

FABIO PESCARMONA GALLUCCI

**O uso do sistema CRISPR-Cas9 para silenciamento da MMP9
no tratamento do câncer de bexiga**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Programa de Urologia

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Thalita dos Reis
Faria

SÃO PAULO

2023

FABIO PESCARMONA GALLUCCI

**O uso do sistema CRISPR-Cas9 para silenciamento da MMP9
no tratamento do câncer de bexiga**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Programa de Urologia

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Thalita dos Reis
Faria

SÃO PAULO

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gallucci, Fabio Pescarmona
O uso do sistema CRISPR-Cas9 para silenciamento
da MMP9 no tratamento do câncer de bexiga / Fabio
Pescarmona Gallucci. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.
Orientadora: Sabrina Thalita dos Reis Faria.

Descritores: 1.Câncer de bexiga
2.Metaloproteinase de matriz 3.CRISPR/Cas9 4.MMP-9
5.Matriz extra-Celular 6.Invasão 7.Proliferação
8.Apoptose 9.Migração

USP/FM/DBD-067/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus filhos Victor, Sofia e Mathias, que são a razão da minha existência e por quem sempre procuro me tornar uma pessoa melhor. À minha esposa Vânia, pelo amor, companhia e apoio incondicional.

Agradecimentos

Agradeço a Prof. Sabrina T. dos Reis Faria por me aceitar como aluno de doutorado e por todo o apoio, suporte, paciência e orientação durante o processo, mesmo nos momentos em que me senti “um peixe fora d’água” no laboratório. Sou grato pelo exemplo como pessoa e pesquisadora exemplar.

À Prof. Katia Ramos Moreira Leite, por seu exemplo de liderança, sua disponibilidade em ajudar, e compartilhar sua experiência.

À Dra. Juliana Alves de Camargo, minha parceira durante o doutorado no desbravamento da técnica de CRISPR-Cas9 e que me auxiliou em grande parte dos trabalhos em laboratórios e biotérios, no mais diferentes locais. Sua presença foi fundamental neste projeto. Agradeço pela dedicação, paciência, ensinamentos e pela amizade.

À Dra. Nayara Izabel Viana, cuja participação foi fundamental na obtenção e análise de grande parte dos dados do trabalho e por sempre estar acessível e disposta a me auxiliar com dúvidas, sugestões e críticas, mesmo quando distante.

Aos funcionários, pesquisadores e alunos do LIM-55, que me ajudaram, cada um na sua maneira, na elaboração e execução do projeto, com sugestões, críticas, apoio intelectual e logístico, e nos momentos lúdicos. Agradeço em especial a Ruan Pimenta e Vanessa Guimarães pela contribuição significativa.

Ao Prof. Niels Olsen Saraiva Câmara (ICB-USP), Dra. Meire Ioshie Hiyane (ICB-USP), Msc. Mara de Souza Junqueira (CTO-ICESP), Dr. Eduardo Pompeu

(Biotério Central FMUSP) por nos receber em seus locais de trabalho e nos dar espaço para realizar parte dos experimentos.

Ao Prof. William Carlos Nahas e ao Prof. Miguel Srougi, cujo apoio à pesquisa básica em urologia no LIM-55 tornou este trabalho possível. Agradeço pelo exemplo de liderança, ética, dedicação e por compartilhar diariamente sua experiência.

Agradeço, ainda, aos meus amigos e colegas de HCFMUSP / ICESP – Dr. Alexandre Iscaife, Prof. Álvaro Sarkis, Dr. Guilherme Padovani, Dr. Jean Lestingi, Dr. José Pontes Junior, Dr. Luiz Botelho, Dr. Maurício Cordeiro e Dr. Paulo Afonso de Carvalho pelo companheirismo, incentivo, ajuda com coberturas, trocas de grades, ambulatórios e plantões. Sou grato também ao Dr. Guilherme Rossetti, amigo de longa data, que sempre me estimulou a perseguir este objetivo.

Por fim, não menos importante, agradeço aos meus irmãos Emílio e Thaís, minha mãe Luiza, meus sogros Paulo e Lúcia e meus cunhados Luiza, Sílvia, Osvaldo e Fábio, por todos os momentos em família que me proporcionaram grande felicidade e por me ajudar na criação dos meus filhos, as coisas mais preciosas na minha vida.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas.....	iv
Resumo	v
Summary	vi
1. Introdução	1
1.1 Câncer de Bexiga.....	2
1.2 Metaloproteinases de matriz	6
1.3 CRISPR-Cas9	10
2. Objetivos.....	18
2.1 Objetivo Primário.....	19
2.2 Objetivos Secundários	19
3. Materiais e Métodos.....	20
3.1 Linhagem Celular	21
3.2 CRISPR-Cas9	21
3.3 Ensaio de transfecção in vitro	25
3.4 Ensaio de formação de colônias	26
3.5 Ensaio de proliferação celular por citometria de fluxo.....	26
3.6 Ensaio de apoptose celular por citometria de fluxo.....	28
3.7 Isolamento de RNA	28
3.8 Síntese do DNA complementar.....	29
3.9 Expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real	29
3.10 Ensaio de extração e análise proteica por Western-blotting	30
3.11 Ensaio de fechamento de ferida para avaliação de migração celular..	33

3.12	Ensaio de invasão	33
3.13	Análise estatística	34
4.	Resultados	36
4.1	Validação dos plasmídeos PX-330 após inserção da sequência do sgRNA para MMP9.	37
4.2	Edição gênica in vitro da MMP9 com a técnica de CRISPR-Cas9	40
4.2.1	<i>Validação da transfecção do plasmídeo pX-330 + sgRNA 1 e 2 in vitro</i>	41
4.2.2	<i>Ensaio de formação de colônias</i>	42
4.2.3	<i>Ensaio de apoptose e proliferação celular por citometria de fluxo</i> ...	43
4.2.4	<i>Expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real</i>	44
4.2.5	<i>Expressão proteica por Western-blotting</i>	44
4.2.6	<i>Ensaio de fechamento de ferida para avaliação de migração celular</i>	45
4.2.7	<i>Ensaio de invasão</i>	47
5.	Discussão	48
6.	Conclusões	55
7.	Referências Bibliográficas	57

Lista de Abreviaturas

CaB – Câncer de bexiga

CaB-MI – Câncer de bexiga músculo-invasivo

CaB-NMI - Câncer de bexiga não-músculo-invasivo

CAR – *Chimeric antigen receptor*

Cas – *CRISPR associated genes*

CRISPR – Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

crRNA – *CRISPR-derived RNA*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EUA – Estados Unidos da América

FGFR - *Fibroblast growth factor receptor*

GWAS – *Genomic Wide Association Studies*

HDR – *Homology directed repair*

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

IL-8 – interleucina 8

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ISUP – Sociedade Internacional de Patologia Urológica

LUTS – *Lower Urinary Tract Symptoms* (sintomas do trato urinário inferior)

MEC – Matriz extracelular

MMPs – Metaloproteinases de matriz

NF-κB – fator nuclear kappa B

NFR2 – *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor*

NHEJ – *Non-homologous end joining*

NIH – *National Institutes of Health*

PD-L1 – *Programmed cell death ligand 1*

PD-1 – *Programmed cell death protein 1*

PAM – *Protospacer Adjacent Motif*

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA – Ácido ribonucleico

RNAi – RNA de interferência

RNA_m – RNA mensageiro

RTUb – Ressecção trans-uretral de bexiga

SEER – *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*

sgRNA – *single guide RNA*

STAT3 – *signal transducer and activator of transcription 3*

TALENs – *Transcriptor Activator-like Effector Nucleases*

TIMPs – *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases*

tracrRNA – *trans* - ativação de crRNA

UICC – *Union International Contre le Cancer*

uPAR – *urokinase plasminogen activator receptor*

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

ZFN – *Zinc Fingers Nucleases*

Lista de Figuras

Figura 1. Estadiamento local do CaB	5
Figura 2. Processos induzidos pelas MMPs relevantes para o crescimento e progressão tumoral.....	8
Figura 3. Mecanismo do sistema CRISPR-Cas9 tipo II.....	13
Figura 4. Mecanismo do sistema CRISPR-Cas9 para edição genômica	14
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 0,8% com as amostras do plasmídeo pX-330 com os insertos dos sgRNAs após a digestão.	38
Figura 6. Placas de bactéria DH5 α em meio LB com Ampicilina e suas respectivas colônias	38
Figura 7. Gel de agarose 0,8% dos plasmídeos com sgRNA digeridos com a enzima BbsI.....	39
Figura 8. Sequenciamento dos plasmídeos com os sgRNAs de interesse	40
Figura 9. Linhagem celular T24 transfectada com o plasmídeo PX-330 contendo sgRNA2 para MMP9.....	41
Figura 10. Linhagem celular T24 sem transfecção (controle)	41
Figura 11. Crescimento da linhagem celular T24 transfectada com PX330 + sgRNA2 para MMP9 e seu respectivo controle sem transfecção	42
Figura 12. Ensaio de formação de colônias	42
Figura 13. Ensaios de apoptose e proliferação por citometria de fluxo.....	43
Figura 14. Expressão gênica de MMP-9 nas linhagens celulares T24, transfectadas com o PX-330 com sgRNA1 (G1) e sgRNA2 (G2)	44
Figura 15. <i>Western Blotting</i> de MMP9 e β -actina (controle endógeno) da linhagem T24 das amostras controle e transfectadas.....	45
Figura 16. Ensaio de fechamento de ferida.....	46
Figura 17. Ensaio de fechamento de ferida.....	46
Figura 18. Ensaio de migração no Matrigel™	47

Lista de Tabelas

Tabela 1. sgRNAs para a edição gênica de MMP9	21
Tabela 2. Ensaio de fechamento de ferida	45

Resumo

Gallucci, FP. *O uso do sistema CRISPR-Cas9 para silenciamento da MMP9 no tratamento do câncer de bexiga* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

INTRODUÇÃO: O Câncer de Bexiga (CaB) é o décimo tipo de câncer mais comum entre ambos os sexos, responsável por cerca de 4% de todos os casos novos de câncer. É uma doença de morbidade, mortalidade e custos significativos, principalmente nos casos de estadiamento mais avançados. Com o avanço da pesquisa básica em oncologia, novos marcadores tumorais e mecanismos de evolução da doença têm surgido. Com o advento da técnica de CRISPR-Cas9 para edição genômica, novas perspectivas surgiram no estudo do processo de surgimento e progressão do câncer, como a análise do papel de moléculas específicas no processo de carcinogênese, como a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9). **OBJETIVO:** Analisar o efeito do bloqueio da expressão gênica da MMP-9 utilizando a técnica de CRISPR-Cas9 para edição gênica em células de carcinoma urotelial de bexiga T24-luc. **MÉTODOS:** Inicialmente, foi realizada a inserção das sequências de RNAs guias (sgRNA 1 e 2) para sequências-alvo no gene da MMP-9 no plasmídeo pX-330. Em seguida, os plasmídeos já modificados foram transfectados em linhagens celulares T24-luc e posteriormente, realizadas análises de expressão gênica e proteica por meio de RT-qPCR e *Western-blotting*, respectivamente. Para a análise do impacto funcional do bloqueio da MMP-9, foram realizados ensaios de proliferação celular e apoptose com citometria de fluxo, ensaio de formação de colônias, ensaio de migração celular por meio do teste de fechamento de ferida e ensaio de invasão celular através da técnica de Matrigel™. **RESULTADOS:** Primeiramente, foi realizada a validação dos plasmídeos pX-330 após inserção dos sgRNAs da MMP-9 por meio de sequenciamento. Após a transfecção da linhagem celular T24, comprovada pela presença de GFP positiva na microscopia de fluorescência, observou-se a redução da expressão gênica de MMP-9 utilizando a sgRNA2 e redução da expressão proteica de MMP-9 com ambos sgRNAs. O efeito celular do *knockout* da MMP-9 foi observado por redução da capacidade de proliferação e aumento da apoptose celular em citometria de fluxo e redução da capacidade de formação de colônias *in vitro*, das células editadas em comparação ao controle. Observou-se, ainda, significativa redução na capacidade de migração e de invasão celular de células transfectadas. **CONCLUSÃO:** A edição gênica pela técnica de CRISPR-Cas9 para o silenciamento da MMP-9 em linhagem celular de CaB foi capaz de inibir funções como proliferação, migração e invasão celular, etapas essenciais no processo de progressão tumoral, bem como estimulou a apoptose das células editadas. Tais resultados não só corroboram com o papel da MMP-9 nos processos de tumorigênese como também sugerem a MMP-9 como possível alvo terapêutico.

Descritores: câncer de Bexiga; metaloproteinase de matriz; CRISPR/Cas9; MMP-9; matriz extra-celular; invasão; proliferação; apoptose; migração

Summary

Gallucci, FP. *The use of CRISPR-Cas9 system for MMP-9 silencing in the treatment of bladder cancer* [thesis]. “São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

INTRODUCTION: Bladder Cancer (BCa) is the tenth most common type of cancer among both sexes, responsible for approximately 4% of all new cancer cases. It is a disease of significant morbidity, mortality, and healthcare costs, especially in more advanced cases. With the advancement of basic cancer research, new biomarkers and disease mechanisms have emerged. The arrival of the CRISPR-Cas9 genome editing technique brought new perspectives for basic oncologic research, such as the analysis of the role of specific molecules in the carcinogenesis process, such as matrix metalloproteinase 9 (MMP-9).

OBJECTIVE: To analyze the MMP-9 gene expression downregulation effects by CRISPR-Cas9 genome editing technique in T24-luc bladder urothelial carcinoma cell lines. **METHODS:** Initially, the insertion of guide RNA sequences (sgRNA 1 and 2) for target sequences in the MMP-9 gene in the pX-330 plasmid was performed. Then, the modified plasmids were transfected into T24-luc cell lines, and gene and protein expression were analyzed using RT-qPCR and Western-blotting, respectively. To analyze the functional impact of MMP-9 silencing, cell proliferation and apoptosis assays were performed using flow cytometry, colony formation assay, cell migration assay using the wound healing test, and Matrigel™ cell invasion assay. **RESULTS:** Firstly, sequencing validated the pX-330 plasmids after insertion of the MMP-9 sgRNAs. After transfecting the T24 cell line, proven by the presence of positive GFP in fluorescence microscopy, a reduction in MMP-9 gene expression was observed using sgRNA2, and a reduction in MMP-9 protein expression was observed with both sgRNAs. The effect of MMP-9 knockout on T24 cells was observed by reduced proliferation capacity, increased cellular apoptosis in flow cytometry, and reduced *in vitro* colony formation capacity of edited cells compared to the control. A significant reduction in transfected cells' migration and invasion capacity was also observed. **CONCLUSION:** The CRISPR-Cas9 gene editing technique for silencing MMP-9 in BCa cell lines inhibited functions such as proliferation, migration, and cell invasion, essential steps in the tumor progression process, and increased apoptosis of edited cells. These results support the role of MMP-9 in tumorigenesis processes and suggest MMP-9 as a potential therapeutic target.

Descriptors: bladder cancer; matrix metalloproteinases; CRISPR/Cas9; MMP-9; extracellular matrix; invasion; proliferation; apoptosis; migration

1. Introdução

1.1 Câncer de Bexiga

O Câncer de Bexiga (CaB) é o décimo tumor de maior incidência globalmente, considerando-se ambos os sexos. Segundo dados da IARC (*International Agency for Research on Cancer – WHO*), foram registrados 573.000 novos casos de CaB, com 213.000 mortes relacionadas à doença no mundo (1). Nos Estados Unidos da América (EUA), foram estimados em 2023 82.290 novos casos de CaB com 16.710 mortes relacionadas (2), sendo assim a sexta neoplasia de maior incidência em ambos os sexos, representando 4,2% dos casos novos de câncer nos EUA (3). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram estimados 7.870 novos casos de CaB no Brasil em 2022. Esses valores correspondem a uma incidência estimada de 7,45 casos novos a cada 100 mil homens e 3,14 para cada 100 mil mulheres (4).

O CaB é 4 vezes mais comum entre homens, e 75,2% dos casos novos são diagnosticados em pacientes com idade acima dos 65 anos, com mediana de idade de 73 anos (3). Cerca de 85% dos casos novos se apresentam ao diagnóstico com doença localizada, com uma sobrevida relativa de 5 anos de 77,1% quando comparada à sobrevida geral da população no mesmo período, segundo dados do SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results Program – NIH*) (3).

O tabagismo é o principal fator de risco para CaB. Estimativas apontam que o tabaco é responsável direto por até metade dos casos (5), sendo que o risco de desenvolver a neoplasia em fumantes ativos e ex-tabagistas é de 4,04 e 2,03 vezes maior que a população geral, respectivamente. Outros fatores de risco conhecidos incluem exposição ocupacional a carcinógenos como aminas aromáticas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (6), exposição a

radioterapia (ou radiação ionizante), uso de medicamentos específicos (fenacetina, ciclofosfamida) e infecção do trato urinário inferior por esquistossomose também estão associados a maior risco de CaB (7, 8, 9).

Além disso, existe crescente evidência de que fatores genéticos podem estar envolvidos na incidência de tumores uroteliais. Estudos de associação genômica ampla (GWAS – *Genomic Wide Association Studies*) identificaram diversos *loci* possivelmente associados a risco de CaB (10, 11)

Hematúria macroscópica é o sintoma mais comum associado ao CaB. Outros sintomas frequentemente apresentados por pacientes sob suspeita de CaB (em especial carcinoma *in situ* – CIS) são queixas miccionais, especialmente sintomas irritativos (LUTS – *Lower Urinary Tract Symptoms*) (12, 13).

A confirmação diagnóstica é realizada por meio de exames complementares como cistoscopia com biópsia, citologia oncológica urinária e exames de imagem do trato urinário inferior e superior (12, 13). Diversos testes com marcadores moleculares urinários foram desenvolvidos (14). Estes não substituem a cistoscopia como principal método diagnóstico, mas podem auxiliar no manejo clínico dos pacientes.

A ressecção transuretral de bexiga (RTUb) deve ser realizada em todos os pacientes com suspeita de CaB baseada em achados de exames de imagem e/ou cistoscopia. Os objetivos deste procedimento são: diagnóstico histológico através da obtenção amostra tecidual para exame anatomopatológico; estadiamento da lesão (determinando o nível de infiltração tumoral na parede vesical e grau histológico da lesão); tratamento da lesão por meio da sua

remoção completa, quando factível. A ressecção completa da lesão vesical é sempre desejável, fator este que está relacionado a melhor prognóstico oncológico (15). Outro aspecto essencial na RTUb é a representação adequada da musculatura detrusora no espécime cirúrgico, visando o estadiamento local adequado da lesão (16, 17). Uma segunda RTUb (ou Re-RTU) pode ser indicada em casos de amostragem insuficiente de musculatura detrusora.

Dentre os diferentes tipos histológicos, o carcinoma urotelial é o tipo histológico mais comum, compreendendo cerca de 95% dos tumores de bexiga. (12, 13).

Após estadiamento local e sistêmico adequado, utilizando os dados da RTUb e de exames de imagem, é possível dividir o CaB em: CaB não-músculo invasivo (CaB-NMI) ou superficial; CaB músculo-invasivo (CaB-MI); doença localmente avançada (invasão de gordura peri-vesical e/ou estruturas adjacentes); doença metastática (Figura 1). São distintos do ponto de vista histológico, molecular e em sua história natural, e, portanto, possuem manejo clínico diferente.

O CaB-NMI ou superficial engloba a grande maioria dos casos de carcinoma urotelial de bexiga, correspondendo a cerca de 75% dos casos novos diagnosticados (18). Estes tumores mostram um comportamento biológico, assim como um perfil molecular, distintos do CaB-MI. Eles possuem comportamento heterogêneo, mas caracteristicamente recidivam e eventualmente progridem a despeito do tratamento (19). Estão nesse grupo o carcinoma não invasivo (pTa) e aquele invasivo na lâmina própria (pT1). O carcinoma urotelial invasivo (pT1) corresponde a 20% dos casos e apresenta recorrência em cerca de 45% (20, 21) e progressão em 30-50% (20).

Já pacientes com diagnóstico de CaB-MI ou doença localmente avançada apresentam pior sobrevida de longo prazo (29-69%) (22, 23, 24), enquanto na doença metastática, as taxas de mortalidade podem superar 80%.

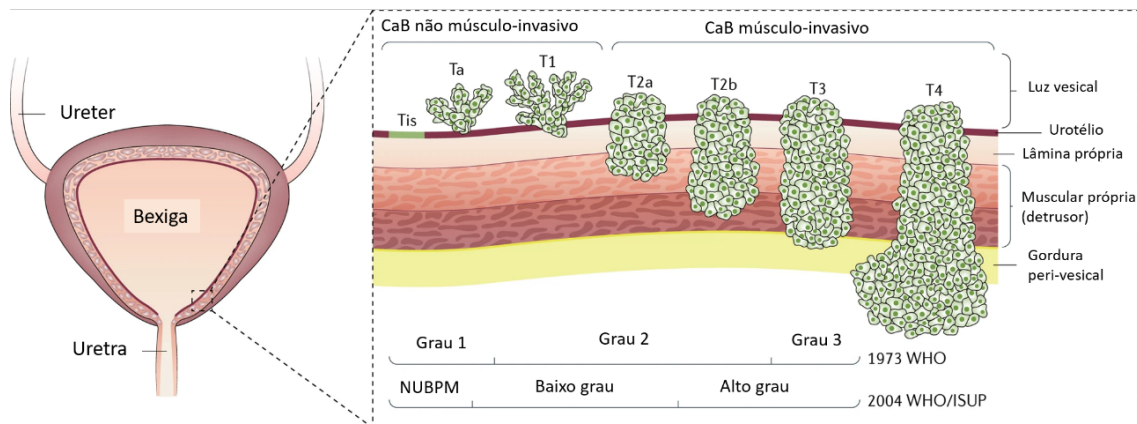


Figura 1. Estadiamento local do CaB – Adaptado de Sanli, O., Dobruch, J., Knowles, M. et al. Bladder cancer. Nat Rev Dis Primers 3, 17022 (2017). (25)

A recorrência do CaB-NMI e sua progressão para doença músculo-invasiva ou metastática requerem tratamento e seguimento clínico mais complexos e invasivos, impactando negativamente a qualidade de vida (26) e gerando aumento no custo assistencial por paciente para o sistema de saúde (27). Nos EUA, o CaB possui o maior custo de tratamento por paciente e o quinto maior custo total de seguimento (28, 29). Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de pesquisas no sentido de caracterizar os mecanismos moleculares do processo de carcinogênese do CaB, progressão tumoral e recorrência, para possível advento de novos métodos diagnósticos, prognósticos e terapêuticos com o objetivo de reduzir os custos e o prejuízo na qualidade de vida dos pacientes.

Nesse sentido, o estudo de marcadores moleculares para seleção de pacientes para terapia dirigida, no contexto de doença avançada, tem

progredido, porém o papel desses marcadores no arsenal terapêutico ainda precisa ser claramente definido. Alterações oncogênicas, como as mutações do gene FGFR (*fibroblast growth factor receptor*) ou outras formas de teste de biomarcadores de imunoterapia como a expressão tumoral de PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) são exemplos de marcadores com possível aplicação clínica (30). No contexto de biomarcadores, as metaloproteinases de matriz (MMPs) são de especial interesse de nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Investigação Médica de Urologia da FMUSP (LIM-55), em especial a MMP-9, cuja função nos processos tumorais do CaB ainda é controversa na literatura. Dessa forma, a investigação das funções da MMP-9 no carcinoma urotelial de bexiga é necessária, a fim de obter novas ferramentas diagnósticas, prognósticas e eventualmente terapêuticas.

1.2 Metaloproteinases de matriz

A matriz extracelular (MEC) possui um papel central na organização da arquitetura tecidual tanto em animais quanto humanos, constituindo o suporte estrutural para as células. A MEC, porém, não é apenas uma estrutura passiva, mas sim um sistema dinâmico que interage com as diferentes células e influencia suas funções, como proliferação, crescimento, diferenciação, migração, adesão e sobrevivência celular (31). Reciprocamente, as células podem exercer influência e remodelar a MEC a sua volta. Essa interação célula-MEC é essencial na manutenção do microambiente e homeostase (32).

As Metaloproteinases de Matriz (MMPs) são proteínas pertencentes a uma família de enzimas proteolíticas ou endoproteinases que degradam vários

componentes da MEC. Elas compartilham diversas similaridades entre si quanto a estrutura, regulação e função. Sua estrutura é composta por 4 regiões: o pró-domínio, domínio catalítico, uma região de dobra (*"hinge region"*) e um domínio hemopexina e as MMPs podem ser agrupadas em 4 grupos: colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas (31). Elas têm papel importante em muitos eventos biológicos além da degradação da MEC, como cicatrização, angiogênese, inflamação, embriogênese e até mesmo estágios iniciais da carcinogênese (Figura 2) (31) e sua atividade é regulada por inibidores endógenos conhecidos como TIMPs (*Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases*) (33).

A expressão da maioria das MMP é baixa em tecido normal e alta quando há remodelamento tecidual. A expressão pode ser induzida por citocinas, fatores de crescimento, agentes químicos, estresse físico, oncogenes e interações com a matriz extracelular (34).

O envolvimento das MMPs nos processos de remodelamento da MEC as torna importantes agentes no desenvolvimento de patologias humanas, incluindo neoplasias, onde sua interação com a MEC tem relação com os processos de crescimento tumoral e metástase tornando essas moléculas candidatas a marcadores biológicos de diagnóstico e prognóstico bem como alvos para terapia dirigida. Sendo assim, diversos estudos foram publicados nos últimos anos envolvendo a expressão gênica das MMPs e seus reguladores em diferentes tipos de neoplasia (incluindo tumores do trato genito-urinário), demonstrando que as MMPs não afetam somente a invasão celular, mas também o comportamento celular e progressão tumoral (35, 36, 37).

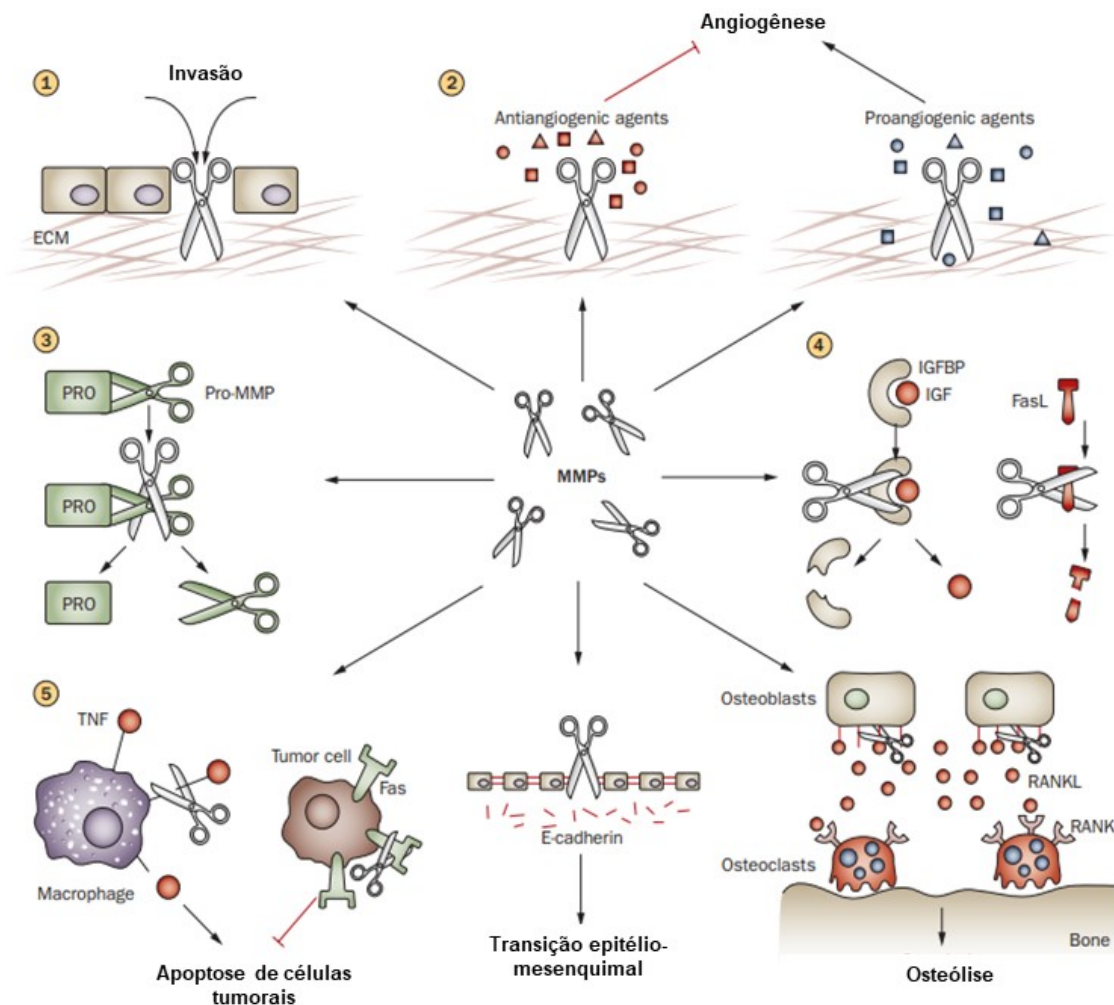


Figura 2. Processos induzidos pelas MMPs relevantes para o crescimento e progressão tumoral. **(1)** Degradação da MEC é um pre-requisito para invasão tecidual, progressão e metástase. **(2)** MMPs podem levar a aumento de fatores tanto pró-angiogênicos quanto anti-angiogênicos, influenciando o processo de angiogênese no microambiente tumoral. **(3)** MMPs podem ativar outras MMPs removendo o domínio do pró-peptídeo. **(4)** Interação com diversas proteínas. Exemplo: inativação de FasL leva a resistência a apoptose. **(5)** Inativação proteolítica de domínios extracelulares de proteínas transmembrana como RANKL, E-caderina, TNF e Fas, levando a aumento da osteólise induzida por tumor, transição epitelial-mesenquimal e inibição da apoptose. – Adaptado de Szarvas *et al.* Matrix metalloproteinases and their clinical relevance in urinary bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2011;8(5):241-54.

No câncer de próstata (CaP), por exemplo, a literatura procurou estabelecer a relação entre o desenvolvimento do CaP e a expressão das MMPs e/ou seus inibidores. Muitos dos estudos focaram no papel destas enzimas como

marcadores de atividade da doença e/ou prognóstico (35, 38, 39, 40, 41, 42, 43), enquanto outros corroboram a ideia de que o desequilíbrio entre as MMPs e seus reguladores pode estar relacionado ao comportamento mais agressivo de alguns tumores (44).

No CaB, o aumento da expressão das MMPs está frequentemente presente e correlacionado com maior risco de progressão e recorrência da doença (45, 46, 47). Seu envolvimento nos estágios iniciais da carcinogênese do CaB, através da regulação da diferenciação celular, angiogênese, apoptose e crescimento tumoral, também fora reportado (31). Entretanto, o papel das MMPs na patogênese, diagnóstico e prognóstico do CaB ainda é controverso, e investigação mais abrangente é necessária. Neste ponto, vale destacar a contribuição LIM-55. Em trabalho de 2012, Reis *et al* demonstraram que o aumento da expressão da MMP-9 está relacionado a fatores prognósticos desfavoráveis como invasão local, alto grau nuclear e aumento da chance de recorrência em pacientes submetidos a RTU de bexiga (47). Em 2021, Srougi *et al* avaliaram o uso de um painel de biomarcadores urinários para identificar recorrência tumoral em pacientes com CaB-NMI em seguimento clínico pós-tratamento. Um dos biomarcadores avaliados foi a MMP-9, a qual foi associada ao diagnóstico de recorrência (48).

A MMP-9 pertence ao sub-grupo das gelatinases, com atividade proteolítica principalmente contra o colágeno tipo IV (49). Sua atividade na MEC resulta em interações com diversos outros alvos, como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, que por sua vez ativam vias moleculares envolvidas no controle do crescimento celular, invasão, inflamação, migração e angiogênese (50). A expressão aumentada da MMP-9 pode ser observada em diversos

tumores humanos metastáticos, como os de mama, esôfago e gástrico (51). O papel da MMP-9 no processo de carcinogênese e progressão tumoral no CaB, porém, ainda é controverso na literatura (31), ao passo que, enquanto alguns estudos demonstram que a expressão de MMP-9 é aumentada em casos de CaB quando comparada à sua atividade em tecido urotelial normal (52, 53) e pode ser correlacionada fatores prognósticos desfavoráveis como alto grau tumoral, tamanho, estadio e progressão tumoral (47, 53, 54), outros não evidenciaram associação da MMP-9 com pior prognóstico (55, 56, 57). Sendo assim, torna-se evidente a necessidade de maior investigação acerca da relação da MMP-9 no processo de carcinogênese do CaB, sendo a redução ou inibição da expressão de MMP-9 em células tumorais de CaB uma das linhas de pesquisa possíveis.

1.3 CRISPR-Cas9

Em 1987, pesquisadores da Universidade de Osaka (Japão), identificaram um loco peculiar no genoma da bactéria *Escherichia coli*, constituído por uma configuração incomum: sequencias repetidas e sequencias espaçadoras intercaladas e de função até então desconhecidas (58). Posteriormente, observou-se que tais sequências foram investigadas por diferentes grupos, sendo identificadas no genoma de diversas outras espécies de organismos procariotos. Somente em 2002 foi cunhada a sigla CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) para designar tais sequencias (59). Com a evolução da pesquisa, foram identificados genes próximos ao loco CRISPR, que codificam nucleases, helicases e polimerases. Tais genes foram denominados Cas (*CRISPR associated genes*) (59). Com o avanço dos estudos

do loco CRISPR, foi demonstrado que as sequencias espaçadoras tem origem extra-cromossômica, ou seja, derivadas de plasmídeos ou vírus. Além disso, foi observado que vírus eram incapazes de infectar as bactérias cujas sequencias espaçadoras eram complementares a trechos do seu genoma (60). Baseado nessas observações, foi postulado que o sistema CRISPR-Cas seria uma espécie de sistema imunológico adaptativo dos organismos procariotos, sendo as sequencias espaçadoras uma espécie de memória contra organismos invasores anteriores, de modo que as moléculas de RNA transcritas a partir dessas sequencias seriam complementares ao DNA invasor (denominadas crRNA ou CRISPR-*derived* RNA).

O mecanismo de defesa adaptativa de procariotos pelo sistema CRISPR-Cas se resume a três etapas: adaptação ou aquisição, biogênese do crRNA e interferência (ação efetora contra o invasor) (Figura 3).

A primeira etapa (adaptação) é marcada pela aquisição de uma nova sequência espaçadora no loco CRISPR. Isso ocorre na ocasião de uma primeira infecção da bactéria pelo patógeno, através da clivagem do material genético invasor e sua integração como espaçadores no loco CRISPR pelas enzimas Cas1 e Cas2.

A seguir (etapa de biogênese do crRNA), ocorre a transcrição ininterrupta do loco CRISPR, gerando uma molécula precursora do RNA de CRISPR, conhecida como pré-crRNA, a qual contém diversas sequencias repetidas e espaçadoras. Com a ação da enzima RNase III e de uma molécula tracrRNA a (sequência não codificante *trans* - ativação de crRNA), o pré-crRNA é processado, dando origem a diversas moléculas de RNA menores, denominadas

crRNA, complementares a uma sequência espaçadora alvo distinta do loco CRISPR.

Finalmente, na fase de interferência, o crRNA forma complexos com as proteínas Cas9. Tais complexos crRNA/Cas9 reconhecem por complementariedade as sequências exógenas e as clivam(61). Para que haja o reconhecimento do complexo com a sequência-alvo invasora, é necessária a presença de uma sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) adjacente. Tal sequência PAM tem a função de evitar que o complexo crRNA/Cas9 realize a clivagem do próprio loco CRISPR da bactéria (62). No caso específico da Cas9 derivada do *Streptococcus pyogenes* (spCas9), a sequência PAM é composta por NGG, ou seja, duas moléculas de guanina (GG) precedidas de qualquer nucleotídeo (N).

Foram descritos três sistemas CRISPR-Cas principais (tipo I, tipo II e tipo III), baseados na organização de seus *loci* CRISPR e na ação de diferentes enzimas Cas. O sistema tipo II é o mais simples dos três, e o único com a ação da endonuclease Cas9, e funciona conforme descrito anteriormente. Devido sua simplicidade, o sistema CRISPR-Cas do tipo II é o utilizado no progresso em pesquisa com edição gênica.

Com a evolução do conhecimento sobre o sistema CRISPR-Cas9, logo concluiu-se de que se tratava de uma ferramenta eficaz para manipulação genética. Isso tornou possível editar com sucesso genoma de células eucariontes, como mamíferos (63), com maior facilidade em comparação às técnicas até então disponíveis (como ZFN – *Zinc Fingers Nucleases* e TALENs – *Transcriptor Activator-like Effector Nucleases*), mais complexas, caras, trabalhosas e menos específicas.

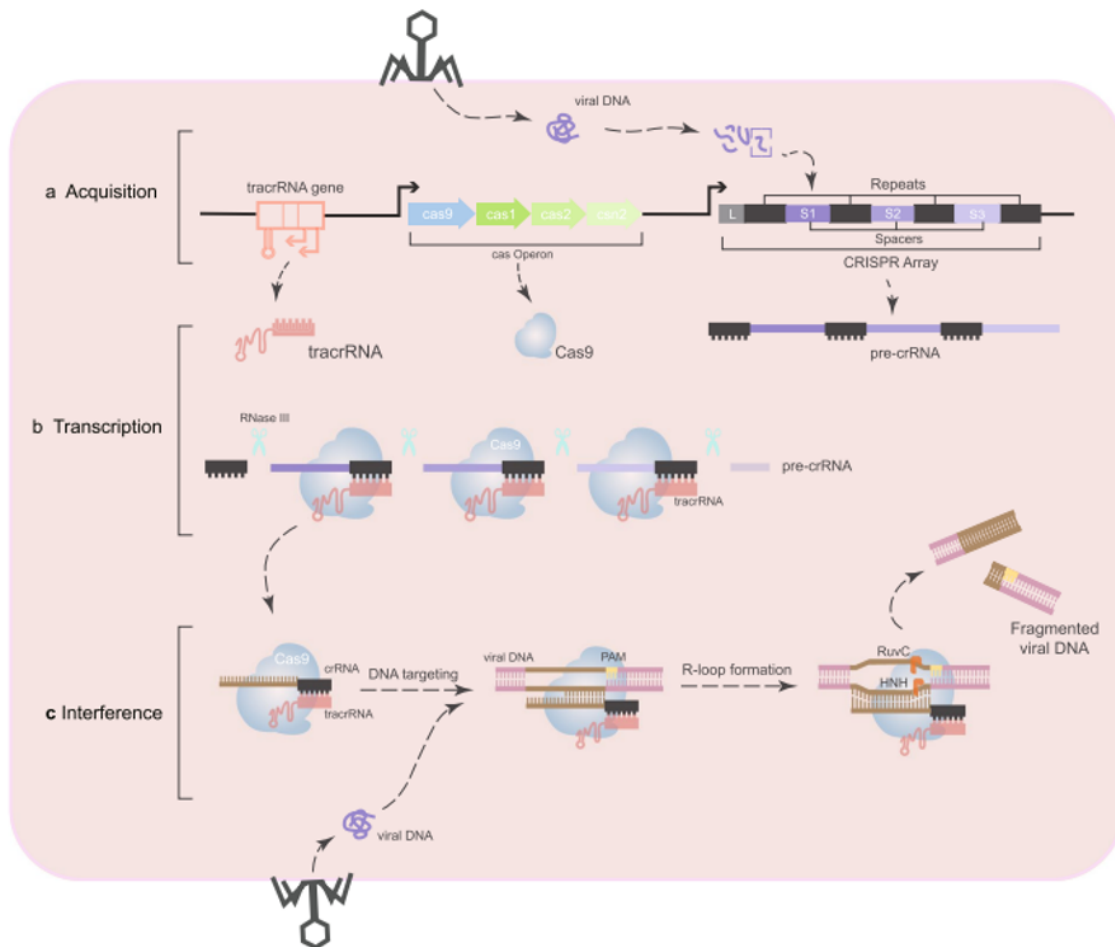


Figura 3. Mecanismo do sistema CRISPR-Cas9 tipo II. **A)** Na fase de aquisição, após infecção pelo vírus, a sequência de DNA invasora é clivada e integrada ao loco CRISPR do hospedeiro como uma sequência espaçadora (ou spacer) e separada por sequencias repetitivas. **B)** Na fase de biogênese do crRNA, o pré-crRNA é transcrito, clivado pela RNaseIII e hibridizado com o tracrRNA, formando o crRNA. **C)** Na fase de interferência, a endonuclease Cas9 realiza a clivagem do DNA invasor, na sequência complementar ao crRNA. – Adaptado de Wang, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer. Mol Cancer 21, 57 (2022) (64)

Para a aplicação da técnica de CRISPR-Cas9 em laboratório, pesquisadores desenvolveram o *single guide RNA* (sgRNA ou gRNA), uma molécula quimérica resultante da fusão do crRNA e tracrRNA, para acumular as duas funções. Sendo assim, a técnica de CRISPR-Cas9 necessita de apenas de dois elementos exógenos: a Cas9 e o sgRNA, tornando o procedimento experimental mais simples (62). A clivagem do DNA alvo se dá a cerca de 3 nucleotídeos de distância da sequência PAM, dentro da sequência alvo, por meio

de quebra de dupla fita de DNA. Para correção dessa quebra do genoma, a célula inicia seus mecanismos de reparo do DNA, que podem ocorrer por meio da junção de pontas não-homólogas (NHEJ – *non-homologous end joining*) ou por reparo direcionado por homologia (HDR – *homology directed repair*), sendo que, no primeiro, as pontas das fitas de DNA clivado são prontamente conectadas, geralmente levando a mutações devido pequenas inserções ou deleções (*indels*), enquanto no segundo, são inseridas sequências de DNA na região clivada utilizando um *template* de DNA homólogo à região alvo.

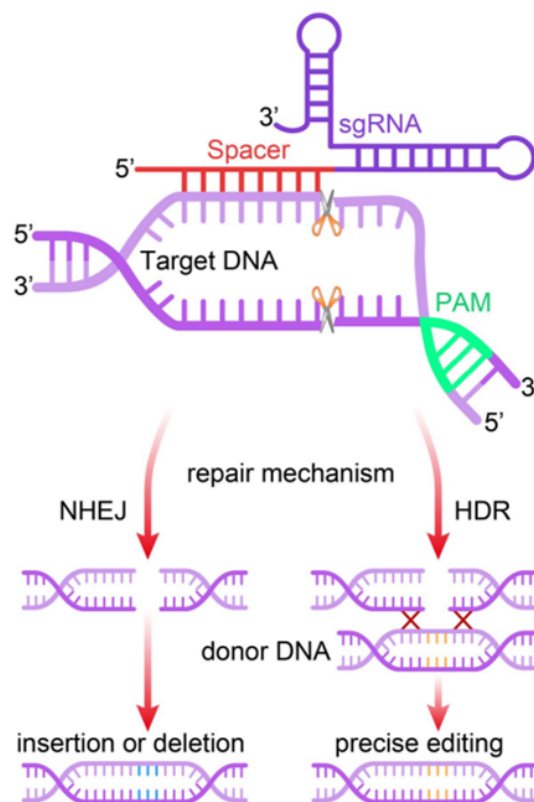


Figura 4. Mecanismo do sistema CRISPR-Cas9 para edição genômica. O sgRNA direciona a Cas9 para a sequência complementar, onde a Cas9 irá realizar a quebra de dupla fita do DNA. O alvo no genoma deve obrigatoriamente ser sucedido pela sequência PAM para o funcionamento adequado da Cas9. As quebras de dupla fita são reparadas por NHEJ ou HDR, a qual pode ser explorada para introdução de uma sequência nova desejada. – Adaptado de Zhang *et al.* Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer. Mol Cancer (2021) 20:126 (65)

A principal aplicação da técnica de CRISPR-Cas9 é a edição gênica, porém com a descoberta de novas variações e o desenvolvimento de modificações nas enzimas Cas, a técnica tornou-se mais versátil, podendo ser aplicada também para marcação de DNA, regulação da expressão gênica, clivagem de RNAs, mapeamento de genes e rastreamento de RNAs (66), expandindo a gama de aplicações da técnica tanto em pesquisa quanto no uso clínico.

No campo da oncologia, é de amplo conhecimento que o câncer é uma doença ocasionada por diversas mutações genéticas herdadas ou adquiridas, bem como alterações epigenéticas que modificam a expressão de genes importantes no processo de tumorigênese. Com os avanços tecnológicos das últimas décadas na identificação e sequenciamento de genes relacionados à iniciação e progressão tumoral, bem como o desenvolvimento da técnica de edição genética com CRISPR-Cas9, surgiu a possibilidade de seu uso para estudar a biologia, bem como obter ferramentas diagnósticas e terapêuticas para o tratamento do câncer, considerando que esse sistema pode atuar no reparo, regulação de expressão e identificação de genes e é altamente específico e controlável (67). Dessa forma, a técnica de CRISPR-Cas9 pode ser utilizada na pesquisa em oncologia para a exploração de mecanismos e tratamentos do câncer, como na identificação e estudo de oncogenes, genes supressores de tumor por meio de *knockout* e *knockin* dos genes. Em estudo de 2019, Li *et al* realizaram o knockout do gene do CD133 em células de câncer colorretal por meio da técnica de CRISPR-Cas9 e observaram que as células modificadas apresentaram redução da expressão de vimentina (proteína relacionada à

transição epitélio-mesenquimal) e perda da capacidade de migração e invasão celular (68). Um outro exemplo do uso da edição gênica por meio do CRISPR-Cas9 é na investigação de genes relacionados a resistência a quimioterapia. Bialk *et al* demonstraram que o *knockout* utilizando CRISPR-Cas9 do gene NFR2 (*Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor*) em células de câncer de pulmão resultou em maior sensibilidade à agentes quimioterápicos, como cisplatina e carboplatina (69).

O processo de desenvolvimento tumoral possui diversas etapas envolvendo interações complexas entre células neoplásicas e sistema imunológico do paciente. Dessa forma, a edição gênica com CRISPR-Cas9 pode ser utilizada para editar células do sistema imune (linfócitos T) *in vitro* com inserção de uma sequência que codifique um receptor de antígeno quimérico (ou CAR – *chimeric antigen receptor*), gerando assim células CAR-T mais eficientes (70). Outra possibilidade atualmente explorada é o *knockout* do gene responsável pela expressão de PD-1 (*programed cell death protein -1*) em linfócitos T *in vitro*, gerando células T impossibilitadas de interagir com a molécula PD-L1 expressa em alguns tipos de tumores, tornando-as mais eficazes na ação antitumoral. Estudos clínicos utilizando essa estratégia em diversos tipos de câncer estão em fase de planejamento ou execução (*ClinicalTrials.gov* – NCT03081715, NCT02793856, NCT03044743, NCT04417764, NCT03545815) (71, 72, 73, 74, 75).

Concluindo, o sistema CRISPR-Cas9 se mostra uma ferramenta versátil, de baixo custo, com planejamento e execução mais simples quando comparada aos métodos alternativos disponíveis para manipulação genética, com uso cada vez mais difundido na pesquisa básica em oncologia e perspectiva de futuro uso

clínico para o tratamento do câncer. A literatura não responde qual é o efeito do bloqueio da expressão da MMP-9 no CaB com foco terapêutico. Através do uso do sistema CRISPR-Cas9, será possível estudar o efeito do *knockout* do gene e a perda total de sua função, com seus efeitos na proliferação, apoptose, nos mecanismos de migração e invasão celular.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Primário

Analisar o efeito do bloqueio da expressão gênica da MMP-9 utilizando a técnica de CRISPR-Cas9 para edição genética em células de carcinoma urotelial de bexiga T24-luc.

2.2 Objetivos Secundários

- Padronização e validação das técnicas envolvidas na edição gênica pela técnica de CRISPR-Cas9, utilizando plasmídeos com insertos de sgRNAs previamente selecionados.
- Análise da expressão gênica e proteica da MMP-9 por meio de qRT-PCR e *Western-blotting*, respectivamente, após transfecção das células T24-luc.
- Análise da inibição da capacidade de migração e invasão celular na linhagem T24-luc após o bloqueio do gene MMP-9
- Estudo do papel da MMP-9 nos processos de migração e invasão celular *in vitro*

3. Materiais e Métodos

3.1 Linhagem Celular

Foi utilizada a linhagem de CaB humano T24 (76), a qual fora previamente transfectada com o gene da luciferase do vaga-lume (Firefly) no Laboratório de Vetores Virais do Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) e cultivada em meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica e antimicótica (*Sigma Co, St. Louis, MO, EUA*). As células no meio de cultura foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e o meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. A linhagem celular T24 é proveniente de tumor urotelial invasivo de alto grau de bexiga (77).

3.2 CRISPR-Cas9

A padronização experimental da técnica CRISPR-Cas9 foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Zhang *et al* (78). Para tal, foram selecionadas três sequências específicas de sgRNAs, sendo duas no exon 1 e uma no exon 2 do gene da MMP-9 (Tabela 3).

Tabela 1. sgRNAs para a edição gênica de MMP9

GUIDES	TOP	BOTTOM
sgRNA 1	CACCGgtgagaaccaatctcaccgac	AAACgtcggtgagattggttctcacC
sgRNA 2	CACCGgaagggtggactggcgctgctc	AAACgacagcgccagtccacccttcC
sgRNA 3	CACCGgcatgccaacccccacggtgctc	AAACcgcaccgtgggggttcgcatgcC

Para os experimentos com CRISPR-Cas9, utilizamos o plasmídeo pX-330 (*pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 – Addgene™ plasmid #42230*) (79) o qual possui sequência para resistência a Ampicilina e Puromicina, GFP, Cas9, e o sítio de restrição para a enzima de digestão, onde será feita a inserção das sequências dos sgRNAs. O plasmídeo foi digerido na concentração de 1µg por 30 minutos a 37°C com a enzima BbsI. A validação da digestão foi obtida em gel de agarose 0,8%.

Paralelamente, foi realizado o anelamento dos sgRNAs top + bottom, os quais são complementares, na concentração de 100µM, utilizando a solução tampão da enzima T4 Ligase. Utilizando o termociclador, a reação foi conduzida na seguinte sequência: 37°C por 30 minutos; 95°C por 5 minutos; redução da temperatura em 5°C por minuto, até atingir 25°C.

Em sequência ao anelamento dos sgRNAs, foi realizada a inserção das mesmas no plasmídeo já digerido pela enzima BbsI, por meio da T4 Ligase. Para a reação de inserção, foram utilizados 50ng do plasmídeo pX-330, 1µl dos sgRNAs já anelados, diluídos na proporção 1:200, 1µl da enzima T4 Ligase, mantidos em solução durante 10 minutos a 25°C.

Após a inserção dos sgRNAs, foi efetuada a transformação dos plasmídeos em bactérias *E.coli* cepa Dh5α. Para tal, foram utilizados 25ng do plasmídeo já com o sgRNA inserido; 5µl de CaCl₂ a 1M durante 30 minutos a 0°C; 1 minuto a 42°C; 2 minutos a 0°C. A transformação foi executada via choque térmico. A seguir, as bactérias foram expandidas em 500µl em meio SOC durante 2 horas a 37°C e, posteriormente, semeadas em meio de cultura com ágar e ampicilina, por uma noite.

As colônias foram selecionadas e expandidas em meio de cultura LB com ampicilina, em volume de 3ml. Os plasmídeos foram, então, extraídos das bactérias com o *kit Mini Prep (Thermo #k210011)*, por meio da centrifugação das amostras contendo as bactérias a 2000rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, o *pellet* foi suspenso em 250µl de tampão R3 contendo a enzima RNase A. A seguir, foram adicionados 250 µl do tampão L7 e realizada a incubação da solução durante 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 350µl do tampão N4. As amostras foram então homogeneizadas e centrifugadas a 12000Gs durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma coluna contendo um tubo de 2 ml e submetido à centrifugação a 12000Gs por 1 minuto. O líquido que passou pela coluna foi descartado e retornamos a coluna para um novo tubo. Foram adicionados 500 µl do tampão de lavagem (W10) com etanol na mesma coluna. Foi realizada a incubação das amostras por 1 minuto em temperatura ambiente e em seguida centrifugação a 12000Gs por 1 minuto. O líquido sobrenadante foi descartado e 700µl do tampão (W9) com etanol foram adicionados à coluna. Foi realizada novamente a centrifugação das amostras a 12000Gs por 1 minuto. O líquido sobrenadante foi descartado e a coluna foi novamente centrifugada a 12000Gs por 1 minuto. A seguir da centrifugação, em um novo tubo, foram adicionados à coluna, 75µl do tampão TE a 70°C e realizada a incubação durante 1 minuto em temperatura ambiente. Finalmente, foi realizada a última centrifugação e as amostras foram armazenadas a -20°C após a leitura.

Realizada a extração, os plasmídeos contendo os insertos (sgRNAs) foram digeridos com a enzima BbsI e validados em um gel de agarose 0,8%.

Enfim, foi realizada a reação de PCR e de sequenciamento dos plasmídeos com os insertos dos diferentes sgRNAs para validação final das amostras, sob as seguintes condições: *Primer Fwd*: 5'GGGCCTATTTCCCATGATTCC-3' e *Rev*: 5'CGCGCTAAAAACGGACTAGC-3'. Os *primers* e DNTP foram utilizados na concentração de 10 μ M e a reação de PCR foi realizada na configuração a seguir: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos em 95°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 5 minutos. Em seguida, foi realizada corrida em gel de agarose para validação da reação. Para o sequenciamento, foram feitas duas reações distintas, utilizando uma mesma amostra de PCR, porém uma reação utilizando o *primer Fwd* e outra o *primer Rev*. Para as reações, foram adicionados o reagente *Big Dy* e o tampão. A reação foi realizada sob as seguintes condições: 96°C por 2 minutos, 35 ciclos de: 96°C por 1 segundo, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após a validação dos plasmídeos por meio do sequenciamento, as amostras das bactérias contendo os plasmídeos com seus respectivos insertos foram expandidas em 450ml de meio de cultura LB com Ampicilina, *overnight* a 37°C.

Posteriormente, essas amostras foram extraídas com o kit *Maxiprep* (#K210017). As bactérias foram centrifugadas a 4000Gs durante 10 minutos, em temperatura ambiente. Foram adicionados ao *pellet* 30 ml do tampão (EQ1), diretamente à coluna do kit, até passar todo o líquido passivamente com a gravidade e o filtrado foi descartado. Em seguida, foram adicionados às amostras 10ml do tampão R3 contendo RNase A. Logo após, foram adicionados 10ml do tampão L7. Passados 5 minutos, foram adicionados 10 ml do tampão N3. Todo o conteúdo foi adicionado à coluna, com passagem de toda a solução

passivamente pela gravidade. A seguir, foram adicionados 10 ml do tampão W8. O cartucho da coluna foi descartado e realizada lavagem com 50ml do tampão W8, com descarte do filtrado após. A coluna foi adicionada a um tubo estéril e 15 ml do tampão de eluição E4 foram aplicados passivamente pela força gravitacional. Após, a coluna foi descartada e, junto ao filtrado resultante, foram adicionados 10,5ml de isopropanol e realizada a centrifugação a 12000Gs por 30 minutos, a temperatura de 4°C. A solução sobrenadante foi descartada e foram adicionados 5ml de etanol 70% ao *pellet* resultante. As amostras foram centrifugadas a 12000Gs por 5 minutos a 4°C. A solução sobrenadante foi novamente descartada e os tubos permaneceram abertos durante 10 minutos a fim de evaporar totalmente o etanol. Enfim, foram adicionados 500µl de TE ao *pellet* final. Ao término do processo de extração, as amostras foram quantificadas e armazenadas a -20°C para uso experimental posterior.

3.3 Ensaio de transfecção *in vitro*

Foram realizadas transfecções dos plasmídeos pX-330 contendo os sgRNAs 1, 2 e 3, com a MMP9 como alvo, utilizando o reagente *Xfect™ Transfection Reagent #631317* (Takara Bio – Mountain View, CA, USA), conforme orientações do fabricante.

Para o ensaio de transfecção, foram plaqueadas 20.000 células em uma placa de 6 poços. Após a adesão das células à placa no dia seguinte, foram adicionados 7,5µg dos plasmídeos ao tampão do reagente em um volume de 100µl e homogeneizado durante 10 segundos. A seguir, foram adicionados 2,25µl do polímero *Xfect™* e a solução foi homogeneizada por 10 segundos.

Essa solução foi incubada durante 10 minutos em temperatura ambiente. Após o término do período de incubação, todo o conteúdo foi adicionado ao meio de cultura e às células aderidas à placa e mantidos em estufa a 37°C, durante 4 horas. Passado esse período, foi realizada a troca do meio de cultura. A validação da transfecção foi executada pelo teste com GFP (*Green Fluorescent Protein*), cuja sequência genética também está presente no plasmídeo pX-330.

3.4 Ensaio de formação de colônias

Para avaliar o efeito do knockdown do gene da MMP9 na capacidade de formação de colônias das células da linhagem T24, foram plaqueadas 300 células em placas de Petri de 6cm e submetidas a 37°C e 5% CO₂ durante 10 dias em estufa de cultura. Os grupos de células avaliados foram as células transfectadas com os plasmídeos pX-330 contendo sgRNA1 e 2 (denominados G1 e G2, respectivamente) e o grupo controle, em triplicata. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas delicadamente com tampão fosfato salina (PBS), com o sobrenadante descartado e as células a seguir foram fixadas com uma solução de metanol e ácido acético (3:1) durante cinco minutos. Em seguida, as células foram coradas com solução de metanol e cristal violeta a 5% durante 30 minutos. O número de colônias e sua área foram medidos utilizando o software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

3.5 Ensaio de proliferação celular por citometria de fluxo

O estudo do impacto na capacidade de proliferação celular das células T24 após supressão da expressão de MMP9, foi realizado utilizando o kit Muse™ Ki67 Proliferation kit - MCH100114 e o citômetro de fluxo Muse™ Cell Analyzer.

Antes de cada análise celular, o equipamento foi calibrado utilizando os reagentes do mesmo kit, a fim de garantir a confiabilidade dos dados obtidos.

Para a realização do experimento, 1×10^5 células T24 foram plaqueadas com soro fetal bovino a 10% livre de antibióticos, em 3 grupos (controle, G1 e G2). Após realização da transfecção conforme descrito anteriormente, as células foram suspensas em 50 μ l de solução de fixação e incubadas em temperatura ambiente durante 15 minutos. A seguir, foi adicionado 150 μ l da solução tampão e realizada a centrifugação das amostras com descarte do sobrenadante. Após, foi adicionada 100 μ l da solução de permeabilização e realizado novo período de incubação durante 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado à solução 100 μ l da solução tampão, realizada nova centrifugação e descarte posterior do sobrenadante. Após realização de lavagem das células, foi feita nova incubação durante 15 minutos em temperatura ambiente, com 50 μ l de solução tampão. Ao final desse processo, foi adicionado 10 μ l do anticorpo Muse™ Hu Ki67-PE e realizada a incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Ao final do período de incubação, foi adicionado 150 μ l da solução tampão e as células foram submetidas a análise no citômetro Muse™, conforme instruções do fabricante. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6 Ensaio de apoptose celular por citometria de fluxo

O ensaio de apoptose foi realizado no citômetro de fluxo Muse™ Cell Analyzer por meio da marcação das células com Anexina V (Muse Annexin V & Cell Death kit - MCH100105). Para o experimento, foram plaqueadas 1×10^5 células dos grupos controle, G1 e G2, com soro fetal bovino a 10%, livre de antibiótico. Após a transfecção e edição gênica por meio da técnica de CRISPR-Cas9, conforme descrição anterior, as células foram suspensas em 100 μ L do reagente Anexina V e do kit morte celular Muse™ (MCH100105). Então as células foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente livre de luz. Posteriormente, as células foram analisadas no mini citômetro Muse™ conforme as instruções do fabricante. Previamente a cada ensaio realizado no citômetro Muse™, fora realizada a calibragem do aparelho com o kit Muse™ System Check para maior confiabilidade dos dados obtidos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.7 Isolamento de RNA

O kit mirVana (*Ambion, Austin, TX, EUA*) foi utilizado para extração do RNA para a análise de expressão gênica da MMP9 após os ensaios de transfecção, seguindo as recomendações do fabricante. Adicionou-se 250 μ l do tampão de lise e 25 μ l do aditivo aos tubos contendo as amostras. A seguir, o conteúdo dos tubos foi homogeneizado e estes foram deixados durante 4 minutos no gelo. Após, foram adicionados 250 μ l da solução fenol-clorofórmio e posteriormente as amostras foram homogeneizadas no vórtex e centrifugadas a 10000rpm durante 5 minutos em temperatura ambiente. Na sequência, o sobrenadante foi transferido para um segundo tubo, e adicionou-se um terço do

volume de etanol a 100%. A solução foi transferida para uma coluna e submetida a centrifugação a 10000rpm durante 30 segundos, restando na coluna a amostra de RNA e o líquido que passou por ela, este descartado. Posteriormente, foram realizadas as etapas de lavagem do RNA, com 700µl de *wash solution*, e duas lavagens com 500µl da solução a dois terços de *wash solution*, centrifugadas por 30 segundos a 10000rpm. Por fim, o filtrado foi descartado e foram adicionados 50µl de água livre de *RNAse* a 95°C à coluna, para a eluição do RNA. Na sequência, as amostras foram quantificadas em um espectrofotômetro (*Nanodrop DN-1000, Wilmington, EUA*) (260/280 nM) e, finalmente, armazenadas a -20°C para uso posterior.

3.8 Síntese do DNA complementar

Após o isolamento e quantificação do RNA, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizando a reação de transcriptase reversa com iniciadores randômicos, por meio da enzima *MultiScribe® Reverse Transcriptase* (*Applied Biosystems, Fostercity, CA, EUA*). Para este processo, o RNA total foi diluído em água livre de nuclease, constituindo volume final de 20µl na concentração de 50ng/µl. Dessa solução, foram utilizados 4µl da amostra e 16µl do “*mix*” de cDNA, o qual contém 2µl da enzima transcriptase reversa (50 U/µl); 1,6µl do “*mix*” de dNTPs (100mM); 4µl do tampão da enzima (10x) e 8,4µl de H₂O livre de nuclease. As soluções foram submetidas a ciclos obedecendo a seguinte sequência: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 min a 85°C. Ao final dos ciclos, o cDNA foi armazenado a -20°C, para uso posterior.

3.9 Expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real

As reações de RT-qPCR foram realizadas de acordo com o kit (*Applied Biosystems® TaqMan® Universal PCR Master Mix*) para RNA. O aparelho termociclador utilizado foi ABI 7500 *fast* (*Applied Biosystems, CA, EUA*) no modo *standard*. A quantificação das amostras foi obtida utilizando-se o reagente *TaqMan®* (*Applied Biosystems, CA, EUA*).

Para a execução da reação, foram utilizados os reagentes nas seguintes concentrações: 0,5µl do primer específico (MMP9 – Hs00957562_m1); 5µl de *TaqMan® master mix*; 2,5µl de água livre de nuclease e 2,0µl de cDNA (concentrado em 15ng de RNA). As condições utilizadas durante a reação no termociclador foram: 2 minutos a 50°C; 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

O nível de expressão dos genes foi obtido pelo método $2^{-\Delta CT}$, adquirido do *Applied Biosystems Data Assist Software*.

As reações foram realizadas em duplicata e como controle endógeno para RNA foi utilizado o gene da β 2- microglobulina (B2M) (*Applied Biosystems, CA, EUA*).

3.10 Ensaio de extração e análise proteica por *Western-blotting*

Para avaliar a expressão proteica de MMP9, com peso molecular de 92 kDa, foi realizado o ensaio de *Western-blotting* das amostras obtidas dos experimentos *in vitro*.

O tampão de lise RIPA (*Lysis Buffer, Millipore*) foi adicionado às amostras, as quais foram deixadas por 30 minutos no gelo. A seguir, foi realizada a

centrifugação refrigerada das amostras durante 20 minutos a 11.000rpm e temperatura de 4°C. O sobrenadante foi recuperado e armazenado a -80°C.

Na sequência, após a extração das proteínas, foi realizada a quantificação das mesmas por espectrofotometria (*Nanodrop® ND-1000, Wilmington, EUA*). Para fins de calibragem do equipamento, realizou-se uma curva com um padrão de concentração de proteínas, utilizando para tal a albumina de soro bovino (BSA) pelo método de *Pierce® (660nm Protein Assay, Thermo)*, assim como a quantificação das amostras experimentais.

Após a quantificação proteica, foi adicionado o tampão de Laemmli, em uma proporção de 1:2 (80) e, posteriormente, a solução foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, o qual é formado a partir da reação de polimerização entre dois compostos, acrilamida e bis-acrilamida.

O marcador de peso molecular determina o tamanho e a altura (posição) das proteínas no gel, bem como monitora a corrida eletroforética. Nos experimentos foi utilizado o marcador *Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad)*.

As amostras foram aplicadas ao gel de poliacrilamida, na concentração de 50µg/ml. A combinação foi submersa em um tampão de corrida e submetida a uma tensão de 80V por 30 minutos durante a passagem pela fase de empilhamento. Posteriormente, a voltagem foi alterada para 100V, pelo intervalo de 1 hora e 30 minutos ou até o final do gel de resolução.

Ao término da corrida no gel, foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose, submersa em um tampão de transferência a base de glicina e tris (1x), sob refrigeração. A membrana foi envolvida por uma

esponja e papel filtro, com contato direto com o gel de poliacrilamida, formando uma espécie de “sanduíche” (esponja / papel-filtro / membrana / gel de poliacrilamida / papel-filtro / esponja), o qual foi submetido a transferência sob tensão de 120V durante 90 minutos (81). Para validação da transferência, as membranas foram submetidas ao *Ponceau Red (Ponceau S Solution – Sigma)*, para visualização das bandas proteicas.

Na etapa seguinte, as membranas foram bloqueadas com BSA 1% em TBS-T (*Tampão tris salina Tween 20*) durante 15 segundos. A incubação com os anticorpos foi realizada no aparelho SNAP (*SNAP i.d.® System – Millipore, USA*), que otimiza os tempos de incubação por meio de um sistema a vácuo. Tais anticorpos foram diluídos em BSA 1%, na concentração sugerida pelo fabricante, com incubação durante 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir, a membrana foi lavada três vezes, durante 10 minutos, com TBS-T a fim de remover o excesso de anticorpo primário.

O anticorpo secundário foi diluído da mesma forma que o primário, conforme protocolo do fabricante. As membranas foram novamente incubadas durante 10 minutos em temperatura ambiente, e submetidas a de três lavagens com TBS-T por 10 minutos.

A revelação dessas membranas foi realizada utilizando o substrato Luminata™ Forte, (*Western HRP Substrate – Millipore, USA*), o qual detecta as proteínas previamente marcadas com os anticorpos. Para obtenção das imagens, foi utilizado o Alliance 4.7 (*Uvitec, Cambridge*), equipamento este composto por uma câmara dentro de um gabinete, a qual detecta a quimio-luminescência da membrana, transformando o sinal em uma imagem digital para análise com o software (*Alliance 16.06*), que acompanha a máquina de detecção.

3.11 Ensaio de fechamento de ferida para avaliação de migração celular

A avaliação da capacidade de migração celular foi realizada por meio do ensaio de fechamento de ferida. Para tal, foram colocadas em placa de 12 poços as amostras contendo 10^5 células T24-luc dos grupos controle, transfectadas com pX-330 + sgRNA1 (G1) e pX-330 + sgRNA2 (G2), em triplicata.

Após 24 horas, foi confeccionada uma solução de continuidade nas amostras de células devidamente fixadas nos fundos dos poços, utilizando a ponta estéril de micropipeta de 200 μ l, na linha média dos poços, de modo a separar as células em duas metades. Fotos sob visão microscópica dos poços foram realizadas nos tempos de 0h, 24h e 48h após os riscos com micropipeta para análise da migração celular. A área de fechamento da risca foi calculada utilizando o *software NIS Elements D 3.1* (Nikon) nos diferentes intervalos de tempo, e sua porcentagem de fechamento foi calculada utilizando a seguinte fórmula (82), sendo “A” a área entre os dois limites da risca:

$$\% \text{ Fechamento da risca} = [(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}) / (A_{t=0h})] \times 100$$

Os dados obtidos foram posteriormente analisados utilizando o *software* GraphPad Prism 9.0® (GraphPad Software - San Diego, CA)

3.12 Ensaio de invasão

Para avaliar a capacidade de invasão tecidual das células editadas pela técnica de CRISPR-Cas9, foi utilizado o ensaio de invasão em câmaras *BioCoat*

Matrigel Invasion Chamber (BD Biosciences, EUA), as quais são constituídas por poros de 8µm, revestidas por Matrigel™ (BD Biosciences, EUA). Para o experimento, as células foram trypsinizadas e plaqueadas (1×10^5 células T24-luc em 750 µl de meio de cultura livre de soro fetal bovino) no compartimento superior da câmara. O compartimento inferior foi preenchido com 1ml de meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino, utilizado como quimioatrativo. As células foram incubadas durante 24 horas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após o período de incubação, as células incapazes de migrar para a câmara inferior foram removidas da parte superior. As células que migraram para a parte inferior da câmara foram fixadas com metanol a 75% e coradas com solução de cristal violeta a 0,5% e metanol a 20%. Essas células, posteriormente, foram quantificadas sob microscopia, em 10 campos por membrana e aumento de 200x. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.13 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão para as variáveis quantitativas. Variáveis categóricas foram descritas com frequências e porcentagens. Para avaliar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. A comparação entre os grupos foi realizada através do teste T de Student (variáveis de distribuição normal). Para a análise de 3 ou mais amostras foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) com correção de Bonferroni e o teste de Kruskal-Wallis (variáveis de distribuição não-normal). Para análise estatística será utilizado o software GraphPad Prism 9.0® (GraphPad Software - San Diego, CA). Em todas as análises foi adotado nível de significância de 5%,

ou seja, foram considerados como estatisticamente significativos os resultados que apresentaram valor de p inferior a 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1 Validação dos plasmídeos pX-330 após inserção dos sgRNAs para MMP-9.

Primeiramente, foram selecionados os sgRNAs de dupla fita, e a seguir foi realizada a digestão do plasmídeo pX-330 com a enzima BbsI, para clivagem da região onde essas sequências serão inseridas. A seguir, foi realizada uma reação de inserção utilizando a enzima T4 ligase, a qual “fecha” o plasmídeo novamente, porém, com a sequência do sgRNA de interesse inserido na região de clivagem anterior.

Com o objetivo de validar o ensaio de inserção, realizamos nova digestão do plasmídeo pX-330 (contendo os sgRNAs) com a enzima BbsI, para verificar se a enzima perdeu seu sítio de ligação no plasmídeo, o que é esperado quando a inserção ocorre de maneira bem sucedida. Após a digestão, foi feita a eletroforese com gel de agarose 0,8% contendo as amostras e a análise do padrão de bandas. Na Figura 4, observamos na amostra de número 1 o padrão de banda do plasmídeo pX-330 nativo, ou seja, sem a inserção dos sgRNAs. Na amostra 2, observamos o padrão de banda do plasmídeo digerido com a enzima BbsI, sem os insertos. As amostras 3 a 5 representam os plasmídeos já com os sgRNAs inseridos, posteriormente digeridos, correspondendo, respectivamente, aos sgRNAs 1,2 e 3 para MMP-9.

Observamos que as amostras 3 a 5 apresentam o mesmo padrão de banda de um plasmídeo não digerido, ou seja, perderam o sítio de ligação da enzima BbsI devido à inserção bem sucedida das respectivas sequências de sgRNAs.

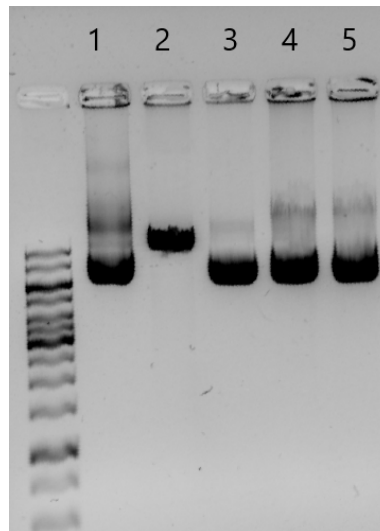


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 0,8% com as amostras do plasmídeo pX-330 com os insertos dos sgRNAs após a digestão.

Após os ensaios de inserção dos sgRNAs, foi realizada a transformação em bactérias *E.coli* da cepa DH5 α competentes. Observamos na figura 5 colônias de bactérias nas placas, que foram selecionadas individualmente e expandidas em cultura, para conferência dos plasmídeos posteriormente.

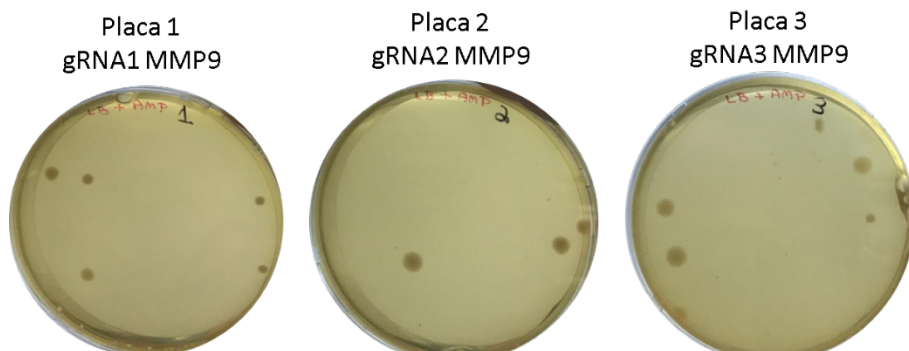


Figura 6. Placas de cultura com a bactéria *E.coli* DH5 α em meio LB com Ampicilina e suas respectivas colônias.

Desas placas, foram selecionadas 12 colônias bacterianas, para averiguar quais delas são positivas para os insertos dos sgRNAs nos plasmídeos, pois existe a probabilidade de nem toda colônia possuir plasmídeos com os insertos

desejados. Sendo assim, após a expansão das colônias, foi realizada a extração dos plasmídeos, os quais foram digeridos com a enzima BbsI e submetidos a corrida em gel de agarose para validação da presença das sequências dos sgRNAs (Figura 7).

Cada amostra foi extraída de uma colônia bacteriana individualmente, de modo que as amostras 1 e 2 pertenciam à placa 1 (sgRNA1), as amostras 3, 4 e 5 provenientes da placa 2 (sgRNA2), e as amostras 6 e 7 da placa 3 (sgRNA3). A amostra 8 constitui o controle positivo, ou seja, o plasmídeo pX-330 sem os insertos, porém digerido e a amostra 9 tem a função de controle negativo, ou seja, o plasmídeo sem digestão. Apenas as amostras 1 e 6 demonstraram um padrão de banda similar ao controle positivo para digestão, ou seja, não apresentaram o sgRNA apropriadamente inserido no plasmídeo. Portanto, selecionamos uma amostra de cada placa para expansão, com exceção da 1 e 6.

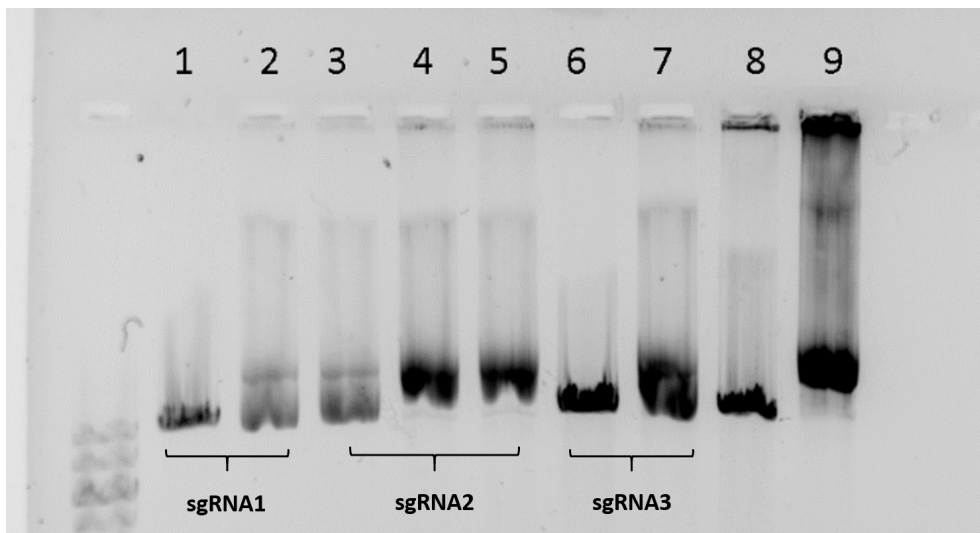


Figura 7. Gel de agarose 0,8% dos plasmídeos com sgRNA digeridos com a enzima BbsI.

Após selecionarmos os plasmídeos adequados, realizamos novamente a sua expansão em bactérias, para obtenção de maior concentração de plasmídeos para o uso experimental posterior. Por fim, realizamos o sequenciamento de todas as amostras para validação final (Figura 8).

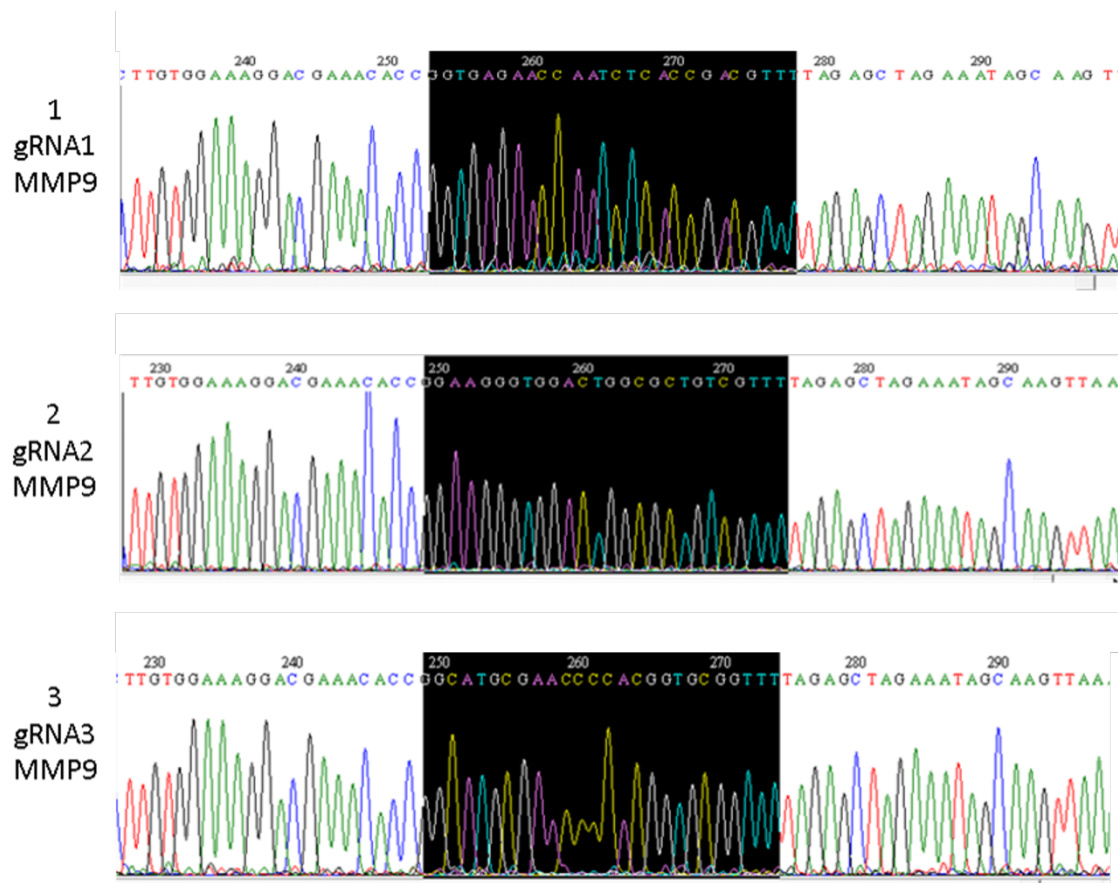


Figura 8. Sequenciamento dos plasmídeos com os sgRNAs de interesse.

Ao analisar os resultados do sequenciamento de cada amostra, observamos que a sequência dos sgRNAs está presente no plasmídeo, de modo que nas amostras 1, 2 e 3, observamos, respectivamente, a sequência dos sgRNAs 1, 2 e 3 complementares a MMP-9. Dessa forma, consideramos as amostras do plasmídeo pX-330 válidas para edição gênica *in vitro* da MMP-9.

4.2 Edição gênica *in vitro* da MMP9 com a técnica de CRISPR-Cas9

4.2.1 Validação da transfecção do plasmídeo pX-330 + sgRNA 1 e 2 *in vitro*

Ao realizar as transfecções dos plasmídeos pX-330 com os respectivos sgRNAs para MMP-9, utilizando o reagente de transfecção *Xfect™ Transfection Reagent* (#631317, Takara Bio – Mountain View, CA, USA.) na linhagem celular T24, observamos células com GFP positivo, o que demonstra a eficácia da transfecção, uma vez que apenas células contendo o plasmídeo pX-330 apresentam a atividade dessa proteína (Figuras 8 e 9).

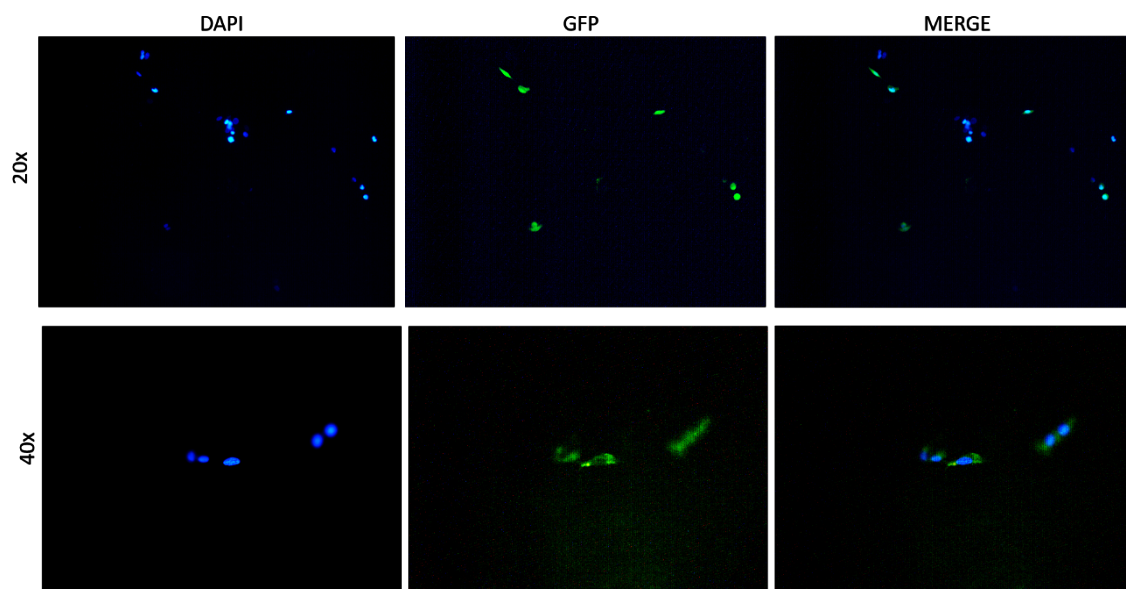


Figura 9. Linhagem celular T24 transfectada com o plasmídeo PX-330 contendo sgRNA2 para MMP9. Imagens em microscópio de fluorescência com aumento de 20x e 40x.



Figura 10. Linhagem celular T24 sem transfecção (controle). Imagens em microscópio de fluorescência com aumento de 20x.

4.2.2 Ensaio de formação de colônias

Para avaliar a capacidade da linhagem de formação de colônias e crescimento, foi realizado o ensaio de formação de colônias. Neste experimento, observamos que as células transfectadas apresentaram redução significativa da área (μm^2) de formação de colônias (**Controle:** 595.581 ± 400.139 vs. **G1:** 381.569 ± 206.747 vs. **G2:** 292.617 ± 177.554 ; $p < 0,05$) (Figuras 10 e 11).

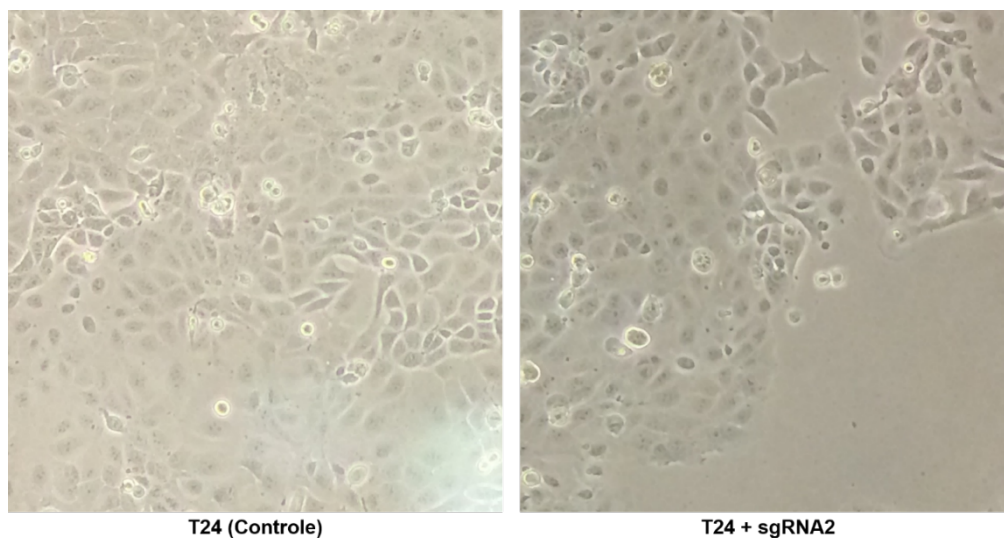


Figura 11: Crescimento da linhagem celular T24 transfectada com PX330 + sgRNA2 para MMP9 e seu respectivo controle sem transfecção. Imagens em microscópio de luz (20x).

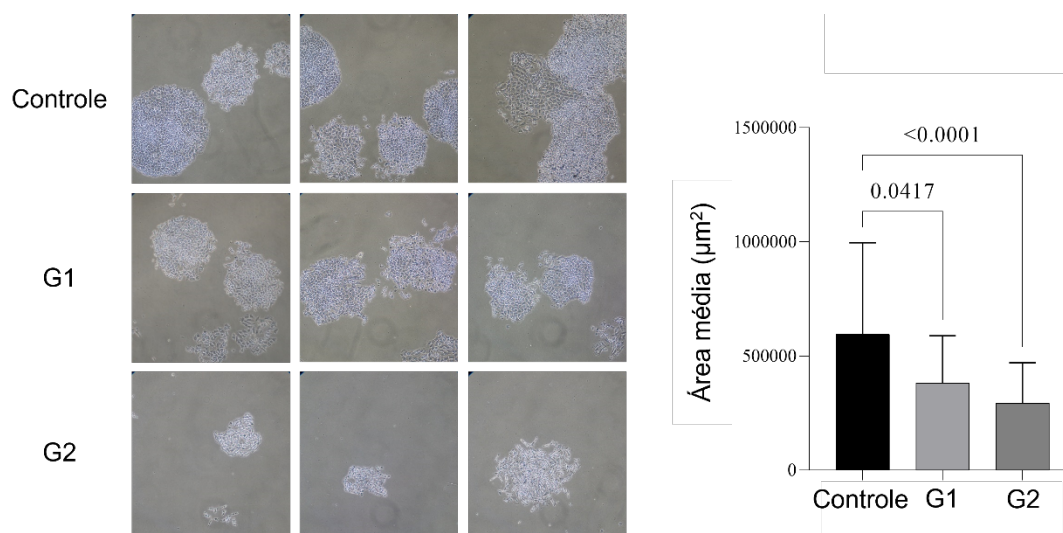


Figura 12. Ensaio de formação de colônias. Observa-se que após transfecção com sgRNA1 (G1) e sgRNA2 (G2), as células T24 tem sua capacidade de formação de colônias reduzidas ($p < 0,05$).

4.2.3 Ensaios de apoptose e proliferação celular por citometria de fluxo

Em relação à apoptose celular na linhagem T24, observamos que, após transfecção, houve aumento da taxa de apoptose total tanto no grupo G1 (sgRNA1) (**G1**: $61,43 \pm 9,68$) quanto G2 (sgRNA2) (**G2**: $44,05 \pm 2,41$) quando comparados ao controle ($26,02 \pm 2,31$) ($p=0,001$ e $p=0,029$, respectivamente), sendo que o sgRNA1 maior taxa de apoptose total quando comparado ao sgRNA2 ($p=0,034$) (Figura 12A). Já nos ensaios de proliferação celular, observamos que a transfecção com o sgRNA2 (grupo G2) levou a significativa redução na capacidade de proliferação da linhagem T24 quando comparada ao controle (**G2**: $80,02 \pm 3,24$ vs. **Controle**: $90,69 \pm 0,83$; $p=0,002$), porém, curiosamente, o sgRNA1 não promoveu impacto significativo (**G1**: $92,44 \pm 1,61$ vs. **Controle**: $90,69 \pm 0,83$; $p>0,05$) (Figura 12B).

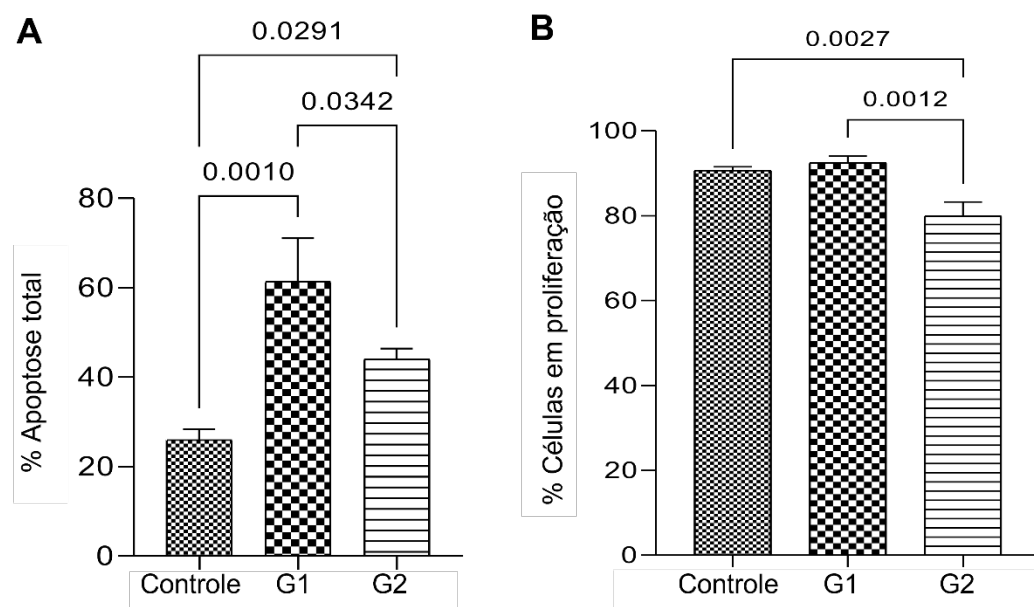


Figura 13. Ensaios de apoptose e proliferação por citometria de fluxo. **A)** Após transfecção com sgRNA1 e sgRNA2, observou-se que as células T24 apresentaram maiores taxas de apoptose quando comparadas ao controle ($p<0,05$). **B)** Após transfecção, apenas o grupo transfectado com a sgRNA2 (G2) apresentou redução significativa da proliferação celular quando comparado com o controle. ($p<0,05$).

4.2.4 Expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real

Ao avaliarmos a expressão gênica da MMP9 utilizando a técnica de RT-qPCR, observamos aumento da expressão no grupo G1 (sgRNA1) quando comparado ao grupo controle. Já nas amostras de células transfectadas do grupo G2 (sgRNA2), não foi observada expressão gênica da MMP9, demonstrando silenciamento completo do gene. (Figura 13).

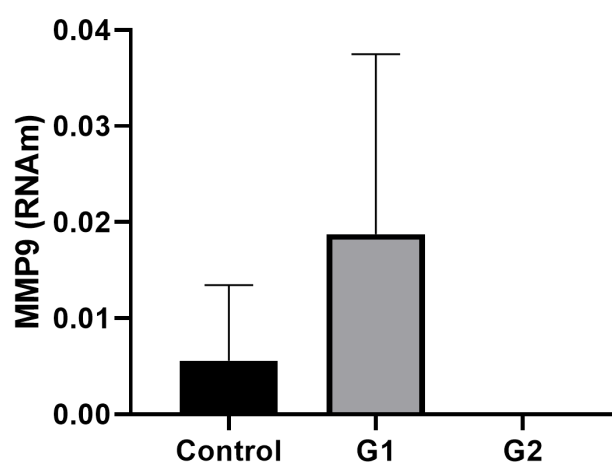


Figura 14. Expressão gênica de MMP-9 nas linhagens celulares T24, transfectadas com o PX-330 com sgRNA1 (G1) e sgRNA2 (G2), relativas ao controle sem transfecção.

4.2.5 Expressão proteica por *Western-blotting*

Em relação à expressão proteica da MMP9, observamos que, quando comparada ao controle não transfectado, houve redução na expressão proteica da MMP9 após transfecção com o plasmídeo pX-330 contendo tanto o sgRNA1 quanto o sgRNA2 (Figura 14).

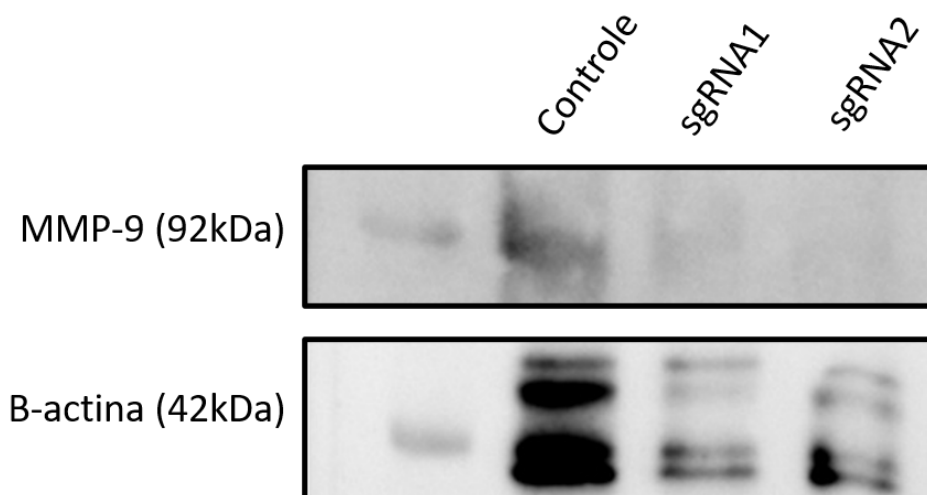


Figura 15. *Western Blotting* de MMP9 e β -actina (controle endógeno) da linhagem T24 das amostras controle e transfectadas com PX-330 + sgRNA1 e 2.

4.2.6 Ensaio de fechamento de ferida para avaliação de migração celular

Para avaliar funcionalmente o bloqueio da expressão da MMP9 por meio da inibição do processo de migração celular, foi realizado um ensaio de fechamento de ferida (*wound healing assay*). Durante o experimento, foi observado que as amostras transfectadas com plasmídeos contendo sgRNA1 e sgRNA2 apresentaram menor capacidade de migração celular para efetuar o fechamento da ferida após 24 horas e 48 horas, conforme apresentado na tabela 2 e nas figuras 15 e 16.

Tabela 2. Ensaio de fechamento de ferida

	% Área de fechamento de ferida			p (Ctrl vs. G1/G2)
	Controle	G1 (sgRNA1)	G2 (sgRNA2)	
24h	76,90 ± 10,3	58,97 ± 3,41	41,79 ± 11,38	0,041 / <0,001
48h	91,81 ± 1,44	79,47 ± 1,99	55,91 ± 9,43	0,025 / <0,001

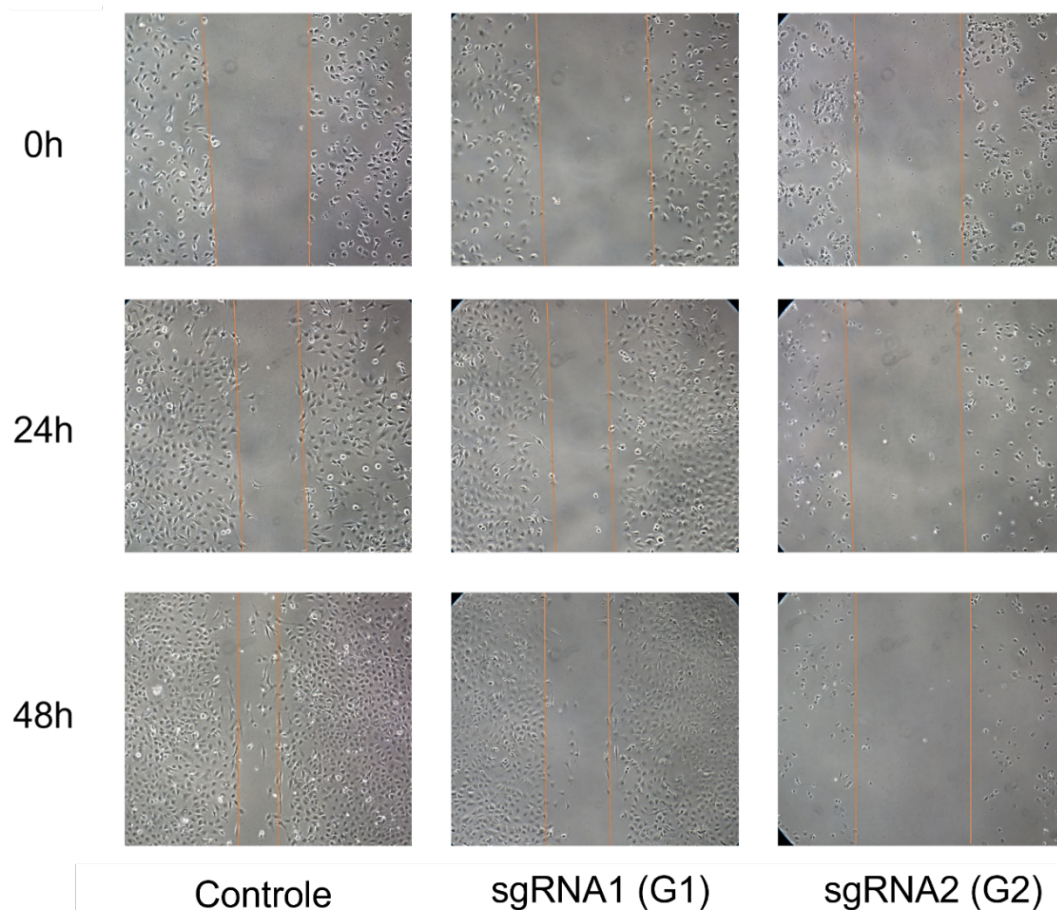


Figura 16. Ensaio de fechamento de ferida. Observa-se que no grupo G2, principalmente, houve importante retardo no processo de migração celular, quando comparado ao controle não-transfectado.

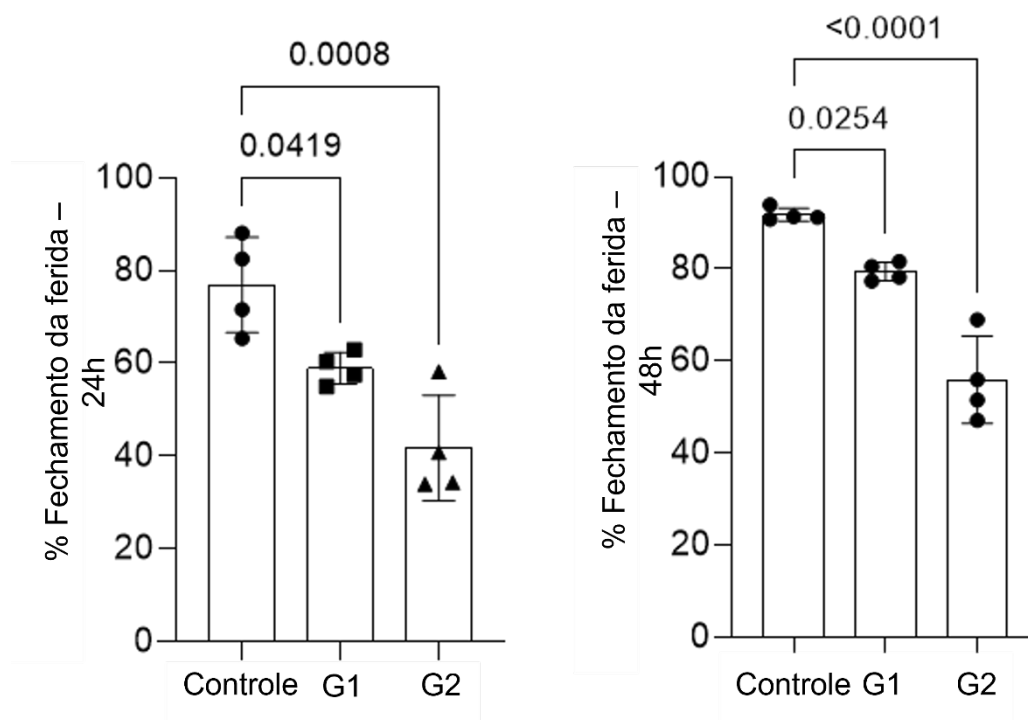


Figura 17. Ensaio de fechamento de ferida. Células T24 transfectadas com PX-330 + sgRNA2 (G2) com significativa redução de migração celular ($p < 0,05$).

4.2.7 Ensaio de invasão

Para avaliar o potencial de invasão tecidual da linhagem celular T24, realizamos o ensaio de invasão em Matrigel™. Observamos que, após a transfecção, tanto o sgRNA1 quanto o sgRNA2 reduziram significativamente a capacidade de invasão da linhagem T24 quando comparados ao controle (**G1**: $32,33 \pm 7,57$ vs. **Controle**: $69,33 \pm 16,01$; $p=0,015$) e (**G2**: $18,0 \pm 4,58$ vs. **Controle**: $69,33 \pm 16,01$; $p=0,003$) (Figura 17)

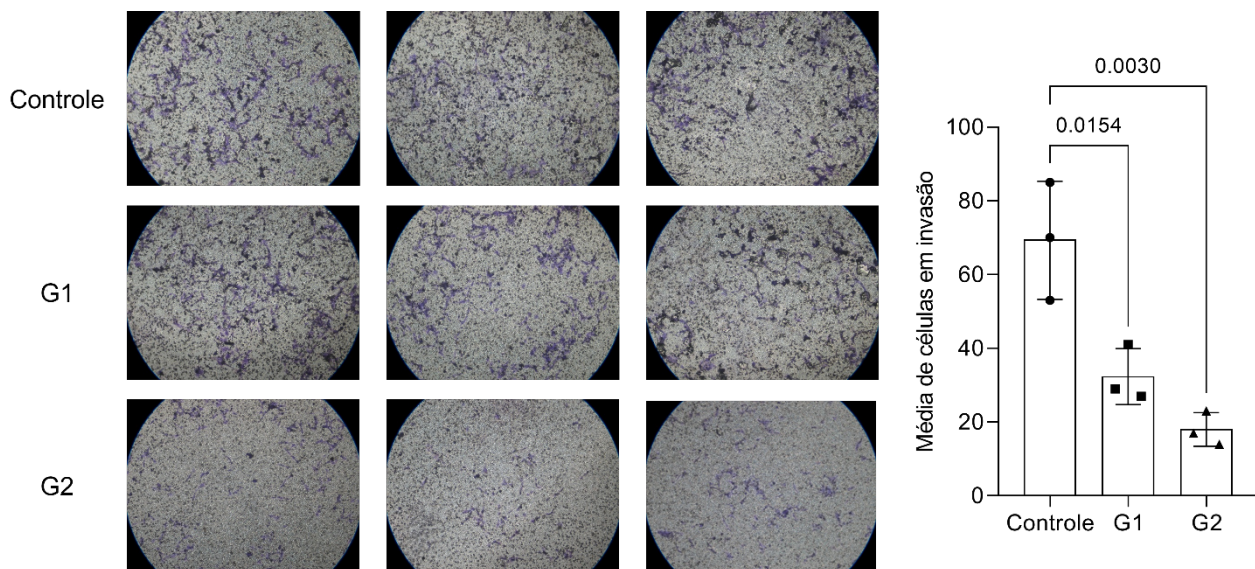


Figura 18. Ensaio de migração com Matrigel™. Células T24 transfectadas com sgRNA1 (G1) e sgRNA2 (G2) com significativa redução na capacidade de invasão ($p<0,05$).

5. Discussão

O CaB é um dos tumores sólidos de maior incidência no mundo, sendo o segundo tumor-gênito-urinário mais frequente (1). A maioria dos tumores diagnosticados (75%) são superficiais, restritos à mucosa ou submucosa, porém altas taxas de recorrência (31 a 78% em 5 anos) e progressão para doença localmente invasiva (até 45% em 5 anos) são observadas (83). Pacientes com doença clinicamente mais avançada requerem assistência mais complexa, cara e invasiva, que em geral levam a aumento da morbidade (22, 23, 24), impacto negativo na qualidade de vida e aumento de custos ao sistema de saúde (26, 27, 28). Portanto, novas ferramentas diagnósticas, prognósticas e terapêuticas são necessárias a fim de mitigar os efeitos negativos da progressão e recorrência do CaB. Neste contexto, a melhor caracterização dos mecanismos moleculares no CaB pode levar ao desenvolvimento de melhores métodos para o tratamento da doença.

A transição epitélio-mesenquimal (TEM) é uma etapa central na progressão para doença metastática. As MMPs desempenham papel essencial nesse processo por conta de sua capacidade de degradar a MEC e as membranas basais, além de suas outras funções nas interações célula-MEC. Dentre as MMPs, a função da MMP-9 no CaB tem sido alvo de investigação, tanto do ponto de vista de função molecular quanto em seu uso como marcador diagnóstico, prognóstico e alvo terapêutico. Sua expressão é aumentada em pacientes com CaB quando comparados com tecido urotelial normal (50, 53) e pode ser correlacionada a fatores prognósticos clínicos. Reis *et al* observaram que pacientes submetidos a RTU de bexiga com fatores prognósticos anátomo-patológicos de pior evolução, como alto grau e tumores invasivos (T1/T2) apresentavam níveis de expressão tumoral de MMP-9 mais elevados. Além

disso, a incidência mais alta de recorrência também foi observada nesse grupo (47). Em seguimento de pacientes submetidos a RTU de bexiga para tratamento de CaB-NMI, Srougi *et al* avaliaram a utilização de um painel de proteínas abrangendo, dentre outras, a MMP-9, para diagnosticar e predizer recorrência, demonstrando possibilidade de aplicação da MMP-9 como biomarcador de recidiva (48). Além disso, diversas proteínas, fatores de crescimento e citocinas exercem seu papel oncogênico regulando o aumento da expressão de MMP-9, sugerindo sua importância na progressão do câncer (84, 85, 86, 87).

O presente estudo examinou os efeitos do bloqueio da expressão gênica da MMP-9 no CaB de alto grau, por meio o uso da técnica de CRISPR-Cas9 para edição do gene em linhagem celular T24-luc *in vitro*. Para tal, inicialmente realizamos a padronização e validação dos plasmídeos utilizados para transfecção, contendo os componentes do sistema CRISPR-Cas9, como o gene para transcrição da endonuclease spCas9 e a sequência do RNA complementar à região-alvo da MMP-9 (sgRNA). Na sequência, uma vez validados os plasmídeos, estes foram transformados em bactérias, as quais foram expandidas em cultura, visando aumentar a concentração dos plasmídeos para os ensaios de transfecção. Esta é uma estratégia mais trabalhosa, tendo em vista que atualmente é possível obter comercialmente os plasmídeos já customizados com a sequência-alvo desejada, porém apresenta a vantagem de melhor custo-benefício. Os experimentos de padronização e validação foram realizados conforme descrito por Ran *et al* em 2013 (78).

Após a transfecção de células da linhagem T24-luc, observamos redução significativa da expressão gênica da MMP-9 utilizando o sgRNA2, ao passo que o sgRNA1, inesperadamente, levou ao aumento da transcrição do

RNA_m. Entretanto, no ensaio de *Western-blotting* para avaliar a expressão proteica da MMP-9, observamos que para ambos sgRNAs (com alvo no exon 1 do gene, porém em regiões diferentes), levaram a baixa detecção da proteína. Tal evento fora constatado previamente por nosso grupo do LIM-55, em tese de doutorado de 2022 focada em câncer de próstata metastático, com mesmo alvo molecular (88). Nossa hipótese para o resultado observado é a de que para ambos os sgRNAs o DNA foi editado com sucesso, resultando em RNA_m modificados, sendo que aquele resultante da transfecção com sgRNA1 ainda pode ser detectado pela sonda no ensaio de qPCR, porém são traduzidos em proteínas cujas estruturas estão modificadas, não sendo mais reconhecidas pelos anticorpos utilizados no *Western-blotting* e, conseqüentemente, apresentando perda de função, o que leva a aumento da transcrição dos RNAs editados numa espécie de mecanismo compensatório pela célula, justificando o aumento da expressão observada no sgRNA1.

Para avaliar o impacto da perda de função da MMP-9 nas células T24, realizamos ensaios de apoptose e proliferação celular com citometria de fluxo, onde observamos significativa redução da proliferação celular com a sgRNA2 e aumento de apoptose com ambas as sgRNAs. Constatamos, ainda, que as células transfectadas apresentaram capacidade de formação de colônias reduzida. Além disso, realizamos os ensaios de migração e invasão celular, processos estes nos quais a MMP-9 está diretamente envolvida. Após a transfecção e conseqüente bloqueio da expressão da MMP-9, pudemos observar perda da capacidade de migração e invasão em Matrigel™ (o qual simula a MEC no ensaio) da linhagem celular T24. Tais resultados são compatíveis com a produção científica prévia visando o bloqueio direto ou

indireto da função da MMP-9 por meio de técnicas diversas. Em estudo de 2010, utilizando a técnica de RNAi com MMP-9, uPAR (*urokinase plasminogen activator receptor*) e catepsina B como alvos moleculares em linhagens celulares de câncer de próstata metastático, os pesquisadores conseguiram inibir com sucesso os processos de migração, invasão, sobrevivência celular e angiogênese *in vitro*, sendo observadas *upregulation* de proteínas pró-apoptóticas como BAX e caspases e *downregulation* de moléculas anti-apoptóticas como XIAP e Bcl-2. Esses resultados foram validados em modelo murino ortotópico após tratamento com os si-RNAs, onde observou-se redução de volume tumoral e inibição de metástases (89). Achados semelhantes foram observados utilizando a técnica de RNAi para MMP-9 em linhagens celulares de melanoma (B16), onde experimentos *in vitro* apresentaram redução na capacidade celular de migração e invasão, enquanto modelo *in vivo* mostrou redução de volume de doença e inibição de metástases (90), e de glioblastoma (SNB19) (91).

No CaB, estudo recente demonstrou que o clerodano diterpeno (CD), um metabólito secundário comumente isolado de diferentes espécies de plantas, quando usado para tratar células T24 *in vitro*, suprimiu a invasão e migração celular, por meio da redução indireta da expressão e atividade da MMP-9 através do bloqueio de vias de sinalização como a do NF- κ B (fator nuclear kappa B) e STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), proteínas que atuam como fatores de transcrição e envolvidas em diferentes processos oncogênicos (92). De maneira inversa, Inoue *et al* demonstrou que células de CaB sem potencial metastático, quando transfectadas com gene para expressão interleucina-8 (IL-8), apresentaram aumento de produção de MMP-9 e passaram

a mostrar potencial invasivo quando implantadas em bexigas de camundongos (93). Esses dados corroboram a ideia de que a MMP-9 possa constituir um alvo molecular no tratamento do CaB.

A terapia baseada em inibição de MMPs, inclusive a MMP-9, já foi amplamente investigada, com resultados decepcionantes. Dufour *et al* desenvolveram um peptídeo que mimetiza uma porção do domínio PEX da MMP-9, que levou ao bloqueio da dimerização da proteína e consequentemente prejuízo de sua função, o que se traduziu em redução de migração celular *in vitro* (94). O mesmo grupo desenvolveu, posteriormente, um composto de baixo peso molecular que se liga especificamente ao domínio PEX da MMP-9, interferindo com os processos de proliferação, migração e invasão tumoral (95). No entanto, ensaios clínicos com foco no uso de inibidores de MMPs falharam em demonstrar efeitos anti-tumorais e ainda se caracterizaram por efeitos adversos importantes (96, 97, 98). Vale notar, porém, que muitos desses estudos foram executados recrutando pacientes com doença avançada não-responsiva e utilizando terapia sistêmica de inibição inespecífica de MMPs, desconsiderando o papel fisiológico das mesmas nas funções celulares normais, o que poderia, de certa forma, justificar os desfechos negativos. Portanto, o uso de um método de maior especificidade para bloqueio das MMPs se faz necessário, tornando a técnica de CRISPR-Cas9 uma candidata plausível.

A tecnologia baseada em CRISPR-Cas9 para manipulação genética vem se destacando como uma ferramenta de grande versatilidade, especificidade, simples aplicação e menores custos. No campo da oncologia, pode ser utilizada tanto na pesquisa básica quanto, como método exploração de mecanismos moleculares de tumorigênese, progressão, resistência a

medicamentos, criação de modelos animais e rastreamento de possíveis alvos-moleculares para terapia-alvo, quanto futuramente na clínica, para diagnóstico e terapia, lançando mão das diversas variações e adaptações da técnica original (65).

Este estudo representa o primeiro uso da técnica de CRISPR-Cas9 para edição gênica da MMP-9 e estudo dos efeitos do bloqueio de sua expressão em linhagem celular de CaB. Como limitações, podemos destacar que não foram avaliadas possíveis ocorrências de edições *off-target* no genoma da célula e suas consequências. Apesar de ser considerada uma técnica de elevada especificidade, a mutagênese *off-target* é reportada na literatura (99). Além disso, a natureza *in vitro* do experimento não leva em consideração os potenciais efeitos colaterais relacionados ao bloqueio das funções fisiológicas e não-relacionadas à MEC em células não-cancerígenas, o que poderia se traduzir em toxicidade e efeitos colaterais *in vivo*.

6. Conclusões

A metodologia utilizada para construção, validação e transfecção dos plasmídeos contendo as sequências da endonuclease spCas9 e o sgRNA para MMP-9 em linhagem celular T24-luc de CaB foi efetiva.

A edição gênica da MMP-9 foi alcançada com sucesso, confirmada pela redução de expressão de seu RNAm no qPCR e pela redução da expressão proteica no *Western-blotting*.

O bloqueio da atividade da MMP-9 pós-transfecção levou a aumento da apoptose e redução de proliferação, formação de colônias, capacidade de migração e invasão celular em linhagem celular T24-luc de CaB.

7. Referências Bibliográficas

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(1):17-48.
3. Howlader N, Noone A, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2017, National Cancer Institute. Bethesda, MD 2022 [Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html>].
4. Estimativa 2022 Rio de Janeiro: INCA - Instituto Nacional do Câncer; 2022 [Available from: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/estado-capital/brasil>].
5. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA.* 2011;306(7):737-45.
6. Purdue MP, Hutchings SJ, Rushton L, Silverman DT. The proportion of cancer attributable to occupational exposures. *Ann Epidemiol.* 2015;25(3):188-92.
7. Nieder AM, Porter MP, Soloway MS. Radiation therapy for prostate cancer increases subsequent risk of bladder and rectal cancer: a population based cohort study. *J Urol.* 2008;180(5):2005-9; discussion 9-10.
8. Gouda I, Mokhtar N, Bilal D, El-Bolkainy T, El-Bolkainy NM. Bilharziasis and bladder cancer: a time trend analysis of 9843 patients. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2007;19(2):158-62.
9. Srougi V, Gallucci FP, Mattedi RL, Srougi M. Carcinosarcoma of the bladder following local schistosomiasis infection. *BMJ Case Rep.* 2017;2017.
10. Figueroa JD, Ye Y, Siddiq A, Garcia-Closas M, Chatterjee N, Prokunina-Olsson L, et al. Genome-wide association study identifies multiple loci associated with bladder cancer risk. *Hum Mol Genet.* 2014;23(5):1387-98.
11. Rothman N, Garcia-Closas M, Chatterjee N, Malats N, Wu X, Figueroa JD, et al. A multi-stage genome-wide association study of bladder cancer identifies multiple susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010;42(11):978-84.
12. Babjuk M, Burger M, Compérat EM, Gontero P, Mostafid AH, Palou J, et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update. *Eur Urol.* 2019;76(5):639-57.
13. Alfred Witjes J, Lebre T, Compérat EM, Cowan NC, De Santis M, Bruins HM, et al. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2017;71(3):462-75.
14. Soria F, Droller MJ, Lotan Y, Gontero P, D'Andrea D, Gust KM, et al. An up-to-date catalog of available urinary biomarkers for the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. *World J Urol.* 2018;36(12):1981-95.
15. Brausi M, Collette L, Kurth K, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, et al. Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven EORTC studies. *Eur Urol.* 2002;41(5):523-31.
16. Mariappan P, Zachou A, Grigor KM, Group EU-O. Detrusor muscle in the first, apparently complete transurethral resection of bladder tumour specimen is a surrogate marker of resection quality, predicts risk of early recurrence, and is dependent on operator experience. *Eur Urol.* 2010;57(5):843-9.

17. Herr HW, Donat SM. Quality control in transurethral resection of bladder tumours. *BJU Int.* 2008;102(9 Pt B):1242-6.
18. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol.* 2013;63(2):234-41.
19. Netto GJ. Molecular genetics and genomics progress in urothelial bladder cancer. *Semin Diagn Pathol.* 2013;30(4):313-20.
20. Dalbagni G, Vora K, Kaag M, Cronin A, Bochner B, Donat SM, et al. Clinical outcome in a contemporary series of restaged patients with clinical T1 bladder cancer. *Eur Urol.* 2009;56(6):903-10.
21. Peyromaure M, Zerbib M. T1G3 transitional cell carcinoma of the bladder: recurrence, progression and survival. *BJU Int.* 2004;93(1):60-3.
22. Canyilmaz E, Yoney A, Serdar L, Uslu GH, Aynaci O, Hacıislamoglu E, et al. Long-term results of a concomitant boost radiotherapy technique for elderly patients with muscle-invasive bladder cancer. *J Geriatr Oncol.* 2015;6(4):316-23.
23. Nuhn P, May M, Sun M, Fritsche HM, Brookman-May S, Buchner A, et al. External validation of postoperative nomograms for prediction of all-cause mortality, cancer-specific mortality, and recurrence in patients with urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 2012;61(1):58-64.
24. Fahmy O, Khairul-Asri MG, Schubert T, Renninger M, Malek R, Kübler H, et al. A systematic review and meta-analysis on the oncological long-term outcomes after trimodality therapy and radical cystectomy with or without neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Urol Oncol.* 2018;36(2):43-53.
25. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, et al. Bladder cancer. *Nature Reviews Disease Primers.* 2017;3(1):17022.
26. Mak KS, Smith AB, Eidelman A, Clayman R, Niemierko A, Cheng JS, et al. Quality of Life in Long-term Survivors of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2016;96(5):1028-36.
27. Cox E, Saramago P, Kelly J, Porta N, Hall E, Tan WS, et al. Effects of Bladder Cancer on UK Healthcare Costs and Patient Health-Related Quality of Life: Evidence From the BOXIT Trial. *Clin Genitourin Cancer.* 2020;18(4):e418-e42.
28. Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, et al. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol.* 2009;27(3):295-300.
29. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics.* 2003;21(18):1315-30.
30. Powles T, Bellmunt J, Comperat E, De Santis M, Huddart R, Loriot Y, et al. Bladder cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2022;33(3):244-58.
31. Szarvas T, vom Dorp F, Ergün S, Rübber H. Matrix metalloproteinases and their clinical relevance in urinary bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2011;8(5):241-54.
32. Aitken KJ, Bägli DJ. The bladder extracellular matrix. Part I: architecture, development and disease. *Nat Rev Urol.* 2009;6(11):596-611.

33. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827-39.
34. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 19):3719-27.
35. Itoh Y, Nagase H. Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem*. 2002;38:21-36.
36. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):161-74.
37. Westermarck J, Kähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*. 1999;13(8):781-92.
38. Jung K, Nowak L, Lein M, Priem F, Schnorr D, Loening SA. Matrix metalloproteinases 1 and 3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and the complex of metalloproteinase-1/tissue inhibitor in plasma of patients with prostate cancer. *Int J Cancer*. 1997;74(2):220-3.
39. Sang QA, Schwartz MA, Li H, Chung LW, Zhou HE. Targeting matrix metalloproteinases in human prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;878:538-40.
40. Lein M, Nowak L, Jung K, Laube C, Ulbricht N, Schnorr D, et al. Metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in plasma of patients with prostate cancer and in prostate cancer tissue. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;878:544-6.
41. Sauer CG, Kappeler A, Späth M, Kaden JJ, Michel MS, Mayer D, et al. Expression and activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 in serum, core needle biopsies and tissue specimens of prostate cancer patients. *Virchows Arch*. 2004;444(6):518-26.
42. Morgia G, Falsaperla M, Malaponte G, Madonia M, Indelicato M, Travali S, et al. Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res*. 2005;33(1):44-50.
43. Escaff S, Fernández JM, González LO, Suárez A, González-Reyes S, González JM, et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(5):922-9.
44. Brehmer B, Biesterfeld S, Jakse G. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2003;6(3):217-22.
45. Džombeta T, Krušlin B. High Grade T1 Papillary Urothelial Bladder Cancer Shows Prominent Peritumoral Retraction Clefting. *Pathol Oncol Res*. 2018;24(3):567-74.
46. Singh R, Mandhani A, Agrawal V, Garg M. Positive Correlation between Matrix Metalloproteinases and Epithelial-to-Mesenchymal Transition and its Association with Clinical Outcome in Bladder Cancer Patients. *Cancer Microenviron*. 2018;11(1):23-39.
47. Reis ST, Leite KR, Piovesan LF, Pontes-Junior J, Viana NI, Abe DK, et al. Increased expression of MMP-9 and IL-8 are correlated with poor prognosis of Bladder Cancer. *BMC Urol*. 2012;12:18.
48. Srougi V, Reis ST, Viana N, Gallucci FP, Leite KR, Srougi M, et al. Prospective evaluation of a urinary biomarker panel to detect and predict recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer. *World J Urol*. 2021;39(2):453-9.

49. De Groef L, Van Hove I, Dekeyster E, Stalmans I, Moons L. MMPs in the neuroretina and optic nerve: modulators of glaucoma pathogenesis and repair? *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(3):1953-64.
50. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1825(1):29-36.
51. Liu D, Guo H, Li Y, Xu X, Yang K, Bai Y. Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (MMPs) and risk of cancer metastasis: a meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(2):e31251.
52. Offersen BV, Knap MM, Horsman MR, Verheijen J, Hanemaaijer R, Overgaard J. Matrix metalloproteinase-9 measured in urine from bladder cancer patients is an independent prognostic marker of poor survival. *Acta Oncol.* 2010;49(8):1283-7.
53. Wu GJ, Bao JS, Yue ZJ, Zeng FC, Cen S, Tang ZY, et al. Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 is associated with bladder cancer pathogenesis. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(Supplement):S54-S9.
54. Gunes M, Kemik AS, Pirincci N, Gecit I, Taken K, Yuksel MB, et al. Preoperative levels of matrix metalloproteinase-7 and -9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 relation to pathologic parameters in bladder carcinoma patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(2):873-6.
55. Slaton JW, Millikan R, Inoue K, Karashima T, Czerniak B, Shen Y, et al. Correlation of metastasis related gene expression and relapse-free survival in patients with locally advanced bladder cancer treated with cystectomy and chemotherapy. *J Urol.* 2004;171(2 Pt 1):570-4.
56. Vasala K, Pääkko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) immunoreactive protein in urinary bladder cancer: a marker of favorable prognosis. *Anticancer Res.* 2008;28(3B):1757-61.
57. Grignon DJ, Sakr W, Toth M, Ravery V, Angulo J, Shamsa F, et al. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 1996;56(7):1654-9.
58. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169(12):5429-33.
59. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1565-75.
60. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading).* 2005;151(Pt 8):2551-61.
61. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(6):467-77.
62. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.* 2014;157(6):1262-78.
63. Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell.* 2017;168(1-2):20-36.

64. Wang SW, Gao C, Zheng YM, Yi L, Lu JC, Huang XY, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer. *Mol Cancer*. 2022;21(1):57.
65. Zhang H, Qin C, An C, Zheng X, Wen S, Chen W, et al. Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer. *Mol Cancer*. 2021;20(1):126.
66. Pereira TC. Introdução à técnica de CRISPR. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética; 2016. 250 p.
67. Yi L, Li J. CRISPR-Cas9 therapeutics in cancer: promising strategies and present challenges. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1866(2):197-207.
68. Li W, Cho MY, Lee S, Jang M, Park J, Park R. CRISPR-Cas9 mediated CD133 knockout inhibits colon cancer invasion through reduced epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2019;14(8):e0220860.
69. Bialk P, Wang Y, Banas K, Kmiec EB. Functional Gene Knockout of. *Mol Ther Oncolytics*. 2018;11:75-89.
70. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJ, Hamieh M, Cunanan KM, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*. 2017;543(7643):113-7.
71. Wu S. Safety and Activity of Programmed Cell Death-1 Knockout Engineered T Cells in Patients With Previously Treated Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma: An Open-label, Single-arm Phase 1 Study. *ClinicalTrials.gov*: US National Library of Medicine; 2017.
72. Wang W. Safety and Effect Assessment of TACE in Combination With Autologous PD-1 Knockout Engineered T Cells by Percutaneous Infusion in the Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma.: US National Library of Medicine; 2019.
73. Lu Y. A Phase I Clinical Trial of PD-1 Knockout Engineered T Cells Treating Patients With Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *ClinicalTrials.gov*: US National Library of Medicine; 2016.
74. Liu B, Su S. A Phase I/II Trial of PD-1 Knockout EBV-CTLs for Advanced Stage EBV Associated Malignancies. *ClinicalTrials.gov*: US National Library of Medicine; 2020.
75. Han W. Phase I Study to Evaluate Treatment of CRISPR-Cas9 Mediated PD-1 and TCR Gene-knocked Out Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells in Patients With Mesothelin Positive Multiple Solid Tumors. *ClinicalTrials.gov*: US National Library of Medicine; 2018.
76. Zuiverloon TCM, de Jong FC, Costello JC, Theodorescu D. Systematic Review: Characteristics and Preclinical Uses of Bladder Cancer Cell Lines. *Bladder Cancer*. 2018;4(2):169-83.
77. Peng CC, Chen KC, Peng RY, Su CH, Hsieh-Li HM. Human urinary bladder cancer T24 cells are susceptible to the *Antrodia camphorata* extracts. *Cancer Lett*. 2006;243(1):109-19.
78. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013;8(11):2281-308.
79. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-23.
80. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.

81. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4.
82. Itesako T, Seki N, Yoshino H, Chiyomaru T, Yamasaki T, Hidaka H, et al. The microRNA expression signature of bladder cancer by deep sequencing: the functional significance of the miR-195/497 cluster. *PLoS One*. 2014;9(2):e84311.
83. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffouix C, Denis L, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*. 2006;49(3):466-5; discussion 75-7.
84. Nutt JE, Durkan GC, Mellon JK, Lunec J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in bladder cancer: the induction of MMP9 by epidermal growth factor and its detection in urine. *BJU Int*. 2003;91(1):99-104.
85. Shin KY, Moon HS, Park HY, Lee TY, Woo YN, Kim HJ, et al. Effects of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on expressions of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human bladder cancer cells. *Cancer Lett*. 2000;159(2):127-34.
86. Ongusaha PP, Kwak JC, Zwible AJ, Macip S, Higashiyama S, Taniguchi N, et al. HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res*. 2004;64(15):5283-90.
87. Lee SJ, Park SS, Cho YH, Park K, Kim EJ, Jung KH, et al. Activation of matrix metalloproteinase-9 by TNF-alpha in human urinary bladder cancer HT1376 cells: the role of MAP kinase signaling pathways. *Oncol Rep*. 2008;19(4):1007-13.
88. Camargo JA. *Edição genômica com CRISPR/Cas9 para avaliação do papel da MMP9 e seu regulador o microRNA-21 no câncer de próstata metastático: Estudo in vitro e in vivo [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo 2022.
89. Nalla AK, Gorantla B, Gondi CS, Lakka SS, Rao JS. Targeting MMP-9, uPAR, and cathepsin B inhibits invasion, migration and activates apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Gene Ther*. 2010;17(9):599-613.
90. Tang ZY, Liu Y, Liu LX, Ding XY, Zhang H, Fang LQ. RNAi-mediated MMP-9 silencing inhibits mouse melanoma cell invasion and migration in vitro and in vivo. *Cell Biol Int*. 2013;37(8):849-54.
91. Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Olivero WC, Dinh DH, Gujrati M, et al. Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene*. 2004;23(27):4681-9.
92. Chen YC, Chen CI, Chang CY, Huang BM. Clerodane diterpene induces apoptosis/anoikis and suppresses migration and invasion of human bladder cancer cells through the histone deacetylases, integrin-focal adhesion kinase, and matrix metalloproteinase 9 signalling pathways. *Hum Exp Toxicol*. 2022;41:9603271221143040.
93. Inoue K, Slaton JW, Kim SJ, Perrotte P, Eve BY, Bar-Eli M, et al. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Res*. 2000;60(8):2290-9.

94. Dufour A, Zucker S, Sampson NS, Kuscu C, Cao J. Role of matrix metalloproteinase-9 dimers in cell migration: design of inhibitory peptides. *J Biol Chem*. 2010;285(46):35944-56.
95. Dufour A, Sampson NS, Li J, Kuscu C, Rizzo RC, Deleon JL, et al. Small-molecule anticancer compounds selectively target the hemopexin domain of matrix metalloproteinase-9. *Cancer Res*. 2011;71(14):4977-88.
96. Pavlaki M, Zucker S. Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPi): the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer Metastasis Rev*. 2003;22(2-3):177-203.
97. Nemunaitis J, Poole C, Primrose J, Rosemurgy A, Malfetano J, Brown P, et al. Combined analysis of studies of the effects of the matrix metalloproteinase inhibitor marimastat on serum tumor markers in advanced cancer: selection of a biologically active and tolerable dose for longer-term studies. *Clin Cancer Res*. 1998;4(5):1101-9.
98. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*. 2002;295(5564):2387-92.
99. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 2013;31(9):822-6.