

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

Lia Franciê Ribeiro dos Santos Bruschi

DESENVOLVIMENTO DE LINHAGEM HUMANA DE ADENOCARCINOMA  
PULMONAR *KNOCKOUT* PARA O GENE DA COFILINA-1 VIA CRISPR/Cas9

Porto Alegre

2019

Lia Franciê Ribeiro dos Santos Bruschi

DESENVOLVIMENTO DE LINHAGEM HUMANA DE ADENOCARCINOMA  
PULMONAR *KNOCKOUT* PARA O GENE DA COFILINA-1 VIA CRISPR/Cas9

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Klamt  
Coorientadora: Dra. Patrícia Luciana da Costa Lopez

Porto Alegre

2019

### CIP - Catalogação na Publicação

BRUSCHI, LIA FRANCIÊ RIBEIRO DOS SANTOS  
DESENVOLVIMENTO DE LINHAGEM HUMANA DE  
ADENOCARCINOMA PULMONAR KNOCKOUT PARA O GENE DA  
COFILINA-1 VIA CRISPR/Cas9 / LIA FRANCIÊ RIBEIRO DOS  
SANTOS BRUSCHI. -- 2019.

74 f.

Orientador: FÁBIO KLAMT.

Coorientadora: PATRÍCIA LUCIANA DA COSTA LOPEZ.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Cofilina-1. 2. A549. 3. Knockout. 4.  
CRISPR/Cas9. 5. Migração celular. I. KLAMT, FÁBIO,  
orient. II. LOPEZ, PATRÍCIA LUCIANA DA COSTA,  
coorient. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço às pessoas que estiveram comigo nesse período e me auxiliaram de alguma forma a chegar nesse resultado. Fazer pesquisa no Brasil se tornou ainda mais um ato de coragem, mas seguiremos resistindo no amor pela ciência.

À minha família, por fornecer a base necessária para que eu pudesse me desenvolver. Obrigada por todo apoio, incentivo, amizade e principalmente presença afetiva. Amo vocês.

Aos meus amigos, aos antigos que se mantiveram firme mesmo eu sendo ausente na maior parte desses últimos tempos, não desistam de mim!

Aos novos amigos do lab. 24, que tornaram mais leve a vida na pós-graduação (tanto quanto possível), com todos os “sim-eventos”; agradeço as parcerias.

Às/os professores/as, coordenação e funcionários/as do PPG, especialmente a Cleia e o Giordano, além dos colegas dos outros laboratórios, sempre facilitando nossa vida científica, seja com um equipamento ou discussão.

Às colaborações estabelecidas, principalmente com a Prof<sup>a</sup> Luciana, que me recebeu no seu lab. e tornou possível que eu trabalhasse com a edição gênica. Ao LAMOC, por todo o auxílio para os experimentos de migração, agradeço demais ao Prof. Marcelo e à Bibiana!

À Dra. Priscila Vianna por toda sua expertise com a citometria e disposição para pela primeira vez executar o *single cell sorting*.

À Patilu! Me orientando desde a iniciação científica, agradeço imensamente pelo convívio, por ser exemplo de profissional, por investires teu tempo e conhecimento comigo! Ao Edu, sempre instigando o pensamento crítico científico, agradeço demais fazer parte também do LaBCM.

Ao Professor Fábio, exemplo de pesquisador, profissional e orientador. Por toda a amizade e acima de tudo incentivo! Obrigada pela confiança e por me receber no LBC.

Finalmente ao meu amor, Mariana. Tu és meu norte, minha casa... esse nós sempre me incentiva a ir além! Agradeço todos os minutinhos que tu passaste me apoiando quando nada estava dando certo, e só de me ver chegar tu já sabias. Ainda mais nessa reta final, com o apoio infinito, muito obrigada meu amor.

Este projeto foi realizado no Laboratório de Bioquímica Celular – LBC (laboratório 24) sob orientação do Prof. Dr. Fábio Klamt, Departamento de Bioquímica Prof. Tuisikon Dick do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Biologia Celular e Molecular – UAMP/HCPA sob Coorientação da Profª Dra. Patrícia Luciana da Costa Lopez, em colaboração com o Laboratório de Biotecnologia - Instituto de Farmácia – PUCRS sob coordenação da Profª. Dra. Luciana Relly, no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional – TECNOPUC, sob coordenação do professor Dr. Cristiano Valim Bizarro, no Laboratório de Migração Celular – Faculdade de Odontologia – UFRGS, sob coordenação do Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers, e no Laboratório de Imunogenética – Departamento de Genética - UFRGS, sob coordenação do Prof. Dr. José Artur Bogo Chies. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM #465458/2014-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e FIPE-HCPA (17-0560).

## SUMÁRIO

PARTE I.....	1
RESUMO .....	2
ABSTRACT .....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
1 INTRODUÇÃO.....	6
1.1 CARCINOMAS DE PULMÃO.....	6
1.2 COFILINA-1 .....	9
1.2.1 Breve histórico e contexto.....	9
1.2.2 Estrutura da cofilina-1 .....	10
1.2.3 Mecanismos regulatórios.....	11
1.2.4 Fisiologia.....	12
1.2.1 O PAPEL DA VIA DA COFILINA-1 EM TUMORES.....	18
1.3 EDIÇÃO GÊNICA .....	19
1.3.1 CRISPR/Cas9 ( <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Crispr-Associated Protein 9</i> ).....	19
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL .....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
PARTE II.....	23
CAPÍTULO I.....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 CULTIVO CELULAR E REAGENTES.....	24
3.2 OBTENÇÃO DA LINHAGEM <i>KNOCKOUT</i> .....	24
3.2.1 Identificação da sequência .....	25
3.2.2 Preparação do vetor CRISPR/Cas9 .....	25
3.2.3 Anelamento dos oligonucleotídeos .....	26
3.2.4 Ligação do gRNA anelado ao vetor .....	26
3.2.5 Transformação química.....	26
3.2.6 PCR de colônias .....	27
3.2.7 Purificação dos vetores.....	28
3.2.8 Transfecção de células .....	29

3.2.9 Avaliação da edição gênica .....	33
3.2.10 Separação em linhagens monoclonais .....	35
3.2.11 Identificação de edição por sequenciamento .....	38
3.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E ELETROFORESE .....	39
3.4 ENSAIO DE IMUNODETECCÃO .....	40
3.5 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	41
3.5 MIGRAÇÃO CELULAR .....	41
3.6 IMUNOCITOQUÍMICA PARA A ANÁLISE DE MORFOLOGIA NUCLEAR (NMA) E ÍNDICE DE POLARIDADE .....	41
3.7 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS/MS) .....	42
3.7.1 Precipitação e digestão de proteínas em solução. ....	42
3.7.2 Identificação de proteínas por LC-MS/MS .....	43
3.7.3 Análise dos dados e identificação das proteínas .....	43
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
CAPÍTULO II .....	45
4 RESULTADOS .....	45
4.1 CONFIRMAÇÃO DA LINHAGEM <i>KNOCKOUT</i> PARA <i>CFL1</i> .....	45
4.1.1 Identificação de mutação por sequenciamento .....	45
4.1.2 Imunodeteccão da cofilina-1 .....	46
4.2 ANÁLISE PROTEÔMICA .....	47
4.3 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (CPD) .....	47
4.4 ÍNDICE DE POLARIDADE E ANÁLISE MORFOMÉTRICA NUCLEAR - NMA ...	48
4.5 ANÁLISE DO PERFIL DE MIGRAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS .....	50
PARTE III .....	52
5 DISCUSSÃO .....	53
6 PERSPECTIVAS .....	56
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	57
REFERÊNCIAS .....	58

## PARTE I



## RESUMO

O câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC) representa aproximadamente 85% de todos os carcinomas pulmonares. Mundialmente, a alta mortalidade associada ao carcinoma pulmonar é intrinsecamente relacionada ao diagnóstico tardio, em que os pacientes são comumente diagnosticados em estágios avançados e/ou disseminados. Apesar dos avanços nas opções para o tratamento, incluindo cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapias direcionadas, o prognóstico permanece ruim, somado ao desenvolvimento de resistências intrínseca ou adquirida frente ao tratamento – o que reflete diretamente na baixa sobrevida dos pacientes. Portanto, a caracterização molecular adicional de mecanismos envolvidos na progressão tumoral tem o potencial de identificar novos biomarcadores e alvos moleculares que afetam a progressão da doença e permitem o desenho de novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, dados do nosso grupo de pesquisa demonstraram ineditamente o envolvimento da proteína cofilina-1 (gene *CFL1* em humanos) na resistência à cisplatina em CPNPC. A cofilina-1 é uma proteína citosólica de ~19 kDa que pertence à família da ADF/cofilina, sendo um reconhecido fator de regulação do *turnover* de actina. Níveis aumentados de cofilina-1 em fenótipos mais agressivos de diversos tipos tumorais são geralmente correlacionados a um pior prognóstico. Dessa forma há a necessidade do desenvolvimento de um modelo *knockout* para determinar o papel específico desse gene na biologia tumoral. Os recentes avanços na elaboração de ferramentas para a edição genômica – sistema CRISPR/Cas9 – têm revolucionado a engenharia genética ao permitir a programação de alterações sítio dirigidas utilizando um mecanismo relativamente simples. No presente estudo, esta ferramenta foi aplicada para desenvolver um modelo único em adenocarcinoma pulmonar, o *knockout* para a proteína cofilina-1, que poderá auxiliar numa melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na biologia da agressividade tumoral. A fim de avaliar o efeito da falta de cofilina-1 sobre a dinâmica da actina, realizamos ensaios de migração por microscopia *time-lapse*, e no grupo *knockout* foi observado um significativo aumento de direcionalidade. Ademais, foram mensurados padrões morfométricos e essas caracterizações demonstraram alteração no fenótipo para um tipo mais fusiforme, com o padrão nuclear elipsoide, sugestivo de transição epitéliomesênquima. Esses dados sugerem a robustez do modelo *knockout* para *CFL1*, que deverá ser complementado com a avaliação da superexpressão e estudo dos mecanismos moleculares alterados entre os fenótipos *wild type*, *knockout* e superexpressão para esse gene.

Palavras-chave: A549; cofilina-1; *knockout*; CRISPR/Cas9; migração celular.

## ABSTRACT

Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for approximately 85% of all lung carcinomas. Worldwide, high mortality associated with lung carcinoma is intrinsically related to late diagnosis, where patients are commonly diagnosed in advanced and / or disseminated stages. Despite advances in treatment options, including surgery, radiotherapy, chemotherapy and targeted therapies, the prognosis remains poor, coupled with the development of intrinsic or acquired resistance to treatment - which directly reflects the patients' poor survival. Therefore, the additional molecular characterization of mechanisms involved in tumor progression has the potential to identify new biomarkers and molecular targets that affect the progression of the disease and allow the design of new therapeutic strategies. In this context, data from our research group have unprecedentedly demonstrated the involvement of cofilin-1 protein (*CFL1* gene in humans) in cisplatin resistance in NSCLC. Cofilin-1 is a ~19 kDa cytosolic protein that belongs to the ADF/cofilin family, being a recognized regulator of actin turnover. Increased levels of cofilin-1 in more aggressive phenotypes of various tumor types are generally correlated with a worse prognosis. Thus, there is a need to develop a knockout model to determine the specific role of this gene in tumor biology. Recent advances in the elaboration of genomic editing tools - CRISPR/Cas9 system - have revolutionized genetic engineering by allowing the programming of site-directed changes using a relatively simple mechanism. In the present study, this tool was applied to develop a unique model in lung adenocarcinoma, the knockout for the cofilin-1 protein, which may help to better understand the mechanisms involved in the biology of tumor aggressiveness. In order to evaluate the effect of the lack of cofilin-1 on actin dynamics, we carried out migration tests by time-lapse microscopy, and in the knockout group a significant increase in directionality was observed. In addition, morphometric patterns were measured and these characterizations demonstrated a change in phenotype for a more fusiform type, with the ellipsoid nuclear pattern, which suggests epithelial-mesenchymal transition. These data indicate the robustness of the knockout model for *CFL1*, which should be complemented with the evaluation of overexpression and with the study of the molecular mechanisms altered among the phenotypes *wild type*, *knockout* and overexpression to this gene.

Keywords: A549; cofilin-1; knockout; CRISPR/Cas9; cell migration.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADF- *actin-depolymerization factor*

ADP- *adenosine diphosphate*

ALK- *anaplastic lymphoma kinase*

ATP- *adenosine triphosphate*

BSA- *bovine serum albumin*

CFL1- *cofilin-1*

CFL2 - *cofilin-2*

CIN- *cronophin*

CPD- *cumulative population doubling*

CPNPC- *câncer de pulmão de não-pequenas células*

CPPC- *câncer de pulmão de pequenas células*

CRISPR/Cas9 - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)/CRISPR-associated 9*

crRNA- *CRISPR ribonucleic acid*

DAPI- *4', 6'-diamino-2-fenil-indol*

DNA- *deoxyribonucleic acid*

DPBS- *Dulbecco's phosphate-buffered saline*

DSB - *double strand break*

EGF- *epidermal growth factor*

EGFR- *epidermal growth factor receptor*

EMT- *epithelial-mesenchymal transition*

FACS - *fluorescence-activated cell sorting*

GFP- *green fluorescent protein*

gRNA- *guide RNA*

GSSG - *glutathiona dissulfeto*

HDR - *homologous directed repair*

KPS - *Karnofsky performance status scale*

KRAS - *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

LIMK - *lim domain kinase*

LKB1- *Lkb1 kinase*

NHEJ- *non-homologous end joining*

NLS - *nuclear localization signal*

PAM- *protospacer adjacent motif*

PBS- *phosphate-buffered saline*

pH- *potential of hydrogen*

PTEN- *phosphatase and tensin homolog*

RNA- *ribonucleic acid*

ROS1- *ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase*

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SFB- *soro fetal bovino*

SSH- *slingshot protein phosphatases*

STK11- *serine/threonine kinase 11*

TALEN- *transcription Activator-Like Nuclease*

TESK- *testicular protein kinase*

TP53- *tumor protein p53*

TracrRNA- *trans-activating crRNA*

T7EI - *T7 Endonuclease I*

WT- *wild type*

ZFN- *zinc finger nuclease*

## 1 INTRODUÇÃO

A presente dissertação, em um primeiro momento, descreve os carcinomas de pulmão e os mecanismos relacionados à vinculação da proteína cofilina-1 (*CFLI*) com a biologia tumoral, além de brevemente contextualizar sobre o recente sistema de edição gênica CRISPR/Cas9. Essa revisão bibliográfica fornece a base para a compreensão do modelo experimental desenvolvido neste trabalho, cujo objetivo é produzir uma linhagem de adenocarcinoma pulmonar *knockout* para *CFLI*.

### 1.1 CARCINOMAS DE PULMÃO

O carcinoma pulmonar é a principal causa de mortalidade relacionada ao câncer no mundo, quatro principais tipos histológicos compreendem a maioria dos carcinomas de pulmão, os quais segundo a OMS são classificados inicialmente em duas categorias: câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) e o câncer de pulmão de não-pequenas células (CPNPC), o qual compreende adenocarcinomas, carcinoma escamoso e carcinoma de grandes células (Siegel, Miller, and Jemal 2018). Assim, os carcinomas pulmonares podem ser classificados com base no seu tipo histológico e subtipos moleculares. O CPPC possui origem neuroendócrina, enquanto que o subtipo mais incidente no CPNPC, o adenocarcinoma, tem por origem as células progenitoras dos bronquíolos (células de Clara), alvéolos (pneumócitos do tipo II) ou células produtoras de mucina. O tumor pulmonar pode se formar desde a traqueia até os brônquios, bem como nas regiões mais periféricas do órgão. Adenocarcinoma é a forma mais comum de câncer de pulmão no mundo hoje, e sua frequência vem aumentando rapidamente (Kumar, V.; Abbas, A. K; Aster 2013).

Anualmente para o carcinoma pulmonar são estimados 2,1 milhões de novos casos e 1,8 milhões de mortes, o que representa 18,4% do total de casos entre todos os tipos de câncer. Aproximadamente 85% dos pacientes são classificados com os subtipos histológicos conhecidos como CPNPC, dentre os quais o adenocarcinoma de pulmão e o carcinoma de células escamosas de pulmão são os mais incidentes (Molina et al. 2008; Siegel et al. 2018). Para o Brasil, estimam-se 18.740 novos casos de câncer de pulmão entre homens e 12.530 entre mulheres em cada ano do biênio 2018-2019, com uma sobrevivência de 5 anos para 10 a 15% dos diagnósticos. O câncer pulmonar é um dos tipos mais agressivos, apresentando a alta razão mortalidade/incidência de aproximadamente 0,87 (INCA 2017).

Para o tratamento, parâmetros como o estadiamento, associado a outros fatores como a *Karnofsky performance status scale* (KPS - a qual avalia o bem-estar do paciente), idade e tipo histológico, direcionam a terapêutica e determinam o prognóstico (Fernandez, Jatene, and Zamboni 2002). Mundialmente, a alta mortalidade associada ao carcinoma pulmonar é intrinsecamente relacionada ao diagnóstico tardio, em que os pacientes são comumente diagnosticados em estágios avançados e/ou disseminados, o que dificulta a terapia curativa.

A rescisão cirúrgica continua sendo a principal forma de tratamento para os estágios iniciais e doenças localizadas, e a quimioterapia sistêmica também tem beneficiado esses pacientes (Arriagada et al. 2004). A administração da quimioterapia baseada em agentes alquilantes como um tratamento de primeira escolha para pacientes com CPNPC avançado foi reportado pela primeira vez no final da década de 1980. E esse tem sido o padrão ouro para o tratamento desses tipos tumorais, no entanto, 40% dos diagnósticos para câncer de pulmão são realizados em estágio IV. Para pacientes com doença avançada e metastática o tratamento é quimioterápico paliativo, com o objetivo de reduzir os efeitos adversos e na melhoria da qualidade de vida. Conforme revisado por Ramalingam e Belani, sobre a eficácia do tratamento baseado em platina, foram demonstrados por meta-análise de ensaios clínicos randomizados, que a quimioterapia com cisplatina foi associada com uma taxa de sobrevivência média de um ano. Devido a isso, outros quimioterápicos passaram a ser combinados como o objetivo de melhorar o tempo de sobrevida, além da qualidade de vida desses pacientes (Ramalingam and Belani 2008). Embora a escolha do tratamento leve em consideração a extensão anatomopatológica e as condições gerais do paciente, o carcinoma pulmonar é uma desordem altamente heterogênea, e seu desenvolvimento e manifestação variam muito de caso a caso. Cada subtipo histológico apresenta associações clinico-patológicas e moleculares únicas, propriedades essas que não são avaliadas nos esquemas de estadiamento (Sholl 2016).

Nesse aspecto, concomitante a alterações morfológicas do epitélio normal, as lesões displásicas, pré-neoplásicas e neoplásicas, o acúmulo múltiplo de 10 a 20 alterações que ocorrem a nível genômico desencadeiam a carcinogênese e a progressão do câncer de pulmão. Tais alterações correspondem a mutações, deleções, modificações epigenéticas que podem afetar toda a árvore brônquica, a qual é sujeita difusamente a danos resultantes da exposição a agentes cancerígenos (por exemplo, a fumaça de cigarro) (Sekido, Fong, and Minna 2003). Entre os principais componentes alterados em CPNPC estão a via para sinalização do receptor de tirosina cinase, sinalização mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*), resposta ao estresse oxidativo e progressão do ciclo celular.

Em adenocarcinoma (o subtipo utilizado nessa dissertação) as principais mutações relacionadas são as do *epidermal growth factor receptor* (EGFR), que tem sido mais frequentemente diagnosticada em paciente que nunca fumaram, e as mutações do *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS) mais identificadas em pacientes com o hábito tabagista, além de ambas já terem sido detectadas fora desses subgrupos (Dearden et al. 2013). Também é importante considerar as mutações em genes supressores tumorais, as quais coincidem com as alterações oncogênicas, e em adenocarcinoma, as mais identificadas são: *tumor protein p53* (TP53), (*liver kinase B1*) LKB1, e *PTEN* (Ding et al. 2008; Sanchez-Cespedes et al. 2002; Skoulidis et al. 2018).

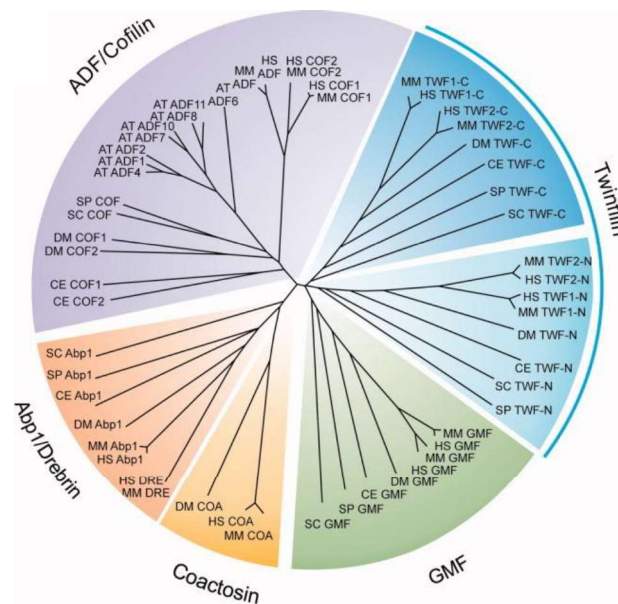
A ampla caracterização genômica do adenocarcinoma levou à identificação de subtipos moleculares que são oncogênicos dependentes e sensíveis às terapias direcionadas. Estes incluem mutações ativadoras no EGFR, *BRAF*, *anaplastic lymphoma kinase* (ALK) e o receptor de tirosina cinase - *ROS1*, entre outros. Fármacos que têm como alvo o domínio da tirosina-quinase desses oncogenes resultaram em melhores taxas de resposta e sobrevida em pacientes com doença metastática. Infelizmente, isso representa apenas 15 a 20% dos pacientes em uma população restrita que tem acesso a esse tipo de tratamento e, embora essas intervenções sejam efetivas inicialmente, a eficácia na maioria dos pacientes é limitada pelo surgimento de mecanismos de resistência (Mayekar and Bivona 2017).

Portanto, a caracterização molecular adicional de mecanismos envolvidos na biologia tumoral tem o potencial de identificar novos biomarcadores e alvos moleculares que afetam a progressão da doença e permitem o desenho de novas estratégias terapêuticas (Jamal-Hanjani et al. 2017; Muller et al. 2015). Nesse contexto, a proteína cofilina-1 vem sendo amplamente estudada, e alterações em sua expressão, regulação ou localização intracelular estão ligadas ao início e progressão de inúmeras patologias, incluindo doenças neurodegenerativas, complicações renais, inflamação, infertilidade, imunodeficiências e progressão em diferentes tipos tumorais (revisado por Bamburg and Wiggan, 2002). Dessa forma há a necessidade do desenvolvimento de um modelo *knockout* para determinar o papel específico desse gene na biologia tumoral.

## 1.2 COFILINA-1

### 1.2.1 Breve histórico e contexto

No final e durante a década de 1980 foram identificadas, em eucariotos, importantes proteínas com funções regulatórias sob a dinâmica dos filamentos de actina (actina-F). De acordo com vários autores, a partir da habilidade em dissociar os polímeros de actina-F em monômeros (actina-G) combinado com o peso molecular, foi possível caracterizar proteínas de aproximadamente 15-19 kDa ou ~93 kDa (Bamburg 1999; Blikstad et al. 1978; Thorstenson, Sterky, and Norberg 1985). Assim, proteínas com ~19 kDa tiveram suas nomeações derivadas inicialmente da capacidade para despolimerizar filamentos de actina (*destroys F-actin*, *Dstn*), sendo chamadas de Destrina ou ADF (*Actin-depolymerizing factor*) e Cofilina por formar estruturas cofilamentosas com actina (Maekawa et al. 1984; Nishida et al. 1984). No final dos anos 1990, essas proteínas foram isoladas em outras espécies, e passaram a ser reunidas na família ADF/Cofilina. Na virada do século 20-21, Lappalainen e colaboradores identificaram



**Figura 1 - Análise filogenética de proteínas do domínio ADF-H.** ADF/Cofilinas estão presentes em todas as espécies eucarióticas de plantas a leveduras e animais. Dados obtidos por transcriptômica de *Homo sapiens* (HS), *Mus musculus* (MM), *D. melanogaster* (DE), *C. elegans* (CE), *S. cerevisiae* (SC), *S. pombe* (SP) e *A. thaliana* (AT). Adaptado de Nakano *et al.*, 2010.



domínios conservados entre as proteínas ADF/Cofilina referentes a módulos de interação com a actina-G e actina-F, denominados domínios de homologia à ADF (ADF-H)

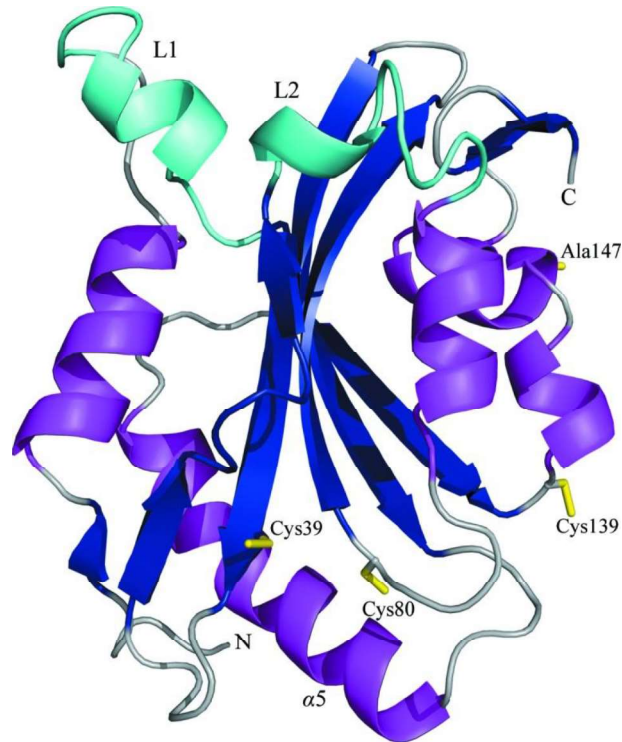
Posteriormente foram identificadas outras quatro famílias de proteínas reguladoras da dinâmica de actina, agrupadas como uma superfamília ADF/Cofilina, representadas na figura 1 (Nakano et al. 2010) .

### 1.2.2 Estrutura da cofilina-1

Há três diferentes isoformas para a família ADF/Cofilina: a cofilina-1 (*CFL1*, cofilina não-muscular), cofilina-2 (*CFL2*, cofilina muscular) e a ADF, também identificada como destrina (Bamburg 1999; Bamburg, Harris, and Weeds 1980). Apesar de as três isoformas serem codificadas por diferentes genes, a ADF possui homologia de 70% com a *CFL1* e *CFL2*, e estas partilham 80% de identidade ao nível dos aminoácidos (Kanellos and Frame 2016).

Estas proteínas possuem ampla expressão tecidual, além de distribuição ubíqua no meio intracelular. A cofilina-1 é a isoforma mais expressa em tecidos não musculares, e devido ao seu papel essencial para o desenvolvimento neuronal, e correlação com agressividade tumoral tem sido também a mais estudada em outras funções e definida como uma reguladora da homeostase celular (Bamburg and Bernstein 2010), e portanto é o objeto de estudo desse trabalho. A sua estrutura é descrita pela formação de um núcleo constituído por seis folhas  $\beta$ , rodeadas por cinco a sete  $\alpha$ -hélices (Hamill et al. 2016; Klejnot et al. 2013), possuindo uma sequência de aminoácidos e estrutura altamente conservada entre espécies. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a cofilina-1 pode permanecer como monômeros ou oligômeros, com mudança de função em dissociar filamento de actina como monômero, para empacotar os filamentos como dímeros ou oligômeros, através da oxidação de resíduos de cisteína (Pfannstiel et al. 2001). Assim, são descritos quatro resíduos de cisteína passíveis de oxidação para a *CFL1* humana (Cys 39, Cys 80, Cys 139 e Cys 147) (Klejnot et al. 2013). São bem identificadas também as regiões específicas de interação com a actina; a principal, localizada na 5ª  $\alpha$ -hélice, se liga às duas formas, actina-G e actina-F, enquanto a segunda se liga apenas à actina-F (Pope et al. 2004). Outra importante modificação é a remoção pós-traducional do iniciador metionina, permanecendo assim somente a Serina 3 (Ser3) na região N-terminal, e é através desse resíduo que a cofilina-1 é modulada (Agnew, Minamide, and Bamburg 1995). Há também (figura 2) relevantes características estruturais, como a presença da sequência de localização nuclear bipartida (NLS, do inglês *nuclear localization signal*) nas posições 21-34, que permitem a

translocação eficiente para o interior do núcleo, bem como uma sequência para exportação nuclear (NES, do inglês *nuclear-export signal*) conservada na  $\alpha$ -hélice 1 (Abe, Nagaoka, and Obinata 1993; Munsie, Desmond, and Truant 2012).



**Figura 2 - Estrutura da cofilina-1 humana C147A.** São demonstradas as folhas  $\beta$  em Azul rodeadas por  $\alpha$ -hélices em magenta. E as cisteínas C39, C80, C139 e C147A são marcadas em amarelo. O Loop 1 contém a NLS. Retirado de Klejnot et al., 2013.

### 1.2.3 Mecanismos regulatórios

Os principais mecanismos regulatórios descritos para a cofilina-1 são a fosforilação da Ser3 a qual foi primeiramente descrita por ação das cinases LIMK1, isoforma predominante em tecido neuronal, e LIMK2, amplamente distribuída no organismo (Arber et al. 1998; Mizuno et al. 1994) além das TES cinases (TESK1 e TESK2), as quais regulam a atividade da cofilina-1 por consequente inibição da sua capacidade de interagir com a actina (Toshima et al. 2001). Tipicamente, a inativação da *CFL1* leva ao acúmulo de filamentos de actina (Agnew et al. 1995). Por outro lado, a ativação através da Ser3 é modulada principalmente por desfosforilação mediada pelas fosfatases da família da *SSHs* (*slingshot family proteins*) (Niwa et al. 2002) e pela

cronofina (CIN) (Gohla, Birkenfeld, and Bokoch 2004), e de forma menos específica por fosfatases tipos 1, 2A e 2B (Ambach et al. 2000).

A relação entre o pH e ligação ao fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>), resultou em uma maior compreensão sobre outros mecanismos de regulação da cofilina-1. Sabe-se que mudanças no pH mediada pela proteína de troca Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> NHE1 pode aumentar a atividade da cofilina-1 em pH alto, ao trocar H<sup>+</sup> intracelular por Na<sup>+</sup> extracelular. Frantz e colaboradores demonstraram a capacidade da cofilina-1 em atuar como um sensor de pH intracelular (Frantz et al. 2008), ao relacionar outro bem estabelecido mecanismo regulatório por PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, o qual inibe a interação com actina por competição do mesmo sitio de ligação (Yonezawa et al. 1990). Observou-se em fibroblastos que a cofilina-1 mutante S3A – que não pode ser inativada pela fosforilação, mas pode ser inativada por protonação no resíduo de His133 e por isso tem forte ligação PtdIns (4,5) P<sub>2</sub> ao pH mais baixo de células em repouso – é incapaz de resgatar a resposta do fator de crescimento (*EGFR*) em fibroblastos com falta de efluxo de H<sup>+</sup> (Leyman et al. 2009). Outro mecanismo regulatório decorre da oxidação; além do efeito clássico de oxidação causado pela glutathiona (maior agente redutor intracelular), esta proteína, quando oxidada (GSSG), também oxida e dimeriza a cofilina-1, através de ligações dissulfeto intramoleculares, o que resulta na inativação da proteína em despolimerizar F-actina (Pfannstiel et al. 2001). Em linfócitos T, foi observado que a oxidação causada por granulócitos gera a ligação intramolecular entre as cisteínas C39–C80, sem eliminar a afinidade com a actina, mas ainda resultando em acúmulo de polímeros de actina, o que sugere um novo modelo de inibição da cofilina-1 por oxidação. Outros estudos foram realizados utilizando taurina cloramina (Tau-Cl), principal oxidante gerado por neutrófilos ativados (Peskin and Winterbourn 2001). A formação de ambas as ligações dissulfeto entre C39–C80 e C139–C147 em células de linfoma nas quais a cofilina-1 é um alvo para oxidação, impactou na inibição da ligação com a actina (Klamt et al. 2009).

## **1.2.4 Fisiologia**

### **1.2.4.1 Regulação da dinâmica da actina**

A maior função descrita para a cofilina-1 é notavelmente a regulação sobre a dinâmica da actina. O citoesqueleto se apresenta de forma dinâmica e adaptável, e a formação de microfilamentos de actina faz parte dessa composição em duas formas: como um monômero livre (actina-G) ou em forma de um polímero chamado actina-F. Para a cofilina-1, é descrita a propriedade incomum de ligar-se a ambas as formas de actina, ou seja, tanto ao filamento quanto à subunidade livre (Carrier, Ressad, and Pantaloni 1999). A cofilina-1 liga-se sobre o filamento de actina, forçando uma torção um pouco mais compacta e esse estresse mecânico enfraquece a ligação entre os monômeros de actina, tornando-o quebradiço e facilmente afetado por oscilações térmicas. Os filamentos de actina possuem duas extremidades com distintas taxas de crescimento, a extremidade menos ou “*Pointed end*” que possui uma taxa de crescimento lento, e a extremidade mais ou “*Barbed ends*” com alta taxa de polimerização. Chama-se processo *treadmilling* a contínua transferência de subunidades de actina da extremidade menos para a extremidades mais. A cofilina-1 controla esse processo através da ligação com os filamentos de actina contendo preferencialmente ADP-actina-F à ADP-Pi-actina-F ou ATP-actina-F, ou seja, na extremidade menos essa proteína se liga à lateral da ADP-actina-F e interage de forma cooperativa formando um aglomerado de ligação com o polímero de actina, que é saturado a razão molar de 1:1 (McGough et al. 1997).

Apesar da maior afinidade com a extremidade menos contendo filamentos mais velhos na célula (e assim contribuindo para a reciclagem dos monômeros de actina e conseqüentemente acelerando o seu *turnover* (Carrier et al. 1997)), recentemente observou-se que a cofilina-1 também pode acelerar a despolimerização na extremidade mais, quando não há monômeros ATP-G-actin disponíveis, sugerindo uma ação conjunta com a proteína de capeamento (Wioland et al. 2017). Quando em baixas concentrações, a cofilina-1 pode promover a despolimerização na extremidade menos, enquanto que em altas concentrações pode aumentar a formação de novos polímeros de actina por liberação de novos monômeros com a extremidade mais disponível para nucleação (Andrianantoandro and Pollard 2006; Bamburg and Bernstein 2010). Assim, a dinâmica da actina é importante no controle da morfologia, migração e divisão celular, além do transporte intracelular e desenvolvimento neuronal. E dessa forma a cofilina-

1 vem sendo estudada em diversos processos biológicos, sugerindo um papel mais amplo das suas funções regulatórias no contexto celular normal e alterado.

#### 1.2.4.2 Translocação nuclear

A actina possui fundamental regulação sob processos nucleares, como transcrição, reprogramação e ativação gênica (revisado por Miyamoto and Gurdon, 2013). Assim, para manter uma regulação entre os níveis de actina citoplasmática e nuclear, um importante mecanismo é regulado pela cofilina-1 e sua interação com o poro nuclear importina-9 (Dopie et al. 2012). A translocação para o núcleo somente acontece quando há fosforilação da Ser3, devido a NLS estar exposta nessa conformação. A cofilina-1 possui uma NLS bipartida, que permite sua eficiente translocação para o núcleo; já a actina não possui essa sequência, o que resulta em uma associação para o seu transporte mediado pela cofilina-1 (Munsie et al. 2012).

Em relação à interação nuclear da cofilina-1 com a RNA polimerase II, foi identificado um possível papel associado à maquinaria de transcrição aparentemente não vinculada a regiões promotoras ou não codificadas (Obrdlik and Percipalle 2011). Este estudo sugere que a cofilina-1 desempenha uma participação mais efetiva no meio intranuclear do que simplesmente carrear actina.

#### 1.2.4.3 Apoptose

Estudos por proteômica sobre etapas iniciais da apoptose identificaram a capacidade de a cofilina-1 desfosforilada – portanto no seu estado ativo – translocar-se para a mitocôndria durante a indução de morte celular por estaurosporina, o que foi demonstrado ser crucial para a liberação de citocromo c e por sua vez a ativação da caspase 9 em linhagem de neuroblastoma pela via intrínseca (Chua et al. 2003). A indução de apoptose pela via extrínseca por TGF- $\beta$  em linhagem de câncer de próstata também requer a translocação inicial da cofilina-1 para a mitocôndria (Zhu et al. 2006). Além disso, a abertura do poro de permeabilidade transitória e consequente liberação de citocromo c, foi associada à indução de apoptose por agentes oxidantes como a taurina cloramina (TnCl) tendo por alvo inicial a cofilina-1. Demonstrou-se que esse efeito é independente da ativação de Bax ou Bak, requer a oxidação dos quatro resíduos de cisteína e a desfosforilação da Ser3. Klamt e colaboradores demonstraram que a prevenção da oxidação unicamente da cofilina-1 pode inibir a morte celular, sugerindo o papel essencial da cofilina-1 na via apoptótica induzida por espécies reativas de oxigênio (Klamt et al. 2009).

A translocação da cofilina-1 para a mitocôndria também medeia a neurotoxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide em um processo que envolve a proteína de ligação Ran 9 (GTPase) (Woo et al. 2015). Embora todos esses eventos apontem para cofilina-1 em seu estado ativo, não há o carreamento de actina, no entanto a via da apoptose destacada por esses processos pode ser bloqueada pela mutação dos domínios ligantes da actina (Chua et al. 2003).

#### 1.2.4.4 Metabolismo lipídico

A forma inativa da cofilina-1 anteriormente considerada sem qualquer função biológica, tem também a sua interação descrita com a fosfolipase D1 (PLD1) (Han et al. 2007). As proteínas fosfolipase D compreendem uma família de enzimas que catalisam a conversão de fosfatidilcolina (PtdCho), um fosfolipídio encontrado em membranas biológicas, em ácido fosfatídico (PA), e assim disparam a sinalização *downstream* dessa via (revisado em Exton, 2002; Wang *et al.*, 2006). A atividade da PLD1 é regulada pela sinalização de Rho (Schmidt et al. 1999), que também controla a atividade de cinases LIMKs e subsequente fosforilação da cofilina. A interação da cofilina fosforilada no resíduo Ser3 com PLD1 é necessária para a translocação de PLD1 para a membrana plasmática e estimulação de sua atividade. Enquanto a atividade de PLD1 pode ser inibida pela cofilina-1 constitutivamente ativa (mutação Ser3 para Ala), por silenciamento da expressão de cofilina ou por superexpressão da fosfatase *slingshot*, a sua ativação pode ser reforçada pela superexpressão de cofilina-1. Esses dados sugerem que mesmo presumindo-se forma inativa em seu estado fosforilado, a cofilina-1 ainda é suscetível a desempenhar importantes funções biológicas (Han et al. 2007).

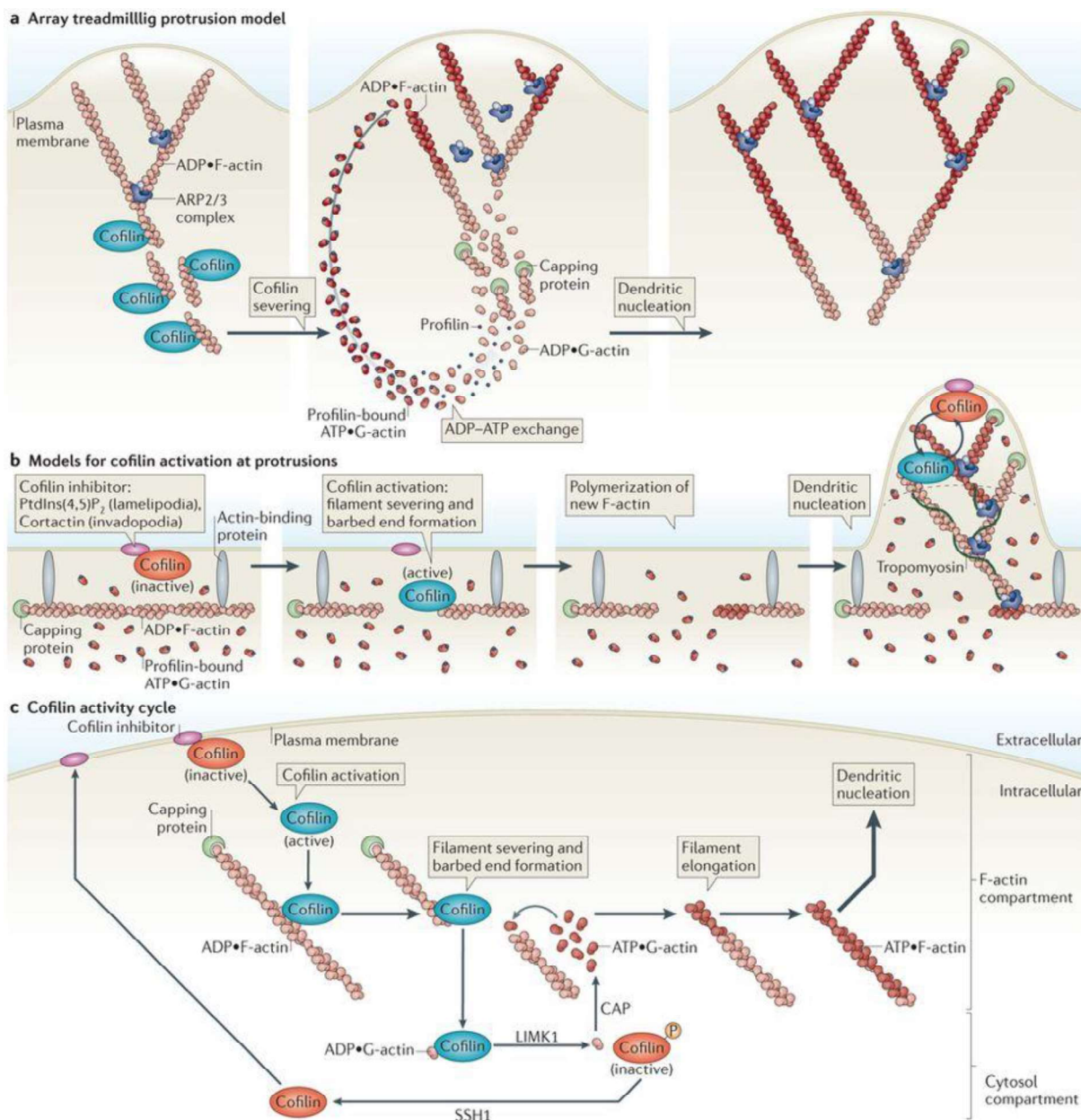
#### 1.2.4.5 Resposta ao estresse celular

Outro importante mecanismo desempenhado pela cofilina-1 se dá a partir do NES, que pode mediar seu transporte para fora do núcleo (Munsie et al. 2012). Sob condições de estresse, como choque térmico, estresse osmótico ou depleção dos níveis de ATP, a cofilina-1 transloca e se acumula no meio intranuclear, onde se liga excessivamente aos filamentos de actina resultando na formação de “*rods*” (complexos compostos primariamente por cofilina-actina). Embora essa formação já tenha sido demonstrada no citoplasma (Bamburg 1999), atualmente sabe-se que essa conformação cofilina-actina pode desempenhar um papel central nas etapas iniciais envolvidas em distúrbios neurodegenerativos, como os de Huntington e Alzheimer (Minamide et al. 2000). Foi proposto que a formação desses “*rods*”, sob condições de estresse

em que a cofilina-1 oxidada se liga excessivamente à actina, podem servir como um meio para a célula impedir a hidrólise excessiva de ATP associado ao *treadmilling* de actina, o que tornaria o ATP indisponível para outras respostas ao estresse celular (Bernstein et al. 2006). Dessa forma, esse processo representa um potencial alvo terapêutico para a prevenção de desordens neurodegenerativas (Bamburg and Bernstein 2010).

#### 1.2.4.6 Migração celular

O ciclo de motilidade celular consiste em uma dinâmica coordenada por ativação de moléculas estruturais e de sinalização, necessária em diversos processos biológicos como a embriogênese, reparos causados por injúria tecidual e regeneração. A migração celular é inicialmente mediada por moléculas de sinalização como as Rho GTPases Rac1 e RhoA, que por sua vez regulam a polimerização da actina e a atividade da miosina II e, portanto, a dinâmica de adesão (Parsons, Horwitz, and Schwartz 2010). A cofilina-1 exerce importante papel na locomoção celular em que a dinâmica da actina é a força propulsora para a formação da protusão. Sua função é exercida desde o início da polimerização assimétrica mediada pela formação de novas extremidades mais à despolimerização de antigos filamentos. Conforme revisado por Bravo-Cordero e colaboradores, foram propostos novos modelos para o entendimento da função da cofilina-1 sobre a regulação da dinâmica necessária ao deslocamento celular (figura 3).



**Figura 3 – Funções da cofilina-1 na locomoção e invasão celular.** A. modelo por protrusão *treadmilling*. A cofilina despolimeriza os filamentos de actina na base do lamelipódio, fornecendo assim monômeros de actina-G para a polimerização de actina em estado estacionário em condições de depleção de G-actina. A nucleação dendrítica é mediada pelo complexo ARP 2/3. B. Modelos para ativação de cofilina nas protrusões. A liberação de cofilina de seu inibidor (PtdIns (4,5) P<sub>2</sub> em lamelipódio ou cortactina em invadopódios) aumenta o rompimento dos filamentos de actina, gerando extremidades mais livres que definem os locais dendríticos para nucleação pelo complexo ARP 2 /3. Os monômeros de G-actina são fornecidos a partir de um abundante *pool* de actina-G resultante desse processo. A tropomiosina limita a ação da cofilina, uma vez que inibe a ligação da cofilina à actina-F, confinando a cofilina-1 à ponta das protuberâncias (linha preta pontilhada), onde a cofilina-1 continua seus ciclos de ativação e desativação devido ao ciclo de atividade local. C. Ciclo de atividade da cofilina-1. Após a sua desfosforilação ou liberação por reguladores de inibição, a cofilina-1 ativada despolimeriza a actina-F, gerando extremidades mais que são utilizadas para a polimerização de actina. A cinase LIM 1 e a proteína CAP aceleram a dissociação dos complexos ADP-actina-G-cofilina, aumentando a concentração dos monômeros de ATP-G-actina disponíveis para o alongamento do filamento nas extremidades mais recém-formadas. O tamponamento de novas extremidades mais pela proteína 1 interagindo com actina (AIP1) (não mostrada) promove a desmontagem de filamentos dependentes de cofilina. A LIMK1 fosforila a cofilina-1, levando à liberação da G-actina ligada. Após a ativação do SSH1, a cofilina é desfosforilada e reciclada para o compartimento inibitório.



Portanto, a cofilina-1 desempenha função central na modulação necessária para o deslocamento celular. Ademais, segundo dados anteriores (Bravo-Cordero et al. 2013; Ghosh et al. 2004), a inibição de sua atividade pode levar a defeitos na formação de protusões, alteração de polaridade celular, direcionalidade e quimiotaxia.

### **1.2.1 O PAPEL DA VIA DA COFILINA-1 EM TUMORES**

O aumento da mobilidade celular representa um mecanismo central utilizado para a invasão e metástase de células tumorais. Nesse cenário, a cofilina-1 vem sendo estudada devido a sua função regulatória sobre estruturas do citoesqueleto, decorrentes do remodelamento dos filamentos de actina, tais como filopódios, lamelipódios, invadopódios, fibras de estresse e redes corticais de actina. Embora os mecanismos moleculares relacionados à cofilina-1 e a agressividade tumoral não tenham sido completamente elucidados, alguns estudos já descreveram o aumento do imunocnteúdo da cofilina-1 em fenótipos malignos de diferentes tipos tumorais (Shishkin et al. 2017). Portanto, existem no mínimo três aspectos sobre a biologia tumoral em que a cofilina-1 e sua fosforegulação desempenham um papel significativo: no processo inicial de transformação celular (Pawlak and Helfman 2002), na divisão celular (Amano et al. 2002; Gunsalus et al. 1995), e migração celular aumentada durante a metástase (Ghosh et al. 2004; Wang, Eddy, and Condeelis 2007). Assim, a importância da cofilina-1 no contexto tumoral do processo migratório, além da relação na modulação de apoptose por agentes oxidantes, tem direcionado para essa proteína a classificação como biomarcador dos fenótipos mais agressivos (Müller et al. 2011; Wang et al. 2007).

O primeiro estudo que relata a cofilina-1 como alvo terapêutico em linhagem de câncer de mama descreveu a especificidade do uso do oligossacarídeo JG6 como inibidor dos sítios de ligação da cofilina-1 para a actina. A partir da análise dos implantes xenográficos foi relatada a prevenção de metástases, sem efeitos colaterais citotóxicos (Huang et al. 2014), sugerindo dessa forma a cofilina-1 como um possível alvo terapêutico a ser modulado em tipos tumorais menos responsivos.

Além disso, o maior imunocnteúdo de cofilina-1 tem sido associado a uma maior resistência à terapia; em linhagens de câncer de pulmão percebeu-se o desenvolvimento dessa correlação principalmente associado a agentes alquilantes. Diversos estudos, baseados em

dados de micro-arranjo, ensaios *in vitro* e coorte retrospectiva têm corroborado os dados sobre altos níveis de expressão da *CFL1* em tumores com comportamento mais agressivo (Becker et al. 2014; Castro et al. 2010). Quando foi avaliada a resposta à radioterapia em linhagem de astrocitoma, uma maior concentração de cofilina-1 também se relacionou ao fenótipo mais resistente e invasivo (Yan et al. 2012). Concatenando esses dados, há uma clara relação entre a cofilina-1 e o desenvolvimento tumoral, o que exige um melhor entendimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na quimiorresistência e da tradução desses dados laboratoriais para uso na clínica.

### 1.3 EDIÇÃO GÊNICA

A tecnologia de edição gênica tem por princípio de funcionamento o reconhecimento de sequências genômicas em sítios específicos e a utilização de endonucleases para modificação precisa de qualquer gene em células e organismos. Para tanto, são empregados sistemas de edição compostos por um domínio complementar a sequências específicas de DNA ligado a um domínio de clivagem de ácidos nucleicos. Os primeiros sistemas utilizados para edição gênica foram enzimas quiméricas como as nucleases dedo de zinco (ZFN, do inglês *zinc finger nuclease*) e as nucleases efetoras do tipo ativadoras de transcrição (TALEN, do inglês *transcription activator-like effector nuclease*). Ambas possuem o domínio proteico que se liga a sequências específicas de DNA fusionado à nuclease FokI, a qual cliva o DNA (Bibikova et al. 2002; Boch et al. 2009). Mas as dificuldades de design de proteínas, síntese, validação e alto custo permaneceram uma barreira para a adesão usual dessas nucleases em possíveis usos rotineiros.

#### 1.3.1 CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Crispr-Associated Protein 9*)

A mais recente e promissora ferramenta para edição gênica é o sistema CRISPR/Cas. Essa plataforma foi fundamentada no sistema adaptativo de defesa de procariotos, que utiliza sequências curtas de RNA para direcionar a degradação de ácidos nucleicos de patógenos invasores (Garneau et al. 2010; Guy et al. 2004). O locus genômico CRISPR/Cas em bactérias

é formado por um conjunto de genes que codificam as proteínas Cas, seguido por sequências repetidas (repetições) que separam sequências variáveis de genomas invasores inseridos no DNA bacteriano (protoespaçadores) (Mojica et al. 2005). Conforme pode ser visto na figura 3, nesse sistema, os genes Cas são traduzidos em proteínas, enquanto o arranjo com as repetições e os protoespaçadores são transcritos em um único RNA antes de ser processado em fragmentos curtos de RNAs CRISPR (crRNA). Cada crRNA hibridiza com um segundo RNA, chamado RNA CRISPR transativador (tracrRNA). Entretanto, para que o espaçador consiga se ligar à sua sequência complementar, ele deve estar adjacente a uma sequência curta, denominada Motivo Adjacente ao Protoespaçador (PAM, do inglês *protospacer adjacent motifs*) (Jinek et al. 2012).

Essa sequência é específica para cada microrganismo e no caso da endonuclease baseada no *S. pyogenes*, a sequência PAM 5' – NGG é necessária para que a Cas9 reconheça a região alvo à montante ao PAM, promovendo a precisão do sistema em executar a DBS no *locus* alvo. (Mali et al. 2013).

Doudna e Charpentier demonstraram pela primeira vez a aplicação *in vitro* do sistema CRISPR/Cas para a edição gênica, em que o crRNA e tracrRNA poderiam ser fusionados em uma quimera, o *single guide* RNA. Ademais, também descreveram sobre a modulação do sistema para novos sítios alvo no DNA, modificando apenas uma pequena sequência de 20 nucleotídeos referente ao gRNA. Nesse caso, o gRNA pode ser dividido entre a sequência que reconhece e hibridiza com o DNA alvo e a sequência universal (RNA *scaffold*) fixada à endonuclease. Posteriormente, diversos autores corroboraram o uso do Sistema CRISPR/Cas para edição em células de mamíferos, e dos três tipos descritos para esse sistema, o mais utilizado atualmente é baseado na endonuclease obtida do *Streptococcus pyogenes*. (Jinek et al. 2012; Ran et al. 2013)

O primeiro passo essencial para a realização de edição gênica é a precisão de uma quebra na fita dupla de DNA (DBS, do inglês *Double Strand Breack*) no *locus* genômico a ser modificado. Essa DBS induzida pela endonuclease pode ser reparada por dois principais tipos de mecanismos de reparo: a via dirigida por recombinação homóloga (HDR, do inglês *homologous directed repair*) ou pela união de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) (Takata et al. 1998). A via NHEJ está ativada durante todos os estágios do ciclo celular, e seu funcionamento em reparar DBS é propenso a *indels* aleatórios que podem ocorrer no local da quebra a ser reparada. A restauração dessa DBS se inicia através do reconhecimento das extremidades livres da fita pelo dímero de proteínas Ku70 E Ku80, que

servem como ponto de ancoragem a proteínas como a DNA polimerase e a DNA ligase IV. A utilização dessa via tem sido utilizada para causar *knockout* em genes alvos em diversos tipos celulares e em diferentes organismos (Shalem et al. 2014).

Quando o dano ao DNA ocorre em uma região codificante, os resultados desses *indels* podem promover mutações de alteração de quadro de leitura (*frameshift*), o que pode impactar na tradução da proteína por alteração de conformação, perda de função parcial ou total, assim como na formação de mutação *nonsense* com um códon de parada prematuro (Ran et al. 2013). De modo alternativo, o reparo por HDR resulta em desde uma simples substituição de nucleotídeo até a inserção de regiões inteiras codificantes ou não. Esse sistema necessita de um molde, conhecido como oligo doador, referente à região a ser editada, contendo sequências complementares homólogas ao DNA alvo, em ambas as suas extremidades. Esse processo ocorre de maneira natural em eucariotos e a cromátide irmã é preferencialmente utilizada como fita molde nessa via de reparo. Logo, o uso do reparo HDR permite correções específicas, inserções de repórteres fluorescentes ou até mesmo superexpressão de genes de interesse de maneira sítio específica (Zhang et al. 2017).

A identificação da tecnologia CRISPR/Cas9 ressalta a maneira pela qual muitas descobertas que têm biologia molecular avançada e medicina surgiram, através da pesquisa básica sobre os mecanismos naturais de replicação do DNA, reparo, e defesa contra vírus. Em muitos casos, metodologias-chave emergiram do estudo de bactérias. A tecnologia CRISPR/Cas9 foi pensada através de um processo semelhante: uma vez que o mecanismo subjacente como funciona o sistema CRISPR/Cas9 foi entendido, este pôde ser aproveitado para aplicações em biologia molecular e genética que não foram previstos anteriormente (Charpentier and Doudna 2013). Em suma, essa tecnologia tem impulsionado aplicações inovadoras em pesquisa básica, biotecnologia e medicina. No presente estudo, esta ferramenta foi aplicada para desenvolver um modelo único em adenocarcinoma pulmonar, o *knockout* para a proteína cofilina-1, que poderá auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na agressividade tumoral.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecimento de uma linhagem de adenocarcinoma pulmonar humana *knockout* estável para o gene *CFLI* pelo método de CRISPR/Cas9.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a edição da *CFLI* humana e avaliar a eficiência para o *knockout* por três diferentes gRNA, utilizando a linhagem de adenocarcinoma A549.
- Confirmar a edição e silenciamento do gene por *Western blotting* e espectrometria de massas.
- Obter o isolamento e expansão monoclonal a partir de célula única editada via CRISPR/Cas9.
- Caracterizar por parâmetros morfométricos celular e nuclear a linhagem estabelecida.
- Avaliar o perfil de migração por microscopia *time-lapse*.

## PARTE II

# CAPÍTULO I

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 CULTIVO CELULAR E REAGENTES

A linhagem de adenocarcinoma pulmonar humano A549 (CLL-185), foi obtida da *American Tissue Culture Collection* (ATCC™, Rockville, MD). As células foram cultivadas em crescimento exponencial em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®), penicilina (100 IU/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (0,25µg/mL) (Sigma Aldrich™), e mantidas em atmosfera umidificada à 37°C contendo 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2 OBTENÇÃO DA LINHAGEM *KNOCKOUT*

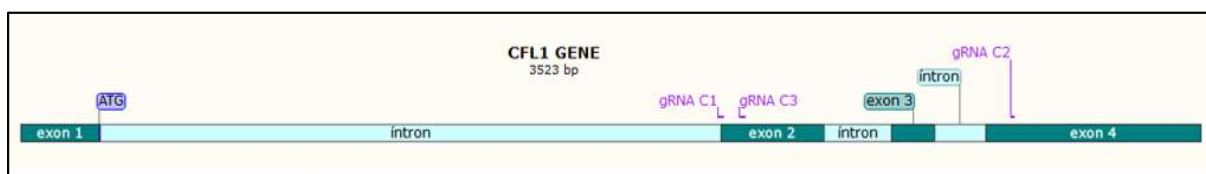
O delineamento experimental seguiu conforme o *pipeline* para a construção do vetor ao estabelecimento do modelo:



Figura 4. Pipeline. Representação das etapas necessárias para obtenção da linhagem *knockout*.

### 3.2.1 Identificação da sequência

O gene *CFL1*, que codifica a proteína cofilina-1, isoforma não muscular (NCBI Gene ID: 1072) foi utilizado para gerar três sequências de 20 nucleotídeos a montante à sequência PAM 5'-NGG-3', a qual confere alta especificidade a esses *guides RNAs* (gRNAs). O desenho dos gRNAs foi feito através do software online <http://zifit.partners.org/ZiFiT/>, bem como a análise de potencial *off-target* foi considerado para determinar quais gRNAs seriam escolhidos.



**Figura 5 - Seleção dos gRNA.** Representação da *CFL1*, indicando localização de exons (verde escuro) e códon iniciador.

Sequências *overhangs* (5'-CACC-3' e 5'-AAAC-3') foram adicionadas aos *guides*, para inserção no sítio BbsI do vetor pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458, Addgene, #48138), conforme tabela 1. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies). Os constructos tiveram por alvo os exons 2 e 3 do gene da *CFL1* (figura 5).

**Tabela 1.** Sequências selecionadas para os gRNAs.

IDENTIFICAÇÃO	SEQUÊNCIA (5'--- 3')
gRNA C1 <i>foward</i>	CACCGGTCTCCTAGGCCTCCGGTG
gRNA C1 <i>reverse</i>	AAACCACCGGAGGCCTAGGAGACC
gRNA C2 <i>foward</i>	CACCGGGCAGTGCCGTCATCTCCC
gRNA C2 <i>reverse</i>	AAACGGGAGATGACGGCACTGCCC
gRNA C3 <i>foward</i>	CACCGCGTAAGTCTTCAACGCCAG
gRNA C3 <i>reverse</i>	AAACCTGGCGTTGAAGACTTACGC

### 3.2.2 Preparação do vetor CRISPR/Cas9

O vetor pX458 foi previamente linearizado pela enzima de restrição BbsI (New England BioLabs™) de acordo com instruções do fabricante. O produto dessa reação de digestão foi



submetido à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X. Em seguida, o fragmento referente ao vetor linear foi extraído do gel e purificado com o QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen).

### 3.2.3 Anelamento dos oligonucleotídeos

Para a reação de anelamento das sequências gRNAs, cada oligonucleotídeo liofilizado foi diluído com H<sub>2</sub>O Milli-Q®, para a concentração de 100 µM. Em um tubo de 1,5 mL, foram adicionados 10 µL de cada sequência complementar além de 80 µL de água Milli-Q®, para cada gRNA. Em um termobloco, as reações foram incubadas à 95°C por 5 minutos, e resfriadas em temperatura ambiente por 3 horas.

### 3.2.4 Ligação do gRNA anelado ao vetor

Foi utilizada a razão molar de 1:3 (vetor:inserto) para a ligação de cada sequência gRNA ao vetor, mais 0,3 µL da enzima T4 DNA ligase 5 U/L (Thermo Fisher Scientific), e 2 µL do tampão de ligação 10x, cada reação foi completada para o volume final de 20 µL com água Milli-Q®. Após a homogeneização, as reações foram incubadas à 16°C por 30 minutos. Dessa forma, os gRNAs foram inseridos nos vetores estabelecendo os três plasmídeos: pX458\_C1, pX458\_C2 e pX458\_C3 (figura 5).

### 3.2.5 Transformação química

Utilizando cerca de 5 µL da reação de ligação (gRNA + vetor) anterior, além de um controle com o vetor linear, cada plasmídeo foi introduzido em bactérias competentes *E. coli* TOP10 separadamente, através da técnica de transformação por choque térmico. Inicialmente, em tubo de 1,5 mL contendo 100 µL de *E. coli* TOP10 foram pipetados 5 µL do vetor ligado. A reação de transformação foi incubada por 1 hora no gelo, seguida do choque térmico: incubação à 42°C por um minuto e meio, mais um minuto no gelo. Logo após, para estabilizar as células bacterianas, foram pipetados 500 µL de meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite Repression*) e mantidas em agitação (140 rpm) por 2 horas à 37°C. Ao final, foram centrifugadas à 300g/ 3 minutos, para reduzir à 2/3 do volume após descarte do sobrenadante, os produtos foram plaqueados em meio ágar Luria Bertani (LB) contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubados por 16 horas a 37°C. Devido ao vetor pX458 conter o gene para a resistência a ampicilina, proliferaram apenas colônias resistentes. Para o controle dessa reação, também foi plaqueado o vetor linearizado, no qual não houve crescimento bacteriano.

### 3.2.6 PCR de colônias

Após a seleção de colônias isoladas, seguiu-se a triagem de colônias com inserção da sequência gRNA no vetor pX458, por reação em cadeia da Polimerase (PCR). Utilizando como *primers* a sequência *foward* de cada gRNA e o *primer reverse* referente ao vetor, foram selecionadas 8 colônias de cada grupo (pX458\_C1, pX458\_C2 e pX458\_C3).

**Tabela 2.** Mix para cada reação.

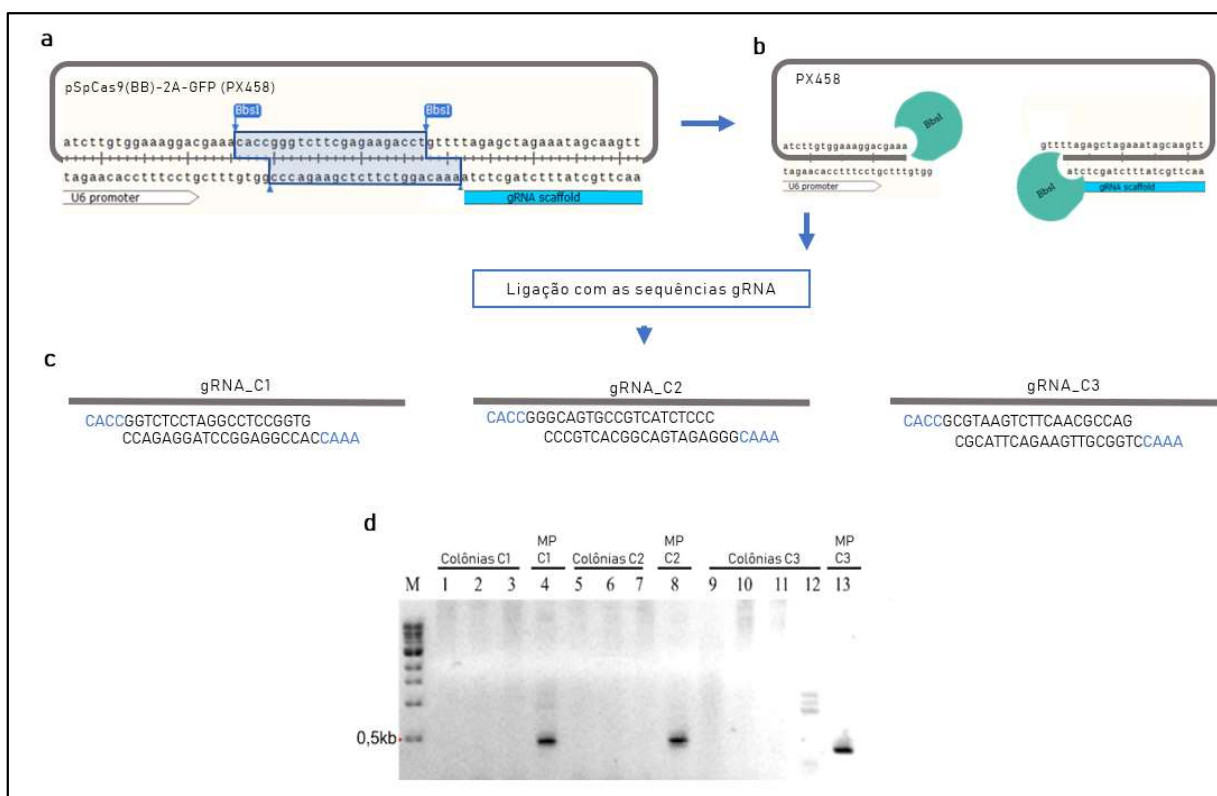
Componente	Volume (µL)
Platinum <sup>®</sup> Multiplex PCR Master Mix, 2×	12,5
<i>Primer foward</i>	0,8
<i>Primer reverse</i>	0,8
água Milli-Q <sup>®</sup>	10,9

As colônias isoladas foram coletadas utilizando microponteiros, e replaqueadas em nova placa com quadrantes identificados para cada amostra, em seguida eram submersas nos microtubos contendo o mix para o PCR.

**Tabela 3.** Condições de ciclagem para amplificação

Número de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
1	95°C, 5 min		
2 - 36	95°C, 35 s	60°C, 35 s	72°C, 45 s
37			72°C, 5 min

Os produtos do PCR, foram em seguida visualizados no gel de agarose (1,5%) corados com tampão de corrida *gel red*. Mas devido às bandas dessas reações terem apresentado baixa intensidade (figura 6), foram feitos inóculos dessas colônias em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL), para que após a purificação plasmidial com o *kit PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega), fosse novamente feita a triagem por PCR.

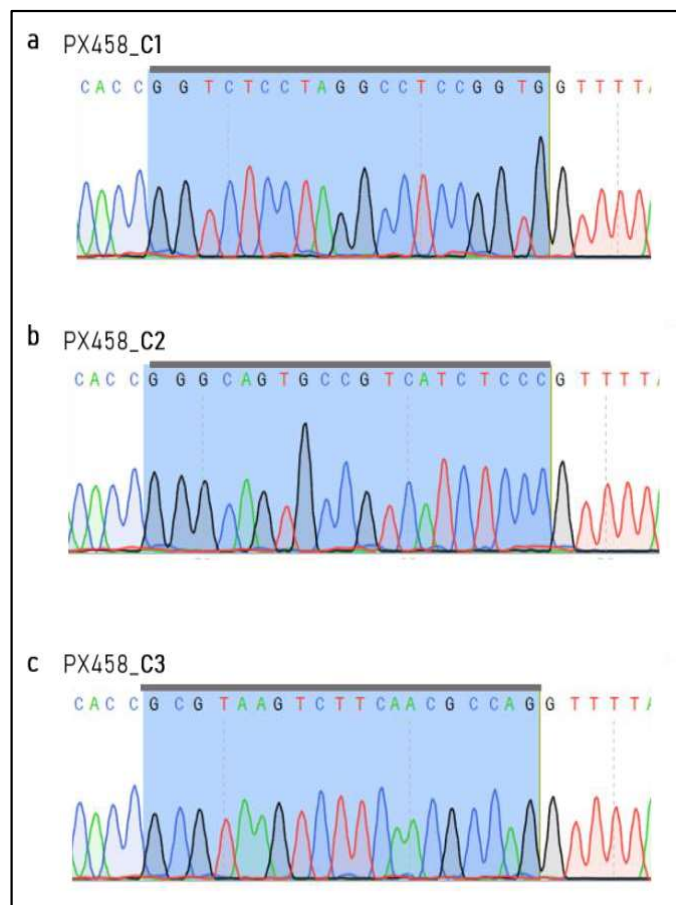


**Figura 6 - Construção e triagem dos vetores.** **a)** O vetor px458 foi desenhado com sítio para digestão enzimática e inserção de gRNA para o gene de interesse. **b)** O vetor foi clivado pela enzima de restrição BbsI e **c)** ligada as sequências gRNA de 24nt com extremidades coesivas a clivagem pela BbsI, **d)** Representação do resultado de *screening* por PCR. M: marcador de peso molecular 1kb. 1: controle negativo, 2-3: colônias do vetor gRNA C1, MP C1: *miniprep* do vetor gRNA C1. 5: controle negativo, 6-7: colônias do vetor gRNA C2, MP C2: *miniprep* do vetor gRNA C2. 9: controle negativo, 10-12: colônias do vetor gRNA C3 e MP C3: *miniprep* do vetor gRNA C3.

### 3.2.7 Purificação dos vetores

Após a confirmação dos vetores com a inserção dos *guides*, uma colônia para cada vetor foi inoculada em 350 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL), as amostras foram incubadas *overnight* em agitação (100 rpm) à 37°C. Para a extração do DNA plasmidial, cada amostra foi concentrada em tubos Falcons® de 50 mL por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos, até que o volume inicial de 350 mL de meio fosse concentrado em um lisado de células. A próxima etapa foi realizada com o kit de purificação *PureLink HiPure Plasmid Maxiprep* (Thermo Fisher Scientific), seguindo instruções do fabricante. A qualidade foi avaliada pela razão A260/A280 da absorvância de ácidos nucleicos em espectrofotômetro Nanodrop, e a integridade do vetor por eletroforese em gel de agarose. Após a quantificação, cada vetor foi encaminhado para o sequenciamento por método *SANGER*, utilizando o *primer*

LKO.1 (promotor U6) 5' – GACTATCATATGCTTACCGT – 3' para confirmação do inserto nos vetores purificados (figura 7).

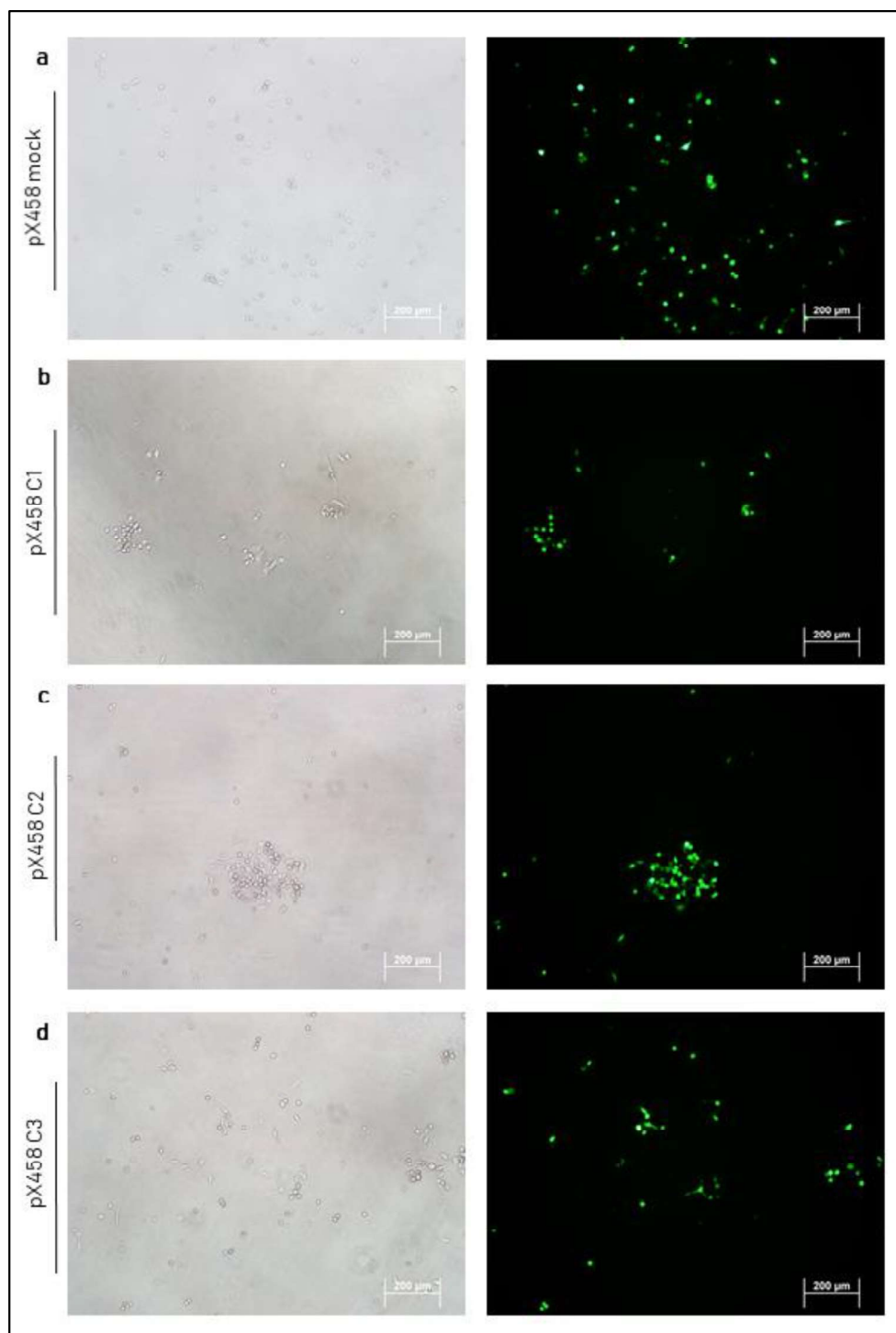


**Figura 7 - Eletroferograma dos vetores.** Após a purificação dos vetores em maxi-preparação, foram feitos os sequenciamentos com o primer LKO.1 U6. a) vetor anelado à sequência gRNA C1, b) vetor anelado à sequência gRNA C2 e c) vetor anelado à sequência gRNA C3.

### 3.2.8 Transfecção de células

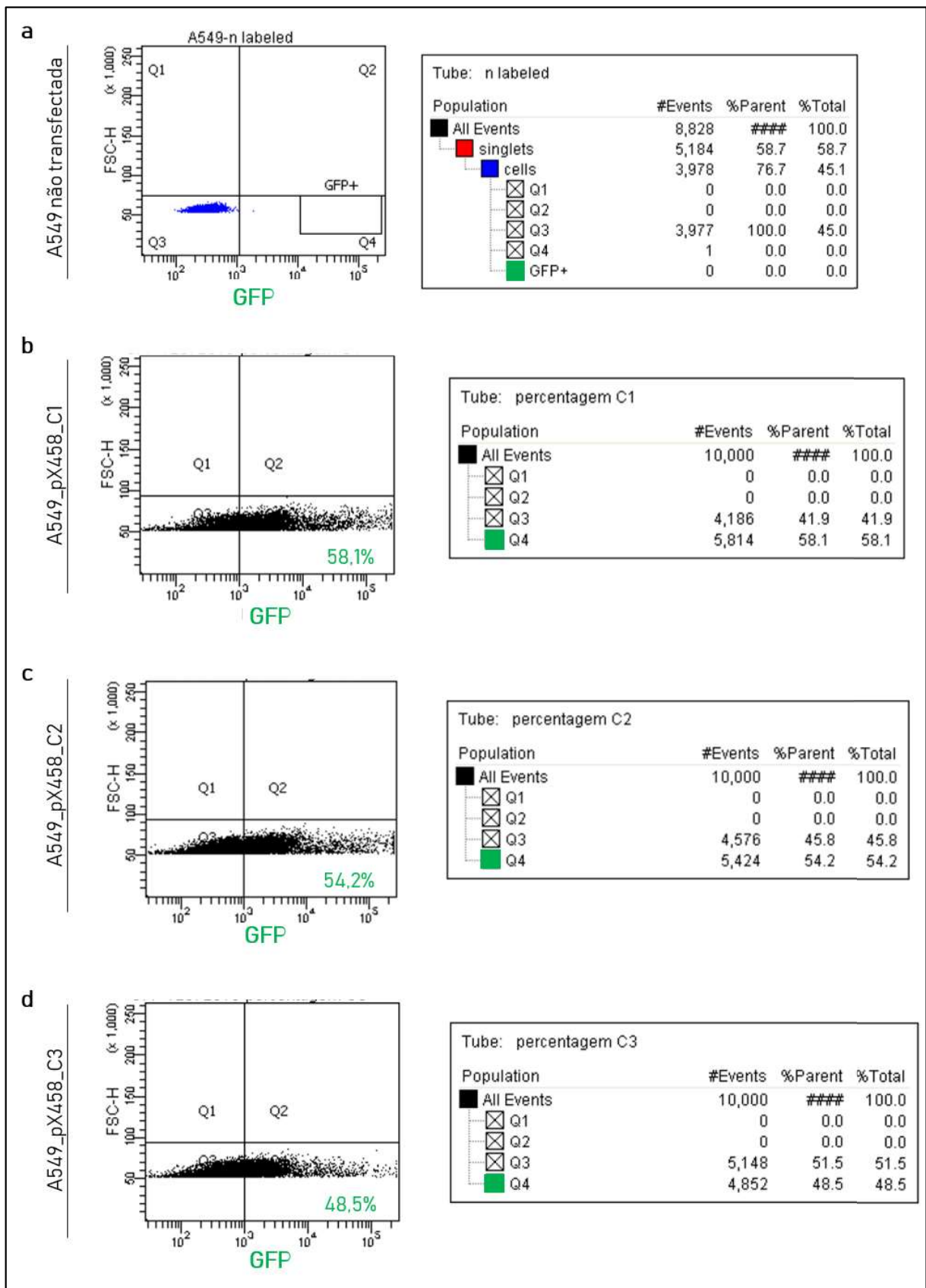
Para a introdução do vetor pX458 na linhagem A549, foi empregado o método de eletroporação, por meio do *Neon<sup>®</sup> Transfection System* (Thermo Fisher Scientific). Primeiramente foram estabelecidas as condições ideais dos seguintes parâmetros para a melhor relação viabilidade/eficiência de transfecção: densidade de células, concentração de DNA plasmidial, voltagem, tempo, e quantidade de pulsos. Dois dias antes, as células foram tripsinizadas, determinada a densidade e replaqueadas, para no dia da transfecção estarem em no máximo 75% de confluência. Para a tripsinização foi utilizado Tripsina-EDTA (0,25%) (Gibco<sup>®</sup>). Após a dissociação, as células foram centrifugadas à 400g/ 3 min, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 1mL com DPBS 1x (Gibco<sup>®</sup>). A contagem era realizada para a densidade final de  $1 \times 10^5$  células por tubos de 1,5 mL, os quais eram novamente

centrifugados, para a ressuspensão com o Buffer R (Neon™ Transfection System), solução indicada para a eletroporação de células aderentes, e o vetor na concentração de 2 µg de DNA. A eletroporação foi feita em duplicata com cada um dos vetores estabelecidos (pX458\_C1, pX458\_C2 e pX458\_C3), além de um controle com vetor *mock* (pX458, sem gRNA), gerando 4 grupos de células para avaliação de edição. Logo após a transfecção, as células foram incubadas por 24 horas em meio de cultura sem antibiótico, seguido da avaliação de eficiência e viabilidade que foi realizada por visualização em microscopia de fluorescência (figura 8) (Eclipse Ti-S®, Nikon).



**Figura 8 - Microscopia de fluorescência.** Aproximadamente 24 após a transfecção, as células foram expostas a visualização em microscópio invertido de fluorescência (Eclipse Ti-S®, Nikon) para avaliação da transfecção.

Foi utilizado o citômetro FACSaria III para a mensuração da expressão de *GFP* (a mensuração da expressão de *GFP* (do inglês, *Green Fluorescent Protein*), 72 horas após a transfecção, conforme figura 9. A exclusão da autofluorescência foi estabelecida com o ajuste dos parâmetros utilizando as células A549 não transfectadas, no quadrante “Q4” é indicada a quantificação das porcentagens de expressão da proteína verde:



**Figura 9 - Avaliação da expressão de GFP.** Em (a) o vetor pX458 apresentou a melhor razão da expressão em 58%, seguida do vetor pX458 C2 com 54% (b) e o vetor pX458 C3 (c) que mesmo com a mais baixa expressão ainda apresentava quase 50% de células transfectadas viáveis.

### 3.2.9 Avaliação da edição gênica

Para a avaliação da precisão do sistema em editar o gene alvo, foram desenhados *primers* de acordo com a sequência depositada no GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta *Primer Designing Tools* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A amplificação para cada região alvo da CRISPR/Cas9 deve considerar o ensaio da endonuclease T7, que irá clivar *heteroduplexes* formados na região editada após anelamento da fita de DNA *wild type* com a mutada. Portanto, a partir da clivagem nesse ensaio (T7EI), o *amplicon* deve separar, quando submetido a eletroforese, em bandas de tamanhos diferentes e dessa forma indicar a atividade do sistema CRISPR/Cas9. Assim, foram desenhados *primers* flanqueado as regiões editadas, em que o produto de PCR amplificaria uma região a montante da clivagem pela Cas9, com diferença na quantidade de nucleotídeos a jusante.

**Tabela 4. Primers para triagem de mutação**

Identificação	Sequência (5'--- 3')
Dig_C1C3_F	AGTCAGTAGCCGGTGGATCT
Dig_C1C3_R	AATGCTGGCCCTTACCTGTC
Dig_C2_F	CTGAGTGCCCTTCTGCTCTG
Dig_C2_R	TGCTTCCATGAGTAGCCGTG

As células A549 foram transfectadas separadamente com cada vetor e mantidas em cultura por 72 horas. O DNA genômico de cada grupo de células diferenciadas por C1, C2, C3 e *mock/wild type* (WT), foi extraído com *PureLink® Genomic DNA* (Invitrogen®). Para amplificar as regiões alvo de cada gRNA foram otimizadas as seguintes condições para cada reação, (com os *primers* diluídos para 100 µM): Platinum® Multiplex PCR Master Mix, 2X - 25 µL, *primer forward* - 0,8 µL, *primer reverse* - 0,8 µL, DNA - 65 ng, água Milli-Q® - Completar para volume final de 50 µL e a ciclagem de temperatura seguiu conforme especificado na tabela 5.

**Tabela 5. Condições otimizadas para amplificação dos sítios alvos da *CFL1***

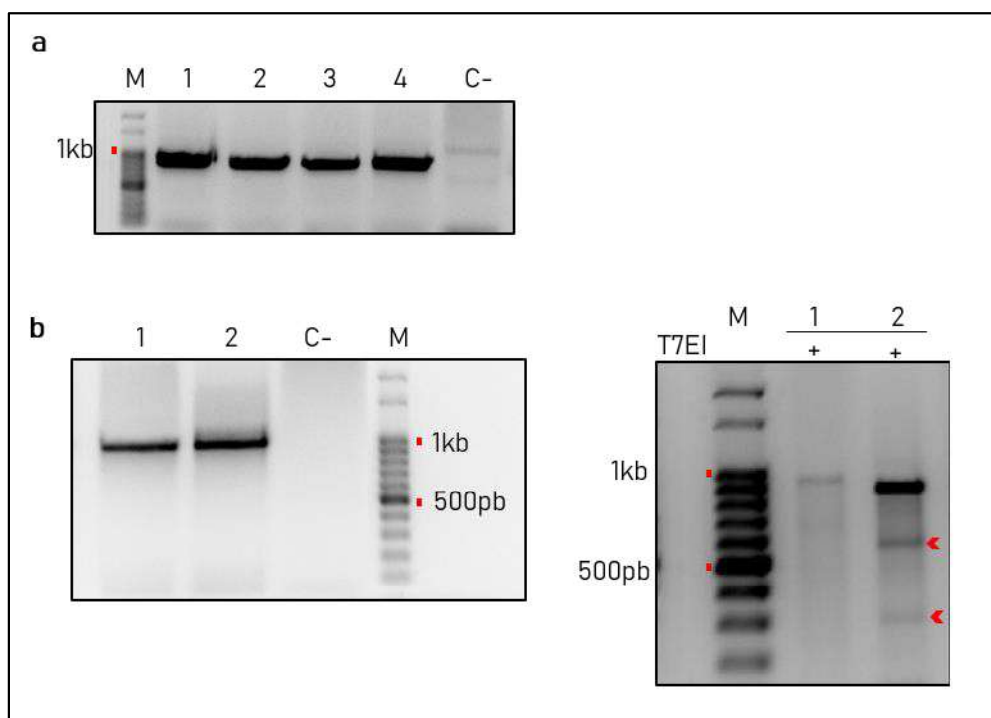
Número de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
1	95°C, 5 min		
2 - 36	95°C, 35 s	61°C, 35 s	72°C, 45 s
37			72°C, 5 min



Os produtos de PCR, foram em seguida visualizados no gel de agarose (1,5%) corados com *BlueJuice Gel Loading Buffer* (Invitrogen®), as bandas foram recortadas e purificadas do gel seguindo o protocolo do kit *PCR Purification* (Qiagen®). Após a quantificação, foram pipetados em microtubos de 0,2 mL, 200 ng de DNA de cada reação, 1,9 µL de Buffer 2 (New England Biolabs) e o volume final foi completado com água Milli-Q® para 19 µL. As amostras foram homogeneizadas e submetidas a etapa de desnaturação e hibridização lenta:

Temperatura	Tempo	Rampa de decaimento
95°C	10 min	5°C/seg
85°C	5 seg	2°C/seg
25°C	5 seg	0.1°C/seg
4°C	manter	5°C/seg

Na etapa seguinte, são adicionados 10 U de T7EI (NEB #M0302S) por reação e incubados à 37°C por 15 minutos, logo após a incubação a ação da enzima é inibida por adição de 0,25 M EDTA. Os produtos das reações foram corados com *BlueJuice Gel Loading Buffer*



**Figura 10 - Avaliação da edição por ensaio com T7EI.** (a) Amplificação das regiões alvo, M: marcador de peso molecular, 1: *mock*, 2: C1, 3: C2, 4: C3 e C-: controle negativo da reação. (b) Gel à esquerda, representativo da amplificação do clone editado, gel à direita, resultado do ensaio para detecção de *indels*, 1: A549 WT e A549 editada. Setas vermelhas indicam os fragmentos do produto de PCR, correspondentes a clivagem da T7EI.

(Invitrogen<sup>®</sup>), separados em gel de agarose 2%, e expostos a luz UV em um transiluminador para visualização das bandas (figura 10).

### 3.2.10 Separação em linhagens monoclonais

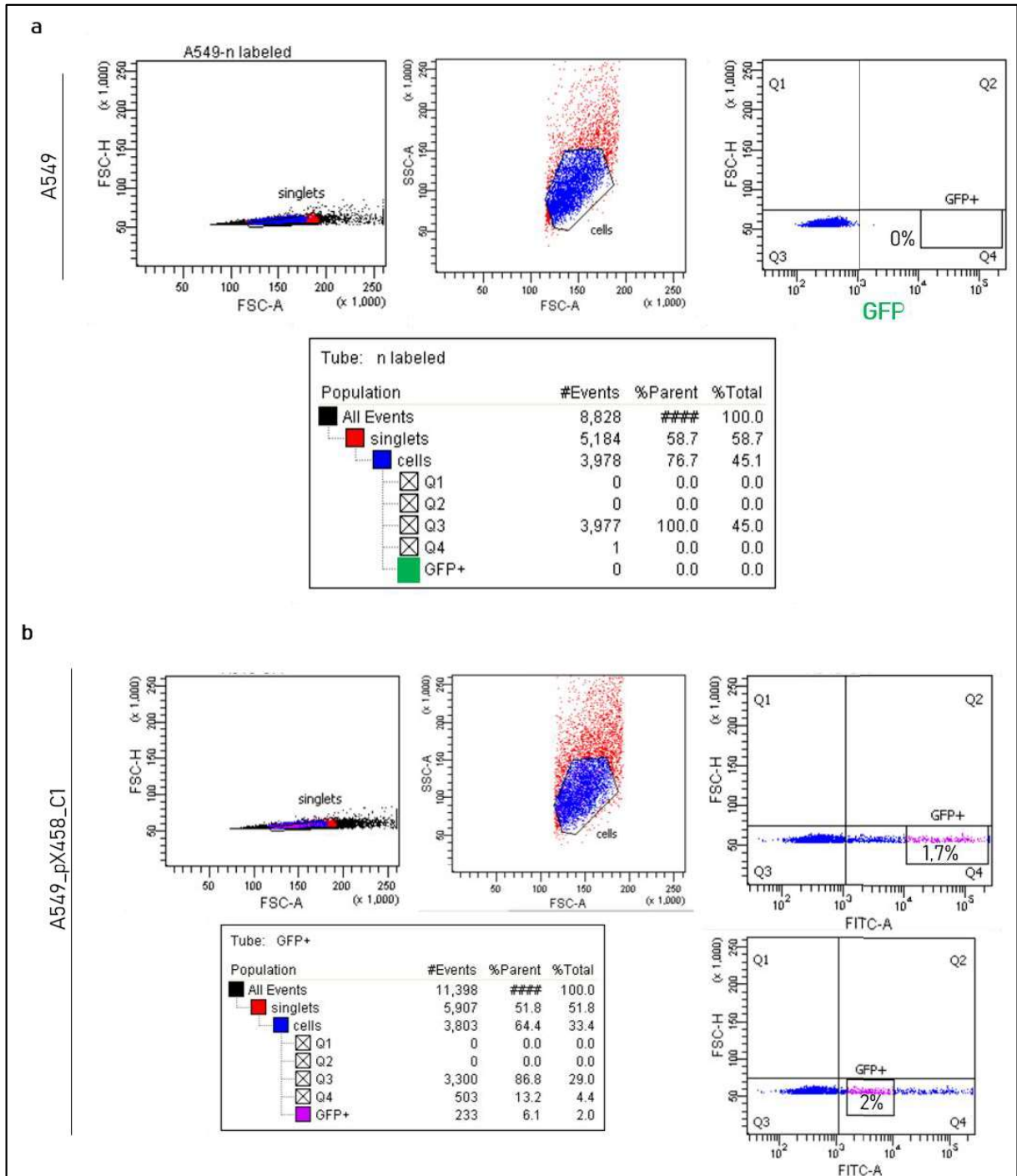
Após a transfecção e incubação por 48 ou 72 horas, os grupos A549 C1, A549 C2 e A549 C3, foram submetidas a separação para expansão de células únicas a fim de maximizar a identificação da mutação e proliferação a partir de um único clone, estabelecendo a linhagem editada. Assim, foram desenhadas três estratégias para separação celular: (i) por diluição limitante; (ii) ensaio clonogênico; e (iii) citometria de fluxo (FACS, *Fluorescence-activated cell sorting*).

Dessa forma, 48 horas após a transfecção, as células foram dissociadas e contadas para diluição limitante e ensaio clonogênico. Para a diluição limitante foram utilizadas placas de 96 poços, a fim de obter uma célula a cada dois poços, 200 µL da solução 1 (12 mL de meio de cultura contendo 60 células), são pipetados em triplicata (3 x 96) para cada vetor.

O isolamento por ensaio clonogênico consistiu no plaqueamento de  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$  e  $2,5 \times 10^3$  células em placas de 100 mm<sup>2</sup>, para cada grupo. Após a adesão das células, a posição de células fluorescentes foram marcadas e acompanhadas até a formação de colônias. Então, em condição estéril, essas colônias foram coletadas e repicadas para expansão inicialmente em placas de 96 poços, seguindo em placas de 24 poços, até atingirem confluência de 80%, e assim foram extraídos DNA para ensaio da T7EI.

A separação em célula única por citômetro FACS, foi realizada no Laboratório de Imunogenética da UFRGS, utilizando o BD FACSAria III. Foram transfectadas  $5 \times 10^{10}$  células em triplicata para cada vetor e incubadas em placas de 60 mm<sup>2</sup>, com meio sem antibiótico nas primeiras 24 horas. Passadas 72 horas, as células foram dissociadas com tripsina-EDTA 0,25% e ressuspensas em meio para sorteamento (PBS 1X, 2 mM de EDTA e 2% de SFB). Com células A549 não transfectadas, foram feitos os ajustes dos *gates* referentes a *Forward vs Side Scatter* (FSc vs SSc), para tamanho e complexidade, FSc *width* vs FSc *height*, para selecionar apenas células separadas, e por fim FSc vs. FITC-A (488) para selecionar intensidade de fluorescência e excluir autofluorescência (figura 11) (Lonowski et al. 2017). Após essas configurações estabelecidas, foram realizados os *sortings* de células únicas em placas de 96 poços, previamente preparadas com 100 µL de meio RPMI 1640 (Gibco<sup>®</sup>), suplementado com 40% de soro fetal bovino (Gibco<sup>®</sup>), penicilina (100 IU/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (0,25 µg/mL) (Sigma<sup>®</sup>). Para esse experimento foram preparadas 3 placas para

cada grupo: pX458\_C1, pX458\_C2 e pX458\_C3. As células são mantidas em cultura para expansão por 2-3 semanas; 100  $\mu$ L de meio de cultura foram adicionados 5 dias após o *sorting*, e posteriormente a cada 5 dias, 100  $\mu$ L de meio cultura foram trocados. Uma semana após *sorting*, as placas foram avaliadas quanto ao indicativo de proliferação celular a partir de um único clone. As células que apresentavam alterações morfológicas e tempo de duplicação diferente da A549 WT foram sendo selecionadas para expansão para extração de DNA, e confirmação da edição do gene *CFL1*.

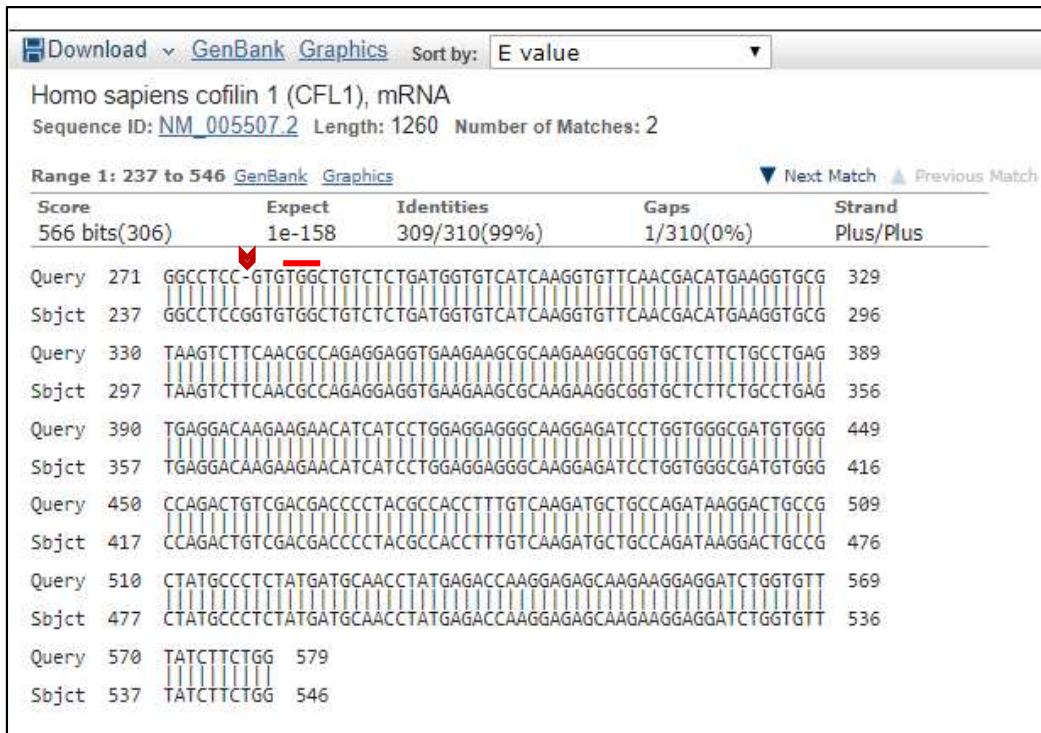


**Figura 11 - Gates representativos do *single cell sorting*.** O ajuste dos parâmetros (a) com as células A549 *wild type* (WT), foi realizado para se seguir ao sorteamento das células transfectadas (b) O quadrante “GFP+” foi ajustado para selecionar dois padrões de expressão, a exemplo do grupo C1, a expressão maior que  $10^4$  selecionava 1,7% do fluxo e na expressão menor que  $10^4$ , selecionou 2%, e foram desses dois quadrantes que foram selecionadas as células únicas para o plaqueamento.

### 3.2.11 Identificação de edição por sequenciamento

Para a confirmação da edição no *locus* exato em que foram planejados para a edição com o sistema CRISPR/Cas9, foram desenhados primer para amplificar as três regiões alvo da *CFL1*. Foram amplificadas as regiões do gene alvo para edição, otimizado-se o *PCR* (conforme descrição no item 3.2.9) e a purificação dos *amplicons*, conforme protocolo do PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen®). O sequenciamento das amostras foi realizado na Unidade de Pesquisa laboratorial (Centro de Pesquisa Experimental, HCPA) utilizando o equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems™). Os produtos de *PCR* foram marcados utilizando-se 5 pmol de cada *primer forward* e 1 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems™) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1 min seguida de 35 ciclos de 96°C por 15 seg, 50°C por 15 seg e 60°C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com *Big Dye XTerminator Purification Kit* (Applied Biosystems™) e eletroinjetadas no analisador genético.

A partir dos resultados do método SANGER, foram primeiro analisados os eletroferogramas para conferência de qualidade das identificações e as sequências em formato *fasta* foram comparados com o banco de dados GenBank usando a ferramenta *BLAST at NCBI* com o *blastn*. Assim, os dados foram avaliados a partir de uma tabela gerada para cada resultado (figura 12), em que lista todos os segmentos de DNA sobrepostos, qualidade dos eventos obtidos para cada um e os classifica por menor *e-value*, maior % de identidade, maior % de positividade, maior tamanho do evento e maior *bit score*.



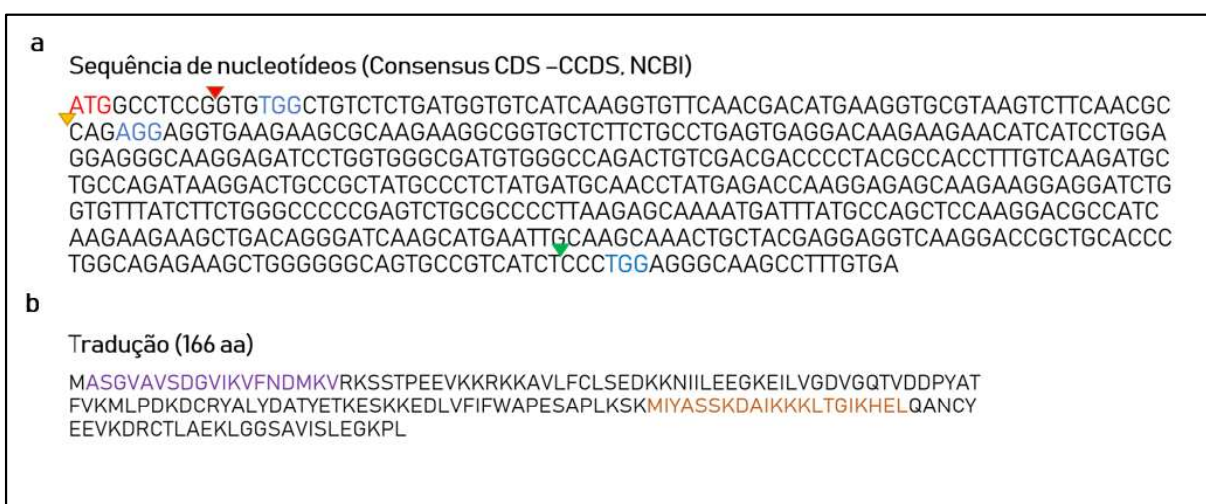
**Figura 12 - Alinhamento com a ferramenta *Blastn*.** Com o resultado do sequenciamento, foi identificada o clone com edição *indel*, que ocorreu exatamente no local (apontada pela seta vermelha) em que a endonuclease Cas9 cliva a dupla fita de DNA (DSB), ~3 nt à montante da sequência PAM (indicada com uma barra vermelha) demonstrando a especificidade do sistema CRISPR/Cas9.

### 3.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E ELETROFORESE

A linhagem A549 WT e os clones isolados foram expandidos em garrafas de cultura (75 cm<sup>2</sup>) para extração de proteínas e posterior análise por *Western blotting* para avaliação do imunocontéudo de cofilina-1. As células foram lavadas com PBS 1X e lisadas por incubação por 5 minutos a 4°C com tampão de extração RIPA e coquetel inibidor de protease (Thermo #78410). O lisado celular foi raspado e coletado em tubos de 2 mL para centrifugação à 14,000g/10 min para separação do *debris*, o sobrenadante foi coletado em novo tubo e alíquota em tubo de 0,6 mL para quantificação através do método de Bradford (Bradford 1976). Para a corrida eletroforética, foi adicionado nas amostras o tampão de corrida *NuPage* na proporção 1:4 contendo 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol. As amostras foram incubadas a 95°C por 5 minutos e aplicadas no gel de SDS-poliacrilamida 4-12%. A eletroforese foi realizada em cubas verticais, contendo tampão de corrida, à 90 V por 30 minutos e após 120 V por 1 hora e 30 minutos.

### 3.4 ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO

As proteínas separadas pela eletroforese foram transferidas em aparato de transferência *semi-dry* (BIO-RAD®), para uma membrana de PVDF 0,45 µM (imobilon™) em tampão contendo 20% de metanol, sob 120 Ma por 30 minutos. Após, a membrana foi corada com corante *Comassie blue* para obtenção do *loading control*, e bloqueada com *BLOTTO* (Sigma) em agitação à temperatura ambiente por 1 h. Em seguida a membrana foi lavada com TTBS 1X por 3 vezes e procedeu-se a incubação *overnight* a 4°C sob leve agitação, com os anticorpos primários policlonal Cofilin 1:1000 (Cell Signaling Technology™, #3312) e monoclonal Anti-cofilin 1:1000 (Abcam® #EP6376) (na figura 13, são demonstrados os locais de reconhecimento de ambos os anticorpos). No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes com TTBS 1X sob refrigeração e em seguida incubada com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase anti-rabbit 1:2000 (Dako P0448), por 2 horas nas mesmas condições da primeira incubação. Após esse período, a membrana foi lavada com TTBS 1X por 5 minutos repetindo por 3 vezes, em seguida procedeu-se a reação de revelação, que consiste na exposição da membrana de PVDF a uma solução 1:2 dos reagentes A e B de Western *Chemiluminescent HRP Substrate* (ECL) (EMD Millipore®), as imagens foram obtidas no fotodocumentador ImageQuant™ LAS 500 (GE Healthcare Instruments) do Serviço de Endocrinologia do HCPA. Intensidades de banda foram analisadas usando o software ImageJ para a quantificação de cada amostra.



**Figura 13 – Sequência de Codificação de Consenso e tradução da CFLI.** Na sequência (a) de nucleotídeos codificadores da proteína cofilina-1 humana, estão indicados por setas os locais que foram selecionados para a edição (pX458 C1 - vermelho, pX458C2 - verde e pX458 C3 - amarelo), em azul as sequências PAM. E (b) a tradução em aminoácidos da proteína, destacado em roxo (epítipo #3312) e laranja (epítipo #EP6376) os aminoácidos referentes a epítipos dos anticorpos utilizados para identificar a expressão da proteína.

### 3.5 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A partir da identificação do clone *knockout* para *CFL1*, essas células foram analisadas em relação à parental para verificação de alteração no tempo de proliferação. As linhagens A549 WT e A549 KO foram plaqueadas na densidade de  $2 \times 10^4$  células em placas de 24 poços. As contagens foram realizadas em câmara de Neubauer, quando as células apresentaram aproximadamente 80% de confluência, o cálculo para determinar o *Cumulative Population Doubling* (CPD), foi determinado conforme descrito por Heiss e colaboradores, seguindo a fórmula:  $PD = [\log N(t) - \log N(t_0)] / \log 2$ , na qual a duplicação da população foi calculada considerando em  $N(t)$  a quantificação de células no momento da passagem, e  $N(t_0)$  o número inicial de células da passagem anterior (Heiss, Schilder, and Dirsch 2007). A soma dos PDs foram plotados por regressão linear contra o tempo em cultura, resultando no CPD das linhagens.

### 3.5 MIGRAÇÃO CELULAR

Para avaliar o perfil migratório da linhagem *knockout* para *CFL1*, foi utilizado o ensaio de *time-lapse* (20h) em colaboração com o Laboratório de Migração Celular (LAMOC) da Faculdade de Odontologia, UFRGS. As células foram contadas para a densidade de  $1,5 \times 10^4$  e plaqueadas em placas de  $10 \text{ mm}^2$ , revestidas com colágeno. Após 4 h para adesão, o meio de cultura era descartado e trocado por meio de cultura e 25mM HEPES, e a tampa da placa selada. Logo, se iniciava a programação da captura das imagens em microscópio invertido (Axio Observer Z1, Zeiss). As condições foram configuradas para uma captura a cada 10 minutos por 20 horas. Utilizando o *software* Fiji - ImageJ, cada célula migratória foi acompanhada e os dados foram analisados quanto à velocidade de migração, distância e a direcionalidade.

### 3.6 IMUNOCITOQUÍMICA PARA A ANÁLISE DE MORFOLOGIA NUCLEAR (NMA) E ÍNDICE DE POLARIDADE

Para análise de morfologia celular, foi utilizado a microscopia de imunofluorescência, assim foram empregados nesse estudo a sonda Rodamina-faloidina 488, marcadora de citoesqueleto devido a afinidade para F-actina e o corante nuclear DAPI. Após 24 h do plaqueamento de  $1 \times 10^5$  células em lamínulas previamente esterilizadas e posicionadas dentro



de poços da placa de seis poços, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (v/v em PBS) por vinte minutos à temperatura ambiente, seguidas de permeabilização com Triton 0,1% e BSA 1% (v/v em PBS), e do bloqueio com BSA 1% (v/v em PBS). Posteriormente, foram feitas as lavagens com PBS 1X, e incubação com 100 nM de Rodamina-faloidina 488 por 40 minutos. Na marcação seguinte foi utilizado 300 nM de DAPI para marcação do núcleo, incubado por 10 minutos e após lavagens com PBS 1X, as lamínulas permaneceram em PBS 1X até a montagem em lâmina ponta fosca. As imagens foram adquiridas no microscópio Fluid™ e as quantificações para o NMA e índice de polaridade foram efetuadas no programa Image Pro Plus 6.0 (IPP6 - Media Cybernetics) e ImageJ, conforme os seguintes parâmetros:

**Tabela 7. Descrição dos parâmetros avaliados na morfometria.**

Parâmetro	Descrição
Área	Medida por meio do número de pixels no polígono
Perímetro	Comprimento do limite externo do polígono
Coefficiente de arredondamento	Indica um valor entre 0 e 1, quanto maior o valor, mais arredondado é o formato. Se a relação for igual a 1, o objeto é um círculo perfeito
Alongamento	Relação do comprimento do eixo principal com o comprimento do eixo secundário. O resultado é um valor entre 0 e 1, se o objeto for mais alongado o resultado será >1.
Comprimento do eixo principal	Linha mais longa que pode ser desenhada pelo objeto
Comprimento do eixo secundário	Comprimento da linha mais longa que pode ter o objeto perpendicular ao eixo principal
Ângulo do eixo principal	Ângulo entre os eixos horizontal e principal, em graus
Ângulo do eixo secundário	Ângulo entre o eixo horizontal e o eixo secundário, em graus.

### **3.7 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS/MS)**

#### **3.7.1 Precipitação e digestão de proteínas em solução.**

Aproximadamente 40 µg de extrato protéico foram submetidos à precipitação por clorofórmio/metanol. Os pellets ressuspensos em 100 mM tris HCl (pH 7.0) (tampão A) contendo 8 M uréia. Ditiotreitól (DTT) foi adicionado na concentração final de 5 mM por 20 min a 37°C para redução das pontes dissulfeto, depois disso, as cisteínas foram alquiladas

utilizando 25 mM de iodoacetamida (IAM) durante 20 min em temperatura ambiente no escuro. Por fim, a concentração de uréia foi reduzida para 2 M utilizando o tampão A e os extratos proteicos digeridos com tripsina em uma proporção de 1:100 enzima/proteínas a 37°C por 16 h. Ácido fórmico foi adicionado para interromper a reação (5% v/v, concentração final)

### 3.7.2 Identificação de proteínas por LC-MS/MS

As separações cromatográficas dos peptídeos gerados pela digestão foram realizadas utilizando o sistema nanoLC Ultra (nanoLC Ultra 1D plus, Eksigent) equipado com um autosampler nanoLC AS-2 (Eksigent, EUA) e conectado a um espectrômetro de massas híbrido LTQ-XL Orbitrap Discovery (Thermo Fischer Scientific) contendo uma fonte de ionização nano-eletrospray (Thermo Fischer Scientific). As colunas capilares analíticas (diâmetro interno de 100 µm e 20 cm de comprimento com ponteira de 5 µm de diâmetro interno) e pré-colunas (diâmetro interno de 150 µm e 2 cm de comprimento), são empacotadas no laboratório com resina de fase reversa (5 µm ODS-AQ C18 Yamamura Chemical Lab). Foram utilizados 2 µg das amostras digeridas em um volume final de injeção de 10 µL em triplicata para cada uma das amostras. O método cromatográfico de 120 minutos foi empregado utilizando o seguinte gradiente descontínuo da fase móvel A (5% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico em água) à fase móvel B (90% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico): 0-5% B em 5 min; 5-25% B em 60 min; 25-50% B em 20 min; 50-80% B em 15 min; 80% B isocrático por 5 min; 80-5% B em 1 min; 5% B isocrático por 14 min com fluxo de 400 nL/min. O instrumento foi programado para ciclos de aquisição, em modo de ionização positiva, de um espectro de MS1 no intervalo de razão massa/carga (m/z) de 400-1600 com resolução de 30.000 (em m/z 400) no Orbitrap, seguido de oito espectros de MS2 dos oito íons mais abundantes do espectro de MS1. Método de dissociação induzida por colisão (CID) foi utilizado como método de fragmentação. Para explorar a complexidade da amostra e adquirir espectros de peptídeos menos abundantes, massas de peptídeos adquiridos foram adicionadas a uma lista de exclusão dinâmica com tamanho de 100 íons e tempo de permanência de 30 segundos durante a aquisição dos espectros MS2.

### 3.7.3 Análise dos dados e identificação das proteínas

A identificação de peptídeos e proteínas foi realizada com *software Patternlab for Proteomics* (<http://patternlabforproteomics.org/>). Espectros de MS2 foram buscados diretamente dos arquivos RAW pelo software de busca *Comet* utilizando banco de dados não-

redundante do proteoma referência. Os dados foram buscados com tolerância de 50 ppm para íons precursores e 1 Da para íons fragmento. Posteriormente, os espectros identificados foram filtrados usando o software *Search Engine Processor*. Os peptídeos identificados foram agrupados de acordo com o estado triptico e carga. Foi estabelecido um valor de corte para aceitar 1% de falso positivo baseado nas identificações do banco de dados reverso.

### **3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram expressos por média  $\pm$  desvio padrão, seguido de Wilcoxon-Mann-Whitney *test*. O software utilizado foi o Prism 6 (GraphPad Software, Inc).

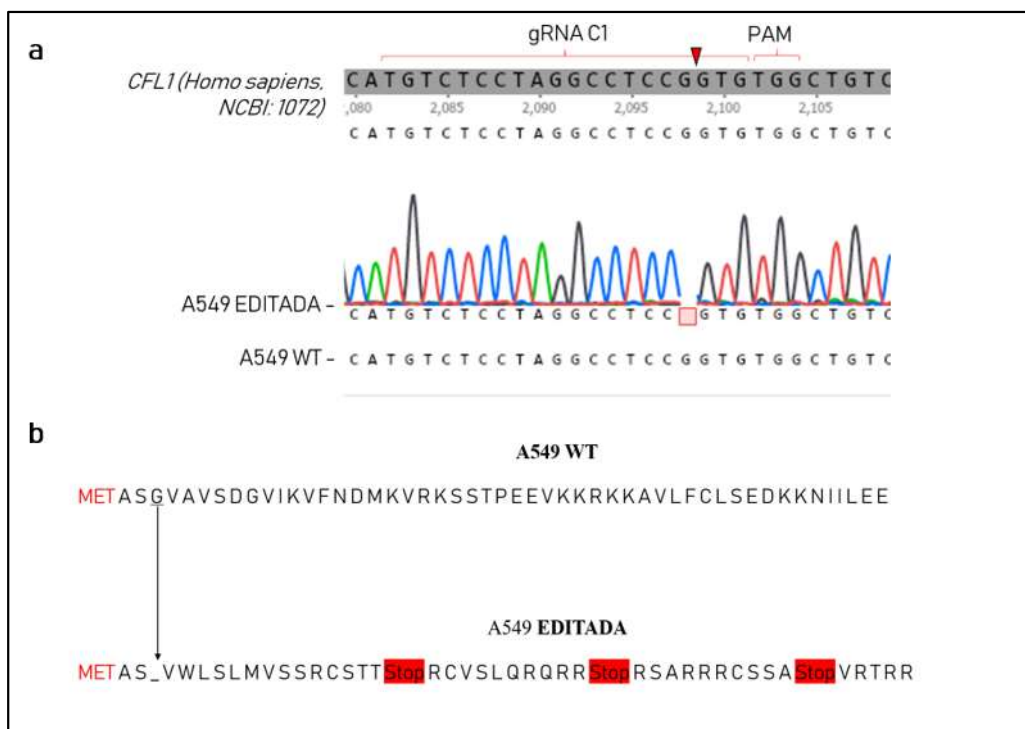
## CAPÍTULO II

### 4 RESULTADOS

#### 4.1 CONFIRMAÇÃO DA LINHAGEM *KNOCKOUT* PARA *CFL1*

##### 4.1.1 Identificação de mutação por sequenciamento

Após o isolamento monoclonal utilizando o citômetro BD FACSAria III, dois clones foram identificados com edições causadas pela CRISPR/Cas9. Sendo que após os alinhamentos (figura 14) e tradução das sequências mutadas, apenas um apresentou deslocamento do modo de leitura, mutação *frameshift*, e antecipação de códon de parada. Esse clone foi então selecionado para as etapas seguintes do estudo, em que são necessários ensaios que confirmem que a edição resultou em *knockout* da expressão da proteína.

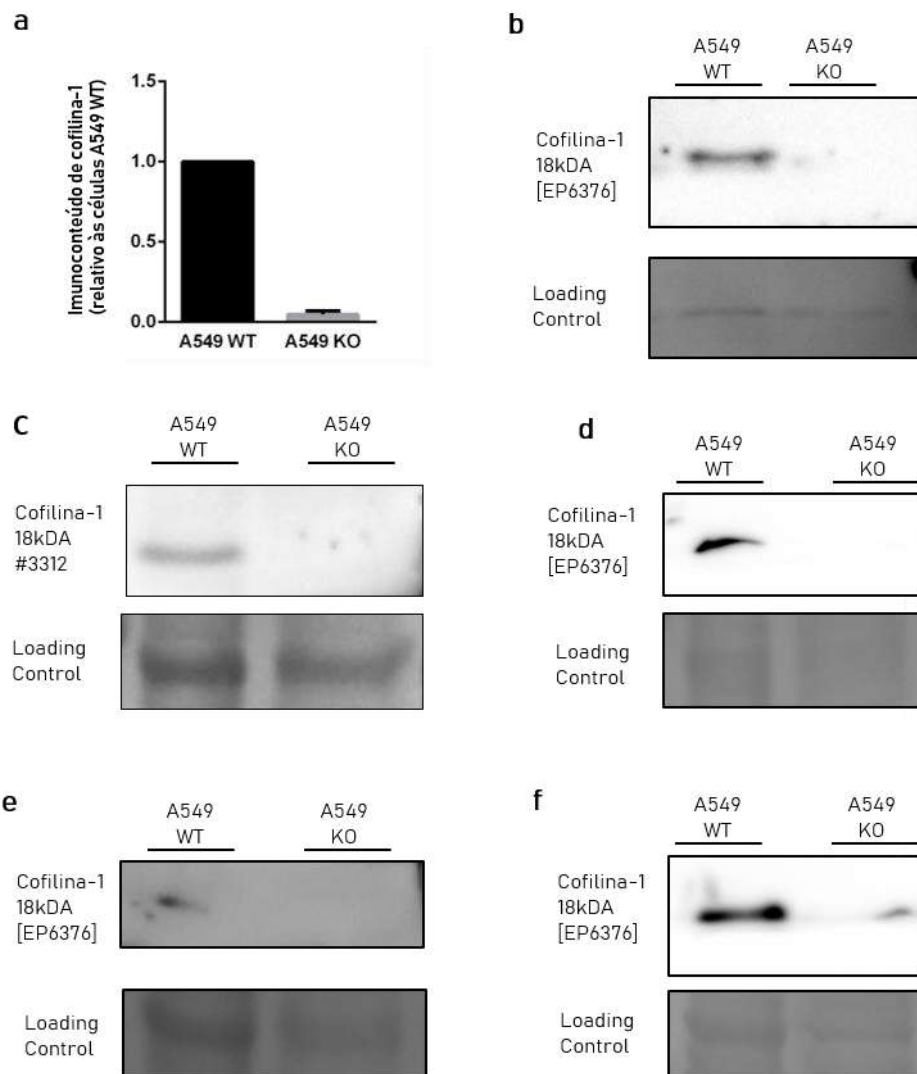


**Figura 14 - Alinhamento e tradução do sequenciamento.** O alinhamento com o gene referência da Cofilina-1 humana, clone mutado da linhagem A549 e *CFL1* da linhagem parental A549, demonstram o local exato em que ocorreu o *indel* e mutação *frameshift* causada pelo sistema CRISPR/Cas9, nesse caso a deleção de uma única base de Guanina, resultou em *frameshift* (b) a partir da Serina 3, seguida da antecipação de códon de parada.

#### 4.1.2 Imunodeteção da cofilina-1

Diferentes passagens (P19, P22 e P28) do clone editado foram analisadas por *Western blotting* para a confirmação do *knockout*. Também foram utilizados anticorpos cujos epítomos reconhecem posições diferentes da proteína, sendo um policlonal e outro monoclonal.

A imunodeteção confirmou que o clone isolado não expressa *CFLI* (figura 15), dessa forma indicando que a edição gênica resultou em um fenótipo homozigoto para a mutação *frameshift*. A estabilidade da linhagem foi avaliada em diferentes passagens, se mantendo negativa para a expressão de *CFLI*. O clone isolado e identificado com a mutação *frameshift* foi transfectado com o vetor pX458 C1.



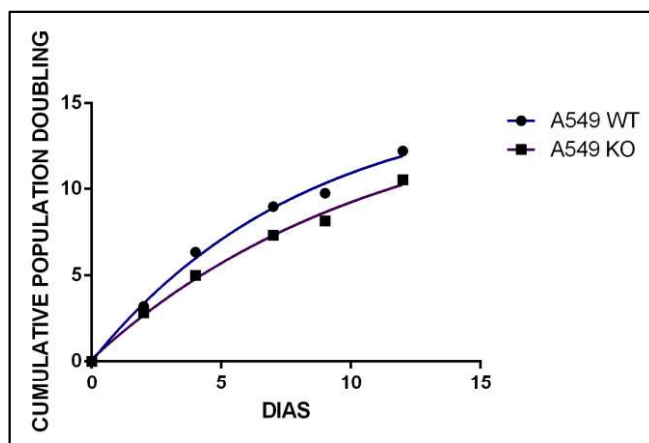
**Figura 15 - Confirmação do knockout por CRISPR/Cas9 para *CFLI* humana através da técnica de *Western blotting*.** (a) Quantificação de 4 experimentos independentes (n=4), utilizando 3 passagens de células, dados em relação A549 WT (normalizado para 1) e A549 KO média  $0,049 \pm 0,021$ , possivelmente esse valor de quantificação resultou de *background* inespecífico. Para o controle de carregamento foi utilizado a membrana corada com *comassie blue*, resultados da passagem 28 em (b) com o anticorpo monoclonal e (c) anticorpo policlonal, os WB anteriores foram feitos todos com o anticorpo monoclonal, (d) representa P22, (e) representa a duplicata da P19 repetida a partir do resultado do primeiro WB (f).

## 4.2 ANÁLISE PROTEÔMICA

Para a análise por espectrometria de massas, foram feitas três digestões independentes para cada amostra. Cada uma delas foi injetada 3 vezes no equipamento. Segundo a média de *SpecCounts* de cada injeção, foram identificadas aproximadamente 1900 proteínas em cada uma das replicatas, utilizando a base de dados para *Homo sapiens* (UP000005640) com 73.931 entradas. Resultados preliminares demonstraram 39 proteínas diferencialmente expressas na linhagem A549 WT, desse total foram identificadas 21 proteínas somente na linhagem parental e entre essas estava a Cofilina-1. Esse resultado para a cofilina-1 corrobora os observados anteriormente, na caracterização da linhagem *knockout* para essa proteína e o correto funcionamento e aplicação do sistema CRISPR/Cas9.

## 4.3 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (CPD)

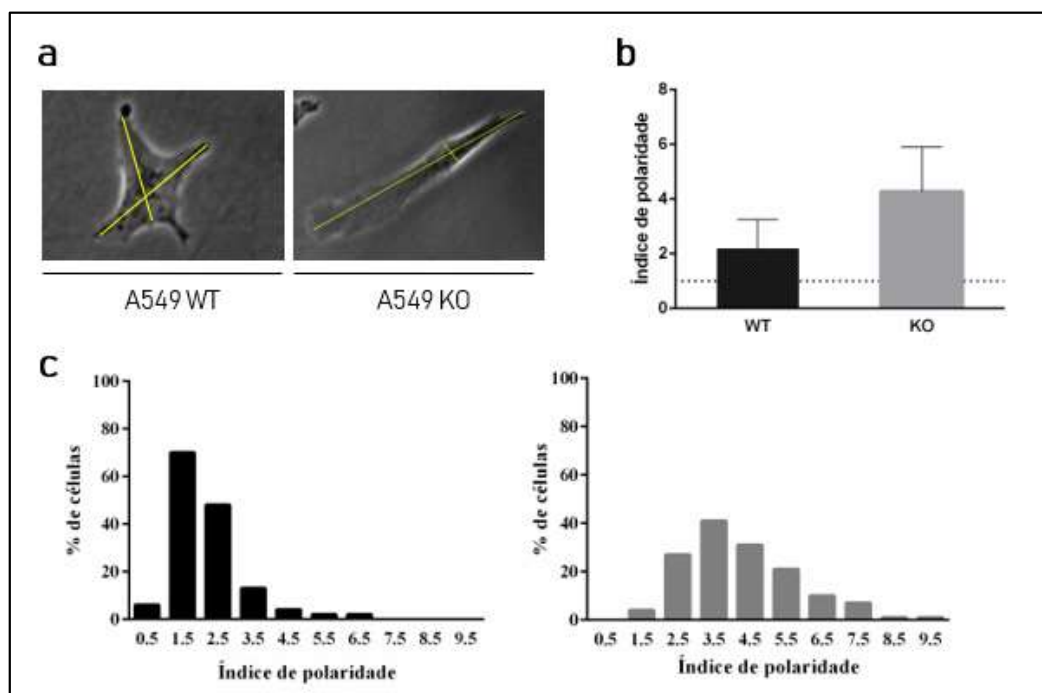
Para avaliar a capacidade proliferativa da linhagem *knockout*, o número de células foi acompanhado por 12 dias e comparados à curva de proliferação da linhagem parental, a qual possui um tempo aproximado para duplicação em 22h (figura 16). Através do método de Population doubling nós observamos que a linhagem A549 KO não apresentou diferença biológica, se manteve em um tempo para duplicação exponencial estável.



**Figura 16 – Curva de CPD.** As células foram plaqueadas e por um intervalo de 15 dias, contadas sempre que estivessem em confluência de 80%.

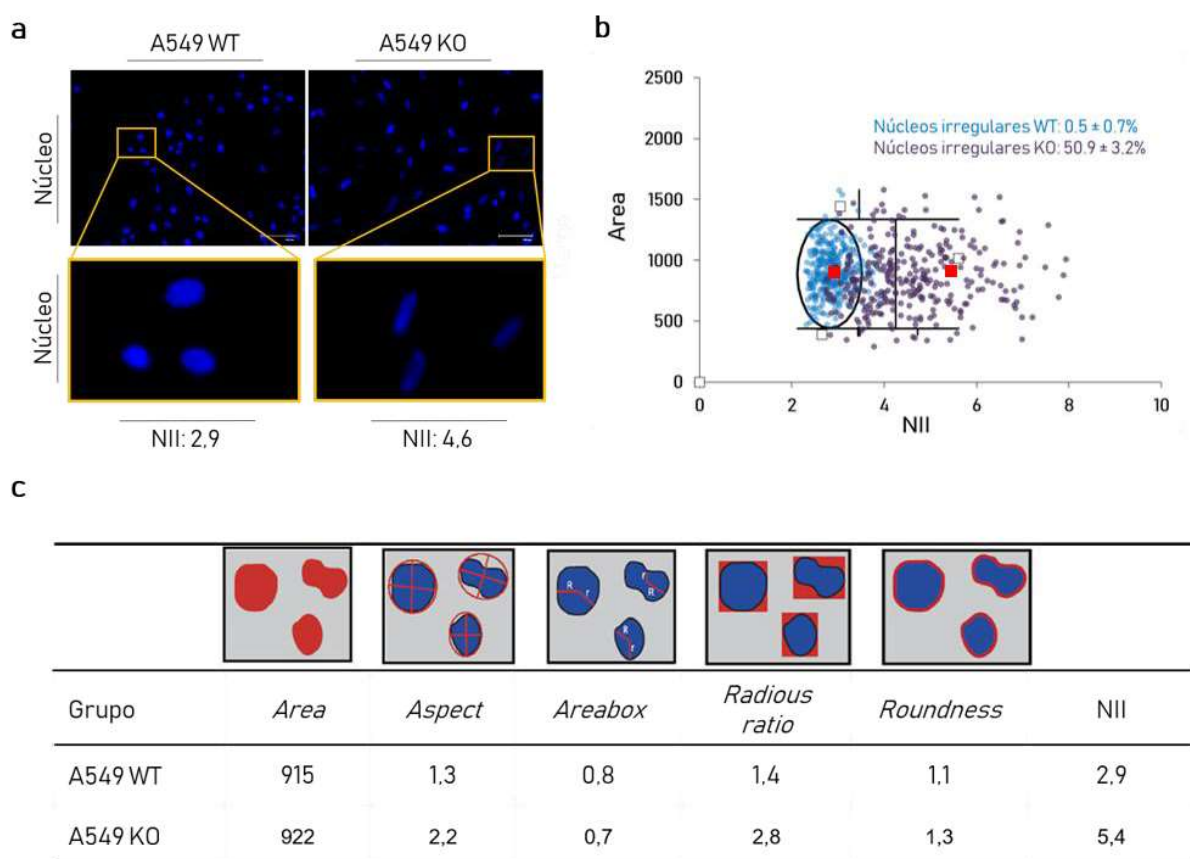
#### 4.4 ÍNDICE DE POLARIDADE E ANÁLISE MORFOMÉTRICA NUCLEAR - NMA

Para a caracterização das alterações morfológicas em decorrência da falta da regulação da cofilina-1 sobre a actina, foram utilizados dois métodos que avaliam padrões celulares estruturais, como formato do núcleo e do citoplasma. O índice de polaridade celular mensura a relação sob o formato da célula a partir da razão entre o maior e o menor eixo, assim células com formatos específicos possuem características indicativas para diferentes fenótipos (figura 17).



**Figura 17 – Índice de polaridade celular.** (a) Representação dos eixos mensurados, referentes a célula A549 WT, e ao lado a A549 KO em que o knockout da cofilina-1 impactou diretamente sobre a alteração do citoesqueleto, conferindo as células um fenótipo fusiforme. (b) Quantificação do índice em que valores próximos a 1 representam células mais arredondadas. (c) Histograma representativo das populações, as barras escuras são referentes as células A549 WT. Foram analisadas 145 células de cada grupo, relacionadas por três experimentos independentes.

A análise morfométrica nuclear foi utilizada para avaliar se havia indicativo de senescência, apoptose ou outras irregularidades nucleares, utilizando o método NMA descrito por Filippi-Chiela e colaboradores (2012). Assim os parâmetros (tabela 8) foram mensurados com o uso do software Image-Pro Plus 6.0, e em seguida plotados no sistema NMA. Foram analisadas 300 células de cada grupo, referentes a três experimentos independentes, os núcleos foram marcados com DAPI, conforme descrição contida nos materiais e métodos.

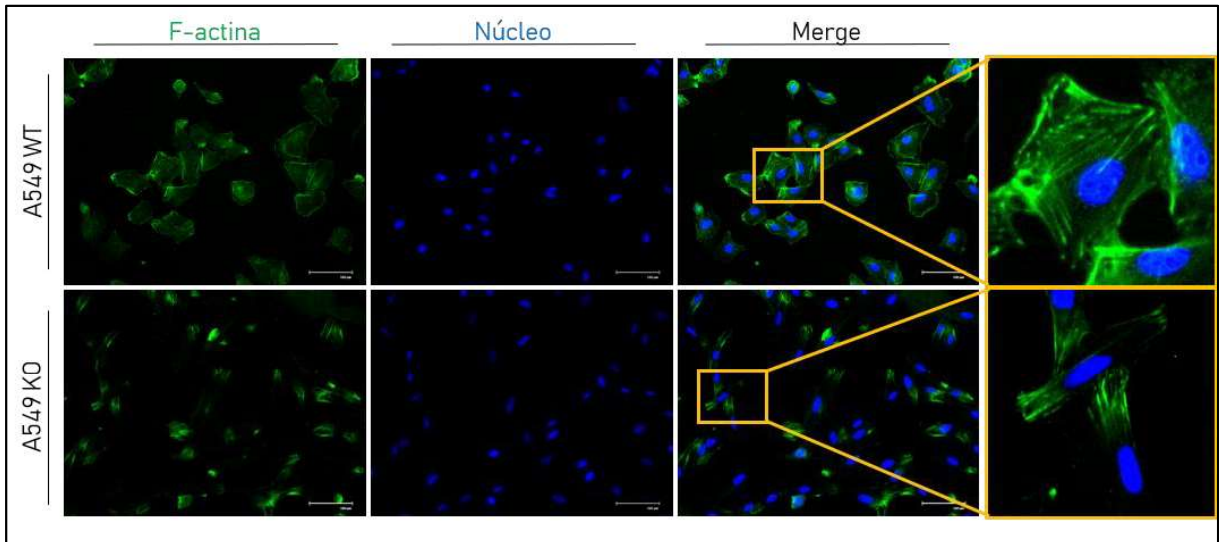


**Figura 18 - NMA.** Representação qualitativa à esquerda (a), evidenciando a diferença fenotípica nuclear entre os grupos. Resultado do NMA (b), referente a distribuição dos núcleos das células A549 WT (círculos azuis) e A549 KO (círculos roxos), e (c) média dos índices que compõe o NII para os grupos analisado, os núcleos das A549 KO apresentam tamanho semelhante a parental, mas diferem em formato, valores referentes as células indicadas no gráfico por marcação vermelha. (Microscópio EVOS Floid)

Visualmente, observamos que os núcleos das células A549 KO apresentaram formato mais elíptico/achatado, em comparação ao formato ovóide dos núcleos das células parentais (Figura 18a). De fato, a resultado do NMA mostrou um claro aumento do Índice de Irregularidades Nuclear (NII) nas células A549 KO. Não foram observadas projeções ou protusões nucleares, nem alterações morfométricas que sugerissem senescência ou apoptose.

Dessa forma, devido ao principal papel da cofilina-1, em condições de homeostasia celular, ser relacionada à dinâmica de regulação do citoesqueleto, nós investigamos a relação de fibras de estresse formadas por agrupamentos de filamentos de actina, com a marcação por Rodamina-faloidina 488 (figura 19). O padrão de formação de fibras de estresse na linhagem *knockout*, pode ser indicativo de menor adesão à matriz extracelular e a redução de fibras ventrais caracteriza o formato mais alongado desse clone.

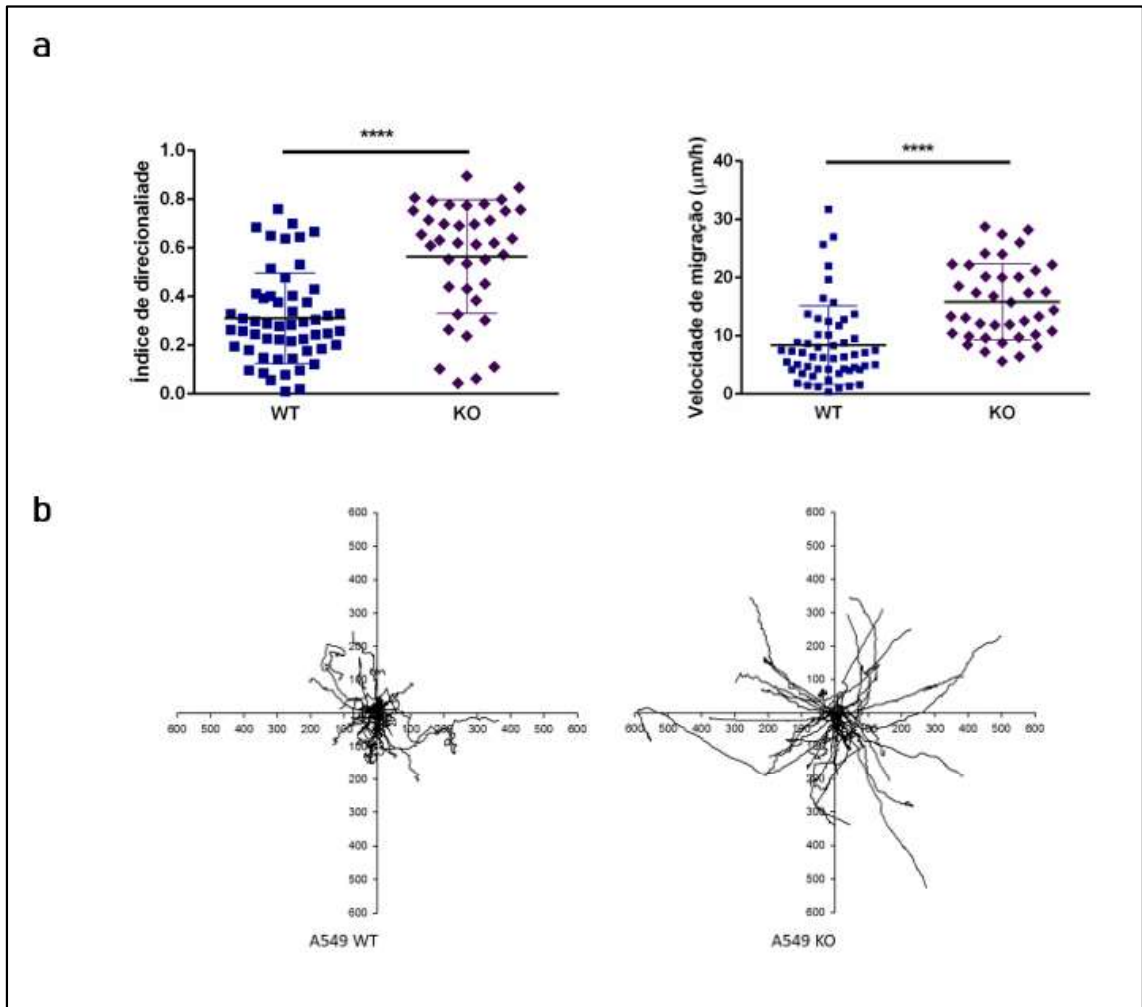




**Figura 19 – Imunocitofluorescência para actina.** A marcação com Rodamina-faloidina 488, caracterizou maior presença de fibras de estresse dorsais na A549 KO, em comparação com a A549 WT que contém uma razão de distribuição mais equilibrada, para os tipos de fibras de estresse classificadas em dorsais, ventrais e arcos transversos. (barra de escala: 100  $\mu$ M)

#### 4.5 ANÁLISE DO PERFIL DE MIGRAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS

Em relação à função da cofilina-1 em regular a estrutura e função dos filamentos de actina, o impacto do *knockout* para *CFL1* foi avaliado sob parâmetros de migração celular. Foi utilizado o método por microscopia *time-lapse*, com capturas por um período de 20h em intervalos de 10 minutos. Os resultados do rastreamento celular, demonstraram que a ausência de cofilina-1 aumentou a direcionalidade, velocidade e consequentemente a distância percorrida, em relação as células parentais. Dessa forma, caracterizando um fenótipo que em ambiente estimulado apresentou maior eficiência do ciclo de protusão (figura 20).



**Figura 20. A ausência de cofilina-1 altera a migração celular.** (a) As células A549 KO apresentam maior direcionalidade, em comparação com as células A549 WT que apresentam perfil migratório mais eficiente em fazer curvas e menor velocidade de deslocamento. (b) Polar-plot correlacionando o rastreamento da migração celular, no qual o knockout para *CFL1* aumentou a distância e direcionalidade. Foram analisados 4 experimentos independentes, por Mann-Whitney *test* (\*\*\*\*  $P < 0.0001$ )

### PARTE III

## 5 DISCUSSÃO

Os recentes avanços no uso de endonucleases projetadas para edição gênica, como ZFN, TALEN e CRISPR/Cas9, têm sido indispensáveis para o estudo da função dos genes, sobretudo com a descoberta da aplicação do sistema CRISPR/Cas9 em eucariotos, método que apresenta vantagens em relação aos outros, por oferecer customização e operação facilitadas. *Knockouts* utilizando CRISPR/Cas9, geralmente resultam de Recombinação não-Homóloga (NHEJ), mecanismo predominante em eucariotos após a clivagem da dupla fita de DNA (Lieber 2010). Nessa via, segundos após a DSB proteínas do complexo de reparo reconhecem no DNA as extremidades danificadas, e assim o processo de NHEJ muitas vezes pode resultar em mudança na fase de leitura, devido à deleção ou inserção (*indels*) de bases que por sua vez pode causar perda de função em alelos (Fujii et al. 2014).

Portanto, o desenvolvimento e emprego de múltiplas técnicas e ferramentas que propiciem o estudo de mecanismos envolvidos na biologia tumoral possui fundamental importância no entendimento das interações moleculares que tornam um fenótipo mais agressivo, e conseqüentemente menos responsivo às terapias antitumorais. Neste contexto, o câncer de pulmão se destaca, tanto por apresentar elevada heterogeneidade no desenvolvimento de tumores primários, quanto por apresentar distintas condutas terapêuticas (Lehtiö and De Petris 2010). As altas taxas de incidência e mortalidade observadas nesses casos derivam não somente do diagnóstico tardio, mas também do insucesso da radio e quimioterapia. Apesar dos recentes avanços das terapias sistêmicas, ainda faltam medicamentos com maior especificidade molecular e menores efeitos adversos, principalmente para pacientes com baixo *performance status* e pacientes idosos (Hirsch et al. 2017). Neste sentido, nosso grupo de pesquisa vem estudando o papel da cofilina-1 e relacionando o imunocontéudo dessa proteína ao prognóstico e quimiorresistência em câncer de pulmão de não pequenas células (Becker et al. 2014; Castro et al. 2010). Ainda, o valor preditivo da cofilina-1 foi avaliado por meta-análise de bancos de dados e coorte retrospectiva, demonstrado o seu potencial como biomarcador em CPNPC (Muller et al. 2011).

Contudo, o entendimento dos mecanismos celulares alterados com a maior expressão de *CFL1* no câncer e interações relacionadas às vias de quimiorresistência ainda precisam ser elucidadas. Para o presente estudo, a linhagem A549 foi previamente selecionada devido aos resultados anteriores sobre a análise *in silico* de expressão do gene *CFL1*. Em um painel de linhagens de CPNPC humana resistentes à cisplatina a A549 demonstrou maior atividade da

rede no subtipo histológico adenocarcinoma, e na comparação do imunoconteúdo dessas linhagens, foi a que apresentou expressão basal média de cofilina-1 (Castro et al. 2010).

No contexto atual, o desenvolvimento de novos modelos *in vitro* que orientem o entendimento sobre a função de alvos moleculares e processos regulados por eles, é de extrema importância para que os processos carcinogênicos, metastáticos e de quimiorresistência sejam reduzidos. Além da possibilidade do surgimento de novas terapias por fármacos mais efetivos, resultados por esse conhecimento.

Dessa forma o presente trabalho apresenta o desenvolvimento de uma linhagem *knockout* para *CFL1*, com o uso do sistema CRISPR/Cas9. Essa linhagem é a primeira descrita para o *knockout* estável dessa proteína em adenocarcinoma. Estudos prévios sobre a função da cofilina-1 relacionam a letalidade do fenótipo *knockout* com base em experimentos em fase de desenvolvimento embrionário, na qual o animal homozigoto para a *CFL1*<sup>-/-</sup> é inviável. Foi demonstrado que apesar da falta dessa proteína ser compensada (*CFL2*, *Dstn*) durante a gastrulação, ela seria indispensável para a migração no estágio de desenvolvimento neuronal (Bellenchi et al. 2007; Gurniak, Perlas, and Witke 2005). Um possível efeito compensatório foi avaliado a partir da superexpressão para *Dstn* nos embriões *knockouts* para *CFL1*, mas não foi observado recuperação do fenótipo, sugerindo que embora sejam da mesma família de ABP, essas proteínas possuem funções distintas no desenvolvimento embrionário (Gurniak et al. 2005). No entanto, esse problema experimental talvez fosse contornado com o uso de mutação tecido específico para inativação por *knockout* condicional, utilizando, por exemplo, a tecnologia empregada pelo sistema de recombinação Cre-loxP, e sistema *Tet-On/Off*.

As caracterizações morfológicas empregadas nesta dissertação de mestrado apontaram para modificações relacionadas à reorganização do citoesqueleto, incluindo proliferação, polimerização dos filamentos de actina e projeções de membrana alterados na linhagem *knockout* estabelecida quando comparados com a linhagem A549 WT parental.

A análise do tempo de duplicação celular não demonstrou diferença biológica em relação ao controle, a linhagem *knockout* apresentou proliferação estável, sugerindo que para a nucleação da actina e regulação do anel contrátil durante a mitose, outras proteínas são capazes de substituir a função da cofilina-1. Em relação a isso, Tanaka e colaboradores demonstraram que o envolvimento de outras proteínas regulatórias de actina, como as Rho-GTPases, podem compensar a inibição da cofilina-1 durante a citocinese.

Os resultados obtidos com o estudo do padrão nuclear da A549 *CFL1*<sup>-/-</sup>, por NMA, classificaram aproximadamente 50% da população como irregular, corroborando os dados do

índice de polaridade celular também obtidos neste estudo. O fenótipo tipo fibroblasto já foi descrito em linhagens silenciadas transientemente para *CFL1* (Sidani et al. 2007), em que há a reorganização do complexo Arp2/3 em resposta à falta da expressão da cofilina-1. Apesar de o padrão nuclear apresentar formato elipsoide, esse dado não foi acompanhado de aumento da área ou indicativos de outras aberrações cromossômicas. Isso novamente indica a estabilidade do modelo estabelecido em manter o fenótipo *knockout* para *CFL1* viável e fidedigno para o estudo das vias compensatórias relacionadas a essa proteína, e possivelmente envolvida na biologia tumoral.

Outros mecanismos relacionados a reorganização do citoesqueleto são descritos durante a transição epitélio-mesênquima (EMT, do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*), na qual a célula perde características epiteliais ao expressar marcadores mesenquimais, aliada às alterações estruturais refletidas na morfologia mais alongada (Shah et al. 2017). As alterações apresentadas pelas células A549 *CFL1*<sup>-/-</sup> apontam para esse possível fenótipo, o qual correlacionou além da morfologia fusiforme a capacidade de migração celular aumentada quando em condições de estímulo para tal. Em comparação com as células parentais, a falta da cofilina-1 respondeu conforme a literatura para a função dessa proteína relacionada à capacidade estrutural da célula direcionar para um movimento de curva (Tania, Condeelis, and Edelstein-Keshet 2013). Existem relatos de diferentes resultados conforme o tipo celular para a avaliação do efeito da supressão da *CFL1*. Em adenocarcinoma mamário já foi observado que a fosforilação dessa proteína resultou na inibição da formação de lamelipódios, e conseqüentemente reduziu a capacidade migratória nesse modelo (Zebda et al. 2000). A supressão de cofilina-1 utilizando RNA de interferência simples também diminuiu a formação e estabilidade das protusões, novamente na linhagem MTLn3 (Yamaguchi et al. 2005). Já a superexpressão de *CFL1* foi relacionada ao aumento da motilidade celular em linhagem de glioblastoma humana (Yap et al. 2005), comportamento semelhante observado com gliossarcoma em modelo murino. Estes apresentaram fenótipo mais invasivo correlacionando nesse estudo a maior expressão da cofilina-1 (Gunnensen et al. 2000). Ainda, a expressão constitutiva da ação do domínio LIN Kinase-1 inativou completamente por fosforilação a função da cofilina-1, o que resultou em inibição da estimulação por *epidermal growth factor* (EGF) para nucleação da actina, protusão e motilidade celular em células tumorais (Zebda et

al. 2000). O mesmo efeito sobre a via da cofilina-1 foi observado em linhagem de linfoma de células T, carcinoma de colo uterino, de cólon e hepático (Nebl, Meuer, and Samstag 1996).

Dessa forma, tais dados sugerem a necessidade de melhor compreensão sobre a interação e regulação exercida pela cofilina-1, principalmente no contexto tumoral. Assim, o desenvolvimento dessa linhagem A459 *knockout* para cofilina-1 representa possibilidade pioneira para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na obstrução do tratamento e entendimento acerca da progressão tumoral.

## 6 PERSPECTIVAS

- Finalizar as análises de proteômica e das vias de interação conforme a expressão diferencial. Realizar análises de protusões por *kymograph*, e a escrita do *paper* referente a esses resultados.

- Sequenciar todo o genoma da linhagem A549 *CFL1*<sup>-/-</sup>, avaliar se houve *off-target* e possíveis impactos.

- Repetir o *knockout* em outra linhagem de CPNPC para maior precisão dos efeitos moleculares observados.

- Superexpressar *CFL1* em A549 através do sistema lentiviral, utilizando o vetor pLVX-IRES-ZsGreen1 (Clontech).

- Analisar a resposta ao tratamento quimioterápico, por vias de quimiorresistência.

- Realizar estudo *in vivo* por implante xenográfico dessas linhagens, por modelo já estabelecido pelo grupo em camundongos nudes.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso grupo de pesquisa vem estudando o envolvimento da cofilina-1 na biologia tumoral e doenças neurodegenerativas. Nesse sentido, já foram validados como fator prognóstico e de quimiorresistência, o imunociteúdo aumentado de cofilina-1 em CPNPC (Castro et al. 2010; Muller et al. 2011; Becker et al. 2014) e em melanoma (Bracalente et al. 2018) bem como sua relação em processos neurotóxicos (revisado por Schonhofen *et al.*, 2014).

Os nossos resultados sobre a avaliação da falta da regulação exercida pela cofilina-1 sobre a dinâmica da actina apontaram para um fenótipo com maior direcionalidade e eficiência no ciclo da protusão. Dessa forma, a correlação com os dados da morfometria sugere a possível transição epitélio-mesênquima, mas, para comprovar o fenótipo, ainda são necessárias outras avaliações utilizando marcadores específicos relacionados a essa transição.

Pode-se dizer que, no presente trabalho, desenvolvemos uma importante ferramenta para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no mau prognóstico para o câncer de pulmão. Assim, além do papel preditivo da cofilina-1 em adenocarcinoma pulmonar, as interações dessa proteína podem vir a elucidar mecanismos centrais na biologia tumoral, potencializando a descoberta de novos alvos terapêuticos. E por consequência, estes possam refletir em uma maior eficiência em relação ao tratamento tradicional, baseado em platina.



## REFERÊNCIAS

- Abe, H., R. Nagaoka, and T. Obinata. 1993. "Cytoplasmic Localization and Nuclear Transport of Cofilin in Cultured Myotubes." *Experimental Cell Research* 206(1):1–10.
- Agnew, B. J., L. S. Minamide, and J. R. Bamburg. 1995. "Reactivation of Phosphorylated Actin Depolymerizing Factor and Identification of the Regulatory Site." *The Journal of Biological Chemistry* 270(29):17582–87.
- Amano, Toru, Noriko Kaji, Kazumasa Ohashi, and Kensaku Mizuno. 2002. "Mitosis-Specific Activation of LIM Motif-Containing Protein Kinase and Roles of Cofilin Phosphorylation and Dephosphorylation in Mitosis." *The Journal of Biological Chemistry* 277(24):22093–102.
- Ambach, A., J. Saunus, M. Konstandin, S. Wesselborg, S. C. Meuer, and Y. Samstag. 2000. "The Serine Phosphatases PP1 and PP2A Associate with and Activate the Actin-Binding Protein Cofilin in Human T Lymphocytes." *European Journal of Immunology* 30(12):3422–31.
- Andrianantoandro, Ernesto and Thomas D. Pollard. 2006. "Mechanism of Actin Filament Turnover by Severing and Nucleation at Different Concentrations of ADF/Cofilin." *Molecular Cell* 24(1):13–23.
- Arber, Silvia, Freda A. Barbayannis, Hartwig Hanser, Corinna Schneider, Clement A. Stanyon, Ora Bernard, and Pico Caroni. 1998. "Regulation of Actin Dynamics through Phosphorylation of Cofilin by LIM-Kinase." *Nature* 393:805.
- Arriagada, R., B. Bergman, A. Dunant, T. Le Chevalier, JP Pignon, and J. Vansteenkiste. 2004. "Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer." *New England Journal of Medicine* 350(4):351–60.
- Bamburg, J. R. 1999. "Proteins of the ADF/Cofilin Family: Essential Regulators of Actin Dynamics." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15:185–230.
- Bamburg, J. R., H. E. Harris, and A. G. Weeds. 1980. "Partial Purification and Characterization of an Actin Depolymerizing Factor from Brain." *FEBS Letters* 121(1):178–82.
- Bamburg, James R. and Barbara W. Bernstein. 2010. "Roles of ADF/Cofilin in Actin Polymerization and Beyond." *FI000 Biology Reports* 2:62.
- Bamburg, James R. and O'Neil P. Wiggan. 2002. "ADF/Cofilin and Actin Dynamics in Disease." *Trends in Cell Biology* 12(12):598–605.
- Becker, Matheus, Marco Antônio De Bastiani, Carolina Beatriz Müller, Melissa M. Markoski, Mauro Antônio A. Castro, and Fábio Klamt. 2014. "High Cofilin-1 Levels Correlate with Cisplatin Resistance in Lung Adenocarcinomas." *Tumor Biology* 35(2):1233–38.
- Bellenchi, Gian Carlo, Christine B. Gurniak, Emerald Perlas, Silvia Middei, Martine Ammassari-Teule, and Walter Witke. 2007. "N-Cofilin Is Associated with Neuronal Migration Disorders and Cell Cycle Control in the Cerebral Cortex." *Genes &*

*Development* 21(18):2347–57.

- Bernstein, Barbara W., Hui Chen, Judith A. Boyle, and James R. Bamburg. 2006. “Formation of Actin-ADF/Cofilin Rods Transiently Retards Decline of Mitochondrial Potential and ATP in Stressed Neurons.” *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 291(5):C828–39.
- Bibikova, Marina, Mary Golic, Kent G. Golic, and Dana Carroll. 2002. “Targeted Chromosomal Cleavage and Mutagenesis in *Drosophila* Using Zinc-Finger Nucleases.” *Genetics* 161(3):1169–75.
- Blikstad, I., F. Markey, L. Carlsson, T. Persson, and U. Lindberg. 1978. “Selective Assay of Monomeric and Filamentous Actin in Cell Extracts, Using Inhibition of Deoxyribonuclease I.” *Cell* 15(3):935–43.
- Boch, Jens, Heidi Scholze, Sebastian Schornack, Angelika Landgraf, Simone Hahn, Sabine Kay, Thomas Lahaye, Anja Nickstadt, and Ulla Bonas. 2009. “Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors.” *Science* 326(5959):1509 LP – 1512.
- Bracalente, Candelaria, Adriana R. Rinflerch, Irene L. Ibañez, Francisco M. García, Victoria Volonteri, Gastón N. Galimberti, Fabio Klamt, and Hebe Durán. 2018. “Cofilin-1 Levels and Intracellular Localization Are Associated with Melanoma Prognosis in a Cohort of Patients.” *Oncotarget* 9(35):24097–108.
- Bravo-Cordero, Jose Javier, Marco A. O. Magalhaes, Robert J. Eddy, Louis Hodgson, and John Condeelis. 2013. “Functions of Cofilin in Cell Locomotion and Invasion.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Carlier, M. F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G. X. Xia, Y. Hong, N. H. Chua, and D. Pantaloni. 1997. “Actin Depolymerizing Factor (ADF/Cofilin) Enhances the Rate of Filament Turnover: Implication in Actin-Based Motility.” *The Journal of Cell Biology* 136(6):1307–22.
- Carlier, M. F., F. Ressay, and D. Pantaloni. 1999. “Control of Actin Dynamics in Cell Motility. Role of ADF/Cofilin.” *The Journal of Biological Chemistry* 274(48):33827–30.
- Castro, Mauro Antonio Alves, Felipe Dal-Pizzol, Stephanie Zdanov, Marcio Soares, Carolina Beatriz Müller, Fernanda Martins Lopes, Alfeu Zanotto-Filho, Marilda da Cruz Fernandes, Jose Claudio Fonseca Moreira, Emily Shacter, and Fábio Klamt. 2010. “CFL1 Expression Levels as a Prognostic and Drug Resistance Marker in Nonsmall Cell Lung Cancer.” *Cancer* 116(15):3645–55.
- Charpentier, Emmanuelle and Jennifer A. Doudna. 2013. “Rewriting a Genome.” *Nature* 495:50.
- Chua, Boon Tin, Christiane Volbracht, Kuan Onn Tan, Rong Li, Victor C. Yu, and Peng Li. 2003. “Mitochondrial Translocation of Cofilin Is an Early Step in Apoptosis Induction.” *Nature Cell Biology* 5:1083.
- Dearden, S., J. Stevens, Y. L. Wu, and D. Blowers. 2013. “Mutation Incidence and Coincidence in Non Small-Cell Lung Cancer: Meta-Analyses by Ethnicity and Histology (MutMap).” *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 24(9):2371–76.

- Ding, Li, Gad Getz, David A. Wheeler, Elaine R. Mardis, Michael D. McLellan, Kristian Cibulskis, Carrie Sougnez, Heidi Greulich, Donna M. Muzny, Margaret B. Morgan, Lucinda Fulton, Robert S. Fulton, Qunyuan Zhang, Michael C. Wendl, Michael S. Lawrence, David E. Larson, Ken Chen, David J. Dooling, Aniko Sabo, Alicia C. Hawes, Hua Shen, Shalini N. Jhangiani, Lora R. Lewis, Otis Hall, Yiming Zhu, Tittu Mathew, Yanru Ren, Jiqiang Yao, Steven E. Scherer, Kerstin Clerc, Ginger A. Metcalf, Brian Ng, Aleksandar Milosavljevic, Manuel L. Gonzalez-Garay, John R. Osborne, Rick Meyer, Xiaoqi Shi, Yuzhu Tang, Daniel C. Koboldt, Ling Lin, Rachel Abbott, Tracie L. Miner, Craig Pohl, Ginger Fewell, Carrie Haipek, Heather Schmidt, Brian H. Dunford-Shore, Aldi Kraja, Seth D. Crosby, Christopher S. Sawyer, Tammi Vickery, Sacha Sander, Jody Robinson, Wendy Winckler, Jennifer Baldwin, Lucian R. Chirieac, Amit Dutt, Tim Fennell, Megan Hanna, Bruce E. Johnson, Robert C. Onofrio, Roman K. Thomas, Giovanni Tonon, Barbara A. Weir, Xiaojun Zhao, Liuda Ziaugra, Michael C. Zody, Thomas Giordano, Mark B. Orringer, Jack A. Roth, Margaret R. Spitz, Ignacio I. Wistuba, Bradley Ozenberger, Peter J. Good, Andrew C. Chang, David G. Beer, Mark A. Watson, Marc Ladanyi, Stephen Broderick, Akihiko Yoshizawa, William D. Travis, William Pao, Michael A. Province, George M. Weinstock, Harold E. Varmus, Stacey B. Gabriel, Eric S. Lander, Richard A. Gibbs, Matthew Meyerson, and Richard K. Wilson. 2008. "Somatic Mutations Affect Key Pathways in Lung Adenocarcinoma." *Nature* 455(7216):1069–75.
- Dopie, Joseph, Kari-Pekka Skarp, Eeva Kaisa Rajakylä, Kimmo Tanhuanpää, and Maria K. Vartiainen. 2012. "Active Maintenance of Nuclear Actin by Importin 9 Supports Transcription." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(9):E544 LP-E552.
- Exton, J. H. 2002. "Phospholipase D—Structure, Regulation and Function BT - Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology." Pp. 1–94 in. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Fernandez, ANGELO, FABIO B. Jatene, and MAURO Zamboni. 2002. "Diagnóstico e Estadiamento Do Câncer de Pulmão." *Jornal de Pneumologia* 28:219–28.
- Filippi-Chiela, Eduardo C., Manuel M. Oliveira, Bruno Jurkovski, Sidia Maria Callegari-Jacques, Vinicius Duval da Silva, and Guido Lenz. 2012. "Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of Senescence, Apoptosis and Nuclear Irregularities." *PLOS ONE* 7(8):e42522.
- Frantz, Christian, Gabriela Barreiro, Laura Dominguez, Xiaoming Chen, Robert Eddy, John Condeelis, Mark J. S. Kelly, Matthew P. Jacobson, and Diane L. Barber. 2008. "Cofilin Is a PH Sensor for Actin Free Barbed End Formation: Role of Phosphoinositide Binding." *The Journal of Cell Biology* 183(5):865 LP – 879.
- Fujii, Wataru, Asuka Onuma, Koji Sugiura, and Kunihiko Naito. 2014. "One-Step Generation of Phenotype-Expressing Triple-Knockout Mice with Heritable Mutated Alleles by the CRISPR/Cas9 System." *The Journal of Reproduction and Development* 60(4):324–27.
- Garneau, Josiane E., Marie-Ève Dupuis, Manuela Villion, Dennis A. Romero, Rodolphe Barrangou, Patrick Boyaval, Christophe Fremaux, Philippe Horvath, Alfonso H. Magadán, and Sylvain Moineau. 2010. "The CRISPR/Cas Bacterial Immune System Cleaves Bacteriophage and Plasmid DNA." *Nature* 468:67.
- Ghosh, Mousumi, Xiaoyan Song, Ghassan Mouneimne, Mazen Sidani, David S. Lawrence, and John S. Condeelis. 2004. "Cofilin Promotes Actin Polymerization and Defines the

Direction of Cell Motility.” *Science*.

- Gohla, Antje, Jörg Birkenfeld, and Gary M. Bokoch. 2004. “Chronophin, a Novel HAD-Type Serine Protein Phosphatase, Regulates Cofilin-Dependent Actin Dynamics.” *Nature Cell Biology* 7:21.
- Gunnensen, J. M., V. Spirkoska, P. E. Smith, R. A. Danks, and S. S. Tan. 2000. “Growth and Migration Markers of Rat C6 Glioma Cells Identified by Serial Analysis of Gene Expression.” *Glia* 32(2):146–54.
- Gunsalus, K. C., S. Bonaccorsi, E. Williams, F. Verni, M. Gatti, and M. L. Goldberg. 1995. “Mutations in Twinstar, a Drosophila Gene Encoding a Cofilin/ADF Homologue, Result in Defects in Centrosome Migration and Cytokinesis.” *The Journal of Cell Biology* 131(5):1243–59.
- Gurniak, Christine B., Emerald Perlas, and Walter Witke. 2005. “The Actin Depolymerizing Factor N-Cofilin Is Essential for Neural Tube Morphogenesis and Neural Crest Cell Migration.” *Developmental Biology* 278(1):231–41.
- Guy, Colin P., Alan I. Majerník, James P. J. Chong, and Edward L. Bolt. 2004. “A Novel Nuclease-ATPase (Nar71) from Archaea Is Part of a Proposed Thermophilic DNA Repair System.” *Nucleic Acids Research* 32(21):6176–86.
- Hamill, Stephanie, Hua Jane Lou, Benjamin E. Turk, and Titus J. Boggon. 2016. “Structural Basis for Noncanonical Substrate Recognition of Cofilin/ADF Proteins by LIM Kinases.” *Molecular Cell* 62(3):397–408.
- Han, Li, Matthias B. Stope, Maider López de Jesús, Paschal A. Oude Weernink, Martina Urban, Thomas Wieland, Dieter Roskopf, Kensaku Mizuno, Karl H. Jakobs, and Martina Schmidt. 2007. “Direct Stimulation of Receptor-controlled Phospholipase D1 by Phosphocofilin.” *The EMBO Journal* 26(19):4189 LP – 4202.
- Heiss, Elke H., Yvonne D. C. Schilder, and Verena M. Dirsch. 2007. “Chronic Treatment with Resveratrol Induces Redox Stress- and Ataxia Telangiectasia-Mutated (ATM)-Dependent Senescence in P53-Positive Cancer Cells.” *The Journal of Biological Chemistry* 282(37):26759–66.
- Hirsch, Fred R., Giorgio V Scagliotti, James L. Mulshine, Regina Kwon, Walter J. Curran, Yi-Long Wu, and Luis Paz-Ares. 2017. “Lung Cancer: Current Therapies and New Targeted Treatments.” *The Lancet* 389(10066):299–311.
- Huang, Xun, Danni Sun, Qiuming Pan, Weiwei Wen, Yi Chen, Xianliang Xin, Min Huang, Jian Ding, and Meiyu Geng. 2014. “JG6, a Novel Marine-Derived Oligosaccharide, Suppresses Breast Cancer Metastasis via Binding to Cofilin.” *Oncotarget* 5(11):3568–78.
- INCA. 2017. “Estimativa 2018: Incidência de Câncer No Brasil.” *Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes Da Silva* 128. Retrieved (<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>).
- Jamal-Hanjani, Mariam, Gareth A. Wilson, Nicholas McGranahan, Nicolai J. Birkbak, Thomas B. K. Watkins, Selvaraju Veeriah, Seema Shafi, Diana H. Johnson, Richard Mitter, Rachel Rosenthal, Max Salm, Stuart Horswell, Mickael Escudero, Nik Matthews, Andrew Rowan, Tim Chambers, David A. Moore, Samra Turajlic, Hang Xu, Siow-Ming Lee,

- Martin D. Forster, Tanya Ahmad, Crispin T. Hiley, Christopher Abbosh, Mary Falzon, Elaine Borg, Teresa Marafioti, David Lawrence, Martin Hayward, Shyam Kolvekar, Nikolaos Panagiotopoulos, Sam M. Janes, Ricky Thakrar, Asia Ahmed, Fiona Blackhall, Yvonne Summers, Rajesh Shah, Leena Joseph, Anne M. Quinn, Phil A. Crosbie, Babu Naidu, Gary Middleton, Gerald Langman, Simon Trotter, Marianne Nicolson, Hardy Remmen, Keith Kerr, Mahendran Chetty, Lesley Gomersall, Dean A. Fennell, Apostolos Nakas, Sridhar Rathinam, Girija Anand, Sajid Khan, Peter Russell, Veni Ezhil, Babikir Ismail, Melanie Irvin-Sellers, Vineet Prakash, Jason F. Lester, Malgorzata Kornaszewska, Richard Attanoos, Haydn Adams, Helen Davies, Stefan Dentro, Philippe Taniere, Brendan O’Sullivan, Helen L. Lowe, John A. Hartley, Natasha Iles, Harriet Bell, Yenting Ngai, Jacqui A. Shaw, Javier Herrero, Zoltan Szallasi, Roland F. Schwarz, Aengus Stewart, Sergio A. Quezada, John Le Quesne, Peter Van Loo, Caroline Dive, Allan Hackshaw, and Charles Swanton. 2017. “Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer.” *The New England Journal of Medicine* 376(22):2109–21.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. “A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.” *Science* 337(6096):816 LP – 821.
- Kanellos, Georgios and Margaret C. Frame. 2016. “Cellular Functions of the ADF/Cofilin Family at a Glance.” *Journal of Cell Science* 129(17):3211 LP – 3218.
- Klamt, Fábio, Stéphanie Zdanov, Rodney L. Levine, Ashley Pariser, Yaqin Zhang, Baolin Zhang, Li-Rong Yu, Timothy D. Veenstra, and Emily Shacter. 2009. “Oxidant-Induced Apoptosis Is Mediated by Oxidation of the Actin-Regulatory Protein Cofilin.” *Nature Cell Biology* 11:1387.
- Klejnot, Marta, Mads Gabrielsen, Jenifer Cameron, Andrzej Mleczak, Sandeep K. Talapatra, Frank Kozielski, Andrew Pannifer, and Michael F. Olson. 2013. “Analysis of the Human Cofilin 1 Structure Reveals Conformational Changes Required for Actin Binding.” *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 69(Pt 9):1780–88.
- Kumar, V.; Abbas, A. K; Aster, J. C. 2013. *Robbins: Patologia Básica*. 9th ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Lehtiö, Janne and Luigi De Petris. 2010. “Lung Cancer Proteomics, Clinical and Technological Considerations.” *Journal of Proteomics* 73(10):1851–63.
- Leyman, Shirley, Mazen Sidani, Laila Ritsma, Davy Waterschoot, Robert Eddy, Daisy Dewitte, Olivier Debeir, Christine Decaestecker, Joel Vandekerckhove, Jacco van Rheenen, Christophe Ampe, John Condeelis, and Marleen Van Troys. 2009. “Unbalancing the Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate-Cofilin Interaction Impairs Cell Steering.” *Molecular Biology of the Cell* 20(21):4509–23.
- Lieber, Michael R. 2010. “The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway.” *Annual Review of Biochemistry* 79:181–211.
- Lonowski, Lindsey A., Yoshiki Narimatsu, Anjum Riaz, Catherine E. Delay, Zhang Yang, Francesco Niola, Katarzyna Duda, Elke A. Ober, Henrik Clausen, Hans H. Wandall, Steen H. Hansen, Eric P. Bennett, and Morten Frodin. 2017. “Genome Editing Using FACS Enrichment of Nuclease-Expressing Cells and Indel Detection by Amplicon Analysis.”

*Nature Protocols* 12(3):581–603.

- Maekawa, S., E. Nishida, Y. Ohta, and H. Sakai. 1984. “Isolation of Low Molecular Weight Actin-Binding Proteins from Porcine Brain.” *Journal of Biochemistry* 95(2):377–85.
- Mali, Prashant, Luhan Yang, Kevin M. Esvelt, John Aach, Marc Guell, James E. DiCarlo, Julie E. Norville, and George M. Church. 2013. “RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9.” *Science* 339(6121):823 LP – 826.
- Mayekar, Manasi K. and Trevor G. Bivona. 2017. “Current Landscape of Targeted Therapy in Lung Cancer.” *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 102(5):757–64.
- McGough, A., B. Pope, W. Chiu, and A. Weeds. 1997. “Cofilin Changes the Twist of F-Actin: Implications for Actin Filament Dynamics and Cellular Function.” *The Journal of Cell Biology* 138(4):771–81.
- Minamide, Laurie S., Amanda M. Striegl, Judith A. Boyle, Peter J. Meberg, and James R. Bamburg. 2000. “Neurodegenerative Stimuli Induce Persistent ADF/Cofilin–Actin Rods That Disrupt Distal Neurite Function.” *Nature Cell Biology* 2:628.
- Mizuno, K., I. Okano, K. Ohashi, K. Nunoue, K. Kuma, T. Miyata, and T. Nakamura. 1994. “Identification of a Human CDNA Encoding a Novel Protein Kinase with Two Repeats of the LIM/Double Zinc Finger Motif.” *Oncogene* 9(6):1605–12.
- Mojica, Francisco J. M., Cesar Diez-Villasenor, Jesus Garcia-Martinez, and Elena Soria. 2005. “Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements.” *Journal of Molecular Evolution* 60(2):174–82.
- Molina, Julian R., Ping Yang, Stephen D. Cassivi, Steven E. Schild, and Alex A. Adjei. 2008. “Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship.” *Mayo Clinic Proceedings* 83(5):584–94.
- Muller, Carolina B., Rafael L. S. de Barros, Mauro A. A. Castro, Fernanda M. Lopes, Rosalva T. Meurer, Adriana Roehe, Guilherme Mazzini, Jane Maria Ulbrich-Kulczynski, Felipe Dal-Pizzol, Marilda C. Fernandes, Jose C. F. Moreira, Leder L. Xavier, and Fabio Klamt. 2011. “Validation of Cofilin-1 as a Biomarker in Non-Small Cell Lung Cancer: Application of Quantitative Method in a Retrospective Cohort.” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 137(9):1309–16.
- Müller, Carolina B., Rafael L. S. de Barros, Mauro A. A. Castro, Fernanda M. Lopes, Rosalva T. Meurer, Adriana Roehe, Guilherme Mazzini, Jane Maria Ulbrich-kulczynski, Felipe Dal-Pizzol, Marilda C. Fernandes, José C. F. Moreira, Léder L. Xavier, and Fábio Klamt. 2011. “Validation of Cofilin-1 as a Biomarker in Non-Small Cell Lung Cancer: Application of Quantitative Method in a Retrospective Cohort.” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 137(9):1309.
- Muller, Carolina Beatriz, Marco Antonio De Bastiani, Matheus Becker, Fernanda Stapenhorst Franca, Mariane Araujo Branco, Mauro Antonio Alves Castro, and Fabio Klamt. 2015. “Potential Crosstalk between Cofilin-1 and EGFR Pathways in Cisplatin Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer.” *Oncotarget* 6(6):3531–39.
- Munsie, Lise Nicole, Carly R. Desmond, and Ray Truant. 2012. “Cofilin Nuclear-Cytoplasmic Shuttling Affects Cofilin-Actin Rod Formation during Stress.” *Journal of Cell Science*

125(Pt 17):3977–88.

- Nakano, Kentaro, Hidekazu Kuwayama, Masato Kawasaki, Osamu Numata, and Masak Takaine. 2010. “GMF Is an Evolutionarily Developed Adf/Cofilin-Super Family Protein Involved in the Arp2/3 Complex-Mediated Organization of the Actin Cytoskeleton.” *Cytoskeleton* 67(6):373–82.
- Nebl, G., S. C. Meuer, and Y. Samstag. 1996. “Dephosphorylation of Serine 3 Regulates Nuclear Translocation of Cofilin.” *The Journal of Biological Chemistry* 271(42):26276–80.
- Nishida, E., S. Maekawa, E. Muneyuki, and H. Sakai. 1984. “Action of a 19K Protein from Porcine Brain on Actin Polymerization: A New Functional Class of Actin-Binding Proteins.” *Journal of Biochemistry* 95(2):387–98.
- Niwa, Ryusuke, Kyoko Nagata-Ohashi, Masatoshi Takeichi, Kensaku Mizuno, and Tadashi Uemura. 2002. “Control of Actin Reorganization by Slingshot, a Family of Phosphatases That Dephosphorylate ADF/Cofilin.” *Cell* 108(2):233–46.
- Obrdlik, Ales and Piergiorgio Percipalle. 2011. “The F-Actin Severing Protein Cofilin-1 Is Required for RNA Polymerase II Transcription Elongation.” *Nucleus* 2(1):72–79.
- Parsons, J. Thomas, Alan Rick Horwitz, and Martin A. Schwartz. 2010. “Cell Adhesion: Integrating Cytoskeletal Dynamics and Cellular Tension.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11(9):633–43.
- Pawlak, Geraldine and David M. Helfman. 2002. “MEK Mediates V-Src-Induced Disruption of the Actin Cytoskeleton via Inactivation of the Rho-ROCK-LIM Kinase Pathway.” *The Journal of Biological Chemistry* 277(30):26927–33.
- Peskin, Alexander V and Christine C. Winterbourn. 2001. “Kinetics of the Reactions of Hypochlorous Acid and Amino Acid Chloramines with Thiols, Methionine, and Ascorbate.” *Free Radical Biology and Medicine* 30(5):572–79.
- Pfannstiel, Jens, Marek Cyrklaff, Anja Habermann, Stanka Stoeva, Gareth Griffiths, Robert Shoeman, and Heinz Faulstich. 2001. “Human Cofilin Forms Oligomers Exhibiting Actin Bundling Activity.” *Journal of Biological Chemistry* 276(52):49476–84.
- Pope, Brian J., Karen M. Zierler-Gould, Ronald Kuhne, Alan G. Weeds, and Linda J. Ball. 2004. “Solution Structure of Human Cofilin: Actin Binding, PH Sensitivity, and Relationship to Actin-Depolymerizing Factor.” *The Journal of Biological Chemistry* 279(6):4840–48.
- Ramalingam, Suresh and Chandra Belani. 2008. “Systemic Chemotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Recent Advances and Future Directions.” *The Oncologist* 13(suppl 1):5–13.
- Ran, F. Ann, Patrick D. Hsu, Jason Wright, Vineeta Agarwala, David A. Scott, and Feng Zhang. 2013. “Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System.” *Nature Protocols* 8(11):2281–2308.
- Sanchez-Cespedes, Montserrat, Paola Parrella, Manel Esteller, Shuji Nomoto, Barry Trink, James M. Engles, William H. Westra, James G. Herman, and David Sidransky. 2002.

“Inactivation of LKB1/STK11 Is a Common Event in Adenocarcinomas of the Lung.” *Cancer Research* 62(13):3659–62.

Schmidt, Martina, Matthias Voß, Paschal A. Oude Weernink, Julia Wetzel, Mutsuki Amano, Kozo Kaibuchi, and Karl H. Jakobs. 1999. “A Role for Rho-Kinase in Rho-Controlled Phospholipase D Stimulation by the M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor.” *Journal of Biological Chemistry* 274(21):14648–54.

Schonhofen, Patricia, Liana Marengo de Medeiros, Carolina Piletti Chatain, Ivi Juliana Bristot, and Fabio Klamt. 2014. “Cofilin/Actin Rod Formation by Dysregulation of Cofilin-1 Activity as a Central Initial Step in Neurodegeneration.” *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 14(5):393–400.

Sekido, Yoshitaka, Kwun M. Fong, and John D. Minna. 2003. “Molecular Genetics of Lung Cancer.” *Annual Review of Medicine* 54:73–87.

Shah, Parag P., Tess V Dupre, Leah J. Siskind, and Levi J. Beverly. 2017. “Common Cytotoxic Chemotherapeutics Induce Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Downstream of ER Stress.” *Oncotarget* 8(14):22625–39.

Shalem, Ophir, Neville E. Sanjana, Ella Hartenian, Xi Shi, David A. Scott, Tarjei S. Mikkelsen, Dirk Heckl, Benjamin L. Ebert, David E. Root, John G. Doench, and Feng Zhang. 2014. “Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells.” *Science* 343(6166):84 LP – 87.

Shishkin, S., L. Eremina, N. Pashintseva, L. Kovalev, and M. Kovaleva. 2017. “Cofilin-1 and Other ADF/Cofilin Superfamily Members in Human Malignant Cells.” *International Journal of Molecular Sciences* 18(1).

Sholl, Lynette M. 2016. “The Molecular Pathology of Lung Cancer.” *Surgical Pathology Clinics* 9(3):353–78.

Sidani, Mazen, Deborah Wessels, Ghassan Mouneimne, Mousumi Ghosh, Sumanta Goswami, Corina Sarmiento, Weigang Wang, Spencer Kuhl, Mirvat El-Sibai, Jonathan M. Backer, Robert Eddy, David Soll, and John Condeelis. 2007. “Cofilin Determines the Migration Behavior and Turning Frequency of Metastatic Cancer Cells.” *The Journal of Cell Biology* 179(4):777 LP – 791.

Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, and Ahmedin Jemal. 2018. “Cancer Statistics, 2018.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68(1):7–30.

Skoulidis, Ferdinandos, Michael E. Goldberg, Danielle M. Greenawalt, Matthew D. Hellmann, Mark M. Awad, Justin F. Gainor, Alexa B. Schrock, Ryan J. Hartmaier, Sally E. Trabucco, Laurie Gay, Siraj M. Ali, Julia A. Elvin, Gaurav Singal, Jeffrey S. Ross, David Fabrizio, Peter M. Szabo, Han Chang, Ariella Sasson, Sujaya Srinivasan, Stefan Kirov, Joseph Szustakowski, Patrik Vitazka, Robin Edwards, Jose A. Bufill, Neelesh Sharma, Sai-Hong I. Ou, Nir Peled, David R. Spigel, Hira Rizvi, Elizabeth Jimenez Aguilar, Brett W. Carter, Jeremy Erasmus, Darragh F. Halpenny, Andrew J. Plodkowski, Niamh M. Long, Mizuki Nishino, Warren L. Denning, Ana Galan-Cobo, Haifa Hamdi, Taghreed Hirz, Pan Tong, Jing Wang, Jaime Rodriguez-Canales, Pamela A. Villalobos, Edwin R. Parra, Neda Kalhor, Lynette M. Sholl, Jennifer L. Sauter, Achim A. Jungbluth, Mari Mino-Kenudson, Roxana Azimi, Yasir Y. Elamin, Jianjun Zhang, Giulia C. Leonardi, Fei Jiang, Kwok-Kin Wong, J. Jack Lee, Vassiliki A. Papadimitrakopoulou, Ignacio I. Wistuba, Vincent A.



- Miller, Garrett M. Frampton, Jedd D. Wolchok, Alice T. Shaw, Pasi A. Jänne, Philip J. Stephens, Charles M. Rudin, William J. Geese, Lee A. Albacker, and John V Heymach. 2018. “STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma.” *Cancer Discovery* CD-18-0099.
- Takata, M., M. S. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, M. Hashimoto, H. Utsumi, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Shinohara, and S. Takeda. 1998. “Homologous Recombination and Non-Homologous End-Joining Pathways of DNA Double-Strand Break Repair Have Overlapping Roles in the Maintenance of Chromosomal Integrity in Vertebrate Cells.” *The EMBO Journal* 17(18):5497–5508.
- Tania, Nessay, John Condeelis, and Leah Edelstein-Keshet. 2013. “Modeling the Synergy of Cofilin and Arp2/3 in Lamellipodial Protrusive Activity.” *Biophysical Journal* 105(9):1946–55.
- Thorstensson, R., C. Sterky, and R. Norberg. 1985. “Preparation of Highly Purified F-Actin-Depolymerizing Factor of Human Serum.” *European Journal of Biochemistry* 147(3):637–40.
- Toshima, Jiro, Junko Y. Toshima, Toru Amano, Neng Yang, Shuh Narumiya, and Kensaku Mizuno. 2001. “Cofilin Phosphorylation by Protein Kinase Testicular Protein Kinase 1 and Its Role in Integrin-Mediated Actin Reorganization and Focal Adhesion Formation.” *Molecular Biology of the Cell* 12(4):1131–45.
- Wang, Weigang, Robert Eddy, and John Condeelis. 2007. “The Cofilin Pathway in Breast Cancer Invasion and Metastasis.” *Nature Reviews. Cancer* 7(6):429–40.
- Wang, Weigang, Ghassan Mouneimne, Mazen Sidani, Jeffrey Wyckoff, Xiaoming Chen, Anastasia Makris, Sumanta Goswami, Anne R. Bresnick, and John S. Condeelis. 2006. “The Activity Status of Cofilin Is Directly Related to Invasion, Intravasation, and Metastasis of Mammary Tumors.” *The Journal of Cell Biology* 173(3):395 LP – 404.
- Wioland, Hugo, Berengere Guichard, Yosuke Senju, Sarah Myram, Pekka Lappalainen, Antoine Jégou, and Guillaume Romet-Lemonne. 2017. “ADF/Cofilin Accelerates Actin Dynamics by Severing Filaments and Promoting Their Depolymerization at Both Ends.” *Current Biology* 27(13):1956-1967.e7.
- Woo, J. A., T. Boggess, C. Uhlar, X. Wang, H. Khan, G. Cappos, A. Joly-Amado, E. De Narvaez, S. Majid, L. S. Minamide, J. R. Bamburg, D. Morgan, E. Weeber, and D. E. Kang. 2015. “RanBP9 at the Intersection between Cofilin and A $\beta$  Pathologies: Rescue of Neurodegenerative Changes by RanBP9 Reduction.” *Cell Death & Disease* 6:1676.
- Yamaguchi, Hideki, Mike Lorenz, Stephan Kempniak, Corina Sarmiento, Salvatore Coniglio, Marc Symons, Jeffrey Segall, Robert Eddy, Hiroaki Miki, Tadaomi Takenawa, and John Condeelis. 2005. “Molecular Mechanisms of Invadopodium Formation: The Role of the N-WASP-Arp2/3 Complex Pathway and Cofilin.” *The Journal of Cell Biology* 168(3):441–52.
- Yan, Hua, Kun Yang, Hong Xiao, Yuan-Jie Zou, Wen-Bin Zhang, and Hong-Yi Liu. 2012. “Over-Expression of Cofilin-1 and Phosphoglycerate Kinase 1 in Astrocytomas Involved in Pathogenesis of Radioresistance.” *CNS Neuroscience & Therapeutics* 18(9):729–36.
- Yap, Celestial T., T. Ian Simpson, Thomas Pratt, David J. Price, and Sutherland K. Maciver.

2005. “The Motility of Glioblastoma Tumour Cells Is Modulated by Intracellular Cofilin Expression in a Concentration-Dependent Manner.” *Cell Motility and the Cytoskeleton* 60(3):153–65.
- Yonezawa, N., E. Nishida, K. Iida, I. Yahara, and H. Sakai. 1990. “Inhibition of the Interactions of Cofilin, Destrin, and Deoxyribonuclease I with Actin by Phosphoinositides.” *The Journal of Biological Chemistry* 265(15):8382–86.
- Zebda, Noureddine, Ora Bernard, Maryse Bailly, Susan Welti, David S. Lawrence, and John S. Condeelis. 2000. “Phosphorylation of Adf/Cofilin Abolishes Egf-Induced Actin Nucleation at the Leading Edge and Subsequent Lamellipod Extension.” *The Journal of Cell Biology* 151(5):1119 LP – 1128.
- Zhang, Jian-Ping, Xiao-Lan Li, Guo-Hua Li, Wanqiu Chen, Cameron Arakaki, Gary D. Botimer, David Baylink, Lu Zhang, Wei Wen, Ya-Wen Fu, Jing Xu, Noah Chun, Weiping Yuan, Tao Cheng, and Xiao-Bing Zhang. 2017. “Efficient Precise Knockin with a Double Cut HDR Donor after CRISPR/Cas9-Mediated Double-Stranded DNA Cleavage.” *Genome Biology* 18(1):35.
- Zhu, Beibei, Kei Fukada, Haining Zhu, and Natasha Kyprianou. 2006. “Prohibitin and Cofilin Are Intracellular Effectors of Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling in Human Prostate Cancer Cells.” *Cancer Research* 66(17):8640 LP – 8647.