAGEck original selecionamos todos os miRs, um total de 45, cujos sgRNA estavam sub-representados em relação ao controle ($p \leq 0,05$). Em colaboração com o Professor

Murilo Vieira Geraldo do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas, conseguimos cruzar os genes alvos desses 45 miR com a nossa lista de 939 genes, buscando assim miR que potencialmente silenciam os genes mediadores a quiescência.

Em seguida, para restringir a nossa busca por alvos realizamos uma análise de enriquecimento de vias e processos celulares. Para tal, utilizamos os genes da lista da seleção positiva de mCitrine+ com valor $p \leq 0,01$ e os *top* 50 genes da lista alvos dos miR sub-representados em mCitrine, dando um total de 310 genes (Fig. 19). Utilizamos então o pacote pathfindR do programa R para a análise de enriquecimento de vias na lista dos 310 genes. O pathfindR foi escolhido por considerar três parâmetros: (i) as informações de expressão obtidas por análises ômicas, (ii) informações de interação de sub-redes ativas e (iii) a definição de genes/vias provenientes de bases de dados como a Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) [102], Reactome [103], BioCarta [104] e Gene Ontology (GO). (iv). O pathfindR mostra apenas relações entre proteínas que foram provadas experimentalmente proveniente dessas bases, o que torna a análise robusta [105] .

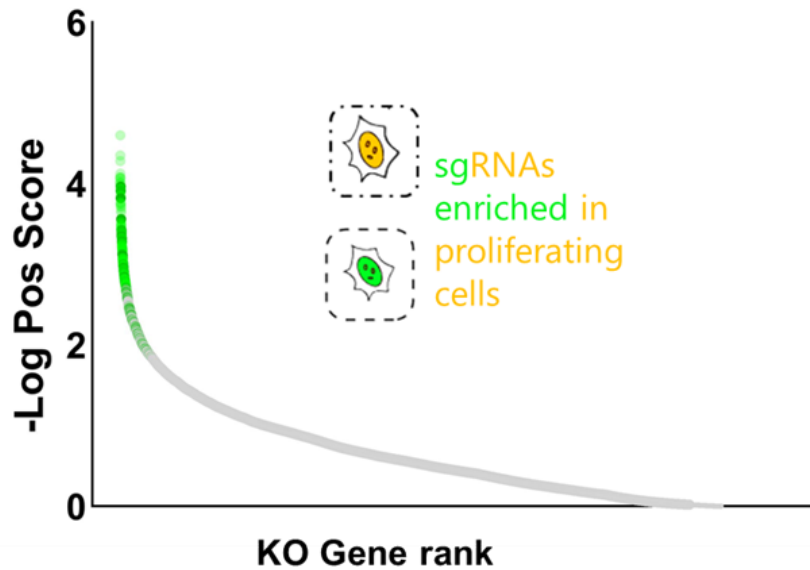


Figura 19 - O gráfico apresenta o -log do score positivo obtido pelo programa MAGEcK de genes individuais em função da posição que ocupam no KO Gene rank (posição baseada no valor do score positivo) da seleção positiva. Em verde se encontram os genes escolhidos para a análise de vias e processos celulares (total de 310 genes; 260 que obtiveram valor de $p < 0,01$ + 50 genes da análise dos alvos de miR).

Na Fig. 20 apresentamos as 10 vias principais, de acordo com o grau de significância, relacionadas a quiescência segundo o pathfindR, usando as bases GO, KEGG e Reactome. Podemos notar que algumas vias se repetem em mais de uma plataforma de análise, como NFkB em GO e KEGG e a via de MAPK em KEGG e Reactome. Com essa análise foi possível avaliar superficialmente a participação dos potenciais genes relacionados à quiescência com outras vias e processos celulares, abrangendo conexões não óbvias, como as vias de receptores *toll-like*.

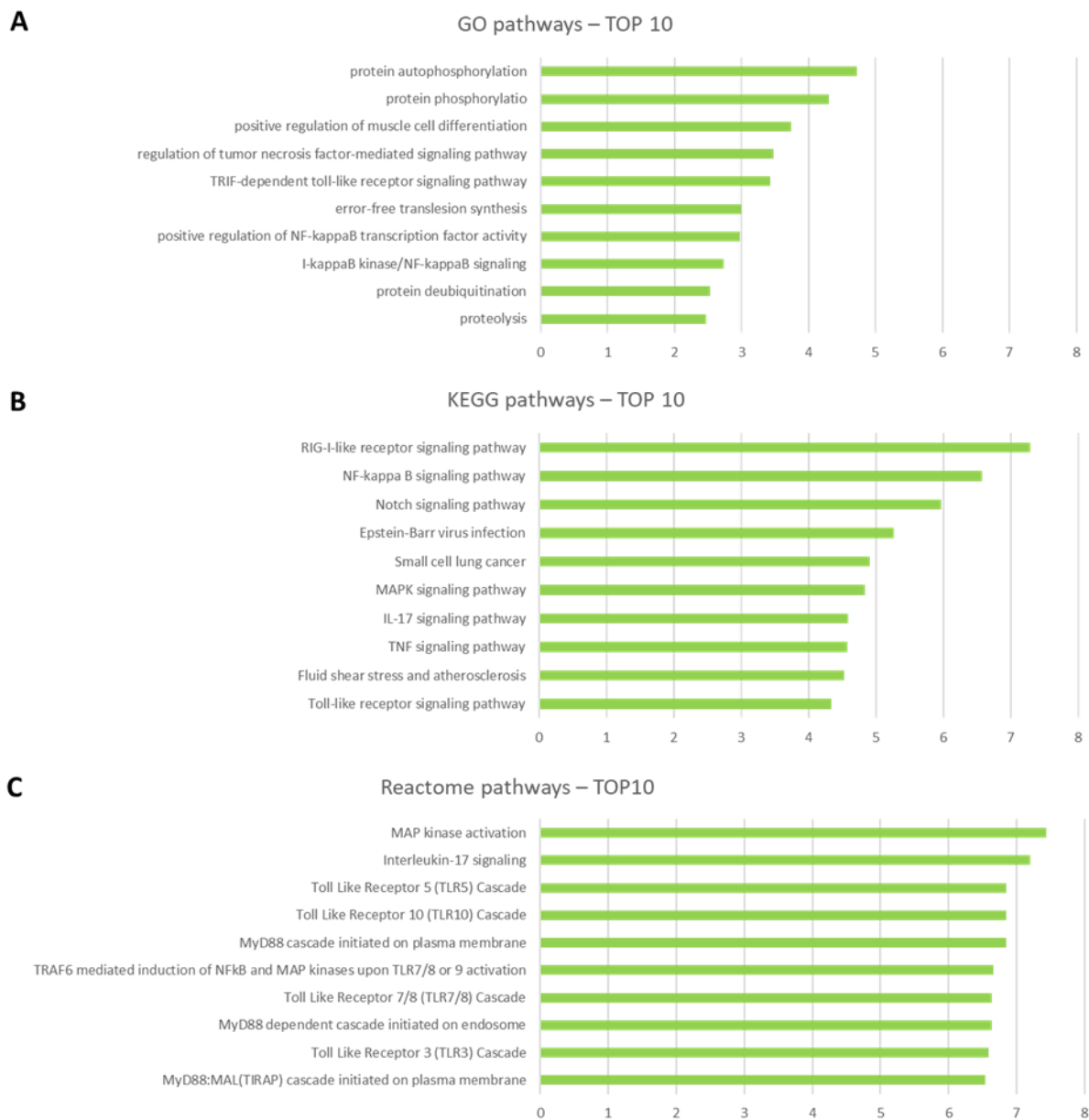


Figura 20 – Análise de enriquecimento de vias na lista de genes potencialmente reguladores da quiescência. Os gráficos mostram as TOP10 vias e processos enriquecidos a partir das bases de dados GO (A), KEGG (B) e Reactome (C). Os eixos X dos gráficos se referem ao de $-\log$ do valor de P.

Para as próximas análises, escolhemos 21 genes. Estes são representativos da maioria das vias enriquecidas, além de componentes e receptores da MEC (Tabela 9).

Tabela 9 - Lista dos genes alvo mediadores da quiescência, classificação na seleção do MAGEcK, número de miR que atuam no gene, função do gene.

Gene	Posição MAGEcK	Alvo miR	Breve descrição da função
Akap2	201	1	Sinalização de cAMP. Proteína scaffold [106]
Ankle1	4	6	Reparo de DNA [107]
Cebpb	8	0	Fator de transcrição relacionado com adipogênese. [108]
Chuk	77	4	Inibe NFκB. Modulação anti e pro inflamatórias e envolvimento em sobrevivência e diferenciação celular [109]
Col25a1	84	16	Molécula da matriz extracelular [110]
Creb3l2	633	13	Fator de transcrição envolvido na regulação de função do retículo endoplasmático e complexo de Golgi [111]
Epbh1	169	10	Ativa sinalização MAPK/ERK e JNK. Regula migração e adesão celular [112]
Foxk1	87	18	Regulador transcricional da expressão de genes da via glicolítica [113]
Has3	184	23	Síntese de ácido hialurônico [114]
Hey2	93	7	Sinalização de NOTCH [115]
Irak1	24	15	Ativa NFκB, p38 e JNK [116]
Map3k1	553	9	Sinalização de MAPK [117]
Mef2a	836	15	Fator de transcrição que ativa genes relacionados a diferenciação muscular e resposta ao estresse[118]
Ntn1	138	15	Molécula da matriz extracelular[119]
Numb	81	14	Sinalização de NOTCH e participação em junções celulares [120]
Pten	346	14	Fosfatase inibidora da via PI3K-AKT [121]
Rpa1	113	0	Reparo de DNA [122]
Scrt2	131	14	Fator de transcrição. Pode prevenir a reentrada no ciclo celular em neurônios [123]
Tjp1	371	7	Junções celulares regulando adesões celulares e mudanças morfológicas [124]
Traf2	36	17	Sinalização de TNF [125]
Trp53	71	4	Ativador da parada do ciclo celular [126]
Xirp1	30	10	Inibe a despolimerização da actina [127]

Analisando rapidamente os genes, destacamos a presença de Pten e Trp53, genes que já são conhecidos como inibidores clássicos do ciclo celular, e genes ainda pouco estudados no contexto da regulação da decisão proliferação/quiescência é um desses genes. Por exemplo, na ausência de Chuk, o ponto de verificação do ciclo celular em G2/M, caso haja danos no DNA, não funciona corretamente. [128]. Scrt2 contribui com a manutenção de altos níveis de inibidores de ciclina, inibindo a

proliferação em neurônios [123]. A proteína ZO1, codificada pelo gene *Tjp1*, é uma das principais moléculas que compõe uma rede comunicação entre a actina e proteínas integrais de junção célula-célula e é crucial para a polarização epitelial, uma característica que é perdida em células invasivas e com proliferação descontrolada [124], [129].

4.2.2. *Análise dos genes possivelmente relacionados com a regulação da diferenciação para lactogênese*

A lista de genes possivelmente envolvidos na diferenciação para a lactogênese foi obtida a partir de genes subrepresentados (seleção negativa) em relação ao controle ($p < 0.05$) na população mCherry+/CFP+ das células tratadas com IrECM e prolactina.

Como filtro inicial, nós excluímos genes compartilhados por ambas as seleções positivas (genes com sgRNAs super-representados) e negativas das populações mCherry+/CFP+ e mCherry+ (genes com sgRNAs sub-representados) que apresentaram significância estatística. Em seguida, escolhemos os genes que apareceram exclusivamente em mCherry+/CFP+ após intersecção com a lista de mCherry+ (Fig. 21).

Do total de 1028 hits da lista pós-filtragem, 937 eram genes codificadores de proteína, 54 miRs e 37 *non-target*. Em seguida, nós realizamos uma análise de miRs, similar ao que foi feito para os genes relacionados com a quiescência, selecionando os miRs cujos sgRNAs estavam super-representados em relação ao controle ($p < 0,05$). De forma que, possivelmente, o knockout destes miRs poderia resultar no aumento da expressão de genes essenciais para a diferenciação para a lactogênese.

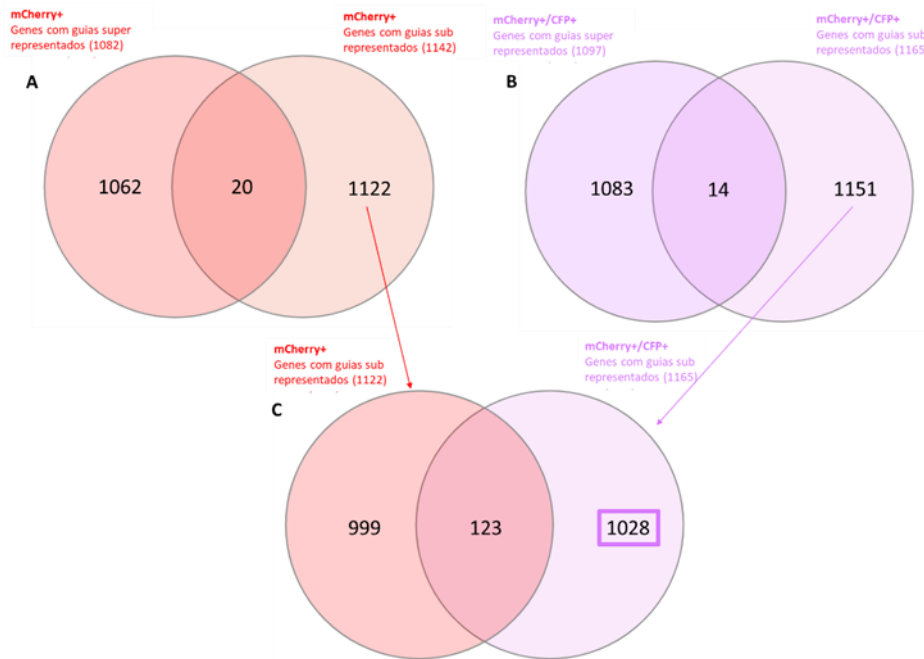


Figura 21 - Estratégia para inclusão de alvos relacionados a diferenciação para lactogênese para análise de enriquecimento de vias. A. Genes com sgRNAs nas super-representados (seleção positiva) e sub-representados (seleção negativa) da população mCherry+ ($p < 0,05$). Na intersecção aparece número de genes que apareceram tanto na seleção positiva como na negativa. Apenas os genes exclusivos da seleção negativa foram selecionados. B. Genes com sgRNAs nas super-representados (seleção positiva) e sub-representados (seleção negativa) da população mCherry+/CFP+ ($p < 0,05$). Na intersecção aparece o número de genes que apareceram tanto na seleção positiva como na negativa. C. Intersecção de genes nas seleções negativas de mCherry+/CFP+ e mCherry+ após a filtragem inicial mostrada em A e B.

Os 78 miRs foram cruzados com a lista pós-filtragem dos genes codificadores com sgRNAs sub-representados na população mCherry+/CFP+. Em seguida, realizamos a análise de vias, como descrito acima, utilizando os genes com valor $p \leq 0,01$ da lista original e os 50 genes que foram mais alvos dos 78 miR, totalizando 320 genes (Fig. 22).

A Fig. 23 apresenta as 10 vias principais, de acordo com o grau de significância, enriquecidas na lista de genes possivelmente envolvidos na diferenciação para lactogênese. Várias destas vias estão relacionadas a regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios (principalmente a partir das bases GO e KEGG) e a sumoilação de proteínas. Além disso, esta análise revelou possíveis conexões não óbvias da

assinatura gênica de lactogênese, como por exemplo, as vias relacionadas a doenças neurológicas (Parkinson, Alzheimer e Huntington).

Nós selecionamos um total de 23 genes para as análises posteriores. O critério de escolha se baseou no papel central do gene nas vias enriquecidas, além de genes codificadores de componentes e receptores da MEC (Tabela 10).

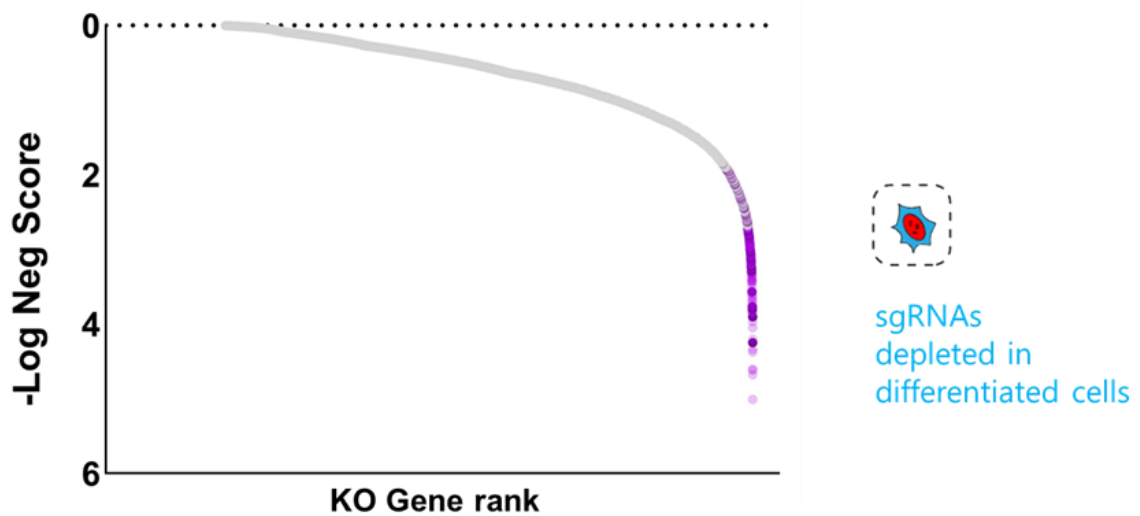


Figura 22 - O gráfico apresenta o -log do score negativo obtido pelo programa MAGEck de genes individuais em função da posição que ocupam no KO Gene rank (posição baseada no valor do score negativo) da seleção negativa das células mCherry+/CFP+. Os pontos de cor roxa indicam os genes escolhidos para a análise de vias e processos celulares (total de 320 genes; 270 que obtiveram valor de $p < 0,01$ + 50 genes da análise dos alvos de miR).

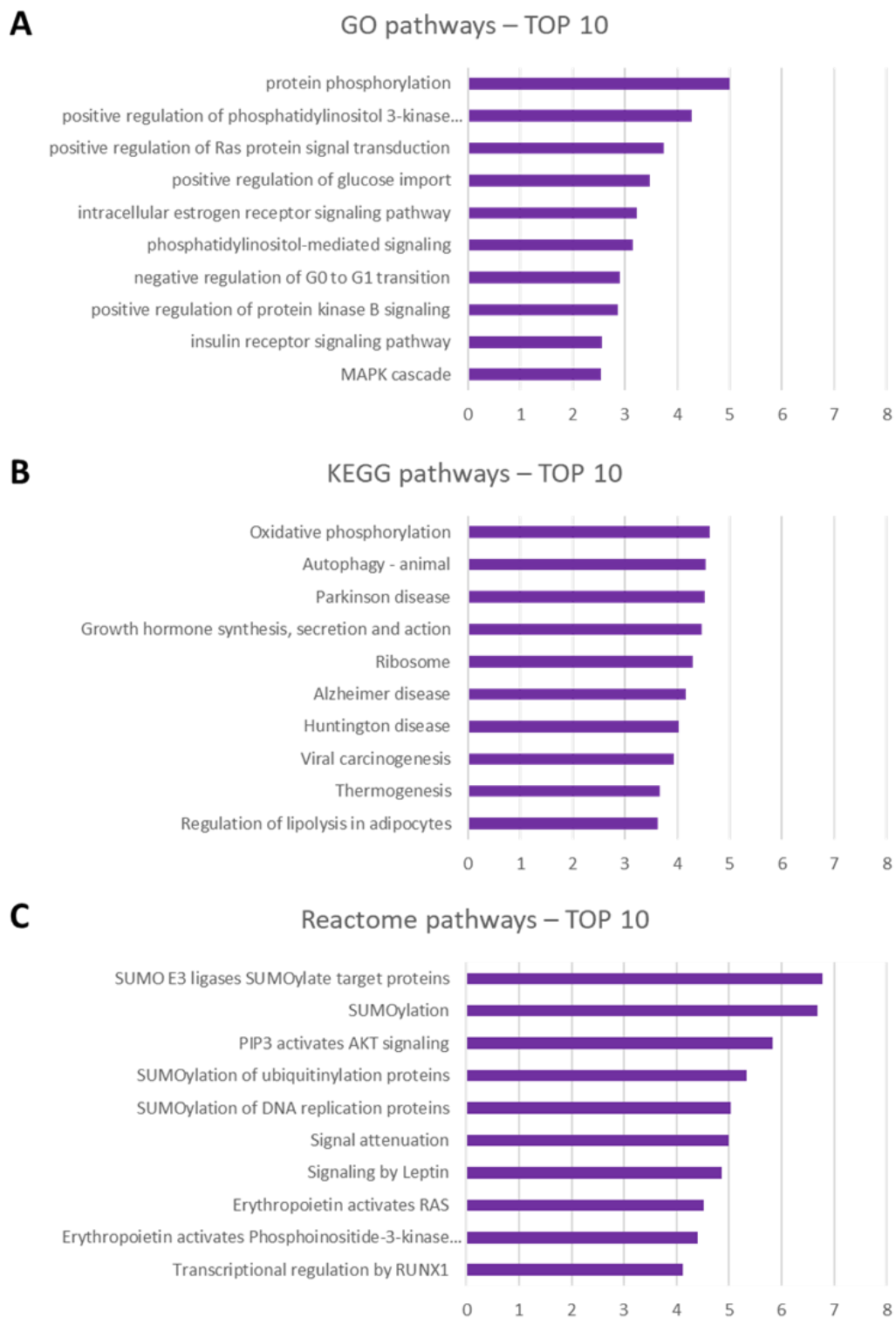


Figura 23 – Análise de enriquecimento de vias na lista de genes potencialmente reguladores da lactogênese. Os gráficos mostram as TOP10 vias e processos enriquecidos a partir das bases de dados GO (A), KEGG (B) e Reactome (C). Os eixos X dos gráficos se referem ao $-\log$ do valor de P.

Tabela 10 – Lista de genes alvo relacionados a diferenciação para lactogênese

Gene	Posição MAGEcK	miR	Breve descrição da função
Agpat6	99	0	Regulação da produção de triacilglicerol no leite [130]
Arid1a	79	7	Interage com fatores de transcrição que inibem a interação de YAP/TAZ com TEAD [131]
Bsg	137	0	Regulação da morfologia celular e organização do citoesqueleto [132]
Ers1	1022	30	Receptor de estrógeno [133]
Fras1	225	7	Regulação da integridade e organização da membrana basal [134]
Fstl1	30	31	Glicoproteína envolvida na proliferação, apoptose, metabolismo celular da glândula mamária [135]
Fto	54	18	Regula gasto energético e adipogênese [136]
Igfbp5	984	28	Participa no processo de involução da glândula mamária [137]
Il1rl1	786	31	Liga-se à IL-33, podendo ativar MAPK e NFκB [138]
Ilk	153	7	Componente intracelular de complexos de adesão célula-MEC [139]
Irs1	938	14	Mediador da sinalização de insulina [140]
Itga2	174	34	Integrina que forma heterodímero com a integrina β1 agindo principalmente como receptor de colágenos [141]
Itgb5	182	11	Integrina que forma heterodímero com a integrina αv agindo principalmente como receptor de fibronectina [142]
Jak2	191	11	Quinase central da via ativada pela prolactina [84]
Lamb3	128	4	Cadeia 2 da laminina 5. Importante para a diferenciação da glândula mamária [133]
Mfn1	48	0	Ativa a fusão da mitocôndria [143]
Ndufa11	735	15	Complexo I da cadeia transportadora de elétrons [144]
Nuak2	70	10	Modula a razão AMP:ATP e a via YAP [145]
Prkaca	14	39	Subunidade catalítica de PKA. Regula o metabolismo de carboidratos e lipídeos [146]
Rassf5	995	38	Regula a atividade de MST1/2 da via Hippo[147]
Serpine1	13	19	Inibe uPA. Regulado por EGFR e TGFβ. Ativa PI3K [148]
Slc2a4	94	26	Transporte de glicose (GLUT4) [149]

Entre nossos alvos, é possível encontrarmos JAK2, já descrito como primordial para diferenciação da glândula mamaria, ativando STAT5 e a diferenciação da glândula mamária em resposta ao estímulo com prolactina [84]. Escolhemos genes que ainda não foram muito explorados em relação a diferenciação da glândula

mamária, como IGFBP5 que não teve sua importância bem descrita no desenvolvimento da glândula mamária, mas sabe-se que IGF1 é um protagonista nesse processo [150]. NUAK2 é já foi descrito como presente nas células epiteliais em diferenciação levando a uma ativação contínua de YAP, mas na glândula mamária ele ainda não foi explorado [145].

4.3. Validação da expressão gênica dos 21 genes relacionados à quiescência e dos 23 relacionados à lactogênese.

Para este experimento, as células EpH4 foram tratadas ou não com IrECM e/ou prolactina por 48 horas e submetidas a qRT-PCR para a análise da expressão diferencial dos 21 genes relacionados à quiescência e dos 23 relacionados à lactogênese. Os dados desta análise estão compilados no Anexo 6. Os genes Akap2, Col25a1, Map3k1 e Scrt2 e Nuak não foram detectados na nossa análise. Vários genes apresentaram expressão menor na presença do IrECM: Chuk, Ephb1, Foxk1, Has3, Hey2, Irak1, Ntn1, Numb, Rpa1, Tjp1, Trp53 e Xirp1, genes relacionados à quiescência. Gpat6, Arid1a, Fstl1, Fto, Fras1, Ilk, Il1rl1, Irs1, Itga2, Prkaca, Rassf5 e Serpine1, genes relacionados à lactogênese. Os genes Cebpb, Cre3l2, Mef2a e Pten, relacionados à quiescência, e os genes Bsg, Ers1, Igfbp5, Itgb5, Jak2, Lamb3, Mfn1, Ndufa11 e Slc2a4, relacionados à lactogênese, não apresentaram mudança ou aumentaram sutilmente frente ao tratamento com IrECM.

4.3.1. Escolha de genes para a validação funcional

Nós decidimos escolher 3 genes relacionados à quiescência e 3 genes relacionados à lactogênese para validação funcional. Para a escolha, nós realizamos

uma busca no Pubmed (até setembro de 2021) de artigos que continham coocorrência de genes dentro da lista de 21 genes de quiescência (Tabela 11) ou a de 23 genes de lactogênese (Tabela 12).

Tabela 11 – Coocorrência de genes relacionados a quiescência. O número de artigos em que a coocorrência de um determinado par de genes aparece é mostrado entre parênteses.

Genes	Coocorrência
Akap2	N/A
Ankle1	N/A
Chuk	Irak1 (8), Map3k1 (31), Pten (9), Pou2f1 (1), Traf2 (74), Trp53 (14)
Creb3l2	Trp53 (1)
Cebpb	Pten (1), Traf2 (1), Trp53 (14), Pou2f1 (3), Sertad2 (1)
Col25a1	N/A
Ephb1	Numb (2), Pten (3)
Foxk1	Pten (1)
Has3	Hey2 (1), Trp53 (1), Tjp1 (1)
Hey2	Has3 (1), Numb (1), Pten (1), Trp53 (6)
Irak1	Chuk (8), Map3k1 (2), Numb (1), Pten (10), Traf2 (9), Trp53 (2)
Map3k1	Chuk (31), Irak1 (2), Pten (12), Tjp1 (25), Traf2 (13), Trp53 (9)
Mef2a	Pten (2), Tjp1 (1), Trp53 (3)
Ntn1	Tjp1 (1), Trp53 (4)
Numb	Ephb1 (2), Hey2, (1), Irak1 (1), Pten (9), Trp53 (11), Tjp1 (1)
Pten	Cebpb (1), Chuk (9), Ephb1 (3), Foxk1 (1), Hey2 (1), Irak1 (10), Map3k1 (12), Mef2a (2), Numb (9), Tjp1 (5), Traf2 (10), Trp53 (1001)
Scrt2	Trp53 (1)
Tjp1	Has3 (1), Map3k1 (25), Mef2a (1), Ntn (1), Numb (1), Pten (5), Trp53 (2)
Traf2	Chuk (74), Irak1 (9), Map3k1 (13), Pten (10), Trp53 (13), Cebpb (1)
Trp53	Cebpb (1), Chuk (14), Crebl2 (1), Has3(1), Hey2 (6), Irak1 (2), Map3k1 (9), Mef2a (3), Ntn1 (4), Numb (11), Pten (1001), Scrt2 (1), Traf2 (13)
Xirp1	N/A
Pou2f1	Chuk (1), Trp53 (12), Cebpb (3)
Csrnp3	N/A
Sertad2	Cebpb (1)
Pla2g15	N/A
Dzip1l	N/A
Rbm41	N/A

Tabela 12 – Coocorrência de genes relacionados a lactogênese. O número de artigos em que a coocorrência de um determinado par de genes aparece é mostrado entre parênteses.

Genes	Conexões
Agpat6	N/A
Arid1a	Esr1 (9), Jak2 (7), Serpine1 (2)
Bsg	Jak2 (1), Serpine1 (1), Slc2a4 (1)
Esr1	Arid1a (9), Fto (8), Igfbp5 (6), Ilk (1), Irs1 (4), Itga2 (3), Jak2 (7) Prkaca (4), Serpine1 (6), Slc2a4 (9), Fras1 (1), Cbx5 (1)
Fras1	Rph3al (1), Crtc1 (1)
Fstl1	Esr1 (8), Igfbp5 (1), Irs1 (1), Jak2 (1), Il1rl1 (1)
Fto	Crtc1 (1), Ers1 (8), Irs1 (20), Il1rl1 (1), Jak2 (2), Lyplal1 (10), Serpine1 (1), Slc2a4 (1)
Igfbp5	Ers1 (6), Fstl1 (1), Ilk (1), Irs1 (19), Itga2 (2), Jak2 (1), Nuak2 (1), Serpine1 (5), Slc2a4 (2)
Il1rl1	Fstl1 (1), Fto (1), Jak2 (6), Mfn1 (1)
Ilk	Ers1 (1), Igfbp5 (1)
Irs1	Ers1 (4), Fstl1 (1), Fto (20), Igfbp5 (19), Jak2 (105)
Itga2	Ers1 (3), Igfbp5 (2), Itgb5 (5), Lamb3 (4), Serpine1 (10), Slc2a4 (338), Crtc1 (3), Lyplal1
Itgb5	Itga2 (5), Serpine1 (1), Fras1 (1), Cbx5 (1)
Jak2	Arid1a (7), Bsg (1), Ers1 (7), Fstl1 (1), Fto (2), Igfbp5 (1), Irs1 (105), Prkaca (2), Serpine1 (2), Slc2a4 (2), Il1rl1 (6), Crtc1 (1)
Lamb3	Itga2 (4)
Mfn1	Il1rl1 (1)
Ndufa11	N/A
Nuak2	Igfbp5 (1)
Prkaca	Ers1 (4), Jak2 (2), Gng12 (1)
Rassf5	N/A
Serpine1	Arid1a (2), Bsg (1), Ers1 (6), Fto (1), Igfbp5 (5), Itga2 (10), Itgb5 (1), Jak2 (2), Slc2a4 (2)
Slc2a4	Bsg (1), Ers1 (9), Fto (1), Igfbp5 (2), Itga2 (338), Jak2 (2), Serpine1 (2)
Cbx5	Ers1 (1), Itgb5 (1)
Gng12	Prkaca (1)
Rph3al	Slc2a4 (1)
Crtc1	Fto (1), Itga2 (3), Jak2 (1), Slc2a4 (1)
Elmsan1	N/A
Lyplal1	Fto (10), Itga2 (4)

Com esta estratégia, pretendemos encontrar aquelas proteínas potencialmente *hubs* de rede de interações que regulam os processos de quiescência e diferenciação das células epiteliais mamárias. Com relação a quiescência, observamos que os genes mais citações foram: Trp53, Pten, Tjp1, Chuk, Irak1, Map3k1 e Numb. Desses,

Pten e Trp53 são amplamente estudados e descritos como reguladores do ciclo celular. Nós escolhemos os genes Tjp1, Chuk e Numb. Map3k1 foi descartado por não ter sido expresso nas células EpH4 (Anexo 6). Tjp1 foi escolhido por ser entre os candidatos o gene com mais conexões. Chuk e Irak fazem parte da mesma via, entretanto, Chuk foi escolhido por estar mais downstream na via. A escolha de Numb se deu por ele estar relacionado. Por fim, Numb foi escolhido devido seu papel conhecido na regulação de Chuk[151] e Irak1[152] e pela sua proteína interagir com P53 [153] e ZO-1 [154].

Já nos genes relacionados com diferenciação para lactogênese, nota-se que os com mais conexões foram: Jak2, Ers1, Fto, Igfbp5, Itga2, Serpine1 e Slc2a4. Jak2 é regulador central lactogênese sendo a principal quinase da via do receptor da prolactina (PRLR). Da mesma forma, Ers1 (receptor do estrógeno) tem papel amplamente conhecido na biologia mamária. O silenciamento de Jak2 será utilizado mais adiante com controle positivo nos ensaios de diferenciação. Escolhemos Fto, Igfbp5 e Itga2 como nossos alvos principais, pois abrangem diferentes camadas de vias que estão interligadas e relacionadas com a diferenciação celular; Igfbp5 regula um fator de crescimento, Itga2 é um receptor da MEC e Fto é um ativador da lipogênese, que é uma das principais funções das células epiteliais mamárias.

Com a finalidade de investigar a cinética de expressão desses genes após o estímulo de IrECM ou IrECM em conjunto com prolactina, avaliamos as quantidades relativas de mRNA dos genes alvo por qRT-PCR nos pontos experimentais 0,5, 2, 4, 8, 24 e 48 horas pós-tratamento. Este experimento de série temporal compreendendo pontos logo após o estímulo e pontos mais tardios, pode nos ajudar a compreender a provável influência da expressão gênica diferencial dos genes alvos na aquisição e manutenção do estado quiescência e comprometimento com a diferenciação.

4.3.2. Expressão dos genes alvo após estímulo com IrECM e prolactina ao longo de 48 horas

Embora não tenhamos encontrado diferenças estatísticas entre os dois regimes de tratamento, IrECM e IrECM+Prolactina, nos diferentes pontos experimentais, observa-se variações de expressão gênica ao longo do tempo. Os dois tratamentos resultaram em curvas de expressão gênica bastante parecidas (Fig. 24). De forma geral, há aumentos transitórios da expressão de todos os genes analisados. A expressão de Chuk apresenta aumento consistente, em ambos os tratamentos, entre 8 e 24 horas, seguida de queda em 48 horas. Já a expressão de Numb é aumentado entre 0.5 e 4 horas pós-tratamentos. Este apresentou dois picos de expressão em 30 minutos e em 8 horas, sendo este último pico mais proeminente nas células expostas à IrECM+Prolactina.

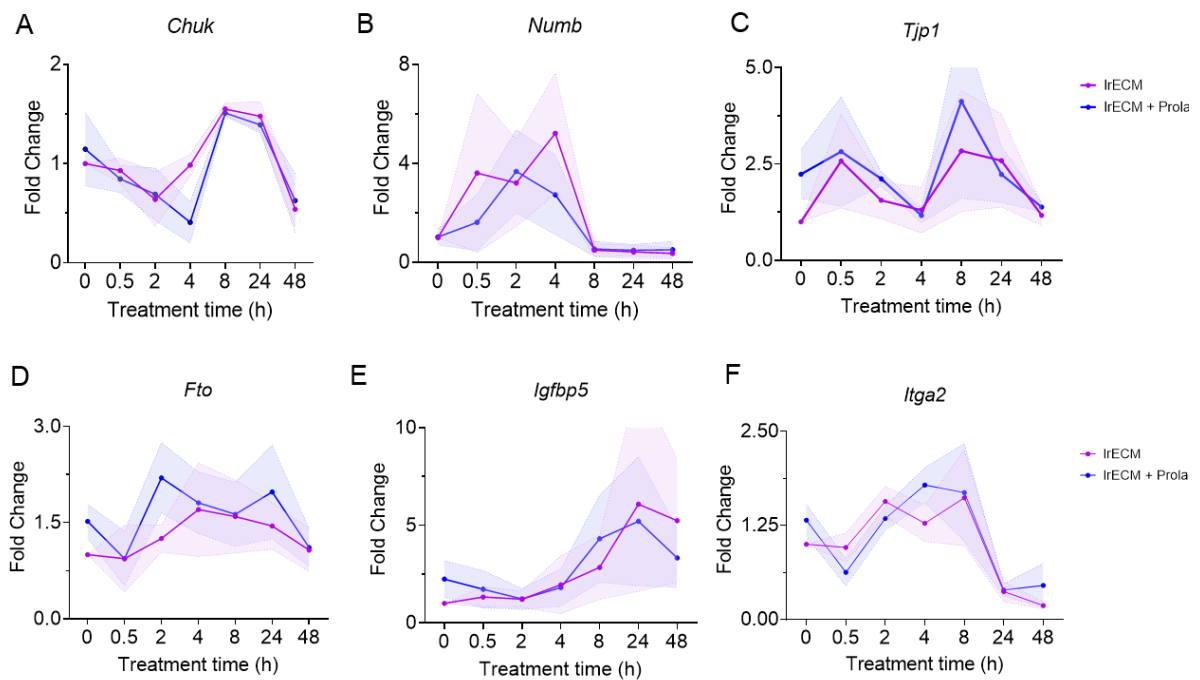


Figura 24 - Expressão dos genes alvos após estímulo com IrECM ou IrECM+Prolactina. A expressão relativa de mRNA foi avaliada por qRT-PCR nas células EpH4 tratadas por 0,5, 2, 4, 8, 24 e 48 horas com IrECM ou IrECM+ Prolactina. A - *Chuk*. B - *Numb*. C - *Tjp1*. D - *Fto*. E - *Igfbp5*. F - *Itga2*. B2M foi o gene escolhido como *housekeeping*. Os dados dos gráficos compreendem a média +/- erro padrão da média de 3 repetições (N=3) realizadas de forma independente. Os dados foram submetidos ao teste two-way ANOVA com correção False-Discovery Rate (FDR<5%) para testes múltiplos. Não foram encontradas diferenças significativas entre as diferentes condições.

A expressão de *Fto* se mostrou aumentada entre 2 e 24 horas após o estímulo do IrECM ou IrECM+Prolactina. *Igfbp5* apresentou um incremento na expressão a partir de 8 horas pós-tratamento, apresentando um pico em 24 horas seguido de uma leve redução em 48 horas. Por fim, *ITGA2* apresenta aumento de expressão após 2 horas de estímulo com IrECM e diminui em menos de 24 após o início.

No conjunto, estes experimentos demonstraram que não há diferenças estatisticamente significativas entre os dois tipos de tratamento, IrECM e IrECM+Prolactina. Entretanto, a presença da IrECM *per se* resulta em aumentos transitórios dos níveis de mRNA dos genes alvo, indicando um possível papel destes na aquisição dos estados de quiescência e de diferenciação lactogênica.

4.3.3. Validação do efeito do silenciamento dos genes alvo na quiescência e na diferenciação lactogênica

Para averiguar os efeitos da perturbação da expressão gênica dos alvos na aquisição da quiescência e na diferenciação lactogênica, utilizamos o silenciamento pós-transcricional por siRNA. Como passo inicial, confirmamos silenciamento de cada um dos siRNAs. Para tal, cultivamos as células como de rotina e transfectamo-as com o siRNA específico para cada gene alvo ou com um siRNA controle (siControl). Após 48 ou 72 horas extraímos RNA e quantificamos a expressão relativa dos genes alvo por qRT-PCR. Nesta análise, nós incluímos os genes Trp53 e Jak2, pois são, respectivamente, reguladores clássicos do ciclo celular e da sinalização para a produção de leite. Todos os siRNAs reduziram os níveis de mRNA dos genes alvo nos dois tempos de duração (Fig. 25 e 26). Entretanto, em 72 horas, observa-se uma redução da expressão dos genes alvo nas células transfectadas com o siControl Logo, para evitar um viés nas análises, optamos por usar somente o tempo de 48 horas para os ensaios de quiescência e diferenciação funcional apresentados a seguir.

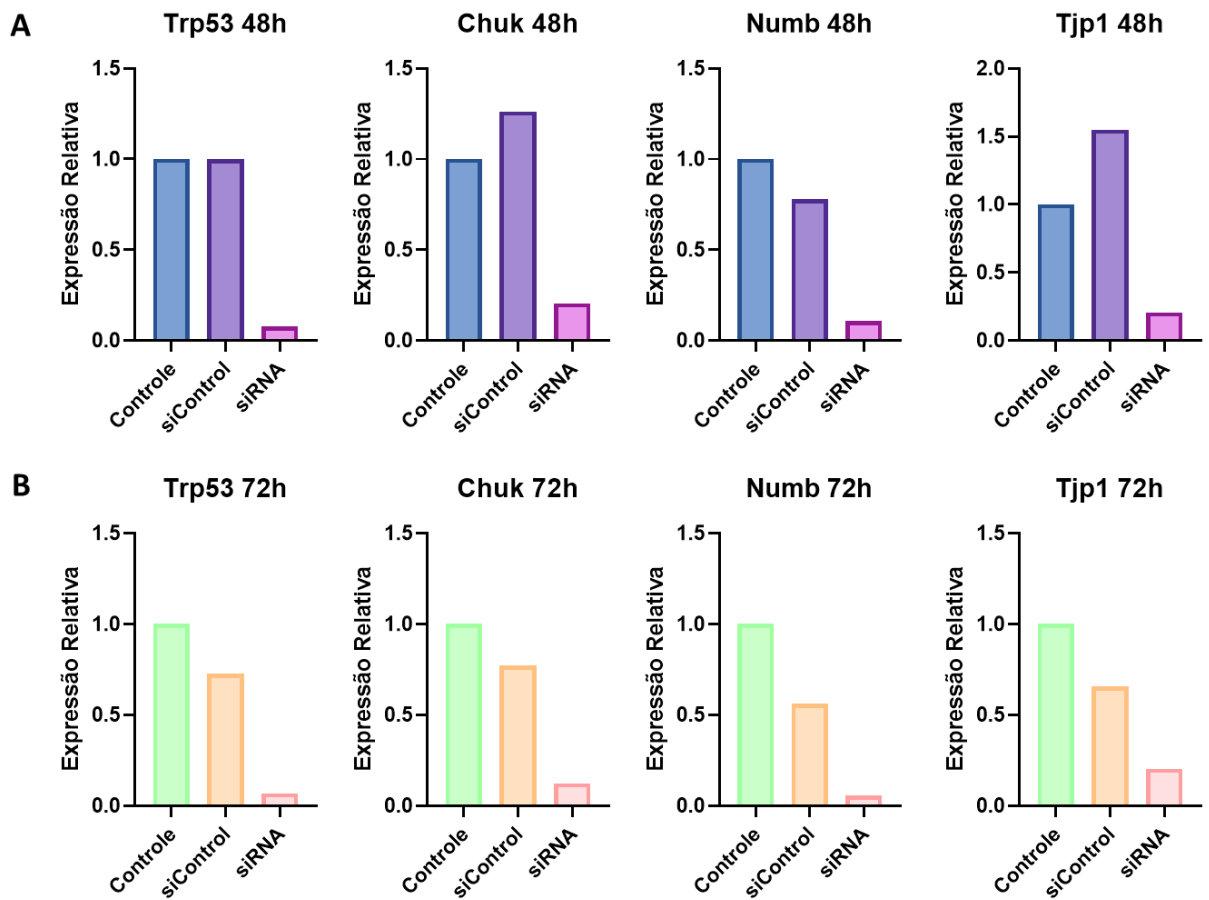


Figura 25 - Expressão relativa dos genes potenciais mediadores de quiescência após silenciamento por siRNA. Para este ensaio, foram utilizadas as células Eph4-βCas-Fucci. Cada gráfico apresenta 3 condições: Controle em que a célula não é tratada com nenhum siRNA. siControl: a célula recebe um siRNA sem alvo. siRNA: siRNA específico para o alvo indicado no título de cada gráfico. A: Extração do RNA ocorreu 48 horas após tratamento com siRNA. B: Extração do RNA ocorreu 72 horas após tratamento com siRNA. Este experimento para medida de eficiência do silenciamento foi realizado somente uma vez, portanto os gráficos não apresentam barras de desvio.

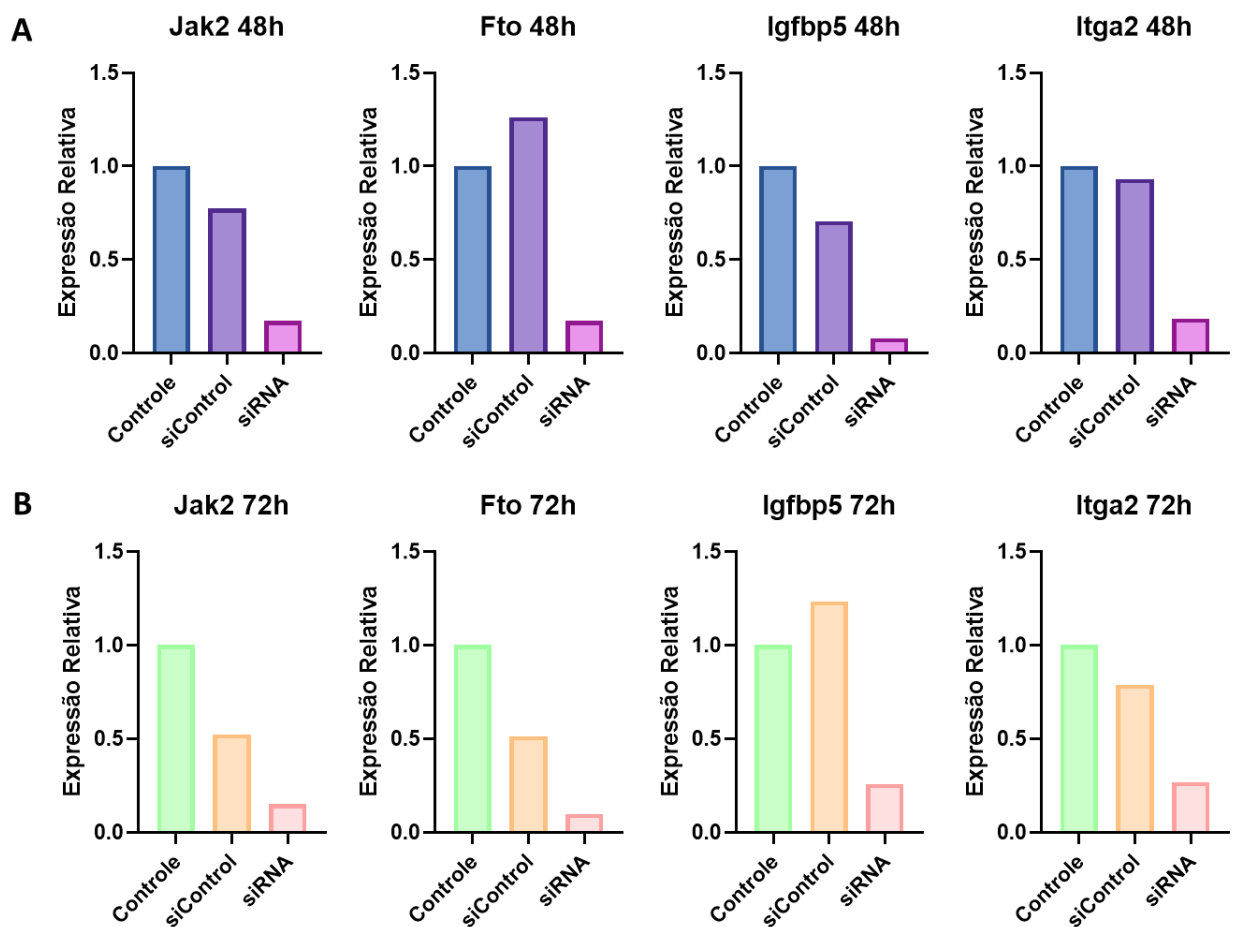


Figura 26 - Expressão relativa dos genes potenciais mediadores de diferenciação de células epiteliais mamárias após silenciamento por siRNA. Para este ensaio, foram utilizadas as células EpH4-βCas-Fucci. Cada gráfico apresenta 3 condições: Controle em que a célula não é tratada com nenhum siRNA. siControl: a célula recebe um siRNA sem alvo. siRNA: siRNA específico para o alvo indicado no título de cada gráfico. A: Extração do RNA ocorreu 48 horas após tratamento com siRNA. B: Extração do RNA ocorreu 72 horas após tratamento com siRNA. Este experimento para medida de eficiência do silenciamento foi realizado somente uma vez, portanto os gráficos não apresentam barras de desvio.

Para validarmos os genes alvo potencialmente mediadores da aquisição do estado de quiescência, tratamos as células com IrECM e quantificamos o número de células que ainda estavam ativas no ciclo celular (mCitrine+) após silenciamento com siRNA para os genes alvo.

Na Fig. 27 podemos observar a resposta das células EpH4-βCas-FUCCI quando são tratadas com prolactina e/ou IrECM por 48 horas. As células responderam

ao tratamento conforme esperado: na ausência de IrECM há muitas células nas fases S/G2/M (mCitrine+); na presença de IrECM a maioria das células encontram-se em G1 (mCherry+); e com o co-tratamento, IrECM + Prolactina, além de entrarem em quiescência, a maioria das células expressa β -caseína (mCherry+/CFP+).

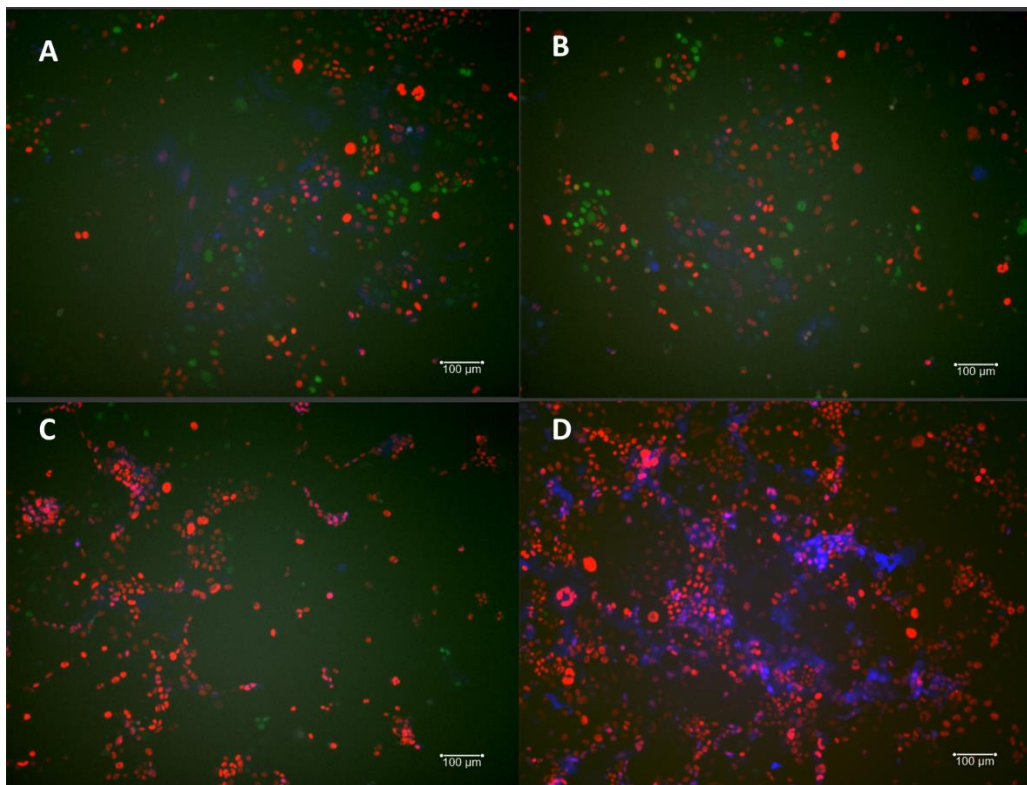


Figura 27 - Células EpH4- β Cas-CFP-FUCCI tratada com IrECM por 48 horas. A – Controle sem IrECM e sem prolactina. Muitas células estão nas fases S/G2/M. B – Controle sem IrECM e com prolactina. Muitas células estão nas fases S/G2/M. C – Tratamento com IrECM sem prolactina. A maioria das células encontra-se nas fases G1, mas não expressam β -caseína. D – Tratamento com IrECM e prolactina. A maioria das células encontra-se nas fases G1 e expressam β -caseína. Os parâmetros de captura e processamento foram os mesmos para todas as imagens. Barra de aumento = 100 μ m. Experimento realizado 3 vezes (N = 3) e em triplicata técnica.

Na Fig. 28 é possível observar a resposta aos mesmos tratamentos mostrados na Fig. 27, porém expostas aos diferentes siRNAs. De forma geral, a partir de uma análise qualitativa, os siRNAs parecem induzir um aumento no número de células mCitrine+. Para avaliar essa diferença mais detalhadamente, usamos o software Strataquest como descrito na seção material e métodos e quantificamos as células

que estavam em S/G2/M (mCitrine+). Entretanto, somente o silenciamento de Tjp1 resultou em aumento do número relativo, em relação ao siControle, de células ciclantes após o tratamento com IrECM (Fig. 29).

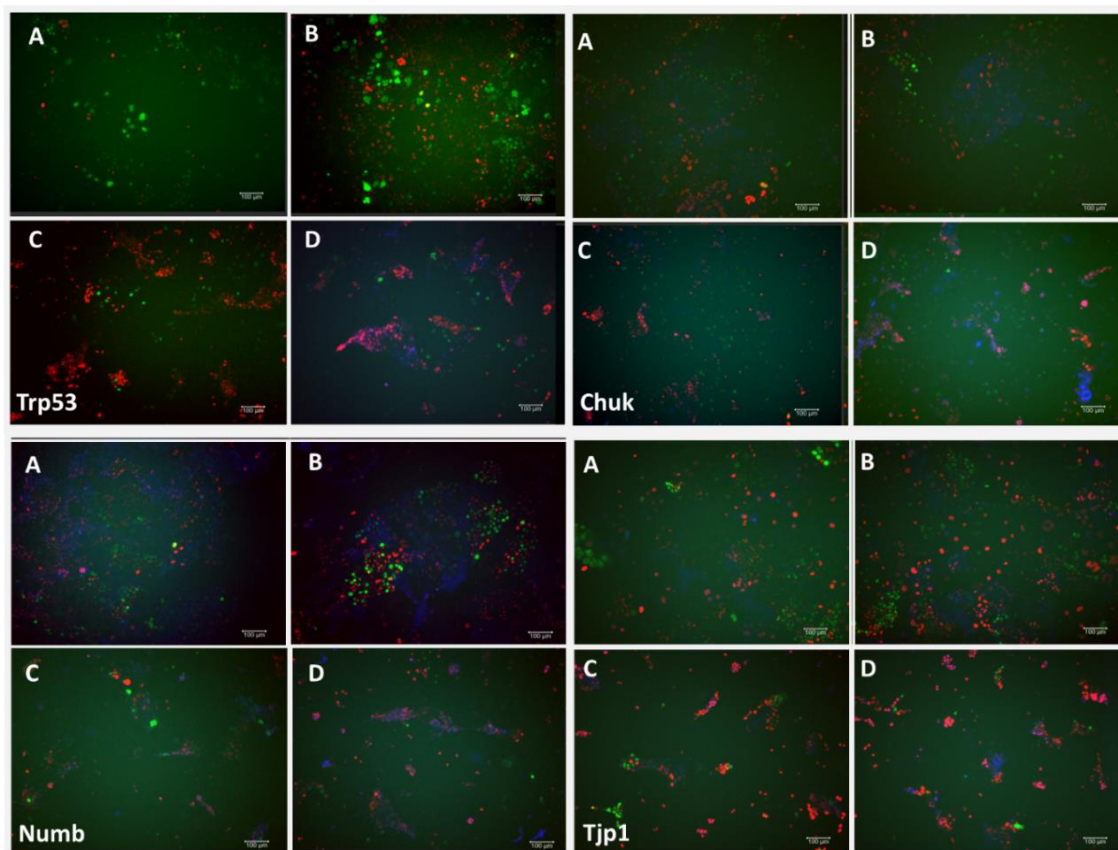


Figura 28 - Células EpH4-βCas-CFP-FUCCI tratadas com os siRNA para Trp53, CHUK, NUMB e Tjp1 e IrECM e/ou prolactina por 48 horas. A – Controle sem IrECM e sem prolactina. B – Controle sem IrECM e com prolactina. C – Tratamento com IrECM sem prolactina. D – Tratamento com IrECM e prolactina. Os parâmetros de captura e processamento foram os mesmos para todas as imagens. Barra de aumento = 100μm. Experimento realizado 3 vezes (N = 3) e em triplicata técnica.

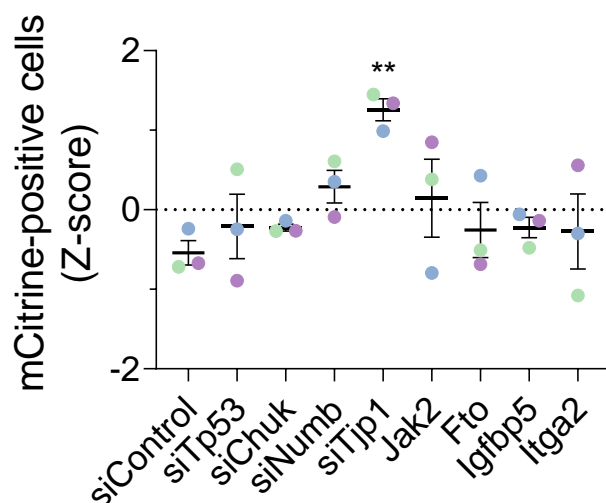


Figura 29 - O silenciamento de Tjp1 resulta em aumento da proliferação em células tratadas com IrECM. Variação relativa no número de células mCitrine+ (células em S/G2/M) em resposta ao silenciamento dos genes alvos em células cultivadas na presença de IrECM. A porcentagem de células mCitrine+ de cada replicata biológica foi normalizada através do método Z-Score ($Z = \frac{x - \mu}{\sigma}$) para atenuar o “batch effect”. Cada replicata biológica é representada por um símbolo de cor diferente. A média +/- SEM das três repetições (N =3) são apresentados no gráfico. Os ** denotam diferença estatística ($p < 0.01$).

Aprofundamos os estudos dos diferentes siRNAs avaliando o efeito de cada siRNA frente aos tratamentos: prolactina, IrECM e IrECM+Prolactina. Apenas na condição com o siControle houve redução significativa da porcentagem de células mCitrine+ frente aos tratamentos com IrECM e IrECM+Prolactina (Fig. 30). Todos os siRNAs específicos inibiram o efeito dos tratamentos contendo IrECM na porcentagem de células mCitrine+, mostrando que, muito provavelmente todos os genes escolhidos para a validação neste ensaio funcional medeiam a sinalização de quiescência induzida pela IrECM.

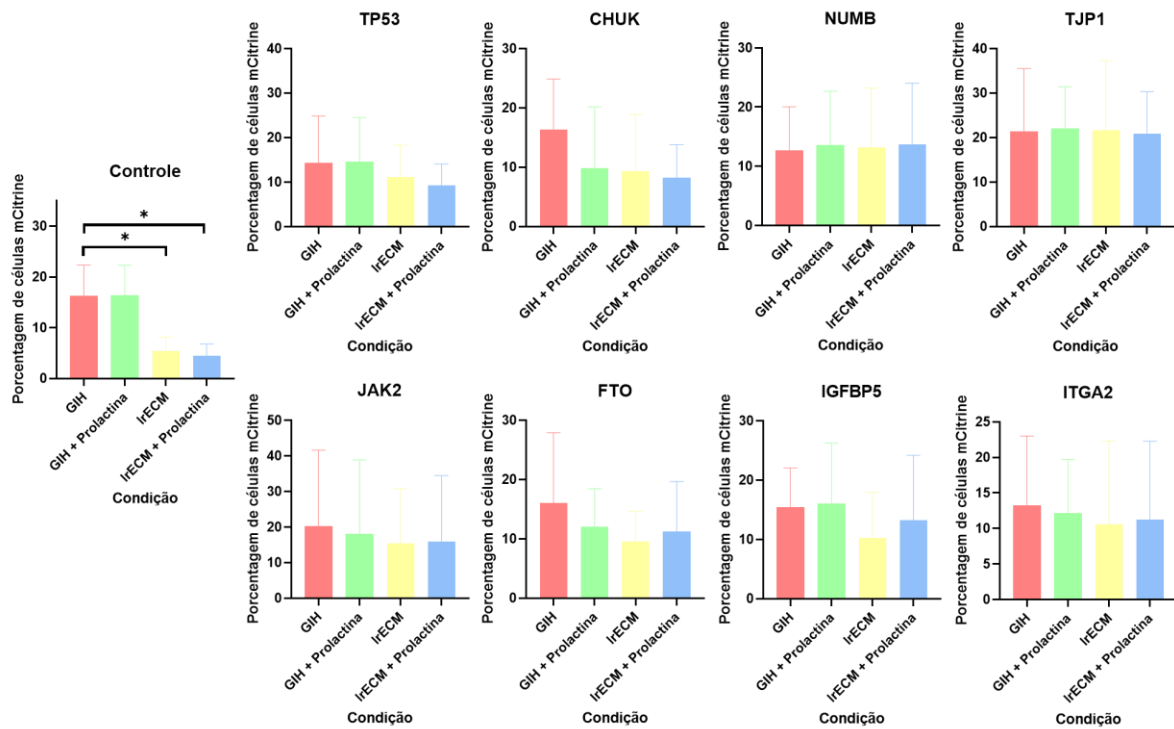


Figura 30 – O silenciamento dos genes alvo envolvidos em quiescência e lactogênese afeta a resposta à IrECM. Gráficos da porcentagem de células mCitrine+ após silenciamento com siRNA. As células foram cultivadas: em meio GIH, meio GIH+Prolactina, meio GIH+IrECM e meio GIH+IrECM+Prolactina. GIH = o meio definido composto por gentamicina, hidrocortisona e prolactina. Matrigel = MEC rica em laminina-111 (IrECM). Apenas a condição com siRNA apresenta diferença estatística (* indica $P < 0,05$) entre as condições GIH versus IrECM e GIH versus IrECM+Prolactina. A média \pm SEM das três repetições experimentais (N=3) são apresentados no gráfico.

Para investigar o efeito do silenciamento dos genes na lactogênese, quantificamos a intensidade de CFP (do repórter promotor de β -caseína-CFP) das células EpH4- β cas-Fucci tratadas com IrECM + prolactina. Para tal somamos a intensidade detectada e dividimos pelo número de células mCherry+ de cada campo microscópico. Na Fig. 31 podemos observar as micrografias das células tratadas com siRNAs específicos e IrECM e/ou prolactina. Qualitativamente, em relação as células sem tratamento com siRNA, todos os siRNAs reduziram a expressão de β -caseína-CFP, o que foi confirmado com a análise quantitativa através do software Strataquest (Fig. 32).

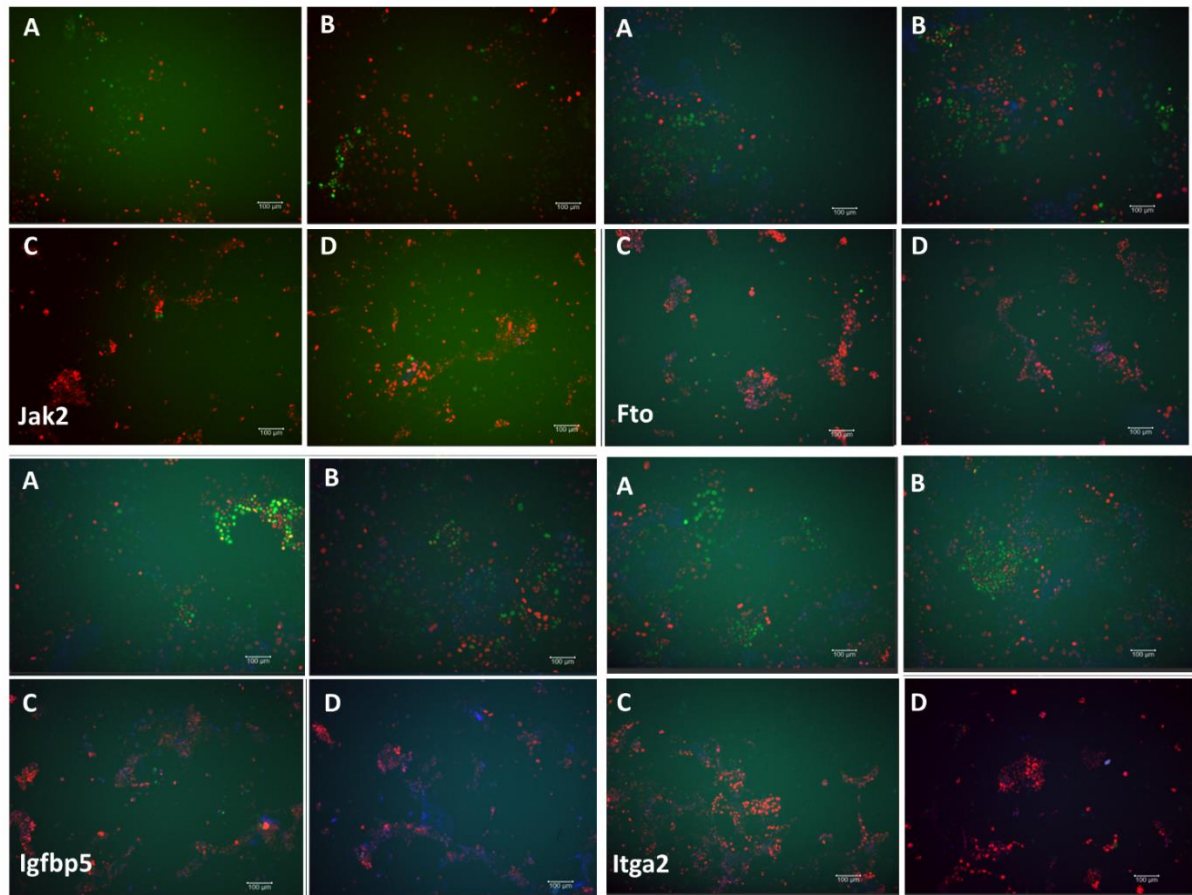


Figura 31 - Eph4-βCas-CFP-FUCCI tratada com os siRNA de Jak2, Fto, Igfbp5 e Itga2 e IrECM e/ou prolactina por 48 horas. A – Controle sem IrECM e sem prolactina. Muitas células estão nas fases S/G2/M. B – Controle sem IrECM e com prolactina. Muitas células estão nas fases S/G2/M. C – Tratamento com IrECM sem prolactina. A maioria das células encontra-se nas fases G1, mas não estão diferenciadas para produção de β-caseína. D – Tratamento com IrECM e prolactina. A maioria das células encontra-se nas fases G1 e está diferenciada expressando β-caseína. Os parâmetros de captura e processamento foram os mesmos para todas as imagens. Barra de aumento = 100μm.

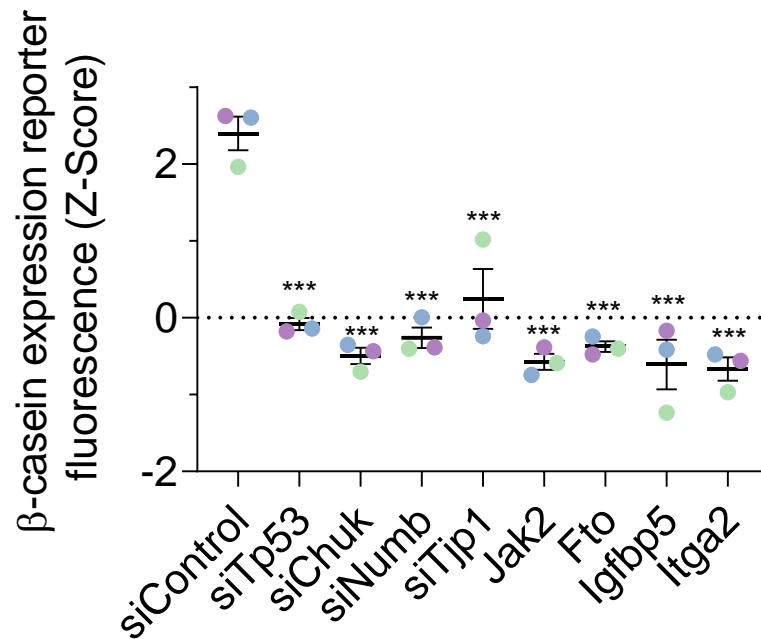


Figura 32 – A expressão de β -Caseína é reduzida em resposta ao silenciamento por siRNA de todos os alvos. Variação relativa na intensidade de fluorescência do repórter para a expressão de β -Caseína resposta ao silenciamento dos genes alvos em células cultivadas na presença de IrECM+Prolactina. A intensidade de fluorescência média de cada replicata biológica foi normalizada através do método Z-Score ($Z=x-\mu/\sigma$) para atenuar o “batch effect”. Cada replicata biológica é representada por um símbolo de cor diferente. A média +/- SEM das três repetições experimentais (N=3) são apresentados no gráfico. *** denota diferença estatística significativa ($p<0,001$).

Assim como realizado para o ensaio de quiescência, analisamos o efeito do silenciamento dos alvos frente aos diferentes tratamentos e medimos a intensidade de fluorescência do repórter β -caseína-CFP. Somente as células tratadas com o siControle seguiram o padrão esperados; apresentaram expressão robusta de β -caseína em resposta ao tratamento com IrECM+Prolactina [80]. Por outro lado, todos os siRNAs específicos interferiram com a capacidade da célula de se diferenciar frente ao estímulo lactogênico.

No conjunto, os ensaios funcionais indicam que todos os genes candidatos testados têm papel potencial na aquisição dos estados de quiescência e diferenciado.

Era esperado que o silenciamento de genes associados a quiescência resultaria na diminuição da expressão de β -caseína, devido ao acoplamento destes dois processos. Todavia, é surpreendente que o silenciamento de genes com sgRNA sub-representados nas células mCherry+/CFP (células diferenciadas) iniba também a aquisição da quiescência.

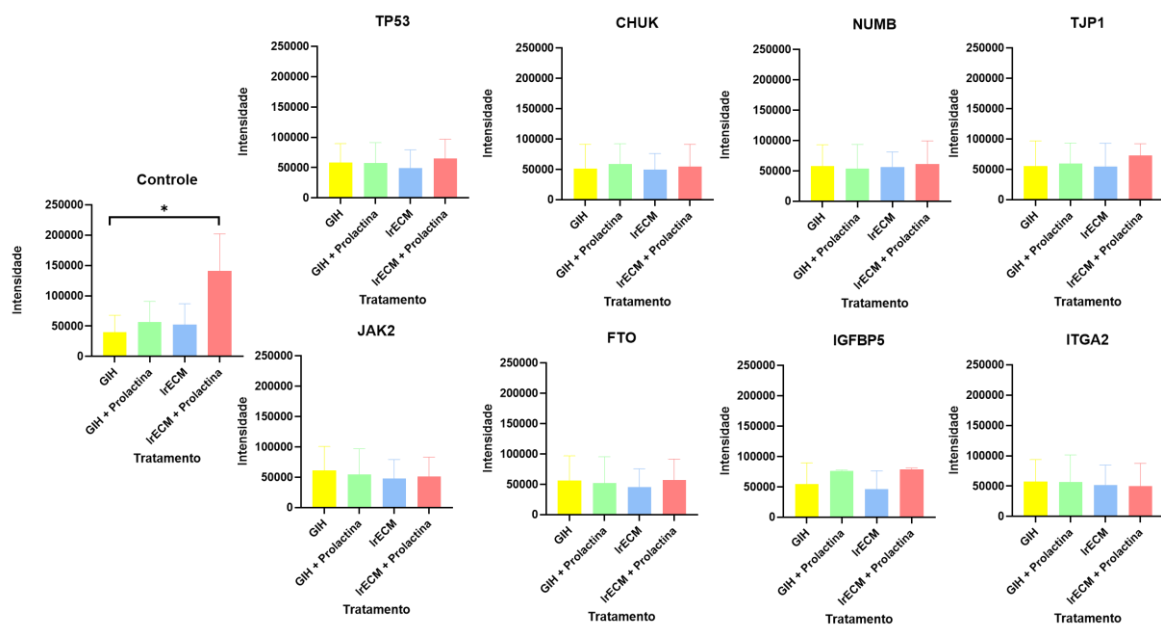


Figura 33 – O silenciamento dos genes alvo envolvidos em quiescência e lactogênese afeta a resposta a indução de expressão de β -caseína. Gráficos da intensidade de CFP (gerada pela expressão do repórter β -caseína-CFP) após silenciamento com siRNA. As células foram cultivadas: em meio GIH, meio GIH+Prolactina, meio GIH+IrECM e meio GIH+IrECM+Prolactina. GIH = o meio definido composto por gentamicina, hidrocortisona e prolactina. Matrigel = MEC rica em laminina-111 (IrECM). Apenas a condição com siRNA apresenta diferença estatística (* indica $P < 0,05$) entre as condições GIH versus IrECM e GIH versus IrECM+Prolactina. A média \pm SEM das três repetições experimentais (N=3) são apresentados no gráfico

5. Discussão

Para que um tecido seja formado e exerça a sua função, é necessário um equilíbrio dinâmico e delicado entre a quiescência, proliferação, sobrevivência e diferenciação celular sendo todos esses processos rigidamente controlados e coordenados [155]. O tecido mamário é moldado em três diferentes fases da vida, no estágio embrionário, durante a puberdade e a gravidez. A capacidade da célula de poder reativar o ciclo celular durante essas etapas é primordial, assim como a necessidade de entrar em quiescência para que ocorra a diferenciação [155].

Para estudarmos a quiescência e diferenciação da glândula mamária, neste trabalho foi desenvolvido um modelo celular. Escolhemos as células EpH4 por manterem características não tumorais, inclusive como polarização e diferenciação funcional, frente aos estímulos da matriz extracelular. Inserimos dois plasmídeos nessa linhagem: o plasmídeo ES-FUCCI [94] para identificarmos as fases do ciclo celular e β -Caseína/CFP [80] que permite identificar as células diferenciadas para lactogênese. A linhagem EpH4- β -Cas-FUCCI consiste numa ferramenta poderosa que foi empregada com sucesso no presente projeto e tem sido utilizada regularmente em outros projetos desenvolvidos no laboratório.

A escolha da biblioteca CRISPR/Cas9 GeckoV2 para o screen de identificação de reguladores da quiescência e da lactogênese nos permitiu abranger todo o genoma de forma específica, com o mínimo de viés possível e de forma estável [156], pois é baseado em vetores lentivirais e contém RNAs guias que alvejam todos os genes codificadores e miRNAs conhecidos.

O nosso laboratório foi capaz de amplificar a biblioteca GeckoV2 com distribuição proporcional dos diferentes sgRNAs similares à da biblioteca original. Além disso, nós produzimos quantidades de plasmídeos da biblioteca suficientes para o presente trabalho e para suprir as necessidades de projetos futuros do nosso laboratório de colaboradores.

Foram necessárias duas rodadas de sequenciamento para se atingir a cobertura de sequenciamento de no mínimo 100x para o screen. Após filtros baseados em compartilhamento de genes nas seleções negativas e positivas de células em estados distintos, nós estabelecemos listas de genes codificadores possíveis candidatos a reguladores da quiescência (939) e para lactogênese (937). Estas listas foram posteriormente reduzidas (21 genes “quiescência” e 23 genes “lactogênese”) levando-se em consideração a informação sobre enriquecimento de miRs, enriquecimento de vias e papel conhecido na constituição da MEC e de receptores de moléculas da MEC. As listas originais e as listas reduzidas poderão ser no futuro cruzadas com datasets de células mamárias de lactantes e de câncer de mama para a geração de *insights*, potencialmente com relevância clínica.

Antes da definição de candidatos a serem testados, nós realizamos uma análise de expressão gênica para os genes das listas reduzidas. A maioria dos genes foi expressa nas células EpH4 e apresentaram variação frente aos tratamentos com IrECM e IrECM+Prolactina. Os genes não expressos foram excluídos das análises posteriores. Com base na coocorrência na literatura de pares de genes das listas reduzidas, nós selecionamos 3 candidatos de cada processo, quiescência ou lactogênese, para a validação em ensaios funcionais baseados no silenciamento por siRNA e avaliação dos diferentes estados celulares por microscopia de fluorescência.

Experimentos do tipo time-course demonstraram que os 6 genes escolhidos para a validação funcional apresentam aumento transitório de expressão logo após o tratamento com IrECM ou IrECM+Prolactina. Não foram encontradas diferenças nas respostas entre as duas condições, IrECM e IrECM+Prolactina, somente em função do tempo pós-tratamentos. De forma geral, há aumentos transitórios da expressão de todos os genes analisados. Estes resultados indicam que o aumento da expressão destes genes, mesmo que transitório, é importante para a saída do ciclo celular e estabelecimento do programa de expressão gênica que sustenta a produção de leite. A resposta não diferencial na presença ou ausência de prolactina sugere que outras camadas regulatórias, como por exemplo regulação traducional e pós-traducional, podem ser relevantes para a lactogênese.

Todos os siRNAs testados foram capazes de reduzir eficientemente os níveis de mRNA dos alvos em 48 e 72 horas pós-transfecção. Entretanto, o tratamento com o siControle também gerou alteração da expressão dos genes alvo pós 72 horas, portanto decidimos realizar os ensaios funcionais com somente 48 horas pós-transfecção dos siRNAs.

Quando comparamos o efeito do silenciamento dos diferentes genes no número relativo de células mCitrine+ após a indução da quiescência com IrECM, somente a redução de Tjp1 levou a um aumento relativo desta população. Curiosamente, o silenciamento de Trp53 não gerou o resultado esperado para este conhecido indutor da parada do ciclo. Entretanto, quando analisamos o padrão de resposta frente a condições sem IrECM, o silenciamento de todos os genes, incluindo Trp53, levou as células a terem porcentagem da população mCitrine similar em todas as condições, com e sem IrECM. Provavelmente, o silenciamento dos alvos afeta o estado proliferativo basal das células, mesmo na ausência

de IrECM, e quando comparamos os efeitos dos diferentes siRNAs no tratamento com IrECM isoladamente, esta diferença é ofuscada.

É importante ressaltar que nas diferentes repetições independentes dos experimentos encontramos variações consideráveis nos números das células proliferativas nas mesmas condições. Esta variação entre as repetições se deve, provavelmente, a flutuações de fluorescência das células, do microscópio de fluorescência, número de células plaqueadas e configurações de captura de imagens. Além disso, o uso de siRNA, devido à natureza transitória dessa ferramenta em comparação com métodos de expressão estável como shRNA baseado em lentivírus ou o knockout com CRISPR-Cas9, pode ter contribuído com esta variação. Este efeito dependente da replicata (*batch effect*) foi atenuado através do método de normalização Z-score, recomendado para análises quantitativas de imagens [157].

O silenciamento de Tjp1 gerou o resultado mais robusto na indução do aumento de células mCitrine+ (possivelmente ciclantes) mesmo na presença de IrECM. Tjp1 codifica uma proteína de membrana, a ZO-1, essencial para a formação das junções epiteliais do tipo zônulas de oclusão (ou tight junctions; TJ) que contribui para a manutenção da polaridade e permeabilidade seletiva das camadas epiteliais [158]. ZO-1 interage com domínios citoplasmáticos de proteínas juncionais transmembranares [129] e com proteínas citosólicas, formando o cerne de complexos proteicos nas interfaces célula-célula onde várias proteínas envolvidas na transdução de sinal e modulação transcricional são recrutadas [159], [160]. Estas incluem proteínas envolvidas na proliferação e diferenciação epitelial que conferem a ZO um papel que vai muito além de sua função na regulação da permeabilidade paracelular e manutenção da morfologia epitelial [161]. Já foi demonstrado

que ao transmitir informações sobre o grau de contato célula-célula com o núcleo, as proteínas ZO influenciam o equilíbrio entre proliferação e diferenciação. regulam a expressão gênica [129], [160]. Por exemplo, ZO-1 pode regular a proteína de ligação ao ácido nucleico associada ao ZO-1 (ZONAB), um fator de transcrição Y-box que promove a proliferação de células epiteliais induzindo a expressão de ciclina D1 (CycD1) e antígeno nuclear de célula em proliferação (PCNA) [162]. CycD1 impulsiona a transição de fase G1 para S [163]. Ao sequestrar ZONAB nas TJ e, assim, reduzindo sua localização no núcleo, a ZO-1 é capaz de reduzir a proliferação celular [162].

Ademais, células epiteliais não tumorais mamárias como as EpH4 ou linhagens humanas como a S1 e as MCF10A imersas numa MEC 3D rica em laminina forma estruturas epiteliais polarizadas que apresentam localização basal de integrinas e distribuição apical de ZO-1, assim como células mamárias *in vivo* em condições fisiológicas. Por outro lado, uma das características principais da citoarquitetura de células de adenocarcinomas é a perda da polarização basal e apical associada a fenótipos invasivo e proliferativo. Nestas células a distribuição de integrinas não é exclusivamente basal e de ZO-1 não é apical, resultando na deficiência na formação de TJs [164].

Estes resultados evidenciam um dos possíveis papéis de Tjp1 na regulação da transição quiescência-proliferação e podem justificar os nossos resultados; uma maior porcentagem de células com ciclo celular ativo mesmo com o estímulo de quiescência da IrECM. Entretanto, mais pesquisas são necessárias para dissecar o papel de ZO-1 na regulação da quiescência pela MEC e como sinais da MEC podem regular a localização celular correta de ZO-1.

Já a proteína adaptadora endocítica NUMB compartilha homologia com uma família de adaptadores endocíticos seletivos de carga [165]. A proteína NUMB é capaz de inibir a via de NOTCH, mas os mecanismos ainda são muito controversos, sendo que existem dados que sugerem que NUMB pode tanto regular positivamente a endocitose de NOTCH1, quanto regular negativamente a reciclagem de NOTCH1 [166]–[168]. Adicionalmente, knockdown ou knockout de NUMB em células HeLa resultara aumento da proliferação e localização aberrante de YAP1 no núcleo em condições confluentes, sendo esse processo dependente de ERBB5 e STAT5, ambas proteínas muito importantes na glândula mamária [169], [170]. É importante ressaltar que NUMB pode ter um papel de supressor tumoral por regular, além de NOTCH, a proteína P53. Numb se liga e inibe Mdm2, a E3-ligase que ubiquitina P53 para a degradação via proteassoma. A deleção de NUMB resulta em aumento de P53 e como consequência uma resposta defeituosa dos pontos de verificação do ciclo celular dependentes de P53 [165]. NUMB também interage com o complexo PAR e regula a formação de junções aderentes e TJs [165].

Furuta e colegas demonstraram que a atividade de P53, proteína com múltiplas funções com destaque na ativação da parada do ciclo celular e da apoptose, é aumentada em células não-tumorais mamárias humana, mas não em células malignas, em resposta as lamininas-111 e -322 [171].

Em artigo bastante recente com estratégia experimental semelhante ao do nosso trabalho. A perda de Traf3 ativa de forma específica a sinalização NF- κ B não canônica, desencadeando uma resposta imune inata que ativa a divisão celular independentemente de mecanismos de proliferação dependentes de densidade conhecidos [172].

Não exploramos no presente trabalho o gene Traf3 e o seu envolvimento na mediação de sinais de quiescência a partir da MEC é ainda desconhecido. Porém, Chuk (também conhecido como IKK α), um dos candidatos principais do nosso screen faz parte da via NF- κ B. Ao contrário de Traf3, a atividade de IKK α leva ativação das vias não canônicas e canônicas de NF- κ B por fosforilar I κ Bs levando a degradação deste inibidor dos fatores de transcrição efetores da via NF- κ B [173]. NF- κ B pode tanto promover como inibir a transição G1/S dependendo do tipo celular e do contexto. A superexpressão de RelA ou c-Rel, fatores de transcrição efetores da via NF- κ B, bloqueiam a transição G1/S em células pró-B e células HeLa, respectivamente [174], [175] Estes efeitos parecem resultar da ativação de p53 após superexpressão de NF- κ B. Além disso, RelA e p50 são capazes de induzir a parada do ciclo celular em células epiteliais, através da indução da CKI p21Waf1 [176], [177].

A partir dos nossos dados e dessas evidências da literatura, uma hipótese plausível seria que Chuk, NUMB, p53 e ZO-1 possam interagir e agir de forma coordenada na mediação de sinais de quiescência originadas pela adesão das células epiteliais à laminina. Apesar de não fornecermos evidências deste mecanismo no presente trabalho, essa hipótese deverá ser objeto de pesquisa em projetos futuros do nosso laboratório.

O silenciamento de todos os genes candidatos, originados da lista de mediadores de quiescência e da lista de lactogênese, levaram a redução da expressão de β -caseína. No caso dos “genes de quiescência” este efeito é esperado uma vez que os mecanismos moleculares dinâmicos e de rearranjo drástico de estruturas celulares que ocorrem durante a proliferação, são incompatíveis com aquisição de função. Para se diferenciar e exercer funções como contração, transmissão de impulsos elétricos e produção leite, as

células têm que pausar o ciclo celular. Portanto, os mecanismos moleculares que permeiam a diferenciação celular são acoplados a manutenção do estado de quiescência [34]. Todavia, é surpreendente que o silenciamento de genes com sgRNA sub-representados nas células mCherry+/CFP (células diferenciadas) iniba também a aquisição da quiescência.

O silenciamento de *Itga2*, *Fto* e *Igfbp-5* resultaram em diminuição da expressão de β -caseína após o tratamento com IrECM+Prolactina. O gene *Fto* é classicamente implicado com a adipogênese[178]. Há evidências, entretanto, de que sua expressão aumentada na glândula mamária após o estímulo de sucção pela prole [136], mas o papel de *Fto* na sinalização que ativa a produção de leite ainda não foi explorada e, até onde sabemos, nós apresentamos aqui a primeira evidência do possível envolvimento de *Fto* na lactogênese. Por outro lado, há evidências de que a *Igfbp-5* seja essencial para o desenvolvimento da glândula mamária, particularmente no mecanismo de regulação de morte das células epiteliais mamárias que ocorre durante o estágio involutivo pós-desmame. Experimentos em cultura demonstraram que a *Igfbp-5* se diretamente liga à laminina, fibronectina e colágenos [179]. Embora pouco se saiba sobre o papel dessa proteína na diferenciação para lactogênese, sabemos que seu principal parceiro, IGF1, é um protagonista nesse processo [150]. A respeito de *Itga2*, camundongos *knockout* para este gene apresentam a ramificação da glândula mamária prejudicada [180]. A expressão de *Itga2* é alterada durante a tumorigênese [180]–[182]. *Itga2* codifica a integrina- α 2 que forma heterodímero com a integrina- β 1 e age classicamente como receptor de colágenos [183]. Entretanto, alguns estudos demonstraram integrina- α 2 pode também interagir com lamininas. Não há indicações explícitas na literatura da interação entre *Itga2*, *Fto* e *Igfbp-5*. É possível que

estas proteínas não interajam diretamente, mas que participe do circuito regulatório que conecta a MEC ao programa de expressão que regula a produção de leite.

Finalmente, acreditamos que os resultados desta tese contribuam para o conhecimento científico básico sobre a regulação da decisão proliferação-quiescência e que o conjunto de dados gerados possam fundamentar outros estudos da área da regulação do ciclo celular em contextos fisiológicos, além de estudos translacionais.

6. Conclusões

- O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de um modelo de celular que permite o monitoramento e isolamento por microscopia e citometria de células epiteliais mamárias em diferentes estados, quiescentes, com o ciclo celular ativo ou funcionalmente diferenciadas.
- A amplificação da biblioteca CRISPR/KO GeCKO permitiu a execução do *screen* genético deste estudo e será utilizada para outros projetos do laboratório e de colaboradores.
- A partir do *screen*, geramos listas de genes envolvidos na quiescência e uma lista de genes envolvidos na lactogênese.
- A expressão dos 6 genes alvos escolhidos para a validação funcional aumentou transitoriamente em resposta à IrECM. Não foram encontradas diferenças estatísticas na expressão destes genes quando comparamos os tratamentos IrECM ou IrECM + Prolactina.
- O silenciamento dos 6 genes alvos impactou a capacidade de resposta das células epiteliais mamárias aos estímulos de quiescência e de expressão de β -caseína.
- *Tjp1* foi um gene-candidato relacionado a quiescência que possui os resultados mais promissores dentre os escolhidos. O silenciamento de *Tjp1* em células expostas à IrECM resultou uma quantidade semelhante de células com o ciclo celular ativo às células não-tratadas.
- *Itga2* foi o gene-candidato relacionado a diferenciação para lactogênese que possui os resultados mais promissores dentre os escolhidos. O silenciamento de *Itga2* inibiu

a capacidade das células epiteliais mamárias de se diferenciar frente aos estímulos lactogênicos.

7. Referências

- [1] P. M. Nurse, "Cyclin dependent kinases and cell cycle control," in *Bioscience Reports*, 2002.
- [2] P. H. O'Farrell, "Quiescence: early evolutionary origins and universality do not imply uniformity," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 366, no. 1584, pp. 3498–3507, 2011.
- [3] J. A. Smith and L. Martin, "Do Cells Cycle? (cell kinetics/control of growth/DNA replication/cell culture)," vol. 70, no. 4, pp. 1263–1267, 1973.
- [4] L. Duan *et al.*, "Negative regulation of EGFR-Vav2 signaling axis by Cbl ubiquitin ligase controls EGF receptor-mediated epithelial cell adherens junction dynamics and cell migration," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 1, pp. 620–633, Jan. 2011.
- [5] J. C. Limas and J. G. Cook, "Preparation for DNA replication: the key to a successful S phase," *FEBS Lett.*, vol. 593, no. 20, pp. 2853–2867, Oct. 2019.
- [6] B. Jingwen, L. Yaochen, and Z. Guojun, "Cell cycle regulation and anticancer drug discovery," *Cancer Biol. Med.*, vol. 14, no. 4, p. 348, 2017.
- [7] J. Massagué, "G1 cell-cycle control and cancer," *Nat. 2004 4327015*, vol. 432, no. 7015, pp. 298–306, Nov. 2004.
- [8] A. Murray, M. Solomon, M. K.- Nature, and undefined 1989, "The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity," *nature.com*, 1989.
- [9] P. Clute, J. P.-N. cell biology, and undefined 1999, "Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase," *nature.com*.
- [10] A. Satyanarayana and P. Kaldis, "Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms," *Oncogene 2009 2833*, vol. 28, no. 33, pp. 2925–2939, Jun. 2009.
- [11] X. Gao, G. W. Leone, and H. Wang, "Cyclin D-CDK4/6 functions in cancer," *Adv. Cancer Res.*, vol. 148, pp. 147–169, Jan. 2020.
- [12] W. Sha *et al.*, "Hysteresis drives cell-cycle transitions in *Xenopus laevis* egg extracts," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 3, pp. 975–980, Feb. 2003.
- [13] J. R. Pomerening, E. D. Sontag, and J. E. Ferrell, "Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of *Cdc2*," *Nat. Cell Biol. 2003 54*, vol. 5, no. 4, pp. 346–351, Mar. 2003.
- [14] S. Y. Kim and J. E. Ferrell, "Substrate competition as a source of ultrasensitivity in the inactivation of *Wee1*," *Cell*, vol. 128, no. 6, pp. 1133–1145, Mar. 2007.
- [15] R. W. Deibler and M. W. Kirschner, "Quantitative reconstitution of mitotic CDK1 activation in somatic cell extracts," *Mol. Cell*, vol. 37, no. 6, pp. 753–767, Mar. 2010.
- [16] B. Novak, J. J. Tyson, B. Gyorffy, and A. Csikasz-Nagy, "Irreversible cell-cycle

- transitions are due to systems-level feedback," *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 7, pp. 724–728, Jul. 2007.
- [17] K. J. Barnum and M. J. O'Connell, "Cell cycle regulation by checkpoints," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1170, pp. 29–40, 2014.
- [18] S. K. Panda, S. Ray, S. R. Nayak, S. Behera, S. S. Bhanja, and V. Acharya, "A Review on Cell Cycle Checkpoints in Relation to Cancer," *J. Med. Sci.*, 2019.
- [19] D. L. Fisher and P. Nurse, "A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins.," *EMBO J.*, vol. 15, no. 4, p. 850, 1996.
- [20] K. Kozar *et al.*, "Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins," *Cell*, vol. 118, no. 4, pp. 477–491, Aug. 2004.
- [21] D. Santamaría *et al.*, "Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle," *Nat. 2007 4487155*, vol. 448, no. 7155, pp. 811–815, Aug. 2007.
- [22] H. Hochegger, S. Takeda, and T. Hunt, "Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008 911*, vol. 9, no. 11, pp. 910–916, Sep. 2008.
- [23] E. Rittershaus, S. Baek, and C. Sassetti, "The normalcy of dormancy," *Cell Host Microbe*, vol. 13, no. 6, pp. 643–651, 2013.
- [24] M. Yanagida, "Cellular quiescence: are controlling genes conserved?," *Trends Cell Biol.*, vol. 19, no. 12, pp. 705–715, Dec. 2009.
- [25] G. Yao, "Modelling mammalian cellular quiescence," *Interface Focus*, vol. 4, no. 3, 2014.
- [26] B. Daignan-Fornier, D. Laporte, and I. Sagot, "Quiescence Through the Prism of Evolution," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, p. 745069, Oct. 2021.
- [27] A. Howard and S. R. Pelc, "Synthesis of Desoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and Its Relation to Chromosome Breakage," <http://dx.doi.org/10.1080/09553008514552501>, vol. 49, no. 2, pp. 207–218, 2009.
- [28] R. Baserga, *BIOCHEMISTRY OF THE CELL CYCLE: A REVIEW*, vol. 1, no. 2. John Wiley & Sons, Ltd, 1968, pp. 167–191.
- [29] N. Fausto, "Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells," *Hepatology*, vol. 39, no. 6, pp. 1477–1487, Jun. 2004.
- [30] R. Bischoff, "Cell cycle commitment of rat muscle satellite cells," *J. Cell Biol.*, vol. 111, no. 1, pp. 201–207, 1990.
- [31] A. Zetterberg, T. And, and O. Larsson, "Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells (G1 arrest/GO state/epidermal growth factor/platelet-derived growth factor/insulin) When cells in culture experience environmental conditions that are suboptimal for proliferation, the cellular response varies depending on cell type. Nontransformed cells usually cease

- to proliferate in a cell cycle-specific fashion. They are," *Cell Biol.*, vol. 82, pp. 5365–5369, 1985.
- [32] H. M. PATT and H. QUASTLER, "Radiation effects on cell renewal and related systems," *Physiol. Rev.*, vol. 43, pp. 357–396, Jul. 1963.
- [33] M. Y. Terzi, M. Izmirli, and B. Gogebakan, "The cell fate: senescence or quiescence," *Molecular Biology Reports*, vol. 43, no. 11. Springer Netherlands, pp. 1213–1220, 01-Nov-2016.
- [34] V. A. Blomen and J. Boonstra, *Cell fate determination during G1 phase progression*, vol. 64, no. 23. Springer, 2007, pp. 3084–3104.
- [35] H. A. Coller, L. Sang, and J. M. Roberts, "No Title," vol. 4, no. 3, p. e83, Mar. 2006.
- [36] M. Valentin and E. Yang, "Autophagy is activated, but is not required for the G0 function of BCL-2 or BCL-xL," vol. 7, no. 17, pp. 2762–2768, Sep. 2008.
- [37] A. Zetterberg, O. Larsson, and K. G. Wiman, "What is the restriction point?," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1995.
- [38] H. M. Temin, "Stimulation by serum of multiplication of stationary chicken cells," vol. 78, no. 2, pp. 161–170, 1971.
- [39] M. G. Stoker, "The Leeuwenhoek lecture, 1971. Tumour viruses and the sociology of fibroblasts," *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.*, vol. 181, no. 1062, pp. 1–17, Apr. 1972.
- [40] K. Polyak *et al.*, "p27 Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-13 and contact inhibition to cell cycle arrest."
- [41] C. M. Benaud and R. B. Dickson, "Adhesion-regulated G1 cell cycle arrest in epithelial cells requires the downregulation of c-Myc," *Oncogene 2001 2033*, vol. 20, no. 33, pp. 4554–4567, Aug. 2001.
- [42] J. C. Wu, G. Merlino, K. Cveklova, B. Mosinger, and N. Fausto, "Autonomous Growth in Serum-free Medium and Production of Hepatocellular Carcinomas by Differentiated Hepatocyte Lines That Overexpress Transforming Growth Factor α ," *Cancer Res.*, vol. 54, no. 22, 1994.
- [43] A. P. Z. P. Fiore, P. de F. Ribeiro, and A. Bruni-Cardoso, "Sleeping beauty and the microenvironment enchantment: Microenvironmental regulation of the proliferation-quiescence decision in normal tissues and in cancer development," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 6, no. JUN, p. 59, Jun. 2018.
- [44] A. B. Pardee, "A restriction point for control of normal animal cell proliferation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 71, no. 4, pp. 1286–1290, 1974.
- [45] A. P. Z. P. Fiore *et al.*, "Laminin-111 and the Level of Nuclear Actin Regulate Epithelial Quiescence via Exportin-6," vol. 19, no. 10, pp. 2102–2115, Jun. 2017.
- [46] V. Spencer, S. Costes, J. Inman, ... R. X.-J. of cell, and undefined 2011, "Depletion of nuclear actin is a key mediator of quiescence in epithelial cells,"

journals.biologists.com.

- [47] M. Glukhova, C. S.-C. opinion in cell biology, and undefined 2013, “How integrins control breast biology,” *Elsevier*.
- [48] N. K. Karamanos *et al.*, “A guide to the composition and functions of the extracellular matrix,” *FEBS J.*, vol. 288, no. 24, pp. 6850–6912, Dec. 2021.
- [49] M. C. Jones, J. Zha, and M. J. Humphries, “Connections between the cell cycle, cell adhesion and the cytoskeleton,” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 374, no. 1779, Aug. 2019.
- [50] V. G. Brunton and M. C. Frame, “Src and focal adhesion kinase as therapeutic targets in cancer,” *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 8, no. 4, pp. 427–432, Aug. 2008.
- [51] S. Ma, Z. Meng, R. Chen, and K. L. Guan, “The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 88, pp. 577–604, Jun. 2019.
- [52] K. F. Harvey, X. Zhang, and D. M. Thomas, “The Hippo pathway and human cancer,” *Nat. Rev. Cancer 2013 134*, vol. 13, no. 4, pp. 246–257, Mar. 2013.
- [53] M. E. Dolega, S. Monnier, B. Brunel, J. F. Joanny, P. Recho, and G. Cappello, “Extra-cellular matrix in multicellular aggregates acts as a pressure sensor controlling cell proliferation and motility,” *Elife*, vol. 10, Mar. 2021.
- [54] R. Fan, N. G. Kim, and B. M. Gumbiner, “Regulation of Hippo pathway by mitogenic growth factors via phosphoinositide 3-kinase and phosphoinositide-dependent kinase-1,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 7, pp. 2569–2574, Feb. 2013.
- [55] M. Mori *et al.*, “Hippo signaling regulates microprocessor and links cell-density-dependent mirna biogenesis to cancer,” *Cell*, vol. 156, no. 5, pp. 893–906, Feb. 2014.
- [56] H. A. El-Mezayen, F. M. Metwally, and H. Darwish, “A novel discriminant score based on tumor-associated trypsin inhibitor for accurate diagnosis of metastasis in patients with breast cancer,” *Tumour Biol.*, vol. 35, no. 3, pp. 2759–2767, Mar. 2014.
- [57] R. Jayadev and D. R. Sherwood, “Basement membranes,” *Curr. Biol.*, vol. 27, no. 6, pp. R207–R211, Mar. 2017.
- [58] J. H. Miner and N. M. Nguyen, “Extracellular Matrix,” *Encycl. Respir. Med. Four-Volume Set*, pp. 157–162, Jan. 2006.
- [59] C. Gérard and A. Goldbeter, “The balance between cell cycle arrest and cell proliferation: control by the extracellular matrix and by contact inhibition,” *Interface Focus*, vol. 4, no. 3, 2014.
- [60] L. M. Coussens and Z. Werb, “Inflammation and cancer,” *Nat. 2002 4206917*, vol. 420, no. 6917, pp. 860–867, Dec. 2002.
- [61] D. Iliopoulos, H. A. Hirsch, and K. Struhl, “An Epigenetic Switch Involving NF-κB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 Links Inflammation to Cell Transformation,” *Cell*, vol. 139, no. 4, pp. 693–706, Nov. 2009.

- [62] L. J. Saucedo and B. A. Edgar, "Filling out the Hippo pathway," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007 88, vol. 8, no. 8, pp. 613–621, Aug. 2007.
- [63] J. P. Alao, "The regulation of cyclin D1 degradation: Roles in cancer development and the potential for therapeutic invention," *Mol. Cancer*, vol. 6, no. 1, pp. 1–16, Apr. 2007.
- [64] D. Hanahan, "Hallmarks of Cancer: New Dimensions," *Cancer Discov.*, vol. 12, no. 1, pp. 31–46, Jan. 2022.
- [65] A. Yasmeeen, W. E. Berdel, H. Serve, and C. Müller-Tidow, "E- and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis," <http://dx.doi.org/10.1586/14737159.3.5.617>, vol. 3, no. 5, pp. 617–633, Sep. 2014.
- [66] S. Gala, A. Marreiros, G. J. Stewart, and P. Williamson, "Overexpression of E2F-1 leads to cytokine-independent proliferation and survival in the hematopoietic cell line BaF-B03," *Blood*, vol. 97, no. 1, pp. 227–234, Jan. 2001.
- [67] P. Cowin and J. Wysolmerski, "Molecular mechanisms guiding embryonic mammary gland development," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 6, 2010.
- [68] M. H. H. L. H. Macias, and L. Hinck, "Mammary gland development," *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, vol. 1, no. 4, pp. 533–557, Jul. 2012.
- [69] G. W. Robinson, "Erratum: Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development," *Nat. Rev. Genet.* 2008 97, vol. 9, no. 7, pp. 566–566, Jun. 2008.
- [70] A. G. Ghadge, P. Dasari, J. Stone, E. W. Thompson, R. L. Robker, and W. V. Ingman, "Pubertal mammary gland development is a key determinant of adult mammographic density," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 114, pp. 143–158, Jun. 2021.
- [71] L. Hinck and G. B. Silberstein, "The mammary end bud as a motile organ," *Breast Cancer Research*, vol. 7, no. 6. BioMed Central, pp. 245–251, Dec-2005.
- [72] S. R. Oakes, R. L. Rogers, M. J. Naylor, and C. J. Ormandy, "Prolactin regulation of mammary gland development," *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 13, no. 1, pp. 13–28, Mar. 2008.
- [73] R. Dulbecco, M. Henahan, and B. Armstrong, "Cell types and morphogenesis in the mammary gland," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 79, no. 23, pp. 7346–7350, Dec. 1982.
- [74] B. A. Howard and B. A. Gusterson, "Human Breast Development," *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2000 52, vol. 5, no. 2, pp. 119–137, 2000.
- [75] A. J. Ewald, A. Brenot, M. Duong, B. S. Chan, and Z. Werb, "Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis," *Dev. Cell*, vol. 14, no. 4, pp. 570–581, Apr. 2008.
- [76] V. Plaks *et al.*, "Adaptive Immune Regulation of Mammary Postnatal Organogenesis," *Dev. Cell*, vol. 34, no. 5, pp. 493–504, Sep. 2015.
- [77] J. R. Reed and K. L. Schwertfeger, "Immune Cell Location and Function During Post-

- Natal Mammary Gland Development,” *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2010 153, vol. 15, no. 3, pp. 329–339, Aug. 2010.
- [78] G. J. Wilson *et al.*, “Chemokine receptors coordinately regulate macrophage dynamics and mammary gland development,” *Development*, vol. 147, no. 12, Jun. 2020.
- [79] I. S. Paine and M. T. Lewis, “The Terminal End Bud: the Little Engine that Could,” vol. 22, no. 2, 2017.
- [80] R. Xu, V. A. Spencer, D. L. Groesser, and M. J. Bissell, “Laminin regulates PI3K basal localization and activation to sustain STAT5 activation,” *Cell Cycle*, vol. 9, no. 21, Nov. 2010.
- [81] J. Howlin, J. McBryan, and F. Martin, “Pubertal mammary gland development: insights from mouse models,” *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 11, no. 3–4, pp. 283–297, Oct. 2006.
- [82] J. N. Ihle, “STATs: signal transducers and activators of transcription,” *Cell*, vol. 84, no. 3, pp. 331–334, Feb. 1996.
- [83] J. Xie, M. J. Lebaron, M. T. Nevalainen, and H. Rui, “Role of tyrosine kinase Jak2 in prolactin-induced differentiation and growth of mammary epithelial cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 16, pp. 14020–14030, Apr. 2002.
- [84] P. D. Rädler, B. L. Wehde, and K. U. Wagner, “Crosstalk between STAT5 activation and PI3K/AKT functions in normal and transformed mammary epithelial cells,” *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 451. Elsevier Ireland Ltd, pp. 31–39, 15-Aug-2017.
- [85] E. Reichmann, R. Ball, B. Groner, and R. R. Friis, “New mammary epithelial and fibroblastic cell clones in coculture form structures competent to differentiate functionally,” *J. Cell Biol.*, vol. 108, no. 3, pp. 1127–1138, 1989.
- [86] E. Reichmann *et al.*, “Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion,” *Cell*, vol. 71, no. 7, pp. 1103–1116, Dec. 1992.
- [87] I. Fialka, H. Schwarz, E. Reichmann, M. Oft, M. Busslinger, and H. Beug, “The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions,” *J. Cell Biol.*, vol. 132, no. 6, pp. 1115–1132, Mar. 1996.
- [88] N. E. Sanjana, O. Shalem, and F. Zhang, “Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening,” *Nature Methods*, vol. 11, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 783–784, Aug-2014.
- [89] O. Shalem *et al.*, “Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells,” *Science (80-.)*, vol. 343, no. 6166, pp. 84–87, 2014.
- [90] J. Joung *et al.*, “Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening,” *Nat. Protoc.*, 2017.

- [91] S. Durand and A. Cimarelli, “The inside out of lentiviral vectors,” *Viruses*, vol. 3, no. 2, pp. 132–159, Feb. 2011.
- [92] “Flowing Software – Turku Bioscience.” [Online]. Available: <https://bioscience.fi/services/cell-imaging/flowing-software/>. [Accessed: 28-Jul-2021].
- [93] R. Mroue and M. J. Bissell, “Three-Dimensional Cultures of Mouse Mammary Epithelial Cells,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 945, p. 221, 2013.
- [94] H. L. Sladitschek and P. A. Neveu, “MXS-chaining: A highly efficient cloning platform for imaging and flow cytometry approaches in mammalian systems,” *PLoS One*, vol. 10, no. 4, Apr. 2015.
- [95] H. Nishitani, Z. Lygerou, T. Nishimoto, and P. Nurse, “The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast,” *Nature*, vol. 404, no. 6778, pp. 625–628, Apr. 2000.
- [96] H. Nishitani, Z. Lygerou, and T. Nishimoto, “Proteolysis of DNA Replication Licensing Factor Cdt1 in S-phase Is Performed Independently of Geminin through Its N-terminal Region *,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 29, pp. 30807–30816, Jul. 2004.
- [97] M. H. BARCELLOS-HOFF, J. AGGELER, T. G. RAM, and M. J. BISSELL, “Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane,” *Development*, vol. 105, no. 2, p. 223, 1989.
- [98] P. OW, R.-J. L, W. VM, and B. MJ, “Differentiation and cancer in the mammary gland: shedding light on an old dichotomy,” *Adv. Cancer Res.*, vol. 75, pp. 135–162, 1998.
- [99] M. Shackleton *et al.*, “Generation of a functional mammary gland from a single stem cell,” *Nature*, vol. 439, no. 7072, pp. 84–88, Jan. 2006.
- [100] S. Tajima and Y. Tabata, “Preparation of epithelial cell aggregates incorporating matrigel microspheres to enhance proliferation and differentiation of epithelial cells,” *Regen. Ther.*, vol. 7, pp. 34–44, Dec. 2017.
- [101] O. Shalem, N. Sanjana, F. Z.-N. R. Genetics, and undefined 2015, “High-throughput functional genomics using CRISPR–Cas9,” *nature.com*.
- [102] M. Kanehisa, M. Furumichi, M. Tanabe, Y. Sato, and K. Morishima, “KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. D1, pp. D353–D361, Jan. 2017.
- [103] A. Fabregat *et al.*, “The Reactome Pathway Knowledgebase,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. D1, pp. D649–D655, Jan. 2018.
- [104] D. Nishimura, “BioCarta,” *Biotech Softw. Internet Rep.*, vol. 2, no. 3, pp. 117–120, Jun. 2001.
- [105] M. Ashburner *et al.*, “Gene ontology: Tool for the unification of biology,” *Nature Genetics*, vol. 25, no. 1. Nat Genet, pp. 25–29, May-2000.
- [106] M. S. Cortese, V. N. Uversky, and A. Keith Dunker, “Intrinsic disorder in scaffold

- proteins: Getting more from less," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 98, no. 1. NIH Public Access, pp. 85–106, Sep-2008.
- [107] A. Brachner and R. Foisner, "Lamina-associated polypeptide (LAP)2 α and other LEM proteins in cancer biology," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 773, pp. 143–163, 2014.
- [108] T. Akasaka *et al.*, "Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL)," *Blood*, vol. 109, no. 8, pp. 3451–3461, Apr. 2007.
- [109] E. Olivotto *et al.*, "IKK α /CHUK Regulates Extracellular Matrix Remodeling Independent of Its Kinase Activity to Facilitate Articular Chondrocyte Differentiation," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, p. e73024, Sep. 2013.
- [110] T. J. M. Gonçalves *et al.*, "Collagen XXV promotes myoblast fusion during myogenic differentiation and muscle formation," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2019.
- [111] L. Sampieri, P. Di Giusto, and C. Alvarez, "CREB3 Transcription Factors: ER-Golgi Stress Transducers as Hubs for Cellular Homeostasis," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 7, Jul. 2019.
- [112] W. Wei, H. Wang, and S. Ji, "Paradoxes of the EphB1 receptor in malignant brain tumors," *Cancer Cell Int*, vol. 17, p. 21, 2017.
- [113] Y. Liu *et al.*, "FOXK transcription factors: Regulation and critical role in cancer," *Cancer Letters*, vol. 458. Elsevier Ireland Ltd, pp. 1–12, 28-Aug-2019.
- [114] S. S. Skandalis, T. Karalis, and P. Heldin, "Intracellular hyaluronan: Importance for cellular functions," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 62. Academic Press, pp. 20–30, 01-May-2020.
- [115] D. Weber, C. Wiese, and M. Gessler, "Hey bHLH transcription factors," in *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 110, Academic Press Inc., 2014, pp. 285–315.
- [116] J. W. Singer, A. Fleischman, S. Al-Fayoumi, J. O. Mascarenhas, Q. Yu, and A. Agarwal, "Inhibition of interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) as a therapeutic strategy," *Oncotarget*, vol. 9, no. 70. Impact Journals LLC, pp. 33416–33439, 01-Sep-2018.
- [117] T. Suddason and E. Gallagher, "A RING to rule them all? Insights into the Map3k1 PHD motif provide a new mechanistic understanding into the diverse roles of Map3k1," *Cell Death and Differentiation*, vol. 22, no. 4. Nature Publishing Group, pp. 540–548, 04-Apr-2015.
- [118] J. R. Pon and M. A. Marra, "MEF2 transcription factors: Developmental regulators and emerging cancer genes," *Oncotarget*, vol. 7, no. 3, pp. 2297–2312, 2016.
- [119] U. Kefeli *et al.*, "Netrin-1 in cancer: Potential biomarker and therapeutic target?," *Tumor Biology*, vol. 39, no. 4. SAGE Publications Ltd, 01-Apr-2017.
- [120] P. Infante, L. Lospinoso Severini, F. Bernardi, F. Bufalieri, and L. Di Marcotullio, "Targeting Hedgehog Signalling through the Ubiquitylation Process: The Multiple Roles of the HECT-E3 Ligase Itch," *Cells*, vol. 8, no. 2, p. 98, Jan. 2019.

- [121] M. Ashrafizadeh *et al.*, “PTEN, a barrier for proliferation and metastasis of gastric cancer cells: From molecular pathways to targeting and regulation,” *Biomedicines*, vol. 8, no. 8. MDPI AG, p. 264, 01-Aug-2020.
- [122] B. M. Byrne and G. G. Oakley, “Replication protein A, the laxative that keeps DNA regular: The importance of RPA phosphorylation in maintaining genome stability,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 86. Elsevier Ltd, pp. 112–120, 01-Feb-2019.
- [123] C. P. Goes, F. M. Vieceli, S. M. De La Cruz, M. Simões-Costa, and C. Y. I. Yan, “Scratch2, a Snail Superfamily Member, Is Regulated by miR-125b,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, p. 769, Aug. 2020.
- [124] A. S. Fanning and J. M. Anderson, “Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1165, pp. 113–120, 2009.
- [125] A. Borghi, L. Verstrepen, and R. Beyaert, “TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF- κ B, MAP kinases and cell death,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 116. Elsevier Inc., pp. 1–10, 15-Sep-2016.
- [126] A. H. Moxley and D. Reisman, “Context is key: Understanding the regulation, functional control, and activities of the p53 tumour suppressor,” *Cell Biochemistry and Function*. John Wiley and Sons Ltd, 2020.
- [127] Q. Wang *et al.*, “Xin proteins and intercalated disc maturation, signaling and diseases,” *Front. Biosci.*, vol. 17, no. 7, pp. 2566–2593, Jun. 2011.
- [128] F. Zhu *et al.*, “IKK α Shields 14-3-3 σ , a G2/M Cell Cycle Checkpoint Gene, from Hypermethylation, Preventing Its Silencing,” *Mol. Cell*, vol. 27, no. 2, pp. 214–227, Jul. 2007.
- [129] H. Bauer, J. Zweimueller-Mayer, P. Steinbacher, A. Lametschwandtner, and H. C. Bauer, “The dual role of zonula occludens (ZO) proteins,” *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, 2010.
- [130] M. Bionaz and J. J. Loor, “ACSL1, AGPAT6, FABP3, LPIN1, and SLC27A6 are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation,” *J. Nutr.*, vol. 138, no. 6, pp. 1019–1024, 2008.
- [131] C. Toumpeki *et al.*, “The role of ARID1A in endometrial cancer and the molecular pathways associated with pathogenesis and cancer progression,” *In Vivo*, vol. 33, no. 3. International Institute of Anticancer Research, pp. 659–667, 01-May-2019.
- [132] T. Muramatsu and T. Miyauchi, “Basigin (CD147): A multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion,” *Histology and Histopathology*, vol. 18, no. 3. Histol Histopathol, pp. 981–987, Jul-2003.
- [133] H. Zhang *et al.*, “LAMB3 mediates apoptotic, proliferative, invasive, and metastatic behaviors in pancreatic cancer by regulating the PI3K/Akt signaling pathway,” *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 3, pp. 1–14, Mar. 2019.

- [134] E. Pavlakis, R. Chiotaki, and G. Chalepakis, "The role of Fras1/Frem proteins in the structure and function of basement membrane," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 43, no. 4. Elsevier Ltd, pp. 487–495, 2011.
- [135] T. Jin, Y. Zhang, and T. Zhang, "MiR-524-5p Suppresses Migration, Invasion, and EMT Progression in Breast Cancer Cells Through Targeting *FSTL1*," *Cancer Biother. Radiopharm.*, p. cbr.2019.3046, Apr. 2020.
- [136] B. C. Melnik, "Milk: An epigenetic amplifier of FTO-mediated transcription? Implications for Western diseases," *Journal of Translational Medicine*, vol. 13, no. 1. BioMed Central Ltd., p. 385, 21-Dec-2015.
- [137] G. J. Allan, J. Beattie, and D. J. Flint, "The role of IGFBP-5 in mammary gland development and involution," *Domest. Anim. Endocrinol.*, vol. 27, no. 3, pp. 257–266, 2004.
- [138] I. Pusceddu, B. Dieplinger, and T. Mueller, "ST2 and the ST2/IL-33 signalling pathway—biochemistry and pathophysiology in animal models and humans," *Clinica Chimica Acta*, vol. 495. Elsevier B.V., pp. 493–500, 01-Aug-2019.
- [139] J. L. Lee and C. H. Streuli, "Integrins and epithelial cell polarity," *Journal of Cell Science*, vol. 127, no. 15. Company of Biologists Ltd, pp. 3217–3225, 2014.
- [140] K. Reiss, L. Del Valle, A. Lassak, and J. Trojanek, "Nuclear IRS-1 and cancer," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 227, no. 8. NIH Public Access, pp. 2992–3000, Aug-2012.
- [141] V. Adorno-Cruz and H. Liu, "Regulation and functions of integrin $\alpha 2$ in cell adhesion and disease," *Genes and Diseases*, vol. 6, no. 1. Chongqing yi ke da xue, di 2 lin chuang xue yuan Bing du xing gan yan yan jiu suo, pp. 16–24, 01-Mar-2019.
- [142] S. Wang, J. Xie, J. Li, F. Liu, X. Wu, and Z. Wang, "Cisplatin suppresses the growth and proliferation of breast and cervical cancer cell lines by inhibiting integrin $\beta 5$ -mediated glycolysis," *Am. J. Cancer Res.*, vol. 6, no. 5, pp. 1108–1117, 2016.
- [143] T. Rodrigues and L. Silva Ferraz, "Therapeutic potential of targeting mitochondrial dynamics in cancer," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 182, p. 114282, Oct. 2020.
- [144] J. Gu *et al.*, "The architecture of the mammalian respirasome," *Nature*, vol. 537, no. 7622, pp. 639–643, Sep. 2016.
- [145] H. Al-Busani *et al.*, "NUAK2 localization in normal skin and its expression in a variety of skin tumors with YAP," *J. Dermatol. Sci.*, vol. 97, no. 2, pp. 143–151, Feb. 2020.
- [146] K. Sørberg, T. Jahnsen, T. Rognes, B. S. Skålhegg, and J. K. Laerdahl, "Evolutionary Paths of the cAMP-Dependent Protein Kinase (PKA) Catalytic Subunits," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e60935, Apr. 2013.
- [147] R. Nussinov, M. Zhang, C. J. Tsai, T. J. Liao, D. Fushman, and H. Jang, "Autoinhibition in Ras effectors Raf, PI3K α , and RASSF5: a comprehensive review underscoring the challenges in pharmacological intervention," *Biophysical Reviews*, vol. 10, no. 5. Springer Verlag, pp. 1263–1282, 01-Oct-2018.

- [148] M. A. Pavón, I. Arroyo-Solera, M. V. Céspedes, I. Casanova, X. León, and R. Mangués, “uPA/uPAR and SERPINE1 in head and neck cancer: Role in tumor resistance, metastasis, prognosis and therapy,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 35. Impact Journals LLC, pp. 57351–57366, 2016.
- [149] A. Klip, T. E. McGraw, and D. E. James, “Thirty sweet years of GLUT4,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 294, no. 30. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., pp. 11369–11381, 26-Jul-2019.
- [150] A. V. Loladze *et al.*, “Epithelial-Specific and Stage-Specific Functions of Insulin-Like Growth Factor-I during Postnatal Mammary Development,” *Endocrinology*, vol. 147, no. 11, pp. 5412–5423, Nov. 2006.
- [151] K. H. Jung *et al.*, “Differentiation therapy for hepatocellular carcinoma: Multifaceted effects of miR-148a on tumor growth and phenotype and liver fibrosis,” *Hepatology*, vol. 63, no. 3, pp. 864–879, Mar. 2016.
- [152] P. S. Hung *et al.*, “miR-146a enhances the oncogenicity of oral carcinoma by concomitant targeting of the IRAK1, TRAF6 and NUMB genes,” *PLoS One*, vol. 8, no. 11, Nov. 2013.
- [153] J. Xian, Y. Cheng, X. Qin, Y. Cao, Y. Luo, and Y. Cao, “Progress in the research of p53 tumour suppressor activity controlled by Numb in triple-negative breast cancer,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 24, no. 13, pp. 7451–7459, Jul. 2020.
- [154] P. W. Young, “LNX1/LNX2 proteins: functions in neuronal signalling and beyond,” *Neuronal Signal.*, vol. 2, no. 2, Jun. 2018.
- [155] K. Boras-Granic, P. Dann, and J. J. Wysolmerski, “Embryonic cells contribute directly to the quiescent stem cell population in the adult mouse mammary gland,” *Breast Cancer Res.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–14, Dec. 2014.
- [156] Y. Ma, L. Zhang, and X. Huang, “Genome modification by CRISPR/Cas9,” *FEBS J.*, vol. 281, no. 23, pp. 5186–5193, 2014.
- [157] [Saul McLeod], “[Z-Score: Definition, Calculation & Interpretation].” 2019.
- [158] S. H. Lee, A. R. Paek, K. Yoon, S. H. Kim, S. Y. Lee, and H. J. You, “Tight junction protein 1 is regulated by transforming growth factor- β and contributes to cell motility in NSCLC cells,” *BMB Rep.*, vol. 48, no. 2, pp. 115–120, 2015.
- [159] K. Matter and M. S. Balda, “Signalling to and from tight junctions,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, no. 3, pp. 225–236, Mar. 2003.
- [160] M. S. Balda and K. Matter, “Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression,” *Trends Cell Biol.*, vol. 13, no. 6, pp. 310–318, Jun. 2003.
- [161] L. González-Mariscal, R. Tapia, and D. Chamorro, “Crosstalk of tight junction components with signaling pathways,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1778, no. 3, pp. 729–756, Mar. 2008.
- [162] T. Sourisseau *et al.*, “Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA,” *Mol. Cell*.

Biol., vol. 26, no. 6, pp. 2387–2398, Mar. 2006.

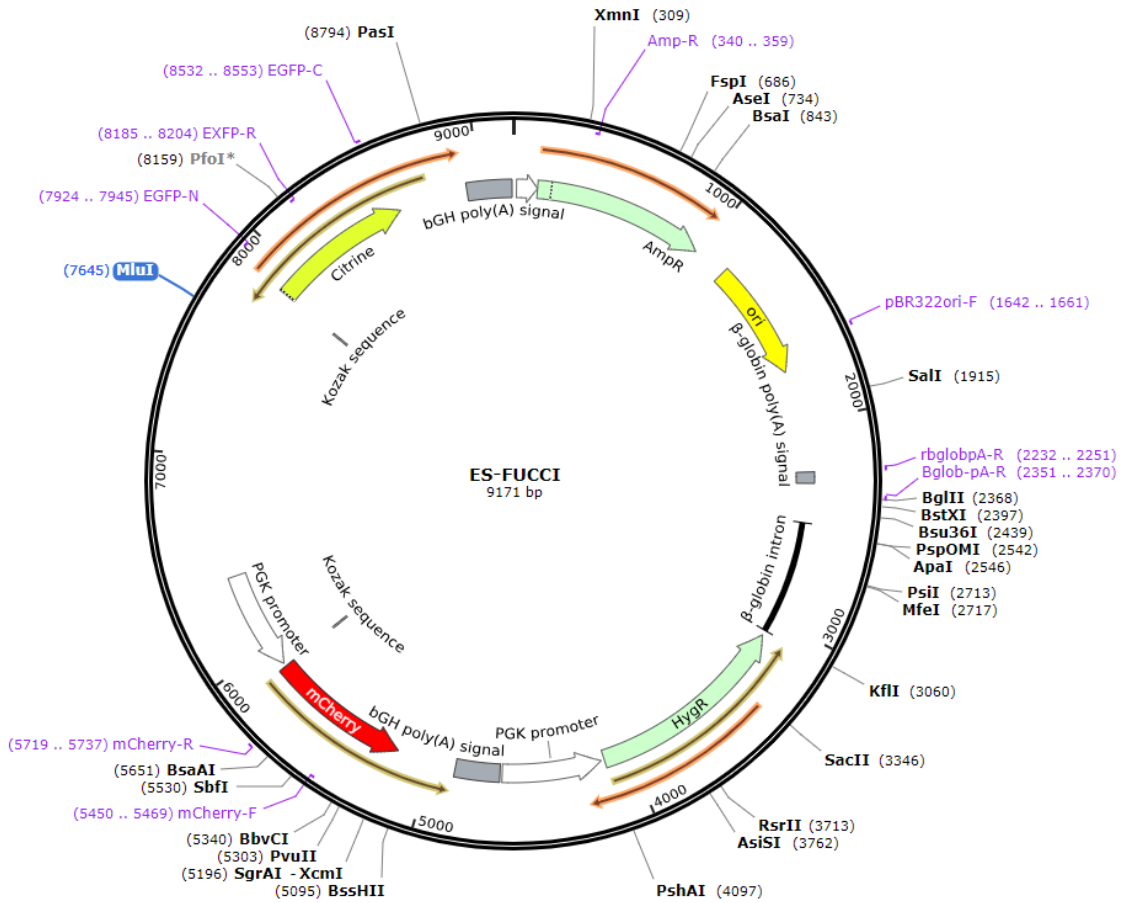
- [163] C. J. Sherr and J. M. Roberts, “CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression.”
- [164] S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, “Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014 153, vol. 15, no. 3, pp. 178–196, Feb. 2014.
- [165] S. Pece, S. Confalonieri, P. R. Romano, and P. P. Di Fiore, “NUMB-ing down cancer by more than just a NOTCH,” vol. 1815, no. 1, pp. 26–43, Jan. 2011.
- [166] J. S. Bonifacino, “Adaptor proteins involved in polarized sorting,” *J. Cell Biol.*, vol. 204, no. 1, pp. 7–17, Jan. 2014.
- [167] V. Kandachar and F. Roegiers, “Endocytosis and control of Notch signaling,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 24, no. 4, pp. 534–540, Aug. 2012.
- [168] L. Couturier, M. Trylinski, K. Mazouni, L. Darnet, and F. Schweisguth, “A fluorescent tagging approach in *Drosophila* reveals late endosomal trafficking of Notch and Sanpodo,” *J. Cell Biol.*, vol. 207, no. 3, pp. 351–363, 2014.
- [169] R. Dobrowolski and E. M. De Robertis, “Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 1, pp. 53–60, Jan. 2011.
- [170] M. Xin *et al.*, “Regulation of insulin-like growth factor signaling by Yap governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size,” *Sci. Signal.*, vol. 4, no. 196, Oct. 2011.
- [171] S. Furuta, G. Ren, J. H. Mao, and M. J. Bissell, “Laminin signals initiate the reciprocal loop that informs breast-specific gene expression and homeostasis by activating no, p53 and micrnas,” *Elife*, vol. 7, Mar. 2018.
- [172] M. Fomicheva and I. G. Macara, “No Title,” *Elife*, vol. 9, pp. 1–24, Oct. 2020.
- [173] J. A. Prescott, J. P. Mitchell, and S. J. Cook, “Inhibitory feedback control of NF- κ B signalling in health and disease,” *Biochem. J.*, vol. 478, no. 13, p. 2619, Jul. 2021.
- [174] J. Bash, W. X. Zong, and C. G elinas, “c-Rel arrests the proliferation of HeLa cells and affects critical regulators of the G₁/S-phase transition,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 17, no. 11, pp. 6526–6536, Nov. 1997.
- [175] A. M. Sheehy and M. S. Schlissel, “Overexpression of RelA causes G₁ arrest and apoptosis in a pro-B cell line,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 13, pp. 8708–8716, Mar. 1999.
- [176] A. C. Ledoux and N. D. Perkins, “NF- κ B and the cell cycle,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 42, no. 1, pp. 76–81, Feb. 2014.
- [177] “Nuclear Factor κ B Subunits Induce Epithelial Cell Growth Arrest1 | Cancer Research | American Association for Cancer Research.” [Online]. Available: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/60/15/4085/506637/Nuclear-Factor-B->

Subunits-Induce-Epithelial-Cell. [Accessed: 14-Aug-2022].

- [178] C. Zabena *et al.*, “The FTO obesity gene. Genotyping and gene expression analysis in morbidly obese patients,” *Obes. Surg.*, vol. 19, no. 1, pp. 87–95, Jan. 2009.
- [179] J. I. Jones, A. Gockerman, W. H. Busby, C. Camacho-Hubner, and D. R. Clemmons, “Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I,” *rupress.org*.
- [180] J. Chen, T. G. Diacovo, D. G. Grenache, S. A. Santoro, and M. M. Zutter, “The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis,” *Am. J. Pathol.*, vol. 161, no. 1, pp. 337–344, 2002.
- [181] H. Pan, L. S. Wanami, T. R. Dissanayake, and R. E. Bachelder, “Autocrine Semaphorin3A stimulates $\alpha 2\beta 1$ integrin expression/function in breast tumor cells,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 118, no. 1, p. 197, Nov. 2009.
- [182] A. Ferraro, T. Boni, and A. Pintzas, “EZH2 Regulates Cofilin Activity and Colon Cancer Cell Migration by Targeting ITGA2 Gene,” *PLoS One*, vol. 9, no. 12, Dec. 2014.
- [183] R. Rathinam and S. K. Alahari, “Important role of integrins in the cancer biology,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 29, no. 1, pp. 223–237, Mar. 2010.

Anexos

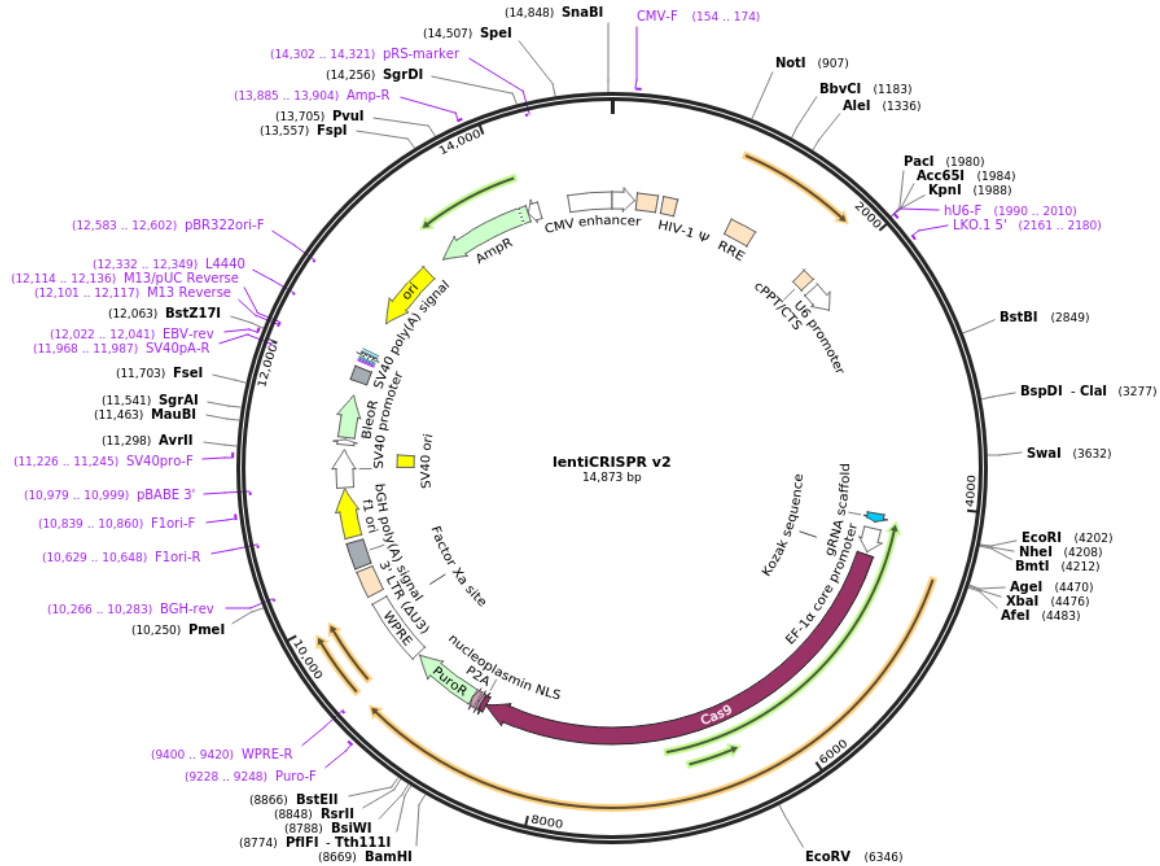
Anexo 1 – Plasmídeo ES-FUCCI



No mapa é possível ver em azul o local em que a enzima MluI segmenta o plasmídeo

Anexo 2 – Plasmídeo da Biblioteca Gecko V2

Created with SnapGene®



Anexo 3 – Primers Forward e Reverse usados nos PCR1 e PCR2

PCR 1

Forward

AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCG

Reverse:

TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGTgtgggcatgtgctctg

Rev complementar: cagagcgcacatcgcccacaACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGA

Minúsculo - Sequência que alinha no vetor

Maiusculo – Sequência inserida pelo *primer* (o *amplicon* do produto 1 terá essa parte inserida)

Amplicon do PCR 1:

AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATAT
 CTTGTGGAAGGACGAAACACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGTTTTAGAGCTAG
 AAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC
 GGTGCTTTTTTGAATTCGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGC
 CCGTCAGTGGGcagagcgcacatcgcccacaACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGA

PCR2

Primers Forward	Sequência
1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTtAAGTAGAGtcttgtaaaggacgaaacaccg
2	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTatACACGATCtcttgtaaaggacgaaacaccg
3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTgatCGCGCGGTtcttgtaaaggacgaaacaccg
4	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTcgatCATGATCGtcttgtaaaggacgaaacaccg
5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTtcgatCGTTACCActcttgtaaaggacgaaacaccg
6	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTatcgatTCCTTGGTtcttgtaaaggacgaaacaccg

Adaptator **Barcode** Parte que alinha no vetor.

Primers Reverse	Sequência
1	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGTAGAGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTtTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
2	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACACGATCGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTatTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGCGCGGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTgatTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
4	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCATGATCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTcgatTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
5	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTTACCACTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTtcgatTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCTTGGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTatcgatTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAACGCATTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTgatcgatTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
8	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACAGGTATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTcgatcgatTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT

Reverse Comple.	Sequência
1	ACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGAaAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCTCTACTTATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
2	ACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGAatAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGATCGTGTATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
3	ACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGAatcAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACACCGCGCGATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
4	ACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGAatcgAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCGATCATGATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
5	ACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGAatcgaAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCTGGTAACGATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
6	ACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGAatcgatAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACACCAAGGAATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
7	ACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGAatcgatcAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACAATGCGTTATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
8	ACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGAatcgatcgAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACATACCTGTATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG

Alinha com o Reverse do PCR1. **Barcode** Adaptador i7

Exemplo de *Amplicon* PCR 2

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA**CTCTTCCCTACACGACGCTCTT**
 CCGATCTatcgat**TCCTTGGTCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG**NNNNNNNN
 NNNNNNNNNNNNTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAG
 TCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGT**GCTTTTTTGAATTCG**
 CTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGG
 GCAGAGCGCACATCGCCACA**ACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGA**aAGA
 TCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC**CTCTACTTATCTCGTATGCC**
GTCTTCTGCTTG

Amostra	Barcode
Bib A	CTCTACTT
Bib B	GATCGTGT
Ctrl 48h 1	CGATCATG
Pre-Exp	ACCGCGCG
mCh	TGGTAACG
mCit	ACCAAGGA
mCh CFP	AATGCGTT

Anexo 4 – Lista de primers usados no Real-Time PCR.

As seqüências de todos os primers foram obtidas no PrimerBank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>)

Gene	Primer ID	Tamanho do amplicon	Primer	Sequencia 5'-3'	Tm °C	Localização	Validado
Agpat6	30520301a1	212	Forward	AGCTTGATTGTCAACCTCCTG	60,0	25-45	Sim
			Reverse	CCGTTGGTGTAGGGCTTGT	61,9	236-218	
Arid1a	15808996a1	192	Forward	TGGGCAAGATGAGACCTCAG	61,0	11-30	Sim
			Reverse	TCTGCTGTGCATAAGAGAGGC	61,9	202-182	
BSG	2808468a1	90	Forward	GTGGCGTTGACATCGTTGG	61,7	137-155	Sim
			Reverse	CTATGTACTTCGTATGCAGGTC G	60,3	226-204	
ESR1	6679695a1	128	Forward	CCTCCCGCCTTCTACAGGT	62,7	448-466	Sim
			Reverse	CACACGGCAGTAGCGAG	63,0	575-557	
FSTL1	31560699a1	160	Forward	CACGGCGAGGAGGAACCTA	63,0	49-67	Sim
			Reverse	TCTTGCCATTACTGCCACACA	62,0	208-188	
FTO	6753916a1	137	Forward	TTCATGCTGGATGACCTCAATG	60,4	877-898	Sim
			Reverse	GCCAACTGACAGCGTTCTAAG	61,2	1013-993	
IGFBP5	6754312a1	231	Forward	CCCTGCGACGAGAAAGCTC	62,7	82-100	Sim
			Reverse	GCTCTTTTCGTTGAGGCAAACC	62,5	312-291	
ILK	6754342a1	199	Forward	ACGACATTTTCACTCAGTGCC	60,8	5-25	Sim
			Reverse	TCATCCCCACGATTCATCACAT	61,2	203-182	
IRS1	29825829a1	209	Forward	CGATGGCTTCTCAGACGTG	60,2	21-39	Sim
			Reverse	CAGCCCGCTTGTTGATGTTG	62,2	229-210	
ITGA2	6680478a1	100	Forward	TGTCTGGCGTATAATGTTGGC	60,4	70-90	Sim
			Reverse	CTTGTGGGTTGTAAGCTGCT	62,6	169-149	
ITGB5	3478697a1	86	Forward	GAAGTGCCACCTCGTGTGAA	62,4	92-111	Sim
			Reverse	GGACCGTGGATTGCCAAAGT	62,7	177-158	
JAK2	6680508a1	109	Forward	TTGTGGTATTACGCTGTGTATC	60,1	222-244	Sim
			Reverse	ATGCCTGGTTGACTCGTCTAT	60,7	330-310	
Lamb3	6678660a1	220	Forward	GGCTGCCTCGAAATTACAACA	60,9	215-235	Sim
			Reverse	ACCCTCCATGTCTTGCCAAAG	62,3	434-414	
MFN1	28436944a1	86	Forward	CCTACTGCTCCTTCTAACCCA	60,3	1687-1707	Sim
			Reverse	AGGGACGCCAATCCTGTGA	62,3	1772-1754	
NDUFA11	12842244a1	108	Forward	GGTGAAGCGTTCTTTGAATCT	60,8	9-30	Sim
			Reverse	GAGCCGATTATGCCGCAAATG	62,4	116-96	
NUAK2	26329673a1	288	Forward	TCACGCTTAGTGACTGTGTTG	60,7	373-394	Sim
			Reverse	CGTCTGGAGGAACCTTGCCTTT	62,3	660-640	
PRKACA	7110693a1	119	Forward	AGATCGTCCTGACCTTTGAGT	60,2	449-469	Sim
			Reverse	GGCAAACCGAAGTCTGTAC	61,7	567-547	
RASSF5	9055292a1	172	Forward	GACGTGAGGAGCATCTTCGAG	62,2	289-309	Sim
			Reverse	GGCAGGTGAATTTACAATTAGC G	60,2	460-438	
SERPINE1	6679373a1	116	Forward	TTCAGCCCTTGCTTGCCCTC	62,6	12-30	Sim
			Reverse	ACACTTTTACTCCGAAGTCGGT	61,3	127-106	

SLC2a4	6678015a1	127	Forward	GTGACTGGAACACTGGTCCTA	60,8	58-78	Sim
			Reverse	CCAGCCACGTTGCATTGTAG	61,6	184-165	
FRAS1	31044442a1	145	Forward	GCTTGTCTGTATCAGGGCTCC	62,2	76-96	Sim
			Reverse	CTTCTCCCTTCTCAAAGGCAC	60,3	220-200	
IL1RL1	286101a1	178	Forward	TGACACCTTACAAAACCCGGA	61,3	1109-1129	Sim
			Reverse	AGGTCTCTCCATAAATGCACA	60,8	1286-1265	
Cbx5	6671694a1	168	Forward	GACAGGCGCATGGTTAAGG	60,8	79-97	Sim
			Reverse	CCTGGGCTTATTGTTTTACCC	61,4	246-225	
Gng12	13384618a1	176	Forward	ATGTCCAGCAAGACGGCAAG	62,8	1-20	Sim
			Reverse	GAGGTCGGTATGCCATCAG	61,8	176-157	
Rph3a1	12857993a1	105	Forward	AGCAGAGAGGCTAGACATCCT	61,6	183-203	Sim
			Reverse	AGACACTGGGAGAGACCGTT	62,1	287-268	
Crtc1	118131085c 1	104	Forward	TGCCCAACGTGAACCAGATT	62,0	194-213	Sim
			Reverse	CCCATGATGTCGTGTGGTCC	62,6	297-278	
Elmsan 1		109	Forward	GGATCCAGTTCTCTCAGTATC	59,9	3791-3812	Não
			Reverse	GAGATCAGAGAAGCAGCTGT	62,3	3900-3880	
Lyplal1	22122621a1	133	Forward	TGTC AAGTGCTCAGTGGATTG	60,2	295-315	Sim
			Reverse	CCACATCTGGGTGACTTCTGTA	61,1	427-406	

Anexo 5 – Detalhamento do experimento usando RNAiMAX e Silencer Select

Após 24 horas de cultivo in vitro em placas de 6 poços, as células estavam com a confluência adequada para receber o tratamento com RNAiMAX e silencer select (aproximadamente 80%), então o meio foi descartado e as células lavadas com PBS para evitar resquícios de SFB e antibióticos que poderiam afetar a transfecção. Em tubos de 0,5mL foram preparadas as soluções A e B da transfecção de cada poço de tratamento. A solução A continha o siRNA selecionado diluído (30pmol) em 150 μ L de Opti-MEM, conforme descrito pelo fabricante. Já a solução B continha 9 μ L de RNAiMAX diluídos em 150 μ L de Opti-MEM. As soluções foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente isoladamente, e depois a solução A foi adicionada a B, sendo que essa solução final foi incubada por 30 minutos. Posteriormente, 300 μ L da solução final foi adicionada a cada poço de tratamento. O protocolo usado foi recomendado pelo fabricante e pode ser encontrado no site (

Anexo 6 – qRT-PCR para validação da expressão genica em células EpH4.

C1 = controle, M1 = Matrigel (IrECM), P1 = Prolactina MP1 = IrECM e prolactina.

ANKLE1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	29.305	19.514	0	0	1	1	1	1.000
M1	32.767	19.634	-3.463	-0.120	0.091	0.927	0.098	1.000
P1	26.020	19.031	3.284	0.483	9.744	1.357	7.183	1.000
MP1	31.526	18.929	-2.222	0.585	0.214	1.447	0.148	1.000

CEBPB		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	21.020	19.514	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000
M1	21.477	19.634	-0.457	-0.120	0.728	0.927	0.786	1.000
P1	20.344	19.031	0.677	0.483	1.598	1.357	1.178	1.000
MP1	20.357	18.929	0.663	0.585	1.584	1.447	1.095	1.000

CHUK		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	22.796	19.514	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000
M1	24.300	19.634	-1.505	-0.120	0.352	0.927	0.380	1.000
P1	22.476	19.031	0.319	0.483	1.248	1.357	0.920	1.000
MP1	22.756	18.929	0.040	0.585	1.028	1.447	0.711	1.000

CREB3L2		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	26.017	19.514	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000
M1	25.756	19.634	0.261	-0.120	1.199	0.927	1.293	1.000
P1	25.777	19.031	0.240	0.483	1.181	1.357	0.871	1.000
MP1	24.649	18.929	1.369	0.585	2.582	1.447	1.785	1.000

EPHB1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	30.117	19.075	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	31.706	19.392	-1.589	-0.316	0.332	0.819	0.406	1
P1	28.978	18.308	1.139	0.767	2.203	1.623	1.357	1
MP1	31.189	18.456	-1.072	0.619	0.476	1.478	0.322	1

FOXK1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	25.004	19.075	0	0	1	1	1	1

M1	25.166	19.392	-0.161	-0.316	0.894	0.819	1.092	1
P1	23.666	18.308	1.338	0.767	2.528	1.623	1.557	1
MP1	24.760	18.456	0.244	0.619	1.185	1.478	0.801	1

HAS3		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	23.085	19.075	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	25.115	19.392	-2.031	-0.316	0.245	0.819	0.299	1
P1	22.701	18.308	0.383	0.767	1.304	1.623	0.803	1
MP1	23.566	18.456	-0.482	0.619	0.716	1.478	0.484	1

HEY2		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	30.167	19.075	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	33.570	19.392	-3.403	-0.316	0.095	0.819	0.115	1
P1	29.636	18.308	0.531	0.767	1.445	1.623	0.890	1
MP1	32.266	18.456	-2.099	0.619	0.233	1.478	0.158	1

IRAK1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	22.931	19.075	0	0	1	1	1	1
M1	24.289	19.392	-1.358	-0.316	0.390	0.819	0.476	1
P1	22.211	18.308	0.720	0.767	1.647	1.623	1.015	1
MP1	23.305	18.456	-0.374	0.619	0.772	1.478	0.522	1

MAP3K1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	32.519	19.075	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	31.834	19.392	0.685	-0.316	1.608	0.819	1.963	1
P1	37.297	18.308	-4.778	0.767	0.036	1.623	0.022	1
MP1	36.168	18.456	-3.649	0.619	0.080	1.478	0.054	1

MEF2A		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	24.482	19.639	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	24.851	19.557	-0.370	0.082	0.774	1.053	0.735	1
P1	23.349	18.851	1.132	0.787	2.192	1.644	1.333	1
MP1	24.012	18.892	0.469	0.747	1.384	1.603	0.864	1

NTN1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	32.049	19.639	0	0	1	1	1	1

M1	35.846	19.557	-3.797	0.082	0.072	1.053	0.068	1
P1	29.282	18.851	2.767	0.787	6.807	1.644	4.141	1
MP1	35.479	18.892	-3.430	0.747	0.093	1.603	0.058	1

NUMB		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	
C1	25.899	19.639	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	27.428	19.557	-1.530	0.082	0.346	1.053	0.329	1
P1	25.282	18.851	0.616	0.787	1.533	1.644	0.932	1
MP1	25.867	18.892	0.032	0.747	1.022	1.603	0.638	1

PTEN		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	
C1	16.377	19.639	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	16.594	19.557	-0.217	0.082	0.860	1.053	0.817	1
P1	15.403	18.851	0.973	0.787	1.963	1.644	1.194	1
MP1	14.947	18.892	1.430	0.747	2.694	1.603	1.681	1

RPA1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	
C1	22.813	19.639	0	0	1	1	1	1
M1	24.942	19.557	-2.129	0.082	0.229	1.053	0.217	1
P1	22.127	18.851	0.686	0.787	1.609	1.644	0.979	1
MP1	23.568	18.892	-0.755	0.747	0.593	1.603	0.370	1

TJP1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	
C1	23.794	18.862	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	24.370	18.419	-0.576	0.443	0.671	1.323	0.507	1
P1	23.701	18.585	0.093	0.276	1.067	1.191	0.896	1
MP1	23.802	18.094	-0.008	0.767	0.994	1.623	0.613	1

TRAF2		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	
C1	23.768	18.862	0	0	1	1	1	1
M1	23.943	18.419	-0.175	0.443	0.886	1.323	0.670	1
P1	23.475	18.585	0.293	0.276	1.225	1.191	1.029	1
MP1	23.835	18.094	-0.067	0.767	0.955	1.623	0.588	1

TRP53		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	
C1	20.799	18.862	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1

M1	22.195	18.419	-1.396	0.443	0.380	1.323	0.287	1
P1	20.678	18.585	0.121	0.276	1.088	1.191	0.914	1
MP1	21.577	18.094	-0.777	0.767	0.583	1.623	0.359	1

XIRP1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	31.867	18.862	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	34.063	18.419	-2.197	0.443	0.218	1.323	0.165	1
P1	31.804	18.585	0.063	0.276	1.044	1.191	0.877	1
MP1	34.488	18.094	-2.622	0.767	0.162	1.623	0.100	1

Arid1a		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	21.628	18.592	0	0	1	1	1	1
M1	22.575	18.483	-0.947	0.109	0.519	1.071	0.484	1
P1	21.545	18.552	0.083	0.040	1.059	1.026	1.033	1
MP1	21.979	18.017	-0.350	0.575	0.784	1.438	0.546	1

BSG		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	16.060	18.592	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	16.023	18.483	0.037	0.109	1.026	1.071	0.958	1
P1	15.870	18.552	0.190	0.040	1.140	1.026	1.112	1
MP1	15.576	18.017	0.484	0.575	1.398	1.438	0.973	1

ESR1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	24.465	18.592	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	25.111	18.483	-0.646	0.109	0.639	1.071	0.597	1
P1	23.927	18.552	0.539	0.040	1.452	1.026	1.416	1
MP1	23.364	18.017	1.101	0.575	2.146	1.438	1.493	1

FSTL1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	32.891	18.592	0	0	1	1	1	1
M1	32.422	18.483	0.469	0.109	1.384	1.071	1.292	1
P1	32.904	18.552	-0.014	0.040	0.991	1.026	0.966	1
MP1	33.295	18.017	-0.404	0.575	0.756	1.438	0.526	1

FTO		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	22.705	18.592	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1

M1	23.080	18.483	-0.375	0.109	0.771	1.071	0.720	1
P1	22.706	18.552	-0.001	0.040	0.999	1.026	0.974	1
MP1	22.892	18.017	-0.186	0.575	0.879	1.438	0.611	1

FRAS1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	32.949	19.350	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	33.609	19.155	-0.660	0.195	0.633	1.131	0.559	1
P1	32.430	19.276	0.519	0.075	1.433	1.048	1.367	1
MP1	33.313	18.898	-0.364	0.453	0.777	1.331	0.584	1

IGFBP5		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	30.011	19.350	0	0	1	1	1	1
M1	27.581	19.155	2.429	0.195	5.386	1.131	4.760	1
P1	32.696	19.276	-2.686	0.075	0.155	1.048	0.148	1
MP1	27.537	18.898	2.473	0.453	5.552	1.331	4.172	1

ILK		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	20.862	19.350	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	21.592	19.155	-0.730	0.195	0.603	1.131	0.533	1
P1	20.917	19.276	-0.055	0.075	0.963	1.048	0.919	1
MP1	21.185	18.898	-0.322	0.453	0.800	1.331	0.601	1

IL1RL1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	29.612	19.350	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	30.152	19.155	-0.541	0.195	0.688	1.131	0.608	1
P1	29.229	19.276	0.383	0.075	1.304	1.048	1.244	1
MP1	30.364	18.898	-0.752	0.453	0.594	1.331	0.446	1

IRS1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	25.063	19.350	0	0	1	1	1	1
M1	26.817	19.155	-1.754	0.195	0.297	1.131	0.262	1
P1	25.145	19.276	-0.082	0.075	0.945	1.048	0.901	1
MP1	25.862	18.898	-0.799	0.453	0.575	1.331	0.432	1

ITGA2		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	26.976	19.350	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1

M1	29.951	19.155	-2.975	0.195	0.127	1.131	0.112	1
P1	27.058	19.276	-0.081	0.075	0.945	1.048	0.902	1
MP1	29.910	18.898	-2.933	0.453	0.131	1.331	0.098	1

ITGB5		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	22.747	18.469	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	22.812	18.697	-0.065	-0.228	0.956	0.866	1.104	1
P1	22.704	18.163	0.043	0.306	1.030	1.213	0.849	1
MP1	22.365	18.671	0.382	-0.203	1.303	0.880	1.481	1

JAK2		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	23.886	18.469	0	0	1	1	1	1
M1	23.836	18.697	0.050	-0.228	1.035	0.866	1.195	1
P1	23.695	18.163	0.190	0.306	1.141	1.213	0.941	1
MP1	23.357	18.671	0.529	-0.203	1.443	0.880	1.639	1

Lamb3		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	21.536	18.469	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	21.852	18.697	-0.317	-0.228	0.803	0.866	0.927	1
P1	21.135	18.163	0.400	0.306	1.320	1.213	1.088	1
MP1	20.445	18.671	1.090	-0.203	2.129	0.880	2.420	1

MFN1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	23.347	18.469	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	23.345	18.697	0.002	-0.228	1.001	0.866	1.156	1
P1	23.398	18.163	-0.051	0.306	0.965	1.213	0.796	1
MP1	22.845	18.671	0.502	-0.203	1.416	0.880	1.609	1

NDUFA11		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	20.465	18.469	0	0	1	1	1	1
M1	20.494	18.697	-0.029	-0.228	0.980	0.866	1.132	1
P1	20.285	18.163	0.180	0.306	1.133	1.213	0.934	1
MP1	19.958	18.671	0.507	-0.203	1.421	0.880	1.615	1

PRKACA		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	21.882	18.875	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1

M1	21.871	18.397	0.011	0.478	1.008	1.352	0.745	1
P1	21.463	18.542	0.419	0.332	1.337	1.233	1.084	1
MP1	22.356	18.676	-0.474	0.198	0.720	1.133	0.635	1

TRAF2		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	23.768	18.875	0	0	1	1	1	1
M1	23.943	18.397	-0.175	0.478	0.886	1.352	0.655	1
P1	23.475	18.542	0.293	0.332	1.225	1.233	0.993	1
MP1	23.835	18.676	-0.067	0.198	0.955	1.133	0.842	1

SERPINE1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	21.917	18.875	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	24.242	18.397	-2.325	0.478	0.200	1.352	0.148	1
P1	21.600	18.542	0.317	0.332	1.246	1.233	1.010	1
MP1	24.785	18.676	-2.868	0.198	0.137	1.133	0.121	1

SLC2a4		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	30.487	18.875	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	29.528	18.397	0.959	0.478	1.944	1.352	1.437	1
P1	30.209	18.542	0.278	0.332	1.212	1.233	0.983	1
MP1	30.267	18.676	0.220	0.198	1.165	1.133	1.028	1

POU2F1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	25.459	19.336	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	25.911	18.789	-0.452	0.547	0.731	1.412	0.518	1
P1	25.205	18.992	0.254	0.344	1.193	1.242	0.960	1
MP1	25.225	18.914	0.234	0.422	1.176	1.305	0.901	1

CSNRP3		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	31.967	19.336	0	0	1	1	1	1
M1	32.415	18.789	-0.448	0.547	0.733	1.412	0.519	1
P1	32.030	18.992	-0.063	0.344	0.957	1.242	0.771	1
MP1	33.191	18.914	-1.224	0.422	0.428	1.305	0.328	1

SERTAD2		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	23.918	19.336	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1

M1	24.060	18.789	-0.142	0.547	0.906	1.412	0.642	1
P1	23.594	18.992	0.324	0.344	1.251	1.242	1.007	1
MP1	24.390	18.914	-0.472	0.422	0.721	1.305	0.553	1

PLA2G15		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	28.695	19.336	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	27.058	18.789	1.637	0.547	3.110	1.412	2.202	1
P1	28.249	18.992	0.446	0.344	1.362	1.242	1.097	1
MP1	27.455	18.914	1.240	0.422	2.362	1.305	1.810	1

DZIP1L		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	30.645	19.336	0	0	1	1	1	1
M1	30.786	18.789	-0.140	0.547	0.907	1.412	0.642	1
P1	30.515	18.992	0.131	0.344	1.095	1.242	0.881	1
MP1	31.598	18.914	-0.952	0.422	0.517	1.305	0.396	1

RBM41		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	25.000	19.336	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	25.450	18.789	-0.450	0.547	0.732	1.412	0.518	1
P1	24.852	18.992	0.148	0.344	1.108	1.242	0.892	1
MP1	25.931	18.914	-0.931	0.422	0.525	1.305	0.402	1

CBX5		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	17.506	19.381	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	17.706	18.738	-0.201	0.643	0.870	1.500	0.580	1
P1	16.782	18.858	0.723	0.522	1.651	1.391	1.187	1
MP1	18.747	19.047	-1.241	0.334	0.423	1.235	0.343	1

GNG12		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref
C1	21.786	19.381	0	0	1	1	1	1
M1	21.097	18.738	0.689	0.643	1.612	1.500	1.074	1
P1	21.289	18.858	0.497	0.522	1.411	1.391	1.014	1
MP1	21.746	19.047	0.040	0.334	1.028	1.235	0.833	1

RPH3AI		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref

C1	21.923	19.381	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	22.528	18.738	-0.605	0.643	0.658	1.500	0.438	1
P1	21.581	18.858	0.342	0.522	1.267	1.391	0.911	1
MP1	23.206	19.047	-1.282	0.334	0.411	1.235	0.333	1

CRTC1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	
C1	25.844	19.381	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	25.313	18.738	0.531	0.643	1.445	1.500	0.963	1
P1	25.545	18.858	0.298	0.522	1.230	1.391	0.884	1
MP1	25.801	19.047	0.042	0.334	1.030	1.235	0.834	1

ELMSAN1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	
C1	25.802	19.381	0	0	1	1	1	1
M1	25.579	18.738	0.224	0.643	1.168	1.500	0.778	1
P1	25.575	18.858	0.228	0.522	1.171	1.391	0.842	1
MP1	25.932	19.047	-0.129	0.334	0.914	1.235	0.741	1

LYPLAL1		deltaCt		E ^{deltaCt}		Expression Ratio		
Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	Target	Ref	
C1	25.926	19.381	0.000	0.000	1.000	1.000	1	1
M1	24.981	18.738	0.945	0.643	1.926	1.500	1.283	1
P1	25.716	18.858	0.210	0.522	1.157	1.391	0.832	1
MP1	25.453	19.047	0.473	0.334	1.388	1.235	1.124	1